

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***ESTUDIO DE LA FLUORESCENCIA INDUCIDA FOTO-
QUÍMICAMENTE ASOCIADA A CALIBRACIÓN MULTIVARIADA
PARA DETERMINAR IMIDACLOPRID EN MUESTRAS DE MIEL.***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Magíster en Química:**

***ALIOSHA ANDRO WILFREDO BAZAES
CASANOVA***

Director de Tesis: Dr. Edwar Fuentes Pérez

Santiago-CHILE

Abril 2016

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

ALIOSHA ANDRO WILFREDO BAZAES CASANOVA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Química, en el examen público rendido el día _____

Director de Tesis:

Dra. Edwar Fuentes Pérez

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Manuel Bravo Mercado

M. S. c Olosmira Correa Briones

Dr. Pablo Richter Duk

*“Si la vida es una orgía lenta,
lo mejor debe estar por llegar.”*

AGRADECIMIENTOS

Antes de todo, quiero agradecer a mi director, el Profesor Edwar Fuentes, tanto por darme la oportunidad de realizar el magíster a su cargo, por creer en mí cuando ni yo lo hacía, así como por su infinita paciencia frente a cada situación y duda. Espero, por mi parte, no haber sido una cruz demasiado pesada.

Así mismo agradezco a las profesoras Jeannette Espinoza y María Baez por todo el apoyo brindado, así como por las entretenidas conversaciones en el laboratorio. A mis compañeras, Karla y Camila, cuya compañía, pastelitos y ayuda fue inestimable, sobretodo lo segundo. A la señora Anita, una de esas personas invisibles para la gran mayoría, pero sin las cuales el reloj no avanza y el motor no funciona.

A mis amigos, Tito, Daniel, Christian, Fede e Italo, por sus arengas, sus "FUA", sus tardes de plástico y sus viernes de cartones, especialmente a Christian y Tito, por su paciencia para escuchar, cuestionar, corregir y preguntar, a pesar de tener miles de cosas mejores por hacer. Muchas gracias, chicos, se ganaron un jumbito.

A mi familia, que me apoyó de forma incondicional en esta aventura y que, con su infinito amor, me lamió las heridas, tendió la mano y me ayudó a continuar. Nunca he sido muy de expresar mi afecto, pero he de decirles que cada parte de mi ser ha sido forjado en vuestra fragua y que todo lo que soy, he sido y seré, es producto de lo que me han enseñado, tanto con palabras como con actos. Muchas gracias, os amo, os adoro.

Por último, a mi compañera, amiga, confidente y amor, Diana. Por lavar con bálsamo mis heridas, por tenderme la mano cuando caigo, por ayudarme y darme el coraje para intentar cada día ser una mejor persona. Siquiera puedes imaginar lo mucho que te agradezco. Estrellas binarias y un amor más grande que el GATO.

I. ÍNDICE GENERAL

I. ÍNDICE GENERAL.....	V
II. ÍNDICE DE TABLAS	VII
III. ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
IV. RESUMEN	XI
V. SUMMARY	XIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Hipótesis.....	6
2. OBJETIVOS.....	6
2.1 Objetivo general.....	6
2.2 Objetivos específicos.....	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
3.1 Muestras, solventes y reactivos.....	7
3.2 Equipos menores y material de laboratorio.....	7
3.3 Equipos mayores.....	8
3.4 Software.....	8
3.6 Métodos.....	8
3.6.1 Métodos quimiométricos de calibración de segundo grado.....	8
3.6.1.1 Datos de segundo orden.....	8
3.6.1.2 Análisis paralelo de factores (PARAFAC).....	9
3.6.1.3 Resolución multivariada de curvas asociada a mínimos cuadrados alternados (MCR-ALS).....	10
3.6.1.4 Mínimos cuadrados parciales desdoblados con bilinearización residual (UPLS-RBL).....	12
3.6.2 Estudio del efecto del tiempo de irradiación sobre la inducción fotoquímica de fluorescencia de imidacloprid.....	14
3.6.3 Calibración de segundo orden utilizando fluorescencia de excitación-emisión foto-inducida (PIF-EEM).....	16
3.6.4 Tratamiento de muestras de miel.....	16
3.6.4.1 SPE sobre columnas de intercambio aniónico y catiónico (MAX y MCX).....	16
3.6.4.2 Partición líquido-líquido.....	17
3.6.4.3 Partición líquido-líquido soportada en tierra de diatomeas.....	18
3.6.4.4 Partición líquido-líquido soportada en tierra de diatomeas y SPE sobre GCB.....	18

3.6.5	Calibración de segundo orden para fluorescencia clásica-tiempo.....	19
3.6.6	Evaluación de recuperación patrones	19
3.6.7	Análisis set de validación	20
3.6.8	Análisis set de prueba.....	20
3.6.9	Muestras reales	20
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1	Inducción fotoquímica de fluorescencia de imidacloprid.....	22
4.2	Calibración de segundo orden utilizando fluorescencia de excitación-emisión foto-inducida (PIF-EEM)	26
4.3	Tratamiento de las muestras de miel	29
4.3.1	SPE sobre columnas de intercambio aniónico y catiónico (MAX y MCX).....	30
4.3.2	Partición L-L	33
4.3.3	Partición L-L soportada sobre tierra de diatomeas.....	35
4.3.4	Partición L-L soportada en tierra de diatomeas y SPE sobre carbon grafitizado (DiatLLE-SPE).....	36
4.4	Estudios sobre la inducción fotoquímica de fluorescencia de imidacloprid en presencia de matriz	37
4.5	Calibración de segundo orden para fluorescencia clásica-tiempo.....	39
4.6	Evaluación de recuperación patrones sometidos a DiatLLE-SPE	41
	42
4.7	Análisis set de validación.....	42
4.8	Análisis set de prueba	45
4.9	Muestras reales	47
5	CONCLUSIONES	50
6.	REFERENCIAS	52

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Soluciones de carga y elución para tratamiento sobre columnas de intercambio aniónico y catiónico. CA: Carga ácida; CN: Carga neutra; CB: carga básica; EN: Elución neutra; EA: Elución ácida; EB: Elución básica.....	17
Tabla 2: Parámetros analíticos para la curva de calibrado correspondiente al modelo U-PLS de los PIF-EEM de imidacloprid.	28
Tabla 3: Valores de concentración de imidacloprid predichos en las fracciones eluidas desde las columnas MCX y MAX (Se cargaron 0,25 ug y se disolvieron en un volumen final de 1 mL).....	31
Tabla 4: Valores promedio (n=3) de la concentración de imidacloprid predicha por los algoritmos quimiométricos luego de aplicar distintos tratamientos a muestras con 0,25 µg de imidacloprid disueltos en 5 ml de solución 5% de NH ₃ o conteniendo además 1 g de miel.....	34
Tabla 6: Parámetros analíticos para la curva de calibrado correspondiente al modelo U-PLS de los los espectros de fluorescencia vs tiempo de irradiación de imidacloprid. 40	
Tabla 7: Predicción mediante MCR-ALS de la recuperación de soluciones acuosas de imidacloprid sometidas a DiatLLE-SPE y medidas de fluorescencia vs tiempo irradiación (Pto. 0,050: 2 componentes; Pto. 0,100: 3 componentes; Pto. 0,200: 2 componentes). Intervalo utilizado: 383-460 nm.....	41
Tabla 8: Concentraciones (ug/g) predichas para muestras del set de validación mediante MCR-ALS. Figuras de mérito para el set de validación.	44
Tabla 9: Concentraciones (ug/g) predichas para muestras del set de prueba mediante MCR-ALS. Figuras de mérito para el set de prueba.....	46
Tabla 10: Concentraciones (ug/g) predichas para muestras de miel artesanal sin fortificar y fortificadas a 0,05 ug/g mediante MCR-ALS.	49

III. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática de obtención de loadings y scores mediante la utilización de PARAFAC.	10
Figura 2: Representación esquemática de expansión de la matriz X_{ijk} en matriz D_{aum} en los distintos modos espectrales.	11
Figura 3: Descomposición matricial de la matriz D_{aum} en la matriz C y S^T que contienen la información de los componentes puros.	11
Figura 4: Representación esquemática de la vectorización de la matriz X_{ijk}	13
Figura 5: Representación esquemática de procedimiento de U-PLS/RBL.	14
Figura 6: A) Espectro de fluorescencia de excitación-emisión de imidacloprid 0,05 $\mu\text{g/mL}$, en buffer fosfato 0,01 M pH 11,5, luego de 25 segundos de irradiación a 245 nm. B) Estructura del probable fotoproducto fluorescente de imidacloprid: 1-(6-cloro-3-piridimetil)-2-(hidroximino)-3,4-didehidroimidazolieno (b en la figura).	22
Figura 7: A) Espectros UV-vis de una solución de 5 $\mu\text{g/ml}$ de imidacloprid en medio tampón de fosfato 0,01 M, ph 11,5 / acetonitrilo (80:20) después irradiación durante 0-80s. B) Variación del máximo de absorbancia a medida que aumenta el tiempo de irradiación a longitud de onda característica de imidacloprid (270 nm) y a aumento de señal de absorbancia (350 nm). C) Espectros de fluorescencia (350 nm λ_{exc}) de una solución de 0,25 $\mu\text{g/ml}$ de imidacloprid en tampón de fosfato 0,01 M, ph 11,5 / acetonitrilo (80:20) obtenido después de irradiación a 254 nm durante 5-90 s. D) Variación de la intensidad de fluorescencia a medida que aumenta el tiempo de irradiación a 350 nm λ_{exc}	23
Figura 8: Perfiles calculados mediante MCR-ALS para cuatro componentes obtenidos con el análisis de los espectros UV-vis de soluciones de imidacloprid irradiadas a 254 nm desde 0 a 80 segundos A) concentraciones; B) espectros UV-vis puros. Componentes: 1 (azul), 2 (verde), 3(rojo) y 4 (cyan).	24
Figura 9: a) Espectros de fluorescencia clásica y b) de fluorescencia de excitación-emisión de imidacloprid a distintas concentraciones registrados luego de 25 segundos e irradiación (para b: 0,05 $\mu\text{g/mL}$ imagen superior, 0,25 $\mu\text{g/mL}$ imagen inferior).....	26
Figura 10: A) Suma de cuadrados de los residuos en función del números de componentes para el modelo U-PLS de los PIF-EEM. B) Regresión entre valores nominales y predichos por el modelo para 4 componentes.	28
Figura 11: PIF-EEM de muestra de miel multifloral al 10% p/v en agua.	30

Figura 12: PIF-EEM de imidacloprid obtenidos luego de cargar el compuesto en medio neutro (A y C) y básico (B y D) y eluirlo con metanol desde columnas MAX (A y B) y MCX (C y D) (Se cargaron 0,25 ug y se disolvieron en un volumen final de 1 mL) ...	32
Figura 13: PIF-EEM para (A) 1 g de miel y (B) 0,25 µg de imidacloprid disueltos en solución 5% NH ₃ extraídos con diclorometano y redisueltos en un volumen final de 2,5 ml.....	34
Figura 14: PIF-EEM para (A) 0,25 µg de imidacloprid en 5 ml de solución 5% NH ₃ y (B) en la misma solución conteniendo 1 g de miel extraídos con diclorometano sobre soporte de tierra de diatomeas y redisueltos en un volumen final de 2,5 ml.	35
Figura 15: PIF-EEM para (A) 0,25 µg de imidacloprid en 5 ml de solución 5% NH ₃ y (B) en la misma solución conteniendo 1 g de miel extraídos con diclorometano sobre soporte de tierra de diatomeas y redisueltos en un volumen final de 2,5 ml.	36
Figura 16: A) Espectros UV-vis de una solución de imidacloprid a 5 ug/ml en medio del extracto obtenido luego del tratamiento de muestra (PLL-diat-SPE-GCB) e irradiado a 254 nm desde 0 a 80 segundos. B) Variación del máximo de absorbancia a medida que aumenta el tiempo de irradiación a longitud de onda característica de imidacloprid (270 nm) y a aumento de señal de absorbancia (350 nm).	37
Figura 17: Perfiles calculados mediante MCR-ALS para cuatro componentes obtenidos con el análisis de los espectros UV-vis de soluciones de imidacloprid en matriz irradiadas a 254 nm desde 0 a 80 segundos A) espectros UV-vis puros; B) concentraciones. Componentes: 1 (azul), 2 (verde), 3(rojo) y 4 (cyan)	38
Figura 18: Perfiles de fluorescencia clásica versus tiempo de irradiación para una concentración de A) 0,025 µg/mL y B) 0,25 µg/mL.	39
Figura 19: A) Suma de cuadrados de los residuos en función del números de componentes par el modelo U-PLS de los espectros de fluorescencia vs tiempo de irradiación. B) Regresión entre valores nominales y predichos por el modelo para 2 componentes.	40
Figura 20: Perfiles de las muestras de recuperación de soluciones acuosas de imidacloprid sometidas a DiatLLE-SPE y medidas de fluorescencia vs tiempo irradiación. A)0,050 ug/mL; C)0,100 ug/mL; D)0,200 ug/mL; perfiles obtenidos por MCR-ALS para las muestras de recuperación de soluciones acuosas de imidacloprid sometidas a DiatLLE-SPE y medidas de fluorescencia vs tiempo irradiación. B)0,050 ug/mL; D)0,100 ug/mL; F)0,200 ug/mL.	42

Figura 21: Perfiles de contorno de fluorescencia clásica-tiempo de irradiación y superficie 3-D para muestras de 1 g de miel tratada y fortificada con 0,03 µg/g (A y C) y 0,25 µg/g (B y D) de imidacloprid.....	43
Figura 22: A) Regresión lineal de valores nominales versus valores predichos: ($C_{predicha}=0,972 \times C_{nominal}+0,0003$); $R=0,974$. B) Test de región elíptica de confianza conjunta (EJCR) para set de validación.	45
Figura 23: A) Regresión lineal de valores nominales versus valores predichos: ($C_{predicha}=0,9013 \times C_{nominal}+0,0132$); $R^2=0,688$. B) Test de región elíptica de confianza conjunta (EJCR) para set de prueba.....	47
Figura 24:	48

IV. RESUMEN

El síndrome de colapso de colmena que afecta a las abejas, principales polinizadores de las plantas, ha escalado hasta convertirse en un problema global. El abandono, sin causa aparente, de colmenares completos con abundancia de comida amenaza de manera alarmante la polinización de cultivos. Estudios recientes relacionan este síndrome con la utilización de pesticidas sistémicos denominados neonicotinoides, los cuales, a pesar de no tener efectos letales a bajos niveles de concentración sobre estos insectos, si presentarían efectos negativos importantes, como por ejemplo la disminución en la capacidad de aprendizaje y la capacidad de forrajeo, además de hacerlas más propensas a adquirir enfermedades, lo que estaría propiciando este fenómeno. Es por esto que la determinación de este tipo de pesticidas, en especial imidacloprid, por ser uno de los más utilizados en el país, es de suma importancia. Estos pesticidas se han encontrado en uno de los productos producidos por las abejas: la miel. Este es un reservorio final de compuestos y contaminantes provenientes de las abejas y refleja su estado metabólico y de salud. Por lo que, es posible obtener información importante sobre la exposición de las abejas a pesticidas al realizar su determinación en miel. Sin embargo, las metodologías comúnmente utilizadas para este fin consumen tiempo y solventes. Es por ello que el diseño de una metodología rápida, con bajo consumo de solventes y con un pre-tratamiento de muestra simple es deseable. La espectroscopia de fluorescencia surge como una alternativa interesante por su sensibilidad y bajo coste, la que además puede ser asociada a procedimientos de análisis multivariado para mejorar su selectividad.

En el presente trabajo se presenta un método para la determinación de imidacloprid en muestras de miel basado en la medición de fluorescencia foto-inducida en el tiempo; asociada a resolución multivariada de curvas con mínimos cuadrados alternantes (MCR-ALS). Para la generación del producto fluorescente las muestras fueron irradiadas con luz UV a una longitud de onda de 254 nm. Como etapa previa se realizó un tratamiento de las muestras destinado a disminuir las interferencias, el que contempló una extracción líquido-líquido soportada sobre columnas de tierra de diatomeas y limpieza mediante extracción en fase sólida sobre carbón grafitizado. Una serie de estudios previos sobre la inducción fotoquímica de la fluorescencia de imidacloprid en tampón y en presencia de la matriz obtenida después de este tratamiento, llevada a cabo mediante MCR-ALS, mostró que la formación del producto fluorescente se produce en forma

paralela a la ruta principal de foto-degradación del imidacloprid. La ventaja de segundo orden alcanzada con MCR-ALS permitió la determinación de imidacloprid en presencia de interferencias presentes en las muestras, las que también muestran fluorescencia nativa o foto-inducida (compuestos fenólicos y furfurales). La recuperación promedio para un set de muestras de prueba contaminadas con distintas concentraciones de imidacloprid fue de 98%, con un error relativo de predicción del 20%. El límite de detección fue de 0,025 ug/g, que es inferior al límite de residuos máximo permitido de imidacloprid en miel por la legislación en la Unión Europea (0,050 µg/g). El método se aplicó para la determinación de imidacloprid en muestras de miel unifloral y polifloral recolectadas directamente de los productores, sin que se detectara presencia del pesticida. La recuperación del compuesto desde estas muestras contaminadas a 0,05 ug/g fue cuantitativa.

V. SUMMARY

The colony collapse disorder that affects bees, main pollinators of plants, has escalated into a global problem. Complete abandonment, without apparent cause, with plenty of food apiaries it's an alarming menace to crop pollination. Recent studies link this syndrome with the use of systemic pesticides called neonicotinoids, which, despite doesn't have lethal effects at low levels of concentration on these insects, presents significant negative effects, such as decreased learning and foraging ability, also make them more susceptible to get diseases, which would be encouraging this phenomenon. That is why the determination of such pesticides, particularly imidacloprid, as one of the most used in the country, it's of utmost importance. These pesticides have been found in one of the products produced by bees: honey. This is a final reservoir of compounds and contaminants from bees and reflects the metabolic status and health. So, it's possible obtain important information about the exposure of bees to pesticides by doing its determination in honey. However, the methods commonly used for this purpose are time and solvents consuming. That is why the design of a fast methodology, with low solvent consumption and a simple sample pre-treatment it's desirable. Fluorescence spectroscopy emerges as an interesting alternative for their sensitivity and low cost, which also can be associated with multivariate analysis methods to improve selectivity.

The present work shows a method for the determination of imidacloprid in honey samples based on the photo-induced fluorescence in time; associated to multivariate curve resolution with alternate least squares (MCR-ALS). For the generation of the fluorescent product, the samples was irradiates with UV light to a wavelength of 254 nm. As a preparative stage it was realized a sample treatment meant to diminish the interferences, which comprehended a supported over diatomeaceous earth columns liquid-liquid extraction and a cleanup through a graphitized carbon black solid phase extraction. A series of previous studies about photochemical fluorescence induction of imidacloprid in buffer and in presence of the matrix obtained after this treatment, performed through MCR-ALS, showed that the formation of the fluorescent compound is produced in parallel to the principal photo-degradation way of imidacloprid. The second-order advantage reached for MCR-ALS allowed the determination of imidacloprid in presence of interferences contained in the samples, which also showed native or photo-induced fluorescence (phenolic and furfural compounds). The mean recovery for a test sample set contaminated with different concentrations of imidacloprid was of 98%, with a relative error of prediction of 20%. The limit of detection was of 0.025 ug/g, which is below the maximum residues limits allowed

by the European Union legislation (0.050 ug/g) for imidacloprid in honey. The method was applied for the determination of imidacloprid in unifloral and multifloral honey samples collected directly from the producers, without detection of presence of the pesticide in the samples. The recovery of the compound from these samples after contamination with 0.050 ug/g of imidacloprid, was quantitative.

1. INTRODUCCIÓN

Durante la última década se ha reportado una disminución en las poblaciones de abejas (*Apis mellifera*) a través de todo el globo, esta disminución ha presentado síntomas característicos: la rápida pérdida de la población adulta de la colonia. Es por ello que se le ha llamado “Síndrome del colapso de colmena” o “CCD” por sus siglas en inglés de “colony collapse disorder”. (Stokstad, 2007 [1]) Las colmenas colapsadas se caracterizan por la rápida pérdida de la población de abejas trabajadoras, sin que se constate la presencia de individuos muertos dentro o alrededor de la colmena; la presencia de la abeja reina junto con crías inmaduras y una alta cantidad de alimento (polen y miel) dentro de la colmena. (vanEngelsdorp et al., 2009 [2]; Farooqui, 2013 [3]). Este fenómeno es preocupante, debido principalmente a que la familia de las abejas (abejas melíferas, abejorros y abejas solitarias) son los principales polinizadores. Alrededor de un 35% de las cosechas mundiales dependen de polinizadores (Blacquièrre et al., 2012 [4]; Aizen et al. 2009 [5]), por lo que la aparición de este síndrome podría derivar en el declive de diversas especies de plantas. Sin embargo, este no es un suceso reciente, existen reportes de sucesos similares desde 1869 alrededor de todo el mundo, sin embargo estos episodios fueron discretos y locales (Underwood, vanEngelsdorp, 2007 [6]), a diferencia del actual, el cual es un suceso a nivel mundial.

Se han propuesto diferentes causas para el CCD, sin que hasta la fecha se haya logrado establecer una causa en definitiva. (Ratnieks, Carreck, 2010 [7]). Una de las causas posibles más citadas son algunas enfermedades que afectan a las abejas, tales como la Nosemosis, producida por el parásito microsporidio *Nosema ceranae* (Maini et al., 2010 [8]) y la Varroosis, producida por el parásito *Varroa destructor* (Guzmán-Novoa et al., 2010 [9]). La Nosemosis es una de las enfermedades más serias que pueden adquirir las abejas adultas, es producida por parásitos microsporidios intracelulares. Hasta 1996, año en el que se descubrió una nueva especie de *Nosema* en abejas melíferas asiáticas, tan sólo se conocía la variedad producida por *Nosema aspis*, la cual altera el comportamiento de las abejas jóvenes haciendo que reduzcan el cuidado de las crías y de la reina, disminuye la cantidad y calidad de la miel y jalea real y aumentaba la retención de agua de las abejas afectadas, lo que les producía disentería. Sin embargo la nueva especie de *Nosema*, *Nosema ceranae*, no presenta el síntoma de la disentería, haciendo más difícil la identificación de la enfermedad. El *Nosema ceranae* ha desplazado al

Nosema aspis (Martínez et al., 2012 [10]) y se ha propagado por el mundo, lo cual ha sido reportado por distintos autores (Hgues et al. 2010 [11]; Fries, 2010 [12]; Cheng, Huang, 2010 [13]). El efecto del parásito incluye la alteración del comportamiento del huésped, así como la supresión del sistema inmunológico del mismo para prolongar la habilidad para reproducirse del parásito.

Otro de los factores posibles es la exposición a pesticidas neonicotinoides, en especial imidacloprid, distribuido en nuestro país por Bayer S.A. a través de sus marcas comerciales Confidor® y Gaucho®. Son antagonistas de los receptores nicotínicos de acetilcolina en el sistema nervioso central de los insectos. Causan estimulación nerviosa a bajas concentraciones, mientras que altas concentraciones causan parálisis y muerte. Su principal ventaja es su selectividad tóxica, ya que enlazan de mejor manera a los receptores nicotínicos de los insectos que a los de los vertebrados (Tomizawa, Casida, 2005 [14]). Los neonicotinoides pueden ser clasificados por su grupo químico en tres grupos: las N-nitroguanidinas (imidacloprid, tiametoxan, clotianidin y dinotefuran), nitrometilenos (nitenpiram) y N-cianoamidinas (acetamiprid y tiacloprid) (Jeschke et al., 2011 [15]). Los pesticidas neonicotinoides son insecticidas sistémicos, lo que significa que son absorbidos por la planta protegiendo toda la cosecha. Son ampliamente aplicados recubriendo la semilla, con lo que se logra la presencia del compuesto en toda la planta, sin importar la parte del cultivo que es atacado por los insectos. Al usar semillas recubiertas, se han encontrado posteriormente en los tejidos de las plantas concentraciones que varían entre 5 a 10 ng g⁻¹, lo que es suficiente para proveer protección contra plagas (Castle et al, 2005 [16]). En polen, las concentraciones varían en un intervalo de <1 a 8,6 ng g⁻¹ y de <1 a 51 ng mL⁻¹ en néctar (EFSA, 2012 [17]). Al ser aplicados directamente al suelo, se ha detectado posteriormente en intervalos que varía de 9 a 66 ng g⁻¹ en polen y de 1 a 23 ng mL⁻¹ en néctar (USEPA, 2012 [18]).

Se ha reportado que el valor de L50 para imidacloprid en abejas melíferas es de 5 ng por abeja (Suchail et al., 2000 [19]), por lo que, para consumir una dosis de LC50, una abeja debería consumir alrededor de 1 g de polen o 2,6 mL de néctar. Estudios sobre el impacto del imidacloprid sobre las abejas en dosis realistas de campo, condiciones de semi-campo y de laboratorio para semillas bañadas, no mostraron efectos letales sobre los polinizadores (Cresswell, 2011 [20]). Sin embargo, si se observan efectos no letales como reducción del aprendizaje y de la capacidad de forrajeo y aumento en las dificultades para volver a la colmena. Así mismo, al alimentar a las larvas con dosis pequeñas de imidacloprid (<1/100 de la dosis de LC50 para una abeja adulta), se

presentó una alta disminución en su capacidad de aprendizaje (Yang et al., 2008 [21]; Yang et al. 2012 [22]; Han et al., 2010 [23]; Mommaerts et al. 2010 [24]; Henry et al., 2012 [25]; Colin et al., 2004 [26]).

No obstante, la hipótesis de que el CCD no tiene solamente una causa, sino que es una conjunción de factores, principalmente efectos sinérgicos entre *N. ceranae* y pesticidas neonicotinoides, toma cada vez más fuerza dentro de la comunidad científica. Pettis et al. (2012) demuestran que existe relación entre la exposición sub-letal a imidacloprid en la colonia y la producción de esporas de *Nosema*. Alaux et al. (2010 [27]) reportan que la interacción entre imidacloprid y *Nosema* debilita de forma significativa a las abejas, aumentando sus tasas de mortandad y requerimientos energéticos, mientras que Vidau et al. (2011 [28]) observaron que la mortandad aumenta al exponer a dosis no letales a abejas infectadas con *N. ceranae*. Es debido a esto que el desarrollo de metodologías para la determinación y cuantificación de pesticidas neonicotinoides es de importancia para discriminar de mejor manera el efecto que estos tienen sobre importantes polinizadores como las abejas.

En nuestro país está normado el límite máximo de residuos de imidacloprid en algunos alimentos como huevos ($0,02 \text{ mg kg}^{-1}$), arándanos, frutillas y uvas (5 mg kg^{-1}) (Resolución exenta 33, Ministerio de Salud [29]). No obstante la miel no se encuentra incluida en el listado de alimentos regulados, así como tampoco se hace mención dentro de la página del Servicio Agrícola y Ganadero del efecto que puede tener el uso de imidacloprid y los pesticidas neonicotinoides en el ámbito de la apicultura. En comparación, en la Unión Europea el límite máximo de residuos para imidacloprid en miel fue fijado en $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ en el 2005 (Regulación (EC) No. 396/2005 [30]), siendo prohibido su uso en la Unión Europea a partir del año 2013, junto con el de tiametoxan y clotianidina; mientras se resuelve si dichos compuestos presentan un riesgo real para la supervivencia de abejas y abejorros (Reglamento de ejecución UE No.485/2013 [31]).

Es en este aspecto en que los estudios en miel, siendo un reflejo del estado metabólico de las abejas, adquieren gran importancia. Al ser procesada a base del polen y néctar que recogen las abejas, es posible rastrear la exposición de estas a pesticidas, enfermedades y antibióticos. Empero, la miel presenta múltiples dificultades para la determinación de este tipo de analitos, debido a su gran complejidad como matriz. A grandes rasgos, la miel es una solución higroscópica altamente concentrada de azúcares, con presencia de aminoácidos, proteínas, pigmentos, cenizas, ácidos orgánicos,

vitaminas y polen, por lo que la presencia de analitos con bajas concentraciones y la presencia de una gran variedad de interferentes, hacen de este análisis una tarea compleja y difícil de abordar.

Múltiples metodologías se han desarrollado para la cuantificación de pesticidas neonicotinoides en miel, en especial imidacloprid; siendo preponderante la determinación por cromatografía, previa etapa de preparación de la muestra y extracción del analito a cuantificar. (García-Chao et al., 2010 [32]; Fidente et al., 2005 [33]; Pirard et al., 2007 [34]; Wiest et al., 2011 [35]; Tomasini et al., 2012 [36]; Jovanov et al., 2013 [37]; de Pinho et al., 2010 [38]; Barganska et al., 2013 [39]; Tanner y Czerwenka, 2011 [40]). Bajo esta perspectiva, el análisis de este tipo de compuestos en miel implica consumo de tiempo y solventes, especialmente en la etapa del análisis cromatográfico. Desde este punto de vista, métodos alternativos de cuantificación, en especial para imidacloprid, se hacen necesarios.

Una alternativa para la determinación de imidacloprid es el análisis mediante fluorescencia. En solución acuosa, el imidacloprid no presenta fluorescencia de forma nativa, no obstante al realizar irradiación con luz UV el compuesto presenta señal fluorescente (Vílchez et al., 1998 [41]). Basados en esta característica, se ha reportado el análisis de imidacloprid en aguas mediante la detección del foto-producto fluorescente obtenido por la irradiación con luz UV (Vílchez et al., 2001 [42]; Araujo et al., 2012 [43]; López et al., 2007 [44]). Sin embargo, si se desea emplear la fluorescencia para el análisis de muestras más complejas como la miel, donde se tiene la presencia de múltiples interferentes, se requiere una aproximación distinta a la utilizada en muestras de agua

Un enfoque para mejorar la selectividad analítica ante esta situación sería el uso de las mediciones de fluorescencia de excitación-emisión (EEMs), en conjunción con diferentes algoritmos quimiométricos como el análisis paralelo de factores (PARAFAC) o mínimos cuadrados parciales desdoblados acoplados a bilinearización residual (U-PLS/RBL); para construir una calibración de segundo orden. Estos métodos permiten resolver las señales analíticas sin el uso de la cromatografía y obtener los espectros de los compuestos de interés (en el caso de PARAFAC) a partir de una señal de fondo compleja e interferencias espectrales superpuestas, que no se incluye en el conjunto de calibración (conocida como la ventaja de segundo orden) (Sánchez y Kowalski, 1986 [45]). Esta característica ayuda a minimizar el pre-tratamiento de la muestra que se destina principalmente para concentrar el analito y disminuir el límite de detección.

Para imidacloprid no hay reportes disponibles sobre la determinación de miel mediante espectroscopia de fluorescencia acoplada a calibración multivariada, por lo que este proyecto propone desarrollar los métodos analíticos para determinar este analito en muestras de miel utilizando espectroscopia de fluorescencia total inducida fotoquímicamente, asociada a calibración multivariada de segundo orden, aplicando los algoritmos que permitan manejar mejor los datos de segundo orden obtenidos (PARAFAC; U-PLS/RBL o resolución multivariada de curvas con mínimos cuadrados alternantes MCR-ALS). Se propone el uso extracción en fase sólida sobre diferentes adsorbentes como tratamiento de la muestras.

1.1 Hipótesis

Tratamiento de extracción en fase sólida puede acoplarse a fluorescencia inducida foto-químicamente asociada a calibración multivariada de segundo orden, para desarrollar un método analítico rápido, sencillo y sensible que permita determinar imidacloprid en miel de abejas en presencia de potenciales interferentes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Desarrollar y validar un método analítico para determinar imidacloprid en miel utilizando fluorescencia inducida foto-químicamente (PIF) asociada a calibración multivariada de segundo orden para el análisis de datos de tres vías.

2.2 Objetivos específicos

1.-Evaluar la extracción en fase sólida como método para extraer imidacloprid desde muestras de miel.

2.-Estudiar y optimizar las condiciones para inducir la fluorescencia de imidacloprid en extractos obtenidos luego de aplicar extracción en fase sólida a muestras de miel fortificadas con el analito.

3.-Evaluar el uso de los perfiles de datos de segundo orden asociados a calibración multivariada de segundo orden para determinar imidacloprid en muestras de miel.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Muestras, solventes y reactivos

- Acetonitrilo, para cromatografía. Merck
- Diclorometano, para cromatografía. Merck
- N-Hexano, para cromatografía. Merck
- Amoniaco, 32% Extra puro. Merck.
- Agua des ionizada.
- Imidacloprid Pestanal®, estándar analítico 99,99%. Sigma-Aldrich.
- Solución tampón fosfato, pH 11,5.

3.2 Equipos menores y material de laboratorio

- Micropipeta 100-1000 μ L. Modelo BioPette Plus. Labnet.
- Micropipeta 20-200 μ L. Modelo BioPette Plus. Labnet.
- Micropipeta 100 μ L. Micro Pipette Controller. Brand.
- Balanza de precisión. Modelo 4000C. Precisa Instruments AG.
- Balanza analítica. Modelo 40SM-200 A. Precisa Instruments AG.
- Agitador vortex. Modelo ZX3. Velp Scientifica.
- Evaporador rotatorio. Modelo WB2000/VV2000. Heindolph.
- Bomba de vacío. Modelo 7530-65. Cole Palmer Instrument Company.
- Columnas SLE de tierra de diatomeas HM-N, 5 mL vol. Isolute.
- Columnas de intercambio catiónico-fase inversa MAX™. Oasis.
- Columnas de intercambio aniónico-fase inversa MCX™. Oasis.
- Columnas Supeclean™ Envi™-Carb, 0,5 g 6 mL. Supelco.
- Celdas para fluorescencia. Modelo 28-F 700 μ L PL 10. Starma Scientific Ltda.
- Lámpara UV Vilbert-Lourmat (Francia). Modelo VL-115-G. Tubo 15W con línea espectral a 254 nm.
- Cronómetro Hanhart Amigo DNGM 716 145 $\frac{1}{2}$ s.
- Capilares desechables de vidrio de 100 μ L. Blaubrand Intramak (Wertheim, Alemania).
- Celda de pasta de hematocrito.
- Material de vidrio.

3.3 Equipos mayores

- Espectrofotómetro de fluorescencia Varian Cary Eclipse. Agilent Technologies. Serie F11101M 002.
- Espectrofotómetro UV-Vis. Cary 8454. Agilent Technologies. Serie M4-14150008, equipado con lámpara de tungsteno y deuterio, para barrido en rango visible y UV, respectivamente.

3.4 Software

- Cary Eclipse Scan Application Fluo®. Versión 1.1(132)
- UV-Vis Chemstation®. Versión B.05.02 [15]
- Matlab®. Versión 7.6.0.324 (r2008a).
- The Unscrambler®. Versión 9.7.

3.6 Métodos

3.6.1 Métodos quimiométricos de calibración de segundo grado

3.6.1.1 Datos de segundo orden

Los datos de segundo orden [46–48] comprenden una matriz bidimensional de datos $J \times K$ (J corresponde al modo instrumental 1, por ejemplo longitud de onda de excitación; K al modo instrumental 2, por ejemplo longitud de onda de emisión). Repitiendo este proceso para I muestras, podemos obtener una matriz tridimensional $J \times K \times I$, donde I corresponde al número de muestras. Si la forma de los espectros de J y K permanece sin variación en todo el intervalo de concentraciones, variando solamente la intensidad en cada muestra I , entonces se puede considerar que los datos son trilineales y se pueden ordenar en una formación de datos de tres vías.

Los modelos trilineales son la base de los algoritmos de descomposición, obteniéndose mediante ellos las “matrices loadings” que contienen toda la información espectral, la cual es proporcional a los perfiles instrumentales de cada constituyente puro (ejemplo: espectros de excitación y emisión puros), así como la “matriz score” cuyo contenido es proporcional a la concentración del constituyente puro. Resumiendo, la generación de la curva de calibrado se realiza con muestras que solamente contienen los constituyentes que desean ser calibrados variando la concentración de los mismos, manteniéndose constantes las matrices de “loadings”, mientras que la matriz de “scores” varía de forma proporcional a la concentración del constituyente puro. Esto implica que,

una vez obtenida la calibración para los componentes de interés, todos los constituyentes inesperados y no calibrados que se presentan en muestras reales, pueden ser modelados y matemáticamente removidos.

3.6.1.2 Análisis paralelo de factores (PARAFAC)

El modelo PARAFAC [49–51] está basado en la ecuación 1

$$X_{ijk} = \sum_{n=1}^N A_{in} B_{jn} C_{kn} + E_{ijk} \quad (1)$$

Donde A_{in} representa la concentración relativa (matriz score) de un constituyente n en la muestra i , B_{jn} y C_{kn} son las intensidades de ambos modos instrumentales (matrices loadings) y E_{ijk} colecta los errores de ajuste. La sumatoria implica que las señales de los constituyentes son aditivas como se representa en la figura 1.

Este modelo utiliza la ecuación 1 en su forma matricial

$$X = B \times A \times C^T + E \quad (2)$$

Utilizando el producto de Khatri-Rao puede ser reescrita como:

$$X^{(I \times JK)} = A(C| \otimes |B)^T + E^{(I \times JK)} \quad (3)$$

La cual puede ser expresada como una matriz simple:

$$X = AB^T + E \quad (4)$$

A esta matriz simple se le realiza minimización, generalmente mediante mínimos cuadrados alternados (ALS), en donde se obtienen las matrices loadings B y C , que son comunes a todas las muestras, y la matriz scores Z_i , para cada muestra. Esta matriz Z_i contiene en su diagonal las concentraciones relativas de la muestra, la cual es transformada en una fila de la matriz A .

Finalmente la información provista por los scores de los constituyentes es utilizada para construir un calibrado de pseudo orden cero entre estos y la concentración de los analitos en las muestras de calibrado, calculándose la concentración de la muestra desconocida por la interpolación de los scores de la muestra desconocida en la matriz A y los scores de la curva ajustada.

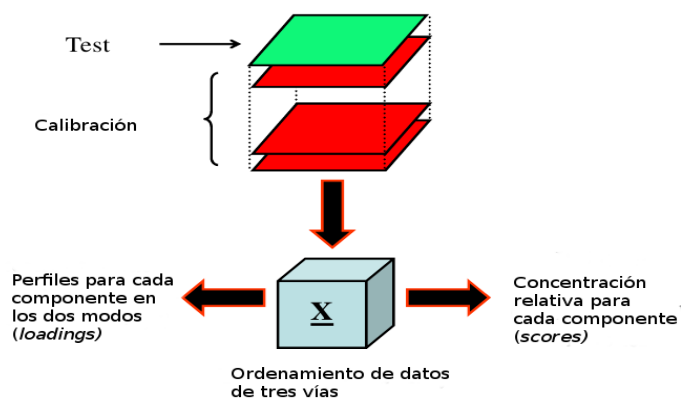


Figura 1: Representación esquemática de obtención de loadings y scores mediante la utilización de PARAFAC.

La principal ventaja de este método es que, mediante restricciones adecuadas como la de generar espectros no negativos, se obtiene un único set de matrices A, B y C que satisfacen el modelo, correspondiente a una solución que tiene significado físico. En contrapartida, el modelo requiere que los datos sean completamente trilineales, obteniéndose resultados no satisfactorios al verse sometido a datos con pérdida de trilinealidad.

3.6.1.3 Resolución multivariada de curvas asociada a mínimos cuadrados alternados (MCR-ALS)

En el modelo MCR-ALS [52–54] se utiliza un modelo bilineal de la matriz X, formando una nueva matriz aumentada (D_{aum}) a partir de la expansión de la matriz X_{ijk} la cual puede ser realizada en cualquiera de los dos modos instrumentales, tal como se puede observar en la figura 2.

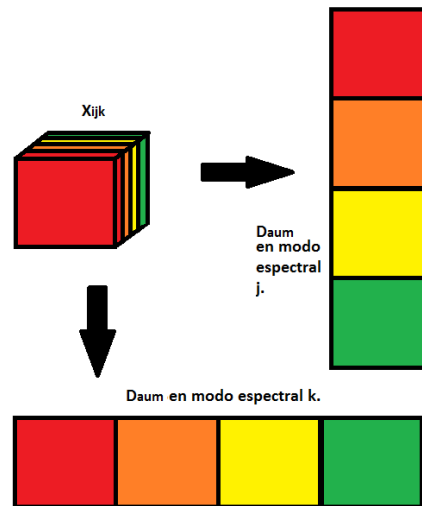


Figura 2: Representación esquemática de expansión de la matriz X_{ijk} en matriz D_{aum} en los distintos modos espectrales.

La matriz D_{aum} se descompone en dos matrices, C correspondiente al modo instrumental 1 (habitualmente de concentración) y S^T que contiene toda la información espectral del modo instrumental 2, donde E corresponde a la matriz de los residuos no explicados por las especies químicas en C y S^T (Ecuación 5 y Figura 3)

$$D_{aum} = CS^T + E \quad (5)$$

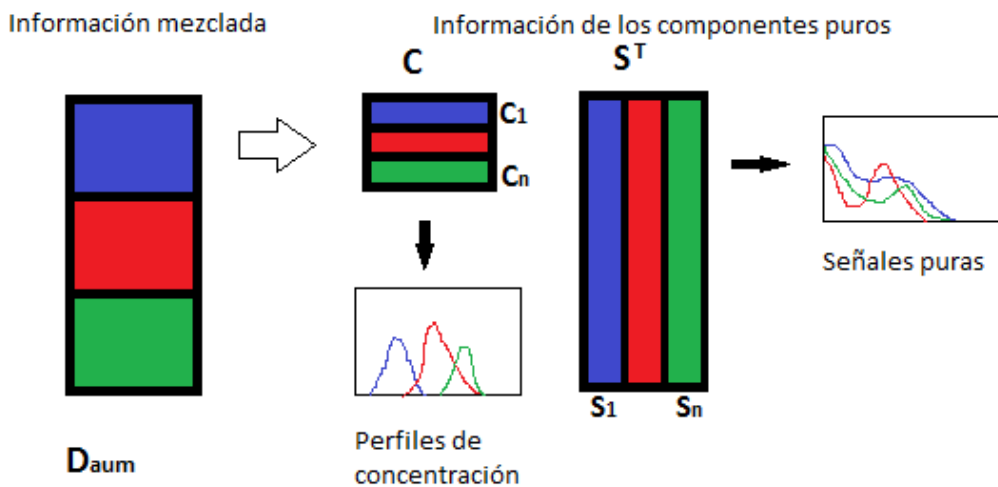


Figura 3: Descomposición matricial de la matriz D_{aum} en la matriz C y S^T que contienen la información de los componentes puros.

El método se inicializa realizando la estimación de los componentes mediante el análisis de componentes principales (PCA), para luego hacer una estimación inicial de la matriz C mediante análisis factorial exploratorio (EFA) o el algoritmo SIMPLISMA (Análisis Interactivo Auto-modelado de Mezclas Sencillo de Usar) y posteriormente la minimización del residuo mediante mínimos cuadrados alternados (ALS) (Ecuación 6)

$$\begin{aligned}
 D &= CS^T \\
 S^T_{cal} &= C^+D \\
 C_{cal} &= DS^{T+} \\
 D_{cal} &= C_{cal}S^T_{cal} \\
 D &\leftrightarrow D_{cal}
 \end{aligned}
 \tag{6}$$

Donde C^+ y S^{T+} son las pseudo inversas de C y S^T respectivamente. Como se muestra en la ecuación 6, el proceso se realiza hasta lograr convergencia entre la matriz D y la matriz D_{cal} .

Debido a que el modelo es bilineal, las matrices pueden presentar ambigüedad rotacional, obteniéndose resultados que cumplen con el modelo, pero no tienen significado físico. Para evitar esto, al realizar la minimización por ALS, es posible aplicar restricciones a las matrices calculadas, tales como no negatividad, clausura o unimodalidad, lo que permite obtener resultados con significado físico como en PARAFAC.

La principal ventaja de MCR-ALS es que al transformar la matriz tridimensional en un arreglo bilineal, permite suplir pérdidas en la trilinealidad de los datos al realizar el aumento de la matriz D en el modo instrumental en el que se percibe la pérdida de la trilinealidad, siendo un algoritmo más permisivo que PARAFAC.

3.6.1.4 Mínimos cuadrados parciales desdoblados con bilinearización residual (UPLS-RBL)

En el modelo UPL-RBL [55–57] se realiza el arreglo matricial de la matriz X en vectores en vez de en matrices, como se realiza en MCR-ALS. Para ello la matriz de cada muestra es desdoblada y convertida en un único vector, cada vector obtenido se acopla con los demás hasta obtener nuevamente una matriz, como se puede observar en la figura 4.

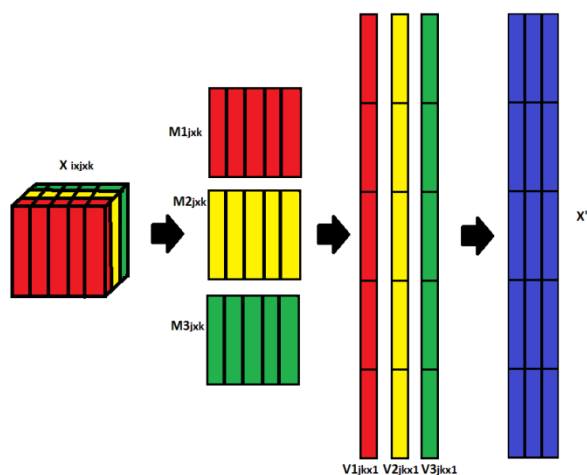


Figura 4: Representación esquemática de la vectorización de la matriz X_{ijk} .

Sobre esta matriz (X') se realiza una descomposición para obtener los scores (T), relacionados con la concentración del analito, y loadings (P). Posteriormente se realiza el calibrado entre T y la concentración y_n como se indica en las ecuaciones 7 y 8:

$$X' = TP^T + E \quad (7)$$

$$y_n = Tv_n + e \quad (8)$$

Sin embargo este algoritmo no presenta la ventaja de segundo orden. Ello implica que si hay constituyentes inesperados en X , las puntuaciones de la muestra dada por la ecuación 2 son inadecuadas para la predicción del analito. Para evitar este inconveniente, es posible combinar U-PLS con bilinearización residual, U-PLS/RBL, procedimiento posterior a la calibración que se basa en el análisis de componentes principales para modelar la presencia de componentes inesperados en una muestra.

La para ello la matriz de datos que contiene constituyentes no calibrados (X_u) es vectorizada [$\text{vec}(X_u)$] y expresada de la siguiente forma (Ecuación 9).

$$\text{vec}(X_u) = Pt_u + [B_{unx}G_{unx}(C_{unx})^T] + e_{RBL} \quad (9)$$

Donde, e_{RBL} es el error residual de RBL y B_{unx} , G_{unx} , y C_{unx} son obtenidos a partir del PCA de una matriz residual obtenida luego de reformular el vector e_{RBL} calculado, asumiendo que las interferencias están ausentes como se indica en la siguiente ecuación (Ecuación 10)

$$B_{unx}G_{unx}(C_{unx})^T = SDV\{reshape[vec(Xu) - Pt_u]\} \quad (10)$$

Donde “reshape” es la operación inversa a la vectorización, convirtiendo el vector JKx1 en la matriz JxK. La operación SVD es aplicada utilizando el primer componente principal N_{unx} , donde N_{unx} es el número de componentes inesperados en la muestra.

La bilinearización residual consiste en mantener constante la matriz de loadings P de la ecuación 9 y variar t_u con el objeto de minimizar e_{rbl} , donde la desviación estándar (S_{RBL}) es considerada como una medida de la bondad del ajuste, asumiendo que S_{RBL} se estabiliza a un valor comparable con el ruido instrumental cuando se encuentra el valor correcto de N_{unx} . La figura 5 muestra un esquema del procedimiento seguido en UPLS/RBL.

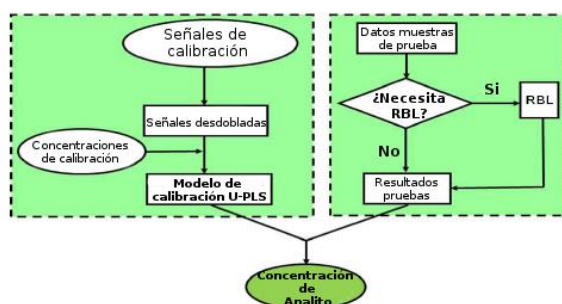


Figura 5: Representación esquemática de procedimiento de U-PLS/RBL

3.6.2 Estudio del efecto del tiempo de irradiación sobre la inducción fotoquímica de fluorescencia de imidacloprid.

Se preparó una solución de imidacloprid 5 µg/mL en tampón fosfato/acetonitrilo en proporción 4:1. Aproximadamente 2,5 ml de esta solución se pusieron en una celda de cuarzo estándar de 1 cm de paso óptico, la que se sometió a irradiación desde 0 a 90 segundos, utilizando una lámpara Vilbert Lourmat (Francia, modelo VL-115.G) que opera un tubo de 15 W a 254 nm (modelo T-15.C). Una caja con un revestimiento interno de aluminio que permite una reflexión máxima de la luz UV fue colocado sobre la lámpara. Debido al corto tiempo de irradiación aplicada a las muestras no fue necesario usar ningún dispositivo de enfriamiento y todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente. Luego se obtuvo el espectro UV-Vis de la solución irradiada entre 200 y 500 nm cada 1 nm. El procedimiento se repitió con una solución de imidacloprid de 0,25 µg/mL para obtener los espectros de fluorescencia clásica entre 365 y 650 nm cada 2 nm a una

excitación de 355 nm, utilizando slit de excitación y emisión de 10 nm y un voltaje de 680 V en el fotomultiplicador.

Para el estudio en presencia de la matriz miel se registraron los espectros UV-vis en un mismo extracto obtenido después del tratamiento de la muestra al que se le agregó imidacloprid a 7,5 µg/mL y se sometió al siguiente procedimiento: Se aspiraron 100 µL con un capilar de vidrio desechable enrasado al mismo volumen (Brand, Wertheim, Alemania) empleando una micropipeta. Posteriormente el capilar fue sellado con cera de hematocrito en un extremo y parafilm en el otro, luego se sometió a irradiación con luz de lámpara UV a 254 nm desde 0 a 90 segundos. La solución irradiada se pasó a una celda de cuarzo de 100 µL y se obtuvo su espectro UV-Vis entre 200 y 500 nm cada 1 nm. El procedimiento se repitió con una solución de imidacloprid de 0,25 µg/mL para obtener los espectros de fluorescencia clásica entre 365 y 650 nm cada 2 nm, a una excitación de 355 nm, utilizando slit de excitación y emisión de 10 nm y un voltaje de 680 V en el fotomultiplicador.

Los espectros se guardaron en formato ASCII y fueron transferidos a un computador personal para su manipulación. Mediante el software The Unscrambler® se generó una estructura de datos de dos vías al apilar los espectros registrados en función del tiempo de irradiación y se realizó una corrección de desplazamiento de línea base (el punto más bajo en el espectro se resta de todas las variables) de modo que cualquier desplazamiento vertical fue eliminado. Para los espectros de fluorescencia clásica se realizó un suavizado de las señales mediante filtro de Savitzky-Golay, con polinomio de orden 1 con ventana de 5 datos. El algoritmo MCR-ALS se implementó para analizar estos datos utilizando la interfaz gráfica de MCR (MCR-ALS GUI 2.0) [58]. Posteriormente todos los cálculos quimiométricos y las rutinas fueron implementados en Matlab® v.7.6 (Mathworks, Natwick, MA). El número de componentes se obtuvo por PCA con descomposición de valores singulares, la inicialización se realizó mediante el método de detección de variables puras (SIMPLISMA), dirección de espectros y un ruido permitido del 5%. Se utilizaron las restricciones de no-negatividad en ambos modos y de clausura al 100%.

3.6.3 Calibración de segundo orden utilizando fluorescencia de excitación-emisión foto-inducida (PIF-EEM)

Se preparó un set de calibración en solución tampón fosfato/acetoniitrilo en proporción 4:1. Las concentraciones utilizadas fueron 0; 0,020; 0,030; 0,040; 0,050; 0,100; 0,150; 0,200; 0,250 y 0,300 µg/mL. Se tomaron 700 µL y se traspasaron a una celda de cuarzo de 700 µL. La celda fue irradiada con luz UV a 254 nm con lámpara de mercurio por 25 segundos. Inmediatamente posterior a la irradiación se obtuvo el perfil excitación-emisión de fluorescencia, realizando barrido de excitación desde 220 hasta 400 nm cada 5 nm, y obteniendo los perfiles de emisión desde 324 hasta 550 nm cada 2 nm. La obtención de los perfiles se realizó con slit de excitación de 10 nm, slit de emisión de 20 nm, voltaje de fotomultiplicador de 600 V.

Utilizando la interfaz gráfica MVC2 [59] en Matlab® en el modo UPLS-RBL (0 RBL) se obtuvo el número de componentes del calibrado mediante la suma de cuadrados de error de predicción en función del número de componentes (validación cruzada); siguiendo el criterio de Haaland [60]. Se obtuvo así mismo el error cuadrado medio de la validación cruzada (RMSEcv), el error cuadrado medio de calibración (RMSEC), el error relativo de calibración (EC%), el error relativo de calibración cruzada (ECv%), la regresión entre los valores nominales y los valores predichos y el límite de detección calculado.

3.6.4 Tratamiento de muestras de miel

3.6.4.1 SPE sobre columnas de intercambio aniónico y catiónico (MAX y MCX)

Se prepararon 5 mL de solución acuosa con 0,25 µg de imidacloprid, la cual fue cargada en columnas MAX o MCX previamente acondicionadas con 3 mL de MetOH y luego con 3 mL de agua desionizada. Una vez cargadas se llevaron las columnas a sequedad haciendo vacío. La elución se realizó con 10 mL del eluyente correspondiente. Las soluciones de carga y elución se muestran en la tabla 1. El eluido se llevó a sequedad en evaporador rotatorio y se reconstituyó en 1 mL de solución tampón fosfato pH 11,5/acetoniitrilo en proporción 4:1. Se tomaron 700 µL de esta solución, se traspasaron a una celda de cuarzo de 700 µL y se irradió con luz UV a 254 nm con la lámpara de mercurio por 25 segundos. La obtención del perfil de excitación-emisión se realizó bajo las mismas condiciones utilizadas en 3.6.3.

Tabla 1: Soluciones de carga y elución para tratamiento sobre columnas de intercambio aniónico y catiónico. CA: Carga ácida; CN: Carga neutra; CB: carga básica; EN: Elución neutra; EA: Elución ácida; EB: Elución básica.

Código	Medio de carga	Elución
CA-EN	H ₃ PO ₄ 4% pH 2	MetOH
CA-EN-EB	H ₃ PO ₄ 4% pH 2	MetOH/NH ₃ 5%
CN	Tampón Fosfato pH 7,5	MetOH
CN-EB	Tampón Fosfato pH 7,5	MetOH/NH ₃ 5%
CN-EA	Tampón Fosfato pH 7,5	MetOH
CB-EN	NH ₃ 5% pH 10	MetOH
CB-EN-EA	NH ₃ 5% pH 10	MetOH/NH ₃ 5%

Posteriormente se prepararon soluciones de miel (1g) con imidacloprid (0,25 µg) tanto en NH₃ 5%, como de tampón fosfato pH 7,5, se tomaron 5 mL de dichas soluciones y se fortificaron con 0,25 µg de imidacloprid. Las soluciones fueron cargadas en columnas MAX o MCX previamente acondicionadas con 3 mL de MetOH y luego con 3 mL de agua desionizada. Una vez cargadas se llevaron las columnas a sequedad haciendo vacío. La elución se realizó con 10 mL del metanol. Los eluidos se llevaron a sequedad en evaporador rotatorio a 60 °C y 90 RPM y se reconstituyeron en 1 mL de solución tampón fosfato pH 11,5/acetonitrilo en proporción 4:1. Se tomaron 700 µL de cada una y se traspasaron a celdas de cuarzo de 700 µL. Las celdas fueron irradiadas con luz UV a 254 nm con lámpara de mercurio por 25 segundos. La obtención del perfil de excitación-emisión se realizó bajo las mismas condiciones utilizadas en 3.6.3.

3.6.4.2 Partición liquido-liquido

Se preparó 5 mL de solución de miel (1g) con imidacloprid (0,25 µg) en NH₃ 5% la cual se traspasó a tubo de centrifuga de 15 mL, se agregaron 5 mL de diclorometano, se agitó en vortex por 1 minuto y se centrifugó por 5 minutos a 3500 RPM. La fase orgánica se retiró mediante pipeta Pasteur, se evaporó a sequedad en evaporador rotatorio a 60 °C y 90 RPM y se reconstituyó en 1 mL de solución tampón fosfato pH 11,5/acetonitrilo en

proporción 4:1 respectivamente. Se tomaron 700 μ L y se traspasaron a celda de cuarzo de 700 μ L. La celda fue irradiada con luz UV a 254 nm con lámpara de mercurio por 25 segundos. La obtención del perfil de excitación-emisión se realizó bajo las mismas condiciones utilizadas en 3.6.3.

3.6.4.3 Partición líquido-líquido soportada en tierra de diatomeas

Se prepararon 5 mL de una solución de miel (1g) con imidacloprid (0,25 μ g) en NH₃ al 5%, la solución fue agitada en vortex por 30 segundos a 40 Hz para propiciar la completa disolución de la miel. La solución fue cargada en columnas de tierra de diatomeas para 5 ml, se dejó un tiempo de contacto de 20 minutos, posteriormente se eluyó con 6 mL de diclorometano. El eluido se evaporó a sequedad en evaporador rotatorio a 60 °C y 90 RPM y se reconstituyó en 1 mL de solución tampón fosfato pH 11,5/acetonitrilo en proporción 4:1 respectivamente. Se tomaron 700 μ L y se traspasaron a celda de cuarzo de 700 μ L. La celda fue irradiada con luz UV a 254 nm con lámpara de mercurio por 25 segundos. La obtención del perfil de excitación-emisión se realizó bajo las mismas condiciones utilizadas en 3.6.3.

3.6.4.4 Partición líquido-líquido soportada en tierra de diatomeas y SPE sobre GCB

Se procedió como fue indicado en la sección anterior. Luego de evaporar a sequedad el residuo fue reconstituido en 2 mL de solución DCM/HEX 1:1. La solución fue cargada en columna de GCB previamente acondicionadas con 6 mL de diclorometano/hexano 1:1 y se eluyó con diclorometano hasta obtener 6 mL de eluido. Este se evaporó a sequedad en evaporador rotatorio a 60 °C y 90 RPM y se reconstituyó en 1 mL de solución tampón fosfato pH 11,5/acetonitrilo en proporción 4:1 respectivamente. Se tomaron 700 μ L y se traspasó a celda de cuarzo de 700 μ L. La celda fue irradiada con luz UV a 254 nm con lámpara de mercurio por 25 segundos. Inmediatamente posterior a la irradiación se obtuvo el perfil excitación-emisión de fluorescencia, realizando barrido de excitación desde 220 hasta 400 nm cada 5 nm, y obteniendo los perfiles de emisión desde 324 hasta 550 nm cada 2 nm. La obtención de los perfiles se realizó con slit de excitación de 10 nm, slit de emisión de 20 nm, voltaje de fotomultiplicador de 680 V.

3.6.5 Calibración de segundo orden para fluorescencia clásica-tiempo

Se preparó un set de calibración en solución tampón fosfato/acetoneitrilo en proporción 4:1. Las concentraciones utilizadas fueron 0; 0,025; 0,050; 0,075; 0,100; 0,125; 0,150; 0,175; 0,200 y 0,250 $\mu\text{g/mL}$. Se tomaron 700 μL de cada solución y se traspasaron a celdas de cuarzo de 700 μL . Cada celda por separado se sometió a irradiación con luz UV a 254 nm con lámpara de mercurio por tiempos acumulativos de 0, 10, 5, 5, 5, 5, 10, 20 y 30 segundos, obteniéndose inmediatamente tras cada irradiación sus perfiles de emisión de fluorescencia a una excitación de 355 nm, con ello se obtuvo el espectro de fluorescencia a tiempos de 0, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 60 y 90 segundos de irradiación. Los datos obtenidos se trataron con el software The Unscrambler® de la manera análoga a 3.6.2.

Utilizando la interfaz gráfica de Matlab® MVC2 [59] en el modo UPLS-RBL (0 RBL) se obtuvo el número de componentes del calibrado mediante la suma de cuadrados de error de predicción en función del número de componentes (calibración cruzada) siguiendo el criterio de Haaland [60]. Se obtuvo así mismo el error cuadrado medio de la validación cruzada (RMSEcv), el error cuadrado medio de calibración (RMSEC), el error relativo de calibración (EC%), el error relativo de calibración cruzada (ECv%), la regresión entre los valores nominales y los valores predichos y el límite de detección calculado.

3.6.6 Evaluación de recuperación patrones

Se fortificaron 3 soluciones de 5 mL de NH_3 5% con 0,05, 0,10 y 0,20 μg de imidacloprid y se sometieron al tratamiento de partición líquido-líquido soportada en tierra de diatomeas y SPE sobre GCB (sección 3.6.4.4). Se tomaron 700 μL de cada solución y se traspasaron a celdas de cuarzo de 700 μL . Cada celda por separado se sometió a irradiación con luz UV a 254 nm con lámpara de mercurio por tiempos acumulativos análogos a los tiempos utilizados en la curva de calibración de segundo orden para fluorescencia clásica-tiempo (sección 3.6.5). Los datos obtenidos se trataron con el software The Unscrambler® de la manera análoga a 3.6.2. Utilizando la interfaz gráfica de Matlab® MVC2 [59] en el modo MCR-ALS se obtuvo el número de componentes y se realizó la predicción de las concentraciones de las muestras utilizando detección de variables puras con 10% de ruido permitido con extensión de la matriz en el sentido de las columnas (tiempo irradiación) y restricción de no negatividad en ambos modos.

3.6.7 Análisis set de validación

Se prepararon 6 soluciones de 5 mL de miel (1g) en NH₃ 5% con distintas mieles disponibles en el laboratorio y se sometieron al tratamiento descrito en 3.6.4.4. Los eluidos fueron fortificados con 0,030; 0,045; 0,060; 0,080; 0,110 y 0,135 µg de imidacloprid. El proceso de irradiación fue análogo al utilizado en 3.6.5 y el tratamiento de datos utilizado fue el descrito en 3.6.2. Utilizando la interfaz gráfica de Matlab® MVC2 en el modo MCR-ALS se obtuvo el número de componentes y se realizó la predicción de las concentraciones de las muestras utilizando detección de variables puras con 10% de ruido permitido con extensión de la matriz en el sentido de las columnas (tiempo de irradiación) y restricción de no negatividad en ambos modos. Se obtuvo la recuperación promedio, el error cuadrado medio de predicción (RMSEP), el error relativo de predicción (REP%), sensibilidad analítica (γ^{-1}) y límite de detección.

3.6.8 Análisis set de prueba

Se prepararon 6 soluciones 5 mL de miel (1g) en NH₃ 5% las cuales fueron fortificadas con 0,030; 0,040; 0,070; 0,080; 0,090 0,110 y 0,120 µg de imidacloprid antes del tratamiento de muestra. Las mieles usadas fueron distintas a las utilizadas en el set de validación. Posteriormente fueron sometidas al tratamiento descrito en 3.6.4.4. El proceso de irradiación fue análogo al utilizado en 3.6.5 y el tratamiento de datos utilizado fue el descrito en 3.6.2. Utilizando la interfaz gráfica de Matlab® MVC2 [59] en el modo MCR-ALS se obtuvo el número de componentes y se realizó la predicción de las concentraciones de las muestras utilizando detección de variables puras con 10% de ruido permitido con extensión de la matriz en el sentido de las columnas (tiempo de irradiación) y restricción de no negatividad en ambos modos. Se obtuvo la recuperación promedio, el error cuadrado medio de predicción (RMSEP), el error relativo de predicción (REP%), sensibilidad analítica (γ^{-1}) y límite de detección.

3.6.9 Muestras reales

Se prepararon 3 soluciones de 5 mL de miel (1g) en NH₃ 5%. Se utilizaron 3 mieles artesanales distintas, dos homoflorales (ulmo y quillay) y una multifloral. Cada una se sometió al tratamiento descrito en 3.6.4.4. El proceso de irradiación fue análogo al descrito en 3.6.5 y el tratamiento de datos utilizado fue el descrito en 3.6.2. Utilizando la interfaz gráfica de Matlab® MVC2 [59] en el modo MCR-ALS se obtuvo el número de componentes y se realizó la predicción de las concentraciones en las muestras utilizando

detección de variables puras con 10% de ruido permitido con extensión de la matriz en el sentido de las columnas (tiempo de irradiación) y restricción de no negatividad en ambos modos.

Utilizando las mismas mieles, se prepararon 3 soluciones de 5 mL de miel (1g) en NH_3 5% por duplicado las cuales fueron fortificadas con 0,050 ug de imidacloprid. El tratamiento utilizado fue el mismo descrito para las muestras no fortificadas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Inducción fotoquímica de fluorescencia de imidacloprid

En solución acuosa, el imidacloprid no presenta fluorescencia de forma nativa, no obstante al irradiarlo en medio básico con luz UV a 254 nm se genera un foto-producto que presentó una señal fluorescente con un máximo de emisión a 410 nm y de excitación a 355 nm. En la Figura 6A se presenta un espectro de fluorescencia de excitación-emisión obtenido para una solución de imidacloprid a 0,05 $\mu\text{g/ml}$ en medio básico. El foto-producto formado correspondería a 1-(6-cloro-3-piridimetil)-2-(hidroximino)-3,4-didehidroimidazoliemo, aislado e identificado por Vilchez y colaboradores (1998) [41], cuya estructura se presenta en la figura 6B. Cabe mencionar que estos autores, a diferencia de lo observado en este trabajo, describen los máximos de emisión y excitación a 334 y 377 nm, respectivamente.

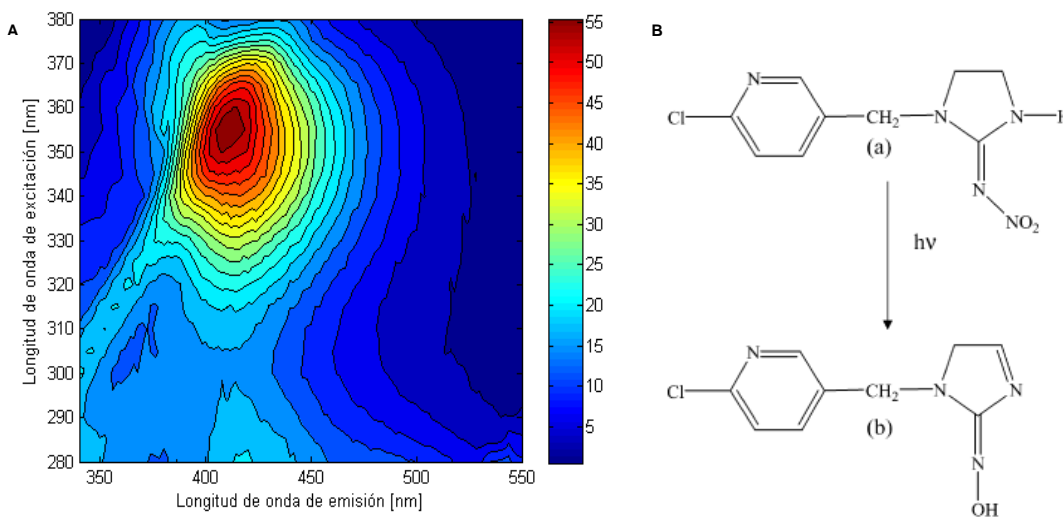


Figura 6: A) Espectro de fluorescencia de excitación-emisión de imidacloprid 0,05 $\mu\text{g/mL}$, en buffer fosfato 0,01 M pH 11,5, luego de 25 segundos de irradiación a 245 nm. B) Estructura del probable fotoproducto fluorescente de imidacloprid: 1-(6-cloro-3-piridimetil)-2-(hidroximino)-3,4-didehidroimidazoliemo (b en la figura).

En general los espectros de excitación-emisión como los aquí obtenidos presentan trilinealidad [61]; es decir sólo cambia su intensidad, mas no su forma con un cambio en la concentración del compuesto; siendo adecuados para usarse en la construcción de un calibrado de segundo orden empleando algoritmos como PARAFAC, U-PLS o MCR, aunque en estos dos últimos casos la trilinealidad no sea estrictamente necesaria.

Dado que la formación del foto-producto depende del tiempo de irradiación, se realizaron una serie de estudios para evaluar este aspecto. Se registraron los espectros de fluorescencia entre 360 y 650 nm (λ_{exc} 355) y de absorción entre 220 y 500 nm, y luego de irradiar a 254 nm una solución de imidacloprid a 5 ug/ml en buffer fosfato, desde 0 a 90 u 80 segundos. En la figura 7 se presentan los resultados.

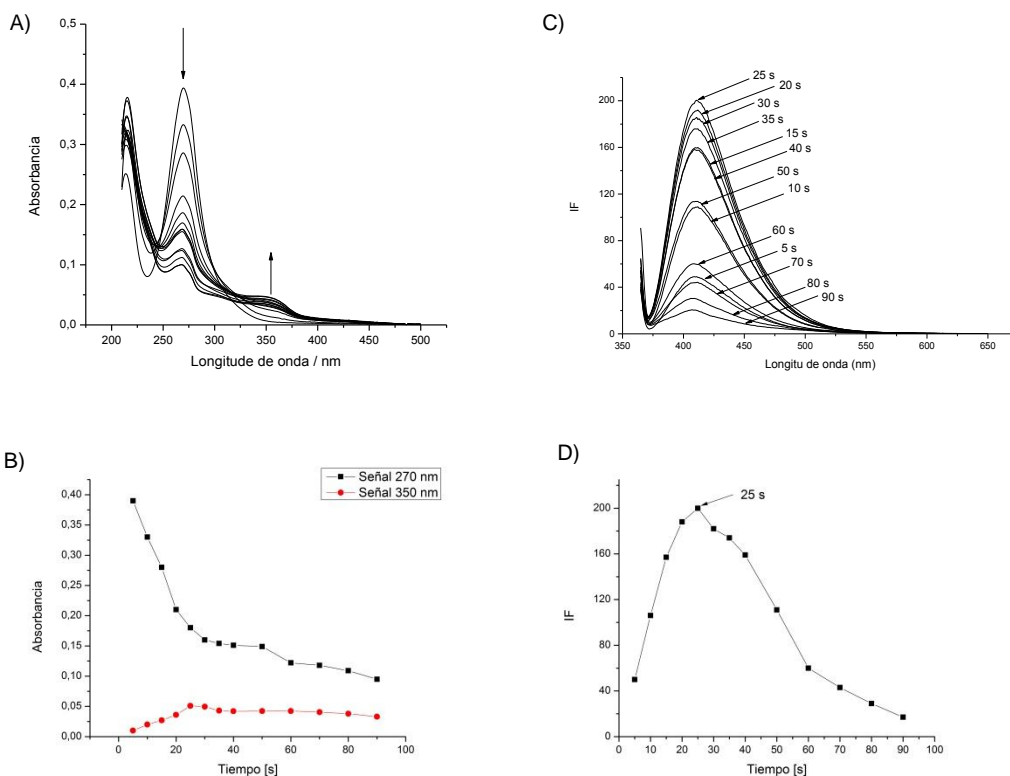


Figura 7: A) Espectros UV-vis de una solución de 5 ug/ml de imidacloprid en medio tampón de fosfato 0,01 M, ph 11,5 / acetonitrilo (80:20) después irradiación durante 0-80s. B) Variación del máximo de absorbancia a medida que aumenta el tiempo de irradiación a longitud de onda característica de imidacloprid (270 nm) y a aumento de señal de absorbancia (350 nm). C) Espectros de fluorescencia (350 nm λ_{exc}) de una solución de 0,25 ug/ml de imidacloprid en tampón de fosfato 0,01 M, ph 11,5 / acetonitrilo (80:20) obtenido después de irradiación a 254 nm durante 5-90 s. D) Variación de la intensidad de fluorescencia a medida que aumenta el tiempo de irradiación a 350 nm λ_{exc} .

En la figura 7A, se observa un incremento sostenido en la fluorescencia hasta los 25 segundos de irradiación, correspondiente a la formación del producto fluorescente, y a continuación una disminución en la señal debido a la fotodegradación del mismo. Por otra parte como se observa en la figura 2B, el imidacloprid poseen una absorbancia característica a 270 nm, la que mostró una disminución continua a medida que aumenta el

tiempo de irradiación, así como el aumento de la absorbancia con un máximo alrededor de 350 nm. Estos cambios en los espectros de absorbancia de imidacloprid se pueden atribuir a la conversión a sus productos de degradación. Para visualizar la formación de estos productos en el tiempo se recurrió al análisis de los espectros de absorbancia mediante MCR-ALS, cuyo uso se describe en la 3.6.1.3. Al analizar los datos usando las restricciones de no-negatividad (concentraciones y espectros de los componentes deben ser positivos) y de cierre (balance de masa debe mantenerse durante el proceso cinético) [52], MCR mostró la presencia de 4 especies (componentes) y su comportamiento frente a los tiempos crecientes de irradiación (% carencia de ajuste=4,07%).

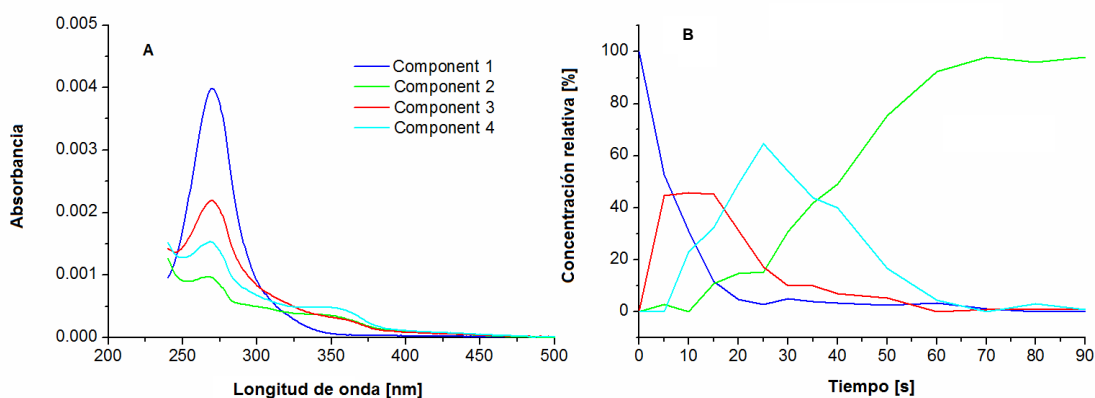


Figura 8: Perfiles calculados mediante MCR-ALS para cuatro componentes obtenidos con el análisis de los espectros UV-vis de soluciones de imidacloprid irradiadas a 254 nm desde 0 a 80 segundos A) concentraciones; B) espectros UV-vis puros. Componentes: 1 (azul), 2 (verde), 3(rojo) y 4 (cyan).

Considerando los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Cid 2014 [62]), los trabajos reportados sobre la degradación y foto-degradación de imidacloprid en medio acuoso por Moza y col., 1998 [63]; Zheng y Liu 1999 [64]; Redlich y col., 2007 [65]; Ding y col., 2011 [66] y no acuoso por Schippers y Schwack 2008 [67] y la modificación de fluorescencia en función del tiempo de irradiación observado en este estudio (Figura 7A); se puede realizar el siguiente análisis de los resultados obtenidos mediante MCR. En los perfiles de concentración obtenidos se observa que durante los primeros 15 segundos de la reacción fotoquímica se genera un producto intermediario no fluorescente (componente 3). A su vez, éste se degrada en un producto estable

(componente 2) que muestra la absorbancia con un máximo a 270 nm y alrededor de 350 nm. Los espectros extraído por MCR-ALS para el intermedio y el compuesto estable (Figura 8A) son muy similares a los reportados por Redlich y col. [65]; quienes aislaron los principales productos de la fotodegradación de imidacloprid, identificándolos mediante FTIR, $1H^+$ y ^{13}C -NMR y espectros UV-vis. Los autores observaron que la degradación fotolítica de imidacloprid es más rápida en medio alcalino al producir por hidrólisis el compuesto 1-[(6-cloro-3-piridinil)metil]-2-imidazolidinimina (imidacloprid desnitrado), que actúa como intermediario bajo condiciones alcalinas y neutras. Posteriormente este compuesto se degrada al producto final 1-[(6-cloro-3-piridinil)-2-imidazolidinona (imidacloprid urea). Los espectros UV-vis obtenidos por Redlich y col. [65] , para el intermediario imidacloprid desnitrado y el compuesto estable imidacloprid urea muestran una similitud significativa con los extraídos por MCR-ALS para los componentes 3 y 2 en el presente trabajo. Schippers y Schwack [67] , establecieron que el principal producto de la foto-degradación de imidacloprid en diferentes solventes fue imidacloprid desnitrado, encontrando una menor cantidad de imidacloprid urea. Sin embargo, se ha demostrado que la degradación o foto-degradación de imidacloprid en medio acuoso conduce principalmente a la formación de ambos compuestos [Ding y col., 2011 [66] ; Zheng y Liu 1999 [64] , Moza y col., 1998 [63]]; con la aparición de imidacloprid urea como producto final estable, particularmente en condiciones alcalinas [Zheng y Liu 1999 [64]]. Además, el mecanismo de foto-degradación que se ha propuesto en todos estos trabajos es la degradación de imidacloprid a imidacloprid desnitrado y subsecuentemente a imidacloprid urea, lo cual concuerda con la secuencia de aparición de compuestos obtenida mediante MCR en este trabajo.

Por otro lado, el componente 4 mostró un perfil de concentración que coincide con la fluorescencia registrada en el tiempo (máxima fluorescencia entre 25 y 30 segundos) (Figura 8B). Este compuesto se formaría directamente por foto-descomposición de imidacloprid en medio alcalino, como una reacción secundaria a la vía principal de degradación. Como se mencionó previamente, Vílchez et al. [41], reportaron el aislamiento y la identificación del producto fluorescente de imidacloprid (Figura 6B); que también fue reportado por Ding et al. 2011 [66], como un producto secundario de la fotólisis de imidacloprid en medio acuoso. Así, el componente 4 podría atribuirse al producto fluorescente. No obstante, para afirmar con seguridad que los perfiles obtenidos mediante MCR-ALS corresponden a los compuestos nombrados, se requeriría el uso de técnicas de identificación, tal como espectroscopia de masas.

4.2 Calibración de segundo orden utilizando fluorescencia de excitación-emisión foto-inducida (PIF-EEM)

De acuerdo a los resultados anteriores, se seleccionaron 25 s como el tiempo de irradiación. La estabilidad del foto-producto con el tiempo después de la irradiación y un posible foto-blanqueo se evaluó mediante el registro de la fluorescencia de 0 a 45 minutos, cada 5 minutos después de la irradiación. Las intensidades de fluorescencia no presentaron variaciones significativas en este período, lo que demuestra la estabilidad del foto-producto con el tiempo y la ausencia de degradación durante la medición de la PIF-EEM. De todos modos, todos las PIF-EEM se obtuvieron inmediatamente después de la irradiación de las muestras. En la Figura 9 A y B se presentan los espectros de fluorescencia clásica y las PIF-EEM; respectivamente, obtenidas para distintas concentraciones de imidacloprid luego de 25 s de irradiación. Ante la posibilidad de cuantificar imidacloprid en presencia de potenciales interferentes presentes en la miel, son los datos de tres vías (PIF-EEM) los que permiten alcanzar tal posibilidad [49]. Dada la característica de estos datos es posible la utilización de los algoritmos descritos en los puntos 3.6.1.2, 3.6.1.3 y 3.6.1.4 para la construcción de calibración de segundo orden.

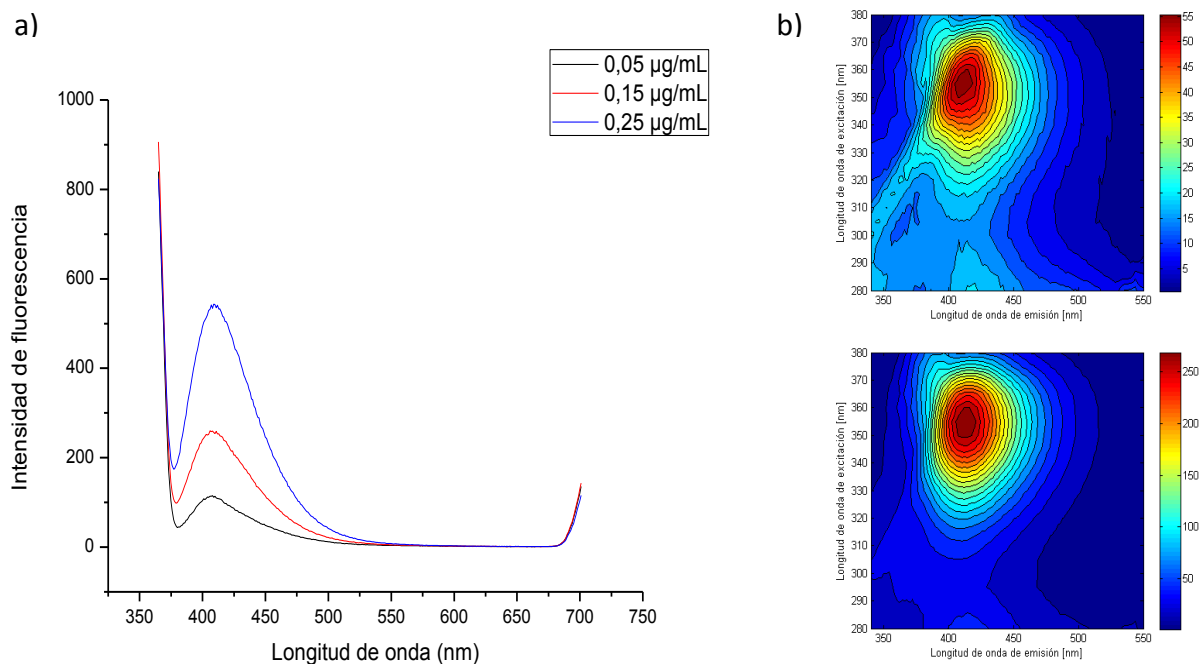


Figura 9: a) Espectros de fluorescencia clásica y b) de fluorescencia de excitación-emisión de imidacloprid a distintas concentraciones registrados luego de 25 segundos e irradiación (para b: 0,05 µg/mL imagen superior, 0,25 µg/mL imagen inferior)

Si bien el contenido de azúcares y agua representa cerca del 95% de la miel, el 5% restante está representado por una gran variedad de compuestos tales como aminoácidos libres, proteínas, ácidos fenólicos, flavonoides, pigmentos, etc. Por otra parte, esta misma composición puede variar en la miel de una misma colmena dependiendo de la estación del año, el clima y las condiciones geográficas del sector. Esto la convierte en una matriz bastante compleja de tratar al momento de la determinación de contaminantes orgánicos como los insecticidas neonicotinoides. La gran mayoría de métodos reportados sobre la determinación de estos compuestos en miel es utilizando cromatografía líquida [68–73], previa extracción y limpieza de los extractos de manera exhaustiva. Sin embargo, estos procedimientos requieren periodos de tiempo importantes e implican la utilización de grandes cantidades de solvente. Como alternativa la utilización de datos de tres vías asociados a calibración de segundo orden presenta ventajas significativas, tales como la resolución de señales analíticas sin el uso de la cromatografía, determinar las concentraciones de los compuestos de interés a partir de señales de fondo complejas que presentan componentes no calibrados, lo que se conoce como la ventaja de segundo orden [45]. De esta manera se puede subsanar la gran variabilidad que se puede encontrar en las muestras de miel, disminuyendo de una manera considerable el tiempo de medición y los solventes utilizados para su determinación.

La construcción del modelo de calibrado de segundo orden utilizando las PIF-EEM se realizó mediante U-PLS de acuerdo a lo descrito en 3.6.1.4. La figura 10 muestra la gráfica de la suma de cuadrados de los residuos (PRESS) en función del número de componentes extraídos (Validación cruzada), que permite seleccionar el número de componentes adecuados para describir los datos; y la regresión entre valores nominales y predichos por el modelo (autopredicción). Los parámetros analíticos de la curva de calibración obtenida se presentan en la tabla 2.

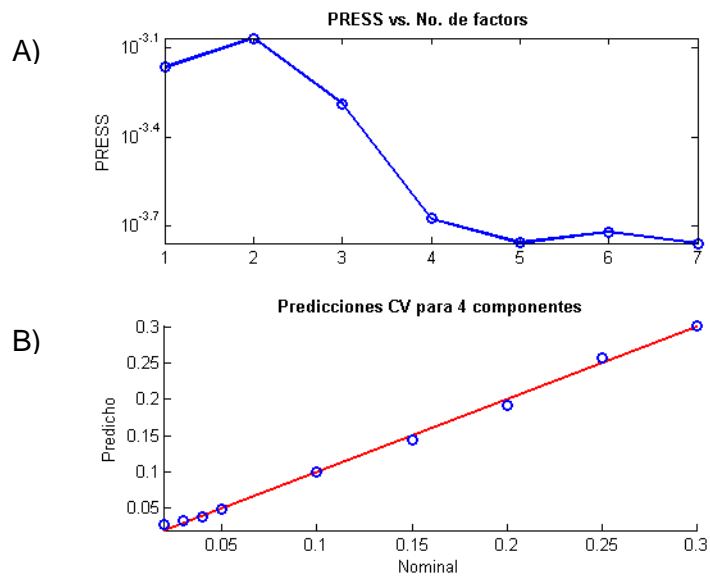


Figura 10: A) Suma de cuadrados de los residuos en función del número de componentes para el modelo U-PLS de los PIF-EEM. B) Regresión entre valores nominales y predichos por el modelo para 4 componentes.

Tabla 2: Parámetros analíticos para la curva de calibrado correspondiente al modelo U-PLS de los PIF-EEM de imidacloprid.

Parámetro	Valor
Nº componentes	4
RMSEC ($\mu\text{g/mL}$)	0,002
REP relativo (%)	1,6
R (y med. v/s y pred.)	0,9996
RMSEcv	0,005
REPcv relativo (%)	3,8
LOD promedio ($\mu\text{g/mL}$)	0,006

El RMSEcv, como medida de la capacidad de un modelo para predecir las muestras que no fueron utilizadas para construirlo durante el procedimiento de validación cruzada, muestra un buen ajuste dentro del modelo de calibración, por lo que la calibración desarrollada es útil para predecir las concentraciones contenidas en la curva de calibración, presentando un error relativo de predicción en la validación cruzada aproximadamente del 4%. Por otro lado, al realizar la auto-predicción de muestras de calibrado se obtuvo el valor de RMSEC de 0,002 ug/mL correspondiente a un error relativo de 1,6% en la predicción de las muestras, siendo un valor completamente aceptable.

El límite de detección promedio calculado sin interferente, en medio acuoso y sin considerar una pre-concentración previa fue de 6 ng/mL. Este fue similar al informado por Araujo y col. (2012) [43] para un método desarrollado con la misma base de generación de fotoproducto fluorescente de imidacloprid con un sistema FIA y fluorescencia clásica (5,32 ng/mL). Por otra parte, fue menor al informado por Gao y col. (2014) [74] utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia (60 ng/g), así como al obtenido por Ettiene y col. (2012) [75] utilizando cromatografía micelar electrocinética (215 ng/mL) . Sin embargo, es mayor al obtenido por Sanchez-Bayo y col. utilizando cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (0,021-0,039 ng/uL) [76].

Este tipo de calibración puede ser empleada en la determinación de imidacloprid en miel, pero la baja concentración en la que podría encontrarse y la gran complejidad de las muestras, con un número importante de fluoróforos potencialmente interferentes y muy difíciles de resolver aún con esta herramienta, hace casi ineludible realizar un pre-tratamiento de las muestras, con el objetivo de concentrar y/o disminuir la presencia de los interferentes.

4.3 Tratamiento de las muestras de miel

Al obtener la PIF-EEM de una muestra diluida de miel se observaron señales asociadas a diferentes compuestos presentes en esta y que se superpondrían a la señal de imidacloprid, tal como se aprecia en la figura 11.

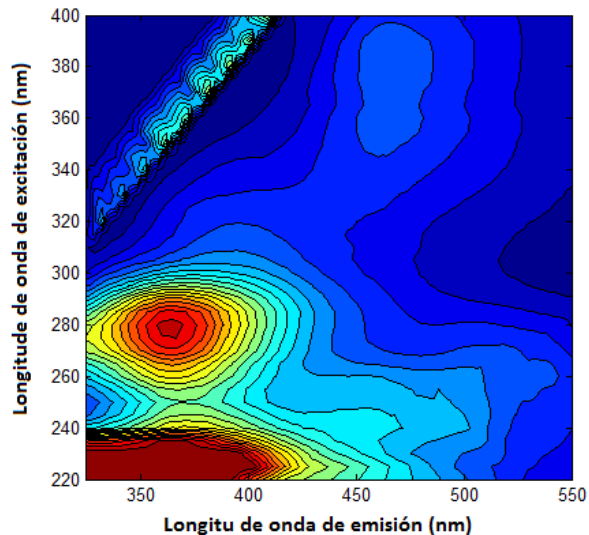


Figura 11: PIF-EEM de muestra de miel multifloral al 10% p/v en agua.

Los interferentes se asociaron por una parte a compuestos polifenólicos (ácidos fenólicos y/o flavonoides), con longitud de onda de excitación en el intervalo de 265 a 335 nm y emisión entre 358 a los 426 nm, como reporta Rodríguez Delgado y col., 2001 [77] ; y a productos de la reacción de Maillard, principalmente furfural e hidroximetilfurfural, que tienen máximos de emisión a los 440 y 425 nm respectivamente al ser excitados a 360 nm, reportado por Kulmyrzaev y Dufour, 2002 [78] y Birluez Aragon y col., 1998 [79] . A pesar de que es factible la utilización de calibración de segundo orden para cuantificar imidacloprid en presencia de interferentes, la disminución o eliminación del solapamiento producido conlleva una mejor capacidad de predicción y disminución en el límite de detección del método; siendo deseables límites menores a los niveles máximos de residuos europeos para imidacloprid (50µg/g en miel) Comisión europea EC pp 839/2008 [80] .

4.3.1 SPE sobre columnas de intercambio aniónico y catiónico (MAX y MCX)

La fase Oasis MAX contiene el co-polímero de N-vinil pirrolidona divinil benceno para interacciones hidrofóbicas de distinta afinidad y una amina cuaternaria de carga positiva permanente para intercambio aniónico. Por su parte la fase Oasis MCX contiene el mismo co-polímero y un grupo sulfonato de carga negativa permanente para intercambio catiónico.

Existen varios reportes acerca de los valores de pKa del imidacloprid, siendo los más confiables los mencionados por Chamberlain y col. 1996 [81], (1,56 y 11,12 para las especies ImiH_2^+ / ImiH y ImiH / Imi^-). Considerando esta información sobre la especie en la que se encontraría imidacloprid en función del pH, se evaluó la posibilidad de retenerlo y/o eluirlo en forma selectiva desde las fases MAX y MCX controlando las condiciones de carga y elución de acuerdo a lo descrito en 3.6.4.1. Se predijo la concentración de imidacloprid en las fracciones eluidas desde ambas columnas, utilizando las PIF-EEM mediante el modelo de calibración antes descrito. El resultado de la predicción se resume en la tabla 3, mientras que en la figura 12 se muestran las PIF-EEM obtenidas.

Tabla 3: Valores de concentración de imidacloprid predichos en las fracciones eluidas desde las columnas MCX y MAX (Se cargaron 0,25 ug y se disolvieron en un volumen final de 1 mL)

Valor predicho en ug/mL (% recuperación)			
Carga-Elución-Elución	MCX (SO_3^-)	MAX (N^+)	Interpretación
CA-EN	< LOD	0,155 (62%)	MCX: ImiH_2^+ fuertemente retenido, ImiH retención débil eluye con MeOH MAX: Por repulsión se pierde parte en la carga (ImiH_2^+) y parte es eluido con MeOH (ImiH).
CA-EN-EB	< LOD	-	MCX: ImiH_2^+ fuertemente retenido no pudo ser eluido en medio MeOH básico.
CN	0,260 (104%)	0,220 (88%)	MCX y MAX: ImiH es retenido en ambas fases por interacciones débiles, luego es eluido con MeOH.
CN-EB	< LOD	-	Eluido en la etapa anterior
CN-EA	-	<LOD	Eluido en la etapa anterior
CB-EN	0,190 (76%)	0,271 (108%)	MCX y MAX: ImiH es retenido en ambas fases por interacciones débiles, luego es eluido con MeOH.
CB-EN-EA	-	<LOD	Eluido en la etapa anterior

Código para el medio de carga y elución: CA: carga medio H_3PO_4 4% pH 2; CN: carga medio neutro pH 7 buffer fosfato; CB: carga medio NH_3 5% pH 10; EN: elusión con metanol; EB: elusión medio metanol con NH_3 5%; EA: elusión medio metanol con H_3PO_4 4%.

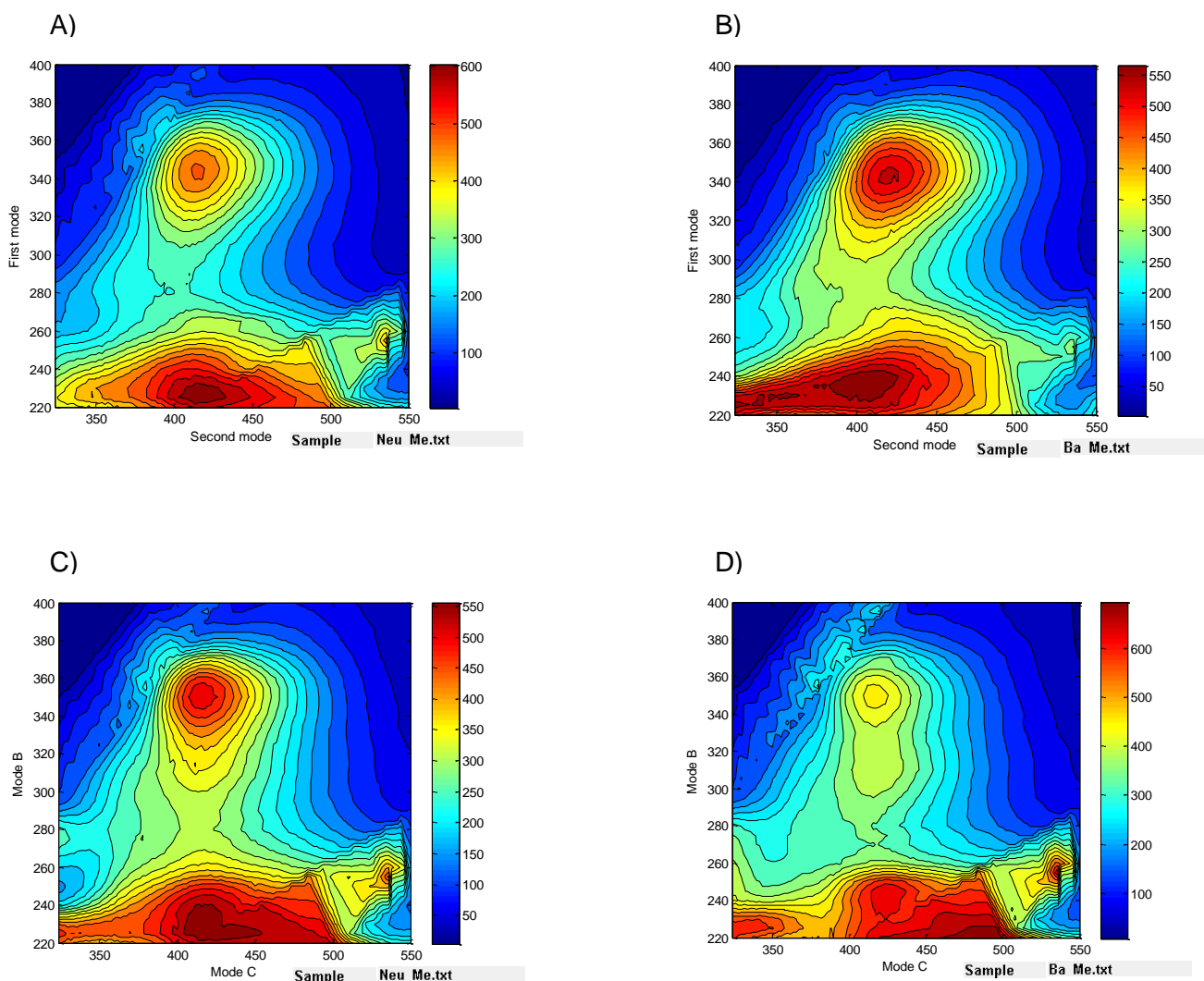


Figura 12: PIF-EEM de imidacloprid obtenidos luego de cargar el compuesto en medio neutro (A y C) y básico (B y D) y eluirlo con metanol desde columnas MAX (A y B) y MCX (C y D) (Se cargaron 0,25 ug y se disolvieron en un volumen final de 1 mL)

Las pruebas anteriores indicaron que imidacloprid es retenido y se puede eluir con MeOH desde ambas fases sólo cuando se carga en medio neutro y básico. Ello demuestra que tanto en el medio neutro como básico imidacloprid no tiene carga, mientras que en medio ácido estaría cargado positivamente, lo que es coincidente con los valores de pKa reportados por Chamberlain y col [81]. De esta forma en las Oasis MAX parte del compuesto sería eluido durante la carga en medio ácido y parte se eluye

posteriormente con metanol; mientras que en las Oasis MCX hay una retención casi irreversible, ya que no se observó el compuesto aún eluyendo con metanol + NH₃.

Se propuso el uso de estas columnas para eliminar los interferentes presentes en la miel considerando los supuestos de que: En medio neutro los ácidos fenólicos podrían ser retenidos por afinidad de carga (sobre MAX) o eliminarlos por repulsión (sobre las MCX); y los compuestos polifenólicos neutros más hidrofóbicos serían retenidos por afinidad tipo Van der Waals con el divinil benceno y los más polares por atracción dipolo-dipolo. Un lavado posterior con hexano-DCM permitiría eliminarlos antes de la elución final de imidacloprid con metanol.

Si bien los resultados en las columnas Oasis MAX y MCX eran prometedores para la separación del imidacloprid desde la miel ya sea cargando en medio neutro o básico, al aplicarlo en presencia de esta, según el procedimiento descrito en 3.6.4.1., se siguieron observando las interferencias antes vistas en los PIF-EEM. Además, estas columnas generaron blancos con fluorescencia significativa que enmascaraba completamente la fluorescencia del analito a concentraciones menores a 0,1 ug/ml, por lo que finalmente fueron descartadas para realizar el tratamiento de las muestras.

4.3.2 Partición L-L

Se consideró la opción de realizar una partición líquido-líquido para la separación del compuesto de la matriz, siguiendo el procedimiento descrito en 3.6.4.2. De acuerdo a la predicción de concentración realizada con los diferentes algoritmos ensayados, la extracción del compuesto disuelto en un medio acuoso básico utilizando diclorometano fue cuantitativa, tal como se resume en la tabla 4; ya que en este medio y tal como se discutió previamente, el imidacloprid se presentaría en forma neutra lo que favorece su paso al medio hidrofóbico. Sin embargo, al realizar este procedimiento para muestras de miel diluida se observó la presencia una importante señal fluorescente solapada con la señal del analito, como se pueden apreciar en las correspondientes PIF-EEM (figura 13); además de producirse una incorrecta separación de las fases debido a la formación de una emulsión.

Tabla 4: Valores promedio ($n=3$) de la concentración de imidacloprid predicha por los algoritmos quimiométricos luego de aplicar distintos tratamientos a muestras con $0,25 \mu\text{g}$ de imidacloprid disueltos en 5 ml de solución 5% de NH_3 o conteniendo además 1 g de miel.

Tipo tratamiento	Valor nominal (ug/ml)	Predicción concentración imidacloprid (ug/ml)		
		U-PLS-RBL	MCR-ALS	PARAFAC
Muestra acuosa				
PLL	0,100	0,105	0,130	0,100
PLL-Diat.	0,250	0,232	0,210	0,186
PLL-Diat-GBC	0,250	0,241	0,181	0,131
Muestra miel				
PLL-Diat	0,250	0,134	0,131	0,128
PLL-Diat-GBC	0,250	0,216	0,335	0,195

(Condiciones de predicción. Muestra acuosa: U-PLS: 4 componentes; 2 RBL. MCR-ALS: 2 componentes. PARAFAC: 2 componentes. Presencia de miel: U-PLS: 4 componentes; 2 RBL. MCR-ALS: 2 componentes. PARAFAC: 3 componentes).

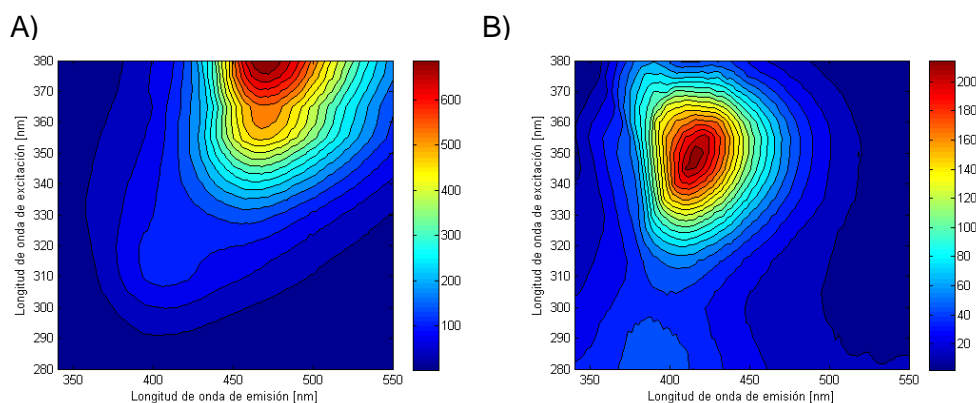


Figura 13: PIF-EEM para (A) 1 g de miel y (B) $0,25 \mu\text{g}$ de imidacloprid disueltos en solución 5% NH_3 extraídos con diclorometano y redisueltos en un volumen final de $2,5 \text{ ml}$.

4.3.3 Partición L-L soportada sobre tierra de diatomeas

Si bien la partición L-L con diclorometano permitió una extracción cuantitativa de imidacloprid desde muestras a pH básico, la formación de una emulsión difícil de romper al aplicarla con muestras de miel representó su principal limitante. Por evitar la emulsión se consideró el uso de columnas de tierra de diatomeas como soporte para este tipo de extracción, ya que además se ha reportado su uso en la determinación de imidacloprid en cera de abejas [82]. El procedimiento seguido se describe en la sección 3.6.4.3. Tal como se observa en la tabla 4, la recuperación estuvo comprendida entre un 75 y 92% de acuerdo a lo predicho por los diferentes algoritmos empleados. Al realizar el procedimiento en presencia de miel se observó la presencia de la señal correspondiente a polifenoles muy solapada con la del analito (figura 14), lo que demostró que la partición soportada sobre tierra de diatomeas, al igual que la partición normal, resultó ser poco selectiva. Esta interferencia quedó de manifiesto por la incapacidad de los algoritmos de predecir correctamente la concentración del analito en las muestras con miel (Tabla 4).

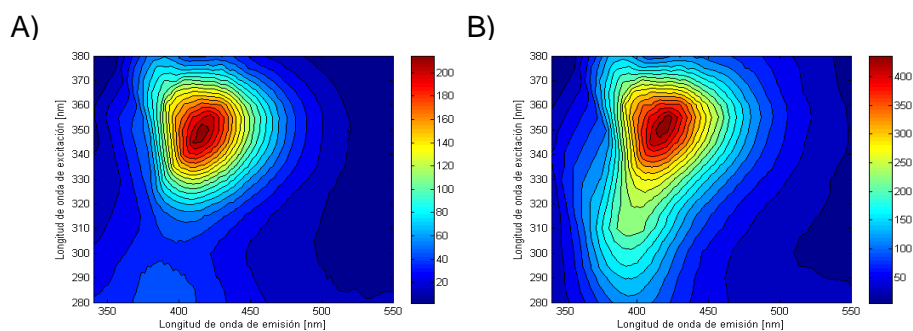


Figura 14: PIF-EEM para (A) 0,25 μg de imidacloprid en 5 ml de solución 5% NH_3 y (B) en la misma solución conteniendo 1 g de miel extraídos con diclorometano sobre soporte de tierra de diatomeas y redisueltos en un volumen final de 2,5 ml.

4.3.4. Partición L-L soportada en tierra de diatomeas y SPE sobre carbon grafitizado (DiatLLE-SPE)

Teniendo como objetivo la reducción de la señal asociada a los polifenoles, se realizó, posterior a la partición líquido-líquido soportada en tierra de diatomeas, una extracción en fase sólida con columnas de carbón grafitizado. Dada las características de este: Afinidad por compuestos orgánicos polares y no polares al utilizarse bajo condiciones de fase inversa; se consideró la posibilidad de eluir de forma selectiva imidacloprid desde esta fase mediante el uso de un solventa de polaridad media y controlando el volumen. Luego de múltiples pruebas de condiciones y solventes, finalmente se utilizó el procedimiento descrito en 3.6.5.4. (6 ml de mezcla de diclorometano-hexano 1:1). Los resultados obtenidos para la predicción de las concentraciones para muestras en solvente se pueden observar en la tabla 4. De los tres algoritmos evaluados, solamente UPLS-RBL realizó una predicción más certera. Al aplicar el procedimiento en muestras de miel se observó nuevamente una señal asociada a polifenoles (Figura 15); sin embargo esta resultó menos extensa en el intervalo espectral, permitiendo una mejor predicción del compuesto.

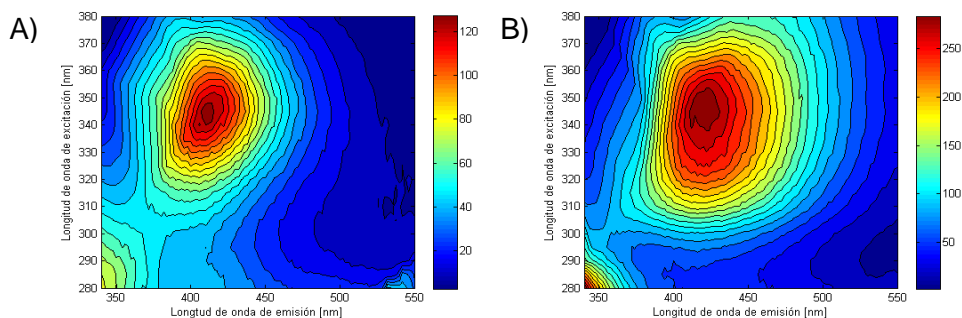


Figura 15: PIF-EEM para (A) 0,25 μg de imidacloprid en 5 ml de solución 5% NH_3 y (B) en la misma solución conteniendo 1 g de miel extraídos con diclorometano sobre soporte de tierra de diatomeas y redisueltos en un volumen final de 2,5 ml.

Los resultados de las predicciones en muestras de miel sometidas a este procedimiento se pueden apreciar en la tabla 4. Las recuperaciones predichas según UPLS-RBL y PARAFAC fueron de 86% y 78% respectivamente; mientras que MCR-ALS no logra discriminar de buena forma la señal del analito, sobrestimando su concentración (134%). Considerando que este fue el tratamiento que permitió obtener extractos con menor interferencia, fue el que finalmente se seleccionó.

4.4 Estudios sobre la inducción fotoquímica de fluorescencia de imidacloprid en presencia de matriz

Una vez seleccionado el método de tratamiento de muestra se realizó el estudio de la inducción fotoquímica de fluorescencia de imidacloprid en presencia de matriz obtenida con este procedimiento (4.3.4) y su relación con los resultados obtenidos en tampón fosfato solo (punto 4.1).

Tal como se aprecia en la figura 16 Se observó la misma disminución de la absorbancia a 270 nm que en medio de tampón solo, asociado a la foto-degradación del imidacloprid. El análisis de esta información espectral mediante MCR-ALS, usando las restricciones de no-negatividad (concentraciones y espectros de los componentes deben ser positivos) y de clausura, indicó la presencia de cuatro componentes (% carencia de ajuste 2,34 %), cuyos espectros puros y comportamiento frente a la creciente irradiación fueron similares a los obtenidos en tampón solo: Imidacloprid (componente 1) se degrada rápidamente al intermediario no fluorescente (componente 3) y subsecuentemente al producto final (componente 2). El fotoproducto fluorescente (componente 4) se genera por degradación directa de imidacloprid de forma paralela a la vía principal de degradación, alcanzando su máximo entre los 25 y 35 segundos; tal como se puede observar en la figura 17.

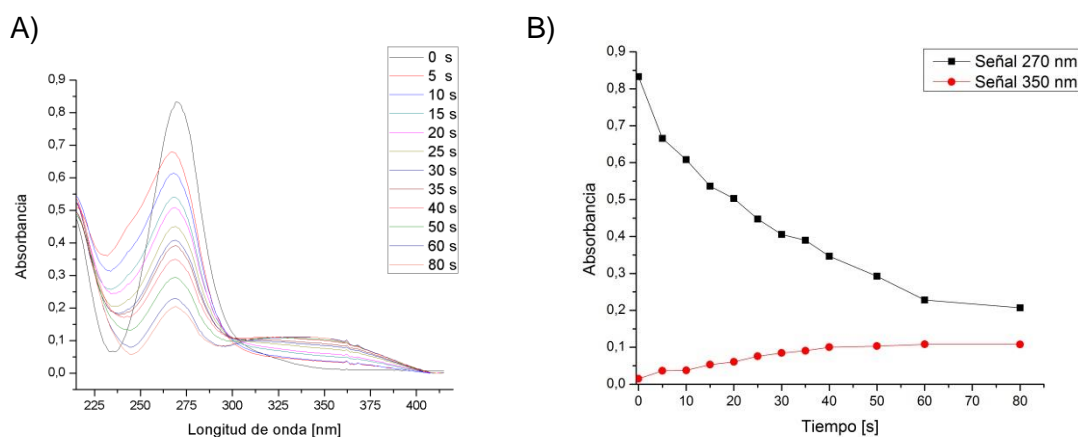


Figura 16: A) Espectros UV-vis de una solución de imidacloprid a 5 µg/ml en medio del extracto obtenido luego del tratamiento de muestra (PLL-diat-SPE-GCB) e irradiado a 254 nm desde 0 a 80 segundos. B) Variación del máximo de absorbancia a medida que aumenta el tiempo de irradiación a longitud de onda característica de imidacloprid (270 nm) y a aumento de señal de absorbancia (350 nm).

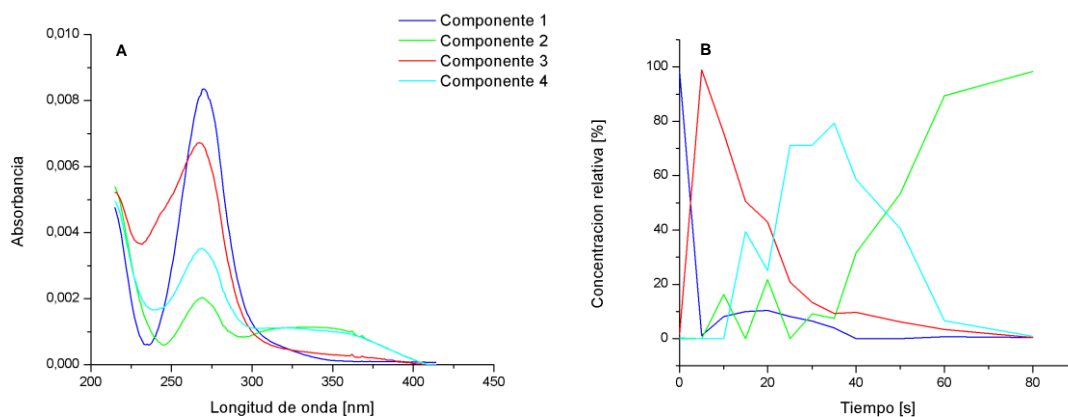


Figura 17: Perfiles calculados mediante MCR-ALS para cuatro componentes obtenidos con el análisis de los espectros UV-vis de soluciones de imidacloprid en matriz irradiadas a 254 nm desde 0 a 80 segundos A) espectros UV-vis puros; B) concentraciones. Componentes: 1 (azul), 2 (verde), 3(rojo) y 4 (cyan)

Considerando que la generación del foto-producto en función del tiempo fue similar en ausencia y presencia de la matriz, y con el fin de obtener un modelo de calibrado de segundo orden a partir de esta información, se obtuvieron los espectros de fluorescencia clásica en función del tiempo de irradiación en medio de tampón, según el procedimiento descrito en 3.6.2. Los perfiles de fluorescencia clásica versus tiempo de irradiación para dos concentraciones distintas de imidacloprid se presentan en la figura 18. En ella se observa claramente la aparición y subsecuente degradación del foto-producto fluorescente a medida que aumenta el tiempo de irradiación. Cabe mencionar que para la obtención de estos espectros tanto la irradiación como la lectura de fluorescencia se hizo en celdas de 700 uL de cuarzo, lo que probablemente explica la disminución en el tiempo de generación del fotoproducto (15 a 20 segundos), en comparación a lo observado previamente al irradiar en capilares de vidrio (sección 4.1), en los cuales hay menor penetración de la radiación UV, a pesar de su bajo grosor (0,25 mm).

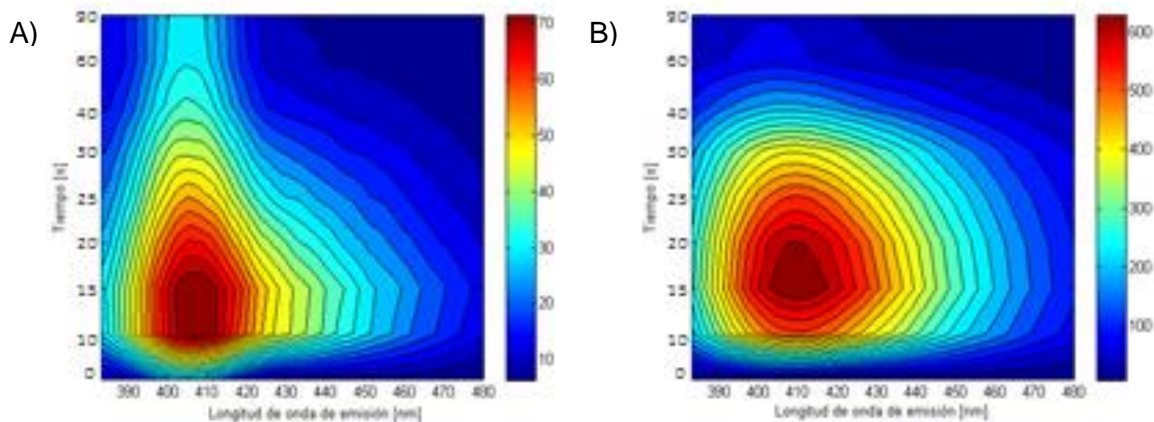


Figura 18: Perfiles de fluorescencia clásica versus tiempo de irradiación para una concentración de A) 0,025 µg/mL y B) 0,25 µg/mL.

Dada la característica de los datos de tres vías así generados, se consideró como buena alternativa la determinación de imidacloprid en matriz miel mediante la construcción de una curva de calibración de segundo orden utilizando fluorescencia clásica-tiempo de irradiación. Además se seleccionó MCR-ALS como algoritmo para la predicción de las concentraciones ya que se ajusta a las características de estos datos, donde se puede producir un desplazamiento del máximo de emisión en el tiempo de irradiación.

4.5. Calibración de segundo orden para fluorescencia clásica-tiempo

La curva de calibración se realizó mediante el procedimiento descrito en 3.6.6. La figura 19 muestra la gráfica de la suma de cuadrados de los residuos (PRESS) en función del número de componentes extraídos (Validación cruzada), que permite seleccionar el número de componentes adecuados para describir los datos; y la regresión entre valores nominales y predichos por el modelo (autopredicción). Los parámetros analíticos de la curva de calibración se presentan en la tabla 5.

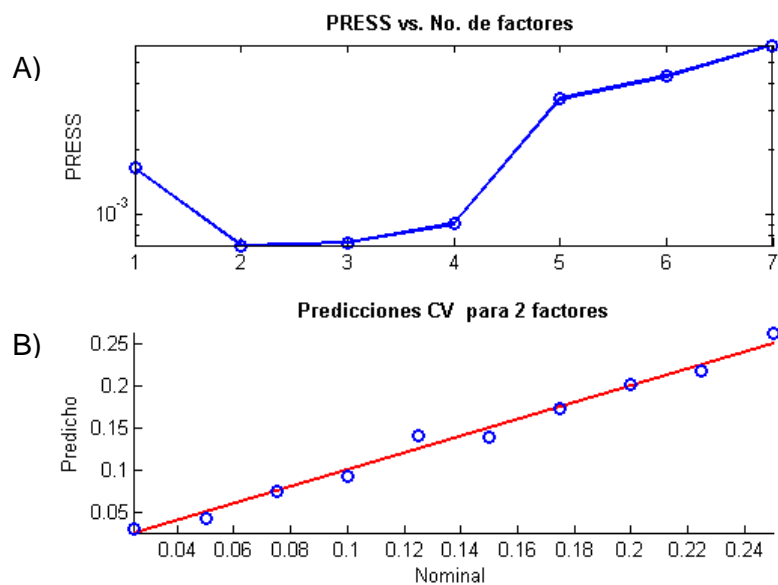


Figura 19: A) Suma de cuadrados de los residuos en función del número de componentes por el modelo U-PLS de los espectros de fluorescencia vs tiempo de irradiación. B) Regresión entre valores nominales y predichos por el modelo para 2 componentes.

Tabla 5: Parámetros analíticos para la curva de calibrado correspondiente al modelo U-PLS de los los espectros de fluorescencia vs tiempo de irradiación de imidacloprid.

Parámetro	Valor
Nº componentes	2
RMSEC	0,007
REP relativo (%)	4,9
R	0,9917
RMSEcv	0,009
REPcv relativo (%)	6,2
LOD promedio	0,005 ug/mL

El modelo de calibrado presentó un error relativo de predicción menor al 5% y de la validación cruzada menor al 7%, siendo mayores que al usar los PIF-EEM. Sin embargo, son valores aceptables para el intervalo de concentraciones estudiadas. Debido a ciertos inconvenientes producidos durante el trabajo, estas medidas se registraron utilizando un voltaje de 680 V en el foto-multiplicador, lo que produjo un aumento del ruido, afectando a las señales de concentración más baja, lo que daría cuenta del aumento del RMSEcv.

El límite de detección promedio obtenido sin interferentes y en medio acuoso fue de 0,005 ug/ml, obteniéndose una señal bien definida en bajas concentraciones, como se puede observar en la figura 18.

4.6 Evaluación de recuperación patrones sometidos a DiatLLE-SPE

La evaluación de la recuperación de imidacloprid desde una solución acuosa sometida a DiatLLE-SPE se realizó según el procedimiento descrito en 3.6.7. Se observó la aparición de señales superpuestas al analito, las cuales pueden ser asociadas a residuos de las columnas utilizadas en el tratamiento de muestra, no obstante el algoritmo quimiométrico fue capaz de diferenciarlas perfectamente, obteniendo una recuperación promedio del 101% (Tabla 6). Los perfiles de las muestras de recuperación se muestran en la figura 20.

Tabla 6: Predicción mediante MCR-ALS de la recuperación de soluciones acuosas de imidacloprid sometidas a DiatLLE-SPE y medidas de fluorescencia vs tiempo irradiación (Pto. 0,050: 2 componentes; Pto. 0,100: 3 componentes; Pto. 0,200: 2 componentes). Intervalo utilizado: 383-460 nm.

Concentración nominal [ug/mL]	Concentración predicha [ug/mL]	Recuperación [%]
0,050	0,051	102
0,100	0,104	104
0,200	0,191	96
	Recuperación promedio	101

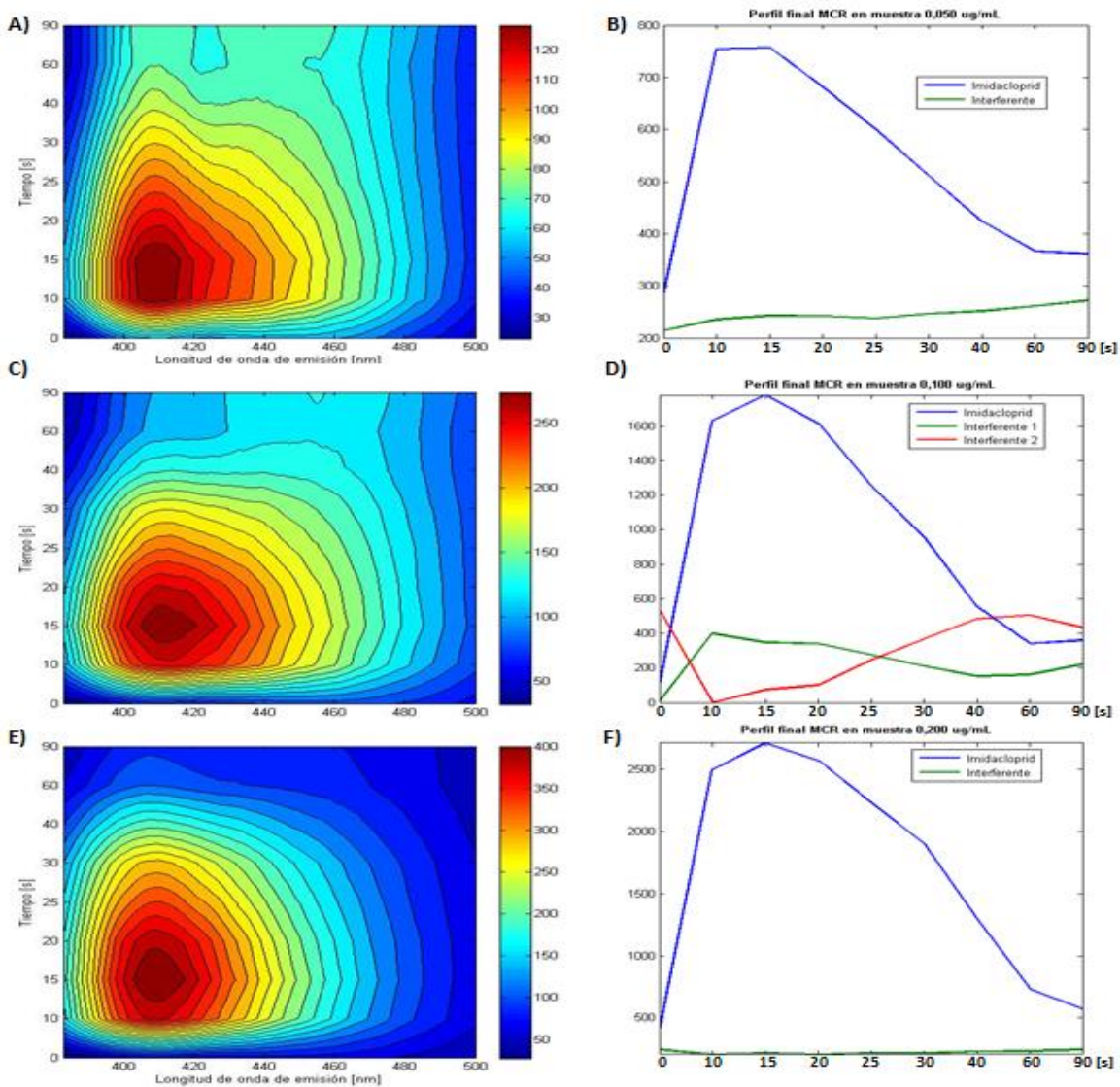


Figura 20: Perfiles de las muestras de recuperación de soluciones acuosas de imidacloprid sometidas a DiatLLE-SPE y medidas de fluorescencia vs tiempo irradiación. A) 0,050 ug/mL; C) 0,100 ug/mL; D) 0,200 ug/mL; perfiles obtenidos por MCR-ALS para las muestras de recuperación de soluciones acuosas de imidacloprid sometidas a DiatLLE-SPE y medidas de fluorescencia vs tiempo irradiación. B) 0,050 ug/mL; D) 0,100 ug/mL; F) 0,200 ug/mL.

4.7 Análisis set de validación

Se preparó un set de validación que permitiese evaluar la capacidad predictiva del modelo de segundo orden de fluorescencia clásica-tiempo. El procedimiento utilizado para ello está descrito en la sección 3.6.8. Tal como se presenta en la Figura 21, a pesar de la presencia de la señal de la matriz de miel, fue factible observar el decaimiento de la fluorescencia del compuesto en función del tiempo de irradiación. Por el contrario, en los

PIF-EEM para imidacloprid en presencia de miel se lograba de manera muy parcial distinguir la señal del fotoproducto, debido al importante solapamiento de las señales.

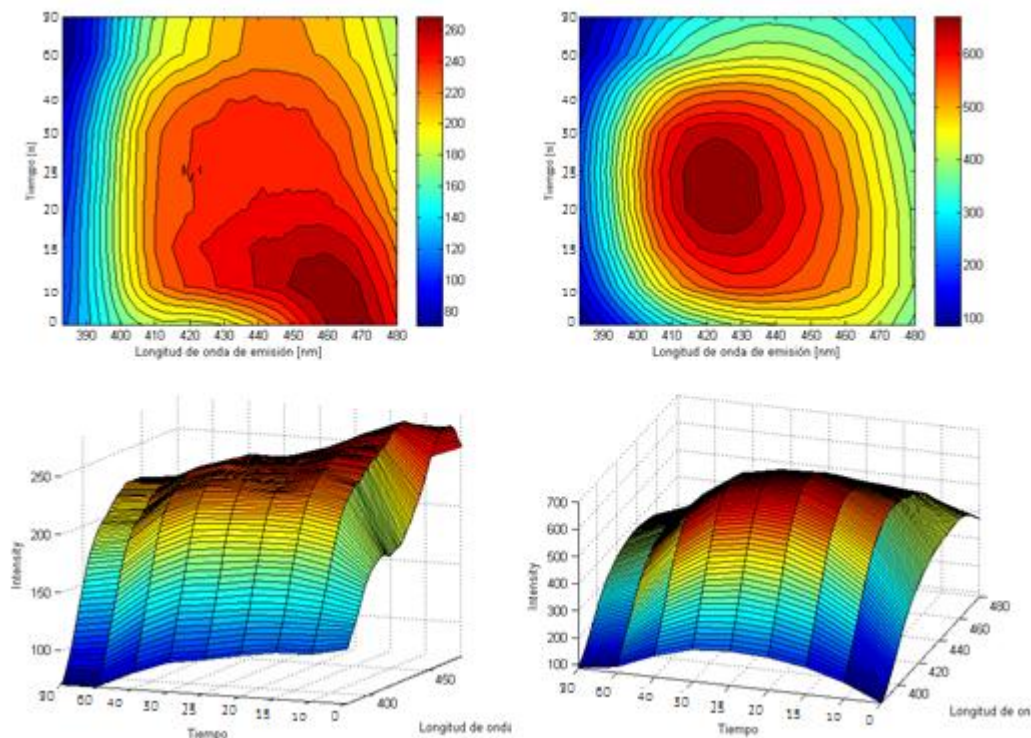


Figura 21: Perfiles de contorno de fluorescencia clásica-tiempo de irradiación y superficie 3-D para muestras de 1 g de miel tratada y fortificada con $0,03 \mu\text{g/g}$ (A y C) y $0,25 \mu\text{g/g}$ (B y D) de imidacloprid.

Debido al arreglo matricial de estos datos: filas correspondientes a tiempos de irradiación (perfiles de concentración “C”) y columnas a emisión a diferentes λ (espectros de emisión “S”); estos son particularmente adecuados para ser analizados mediante MCR al ubicar las matrices adyacentes en el mismo plano (extensión matricial) en vez de formar un arreglo de tres vías. Esto permite a MCR analizar datos que hayan perdido la trilinearidad en uno de sus modos, como efectivamente sucedió en este caso debido a las modificaciones y diferencias en el tiempo de generación del fotoproducto entre las muestras de calibración y las del set de validación. Por ello se utilizó una extensión de matriz en modo columna, equivalente a un “apilamiento” en la dimensión del tiempo, ya que los espectros mantienen su forma en la dimensión espectral.

A pesar de tener una curva de calibración construida desde los 0,025 hasta los 0,25 $\mu\text{g/mL}$, se decidió reducir el rango de concentración en las muestras del set de validación y de prueba, debido a que por las concentraciones de imidacloprid encontradas en polen y néctar (1 a 8,6 ng g^{-1} y de <1 a 51 ng mL^{-1} , respectivamente (EFSA, 2012 [17])), se consideró poco probable encontrar concentraciones mayores a estos valores en miel. Por ello la concentración máxima para la validación se limitó a un valor 3 veces el límite de residuos máximo permitido de imidacloprid en miel, respecto a la legislación en la Union Europea (0,050 $\mu\text{g/g}$; Regulación (EC) No. 396/2005 [30]). Los resultados de las predicciones de las concentraciones para el set de validación se presentan en la Tabla 7. La regresión lineal entre los valores nominales y los predichos y el test de región elíptica de confianza conjunta (EJCR) y se presentan en la figura 22.

Tabla 7: Concentraciones ($\mu\text{g/g}$) predichas para muestras del set de validación mediante MCR-ALS. Figuras de mérito para el set de validación.

Muestra	Añadido	Predicho
V1	0,030	0,040
V2	0,045	0,040
V3	0,060	0,051
V4	0,080	0,091
V5	0,110	0,107
V6	0,135	0,134
Recuperación promedio (%)		103
RMSEP ($\mu\text{g g}^{-1}$)		0,007
REP (%)		9.6
γ^{-1} ($\mu\text{g g}^{-1}$)		0,001
$LOD = 3.3\gamma^{-1}$ ($\mu\text{g g}^{-1}$)		0,005

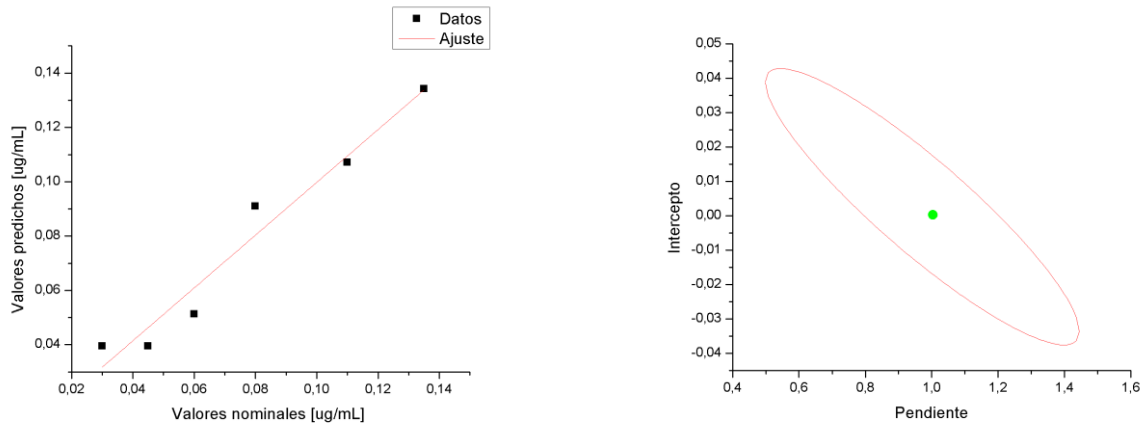


Figura 22: A) Regresión lineal de valores nominales versus valores predichos: ($C_{predicha}=0,972 \times C_{nominal}+0,0003$); $R=0,974$. B) Test de región elíptica de confianza conjunta (EJCR) para set de validación.

La recuperación promedio fue de 103% con un error de predicción relativo de 9,6%; valores considerados como adecuados dada la complejidad de las muestras y el nivel de concentración. Por otra parte, el test de EJCR (Figura 22B) no mostró diferencias significativas (95% confianza) entre los valores nominales. Sin embargo la amplitud de la elipse muestra que existe dispersión en los datos estudiados, lo que se confirma en la regresión de las concentraciones nominales versus las concentraciones predichas (figura 22A), las que presentan un R de 0,974. Por otra parte, el límite de detección promedio obtenido de 0,005 ug/g fue el mismo que el obtenido para el calibrado en solvente cumpliendo el estándar de ser inferior al límite de residuos máximo europeo.

4.8 Análisis set de prueba

Se realizó el análisis del set de prueba de acuerdo al procedimiento descrito en 3.6.9 para evaluar la capacidad predictiva del modelo de segundo orden de fluorescencia clásica-tiempo asociado a la recuperación con el tratamiento elegido para de las muestras de miel (DiatLLE-SPE). Los resultados de las predicciones para el set de prueba se presentan en la tabla 8. La regresión lineal entre los valores nominales y los predichos y el test de región elíptica de confianza conjunta (EJCR) y se presentan en la figura 23.

Tabla 8: Concentraciones (ug/g) predichas para muestras del set de prueba mediante MCR-ALS. Figuras de mérito para el set de prueba.

Muestra	Añadido	Predicho
P1	0,030	0,036
P2	0,060	0,048
P3	0,070	0,108
P4	0,080	0,072
P5	0,090	0,103
P6	0,110	0,101
P7	0,120	0,150
P8	0,135	0,114
Recuperación promedio (%)		107
RMSEP (ug g⁻¹)		0,019
REP (%)		22,5
γ^{-1} (μg g⁻¹)		0,001
LOD = 3.3γ^{-1}(ug g⁻¹)		0,005

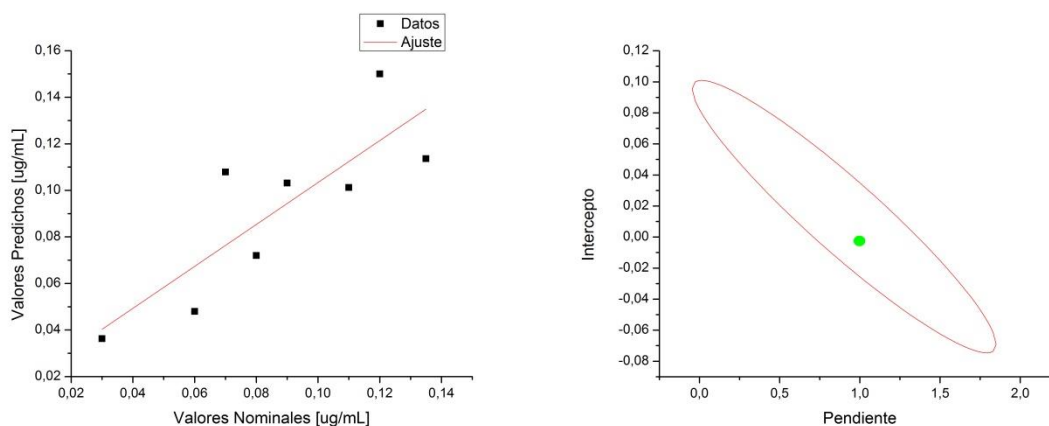


Figura 23: A) Regresión lineal de valores nominales versus valores predichos: ($C_{predicha}=0,9013 \times C_{nominal}+0,0132$); $R^2=0,688$. B) Test de región elíptica de confianza conjunta (EJCR) para set de prueba.

La recuperación promedio fue de 107%; sin embargo, el error de predicción relativo para este set (22,5%) fue mayor que para el set de validación; atribuible a que en este caso se incluye como fuente de error todo el procedimiento de extracción. Si bien el test de EJCR (Figura 23B) no mostró diferencias significativas (95% confianza) entre los valores nominales y los predichos; la amplitud de la elipse da cuenta de una dispersión importante así como el valor del coeficiente de correlación ($R = 0,688$) en la regresión correspondiente (Figura 23A). La alta variabilidad y complejidad de la matriz, un considerable solapamiento de la señal del analito y la baja concentración a determinar son las causas de esta dispersión. Al igual que para el set de validación se obtuvo un límite de detección de 0,005 ug/g. Cabe puntualizar en este sentido que la gran mayoría de los trabajos que utilizan calibración multivariada lo hacen con muestras relativamente simples y/o con una matriz constante, como son muestras farmacéuticas, aguas o en alta concentraciones del analito a analizar [83–85], por lo que una alta dispersión y un alto error relativo de predicción era esperable y dada las condiciones en las que fue realizado el análisis, dichos valores pueden ser considerados aceptables.

4.9 Muestras reales

El método desarrollado fue aplicado en el análisis de un grupo de tres muestras de miel artesanales mono y multifloral. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 9. Los perfiles de MCR-ALS se presentan en la figura 24.

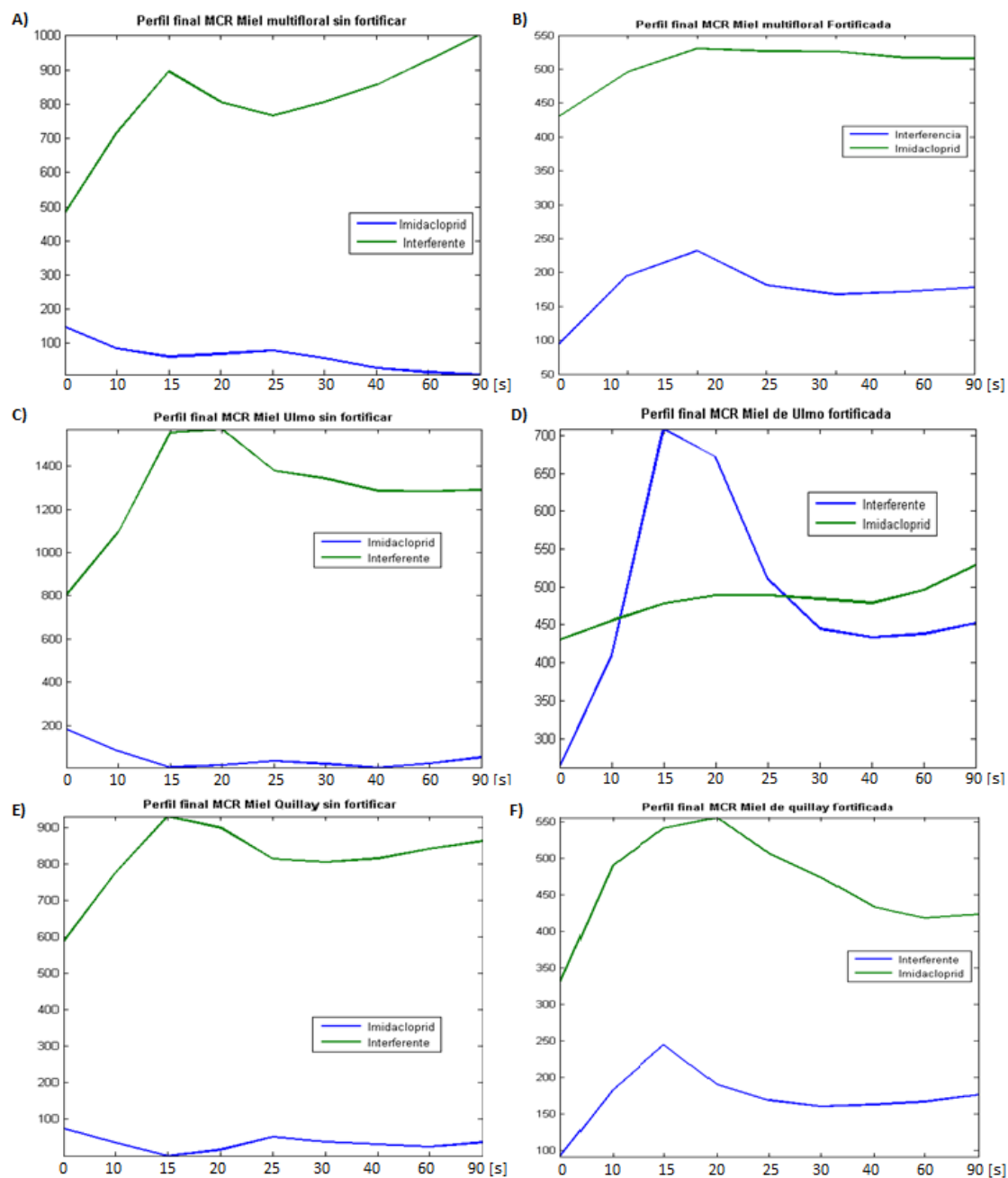


Figura 24: Perfiles obtenidos por MCR-ALS de las muestras de miel artesanales sometidas a DiatLLE-SPE y medidas de fluorescencia vs tiempo irradiación. A) Multifloral ; B) Multifloral fortificada con 0,050 μ g de imidacloprid.

Tabla 9: Concentraciones (ug/g) predichas para muestras de miel artesanal sin fortificar y fortificadas a 0,05 ug/g mediante MCR-ALS.

Miel	Sin fortificar	Muestra 1	Muestra 2	Promedio (%)
Quillay	<LOD	0,067	0,071	0,069 (138)
Ulmo	<LOD	0,061	0,049	0,055 (110)
Multifloral	<LOD	0,058	0,061	0,060 (120)

Se puede observar que no se detectó la presencia de imidacloprid en ninguna de las muestras analizadas sin fortificar. Para la miel de ulmo se obtuvo una recuperación promedio de 110%, mientras que para multifloral y de quillay fue de un 120% y 138%, respectivamente para las muestras fortificadas. Considerando el error de predicción de 21% obtenido en el análisis del set de prueba descrito en 4.7, se puede considerar que la miel de ulmo y la multifloral no muestran presencia del compuesto. En contraparte la concentración de predicha para la miel de quillay muestra una recuperación del 138%, lo que sobrepasa el error de predicción, por lo que se puede considerar la presencia de imidacloprid en esta miel. No obstante esta concentración se encuentra bajo el límite de detección del método y, por lo tanto, bajo el límite de residuos máximos permitidos para la Unión Europea [30].

5. CONCLUSIONES

La utilización de fluorescencia foto-inducida en el tiempo; asociada a resolución multivariada de curvas con mínimos cuadrados alternantes (MCR-ALS); demostró ser un método adecuado para la determinación de imidacloprid en muestras de miel, en presencia de interferentes (compuestos polifenólicos y furfurales). Sin embargo, el error relativo de predicción de 22,5% alcanzado con MCR-ALS indica que persisten compuestos interferentes que dificultan la predicción del analito en la matriz debido al gran solapamiento espectral y a las bajas concentraciones a determinar. Cabe hacer notar que a pesar de estar constituida en más de un 95% por azúcares y agua, la miel es una matriz de alta complejidad debido a la presencia de compuestos polifenólicos y productos de la reacción de Maillard (furfural, hidroximetilfurfural y furosina) que presentan fluorescencia. La concentración de estos constituyentes en la miel es variable y depende de la flora accesible a las abejas, la madurez del producto, su exposición a altas temperaturas y a la luz. Además, en el caso de miel artesanal no procesada se incluyen cantidades variables de cera, polen e inclusive partes de abejas. El límite de detección obtenido mediante esta metodología (0,005 ng/g) permite la determinación de imidacloprid en muestras de miel, tanto comercial como artesanal, bajo el límite de residuos permitidos para imidacloprid en miel en la Unión Europea (0,050 ng/g), sin embargo, debido al alto error relativo de predicción, el método es más adecuado como metodología de screening que como metodología cuantitativa.

Por otro lado, los estudios sobre la inducción fotoquímica de la fluorescencia de imidacloprid en tampón y en presencia de la matriz mediante MCR-ALS, mostraron que es probable que la formación del producto fluorescente en ambos casos se produzca en forma paralela a la ruta principal de foto-degradación del imidacloprid en medio básico, sin embargo es necesaria la utilización de técnicas de identificación para confirmarlo.

La partición líquido-líquido soportada sobre columnas de tierra de diatomeas y limpieza mediante extracción en fase sólida sobre carbón grafitizado (DiatLLE-SPE), demostró ser un método adecuado para la extracción de imidacloprid en muestras de miel presentando una recuperación promedio del 98%. No obstante la extracción no fue selectiva, observándose la presencia de interferentes (compuestos polifenólicos y furfurales) los cuales, gracias a la calibración multivariada de segundo orden, pudieron ser

matemáticamente modelados y removidos para la cuantificación. Esto muestra que la utilización de perfiles de datos de segundo orden asociados a calibración multivariada es una poderosa herramienta analítica, permitiendo la cuantificación de bajas concentraciones de imidacloprid en muestras de miel de composición variable que presentaban una alta superposición de señales.

El método desarrollado se aplicó sobre muestras de miel artesanal, tanto multi como homofloral (ulmo y quillay), obteniéndose concentraciones bajo el límite de detección del método, por lo que no se observa la presencia de imidacloprid en ninguna de las muestras estudiadas.

6. REFERENCIAS

- [1] E. Stokstad, **The Case of The Empty Hives**, Science (80). 316 (2007) 970–972.
- [2] D. Vanengelsdorp, J.D. Evans, C. Saegerman, C. Mullin, E. Haubruge, B.K. Nguyen, et al., **Colony collapse disorder: a descriptive study.**, PLoS One. 4 (2009).
- [3] T. Farooqui, **A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: A unique hypothesis**, Neurochem. Int. 62 (2013) 122–136.
- [4] T. Blacquièrre, G. Smagghe, C.A.M. van Gestel, V. Mommaerts, **Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment**, Ecotoxicology. 21 (2012) 973–992.
- [5] M.A. Aizen, L.A. Garibaldi, S.A. Cunningham, A.M. Klein, **How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production.**, Ann. Bot. 103 (2009) 1579–88.
- [6] R. Underwood, D. VanEngelsdorp, **Colony collapse disorder: Have we seen this before?**, Bee Cult. (2007) 13–18.
- [7] F.L.W. Ratnieks, N.L. Carreck, **Carity on honey bee collapse?**, Science (80). 327 (2010) 152–153.
- [8] S. Maini, P. Medrzycki, C. Porrini, **The puzzle of honey bee losses: A brief review**, Bull. Insectology. 63 (2010) 153–160.
- [9] E. Guzmán-Novoa, L. Eccles, Y. Calvete, J. MCGowan, P.G. Kelly, A. Correa-Benítez, **Varroa destructor is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (Apis mellifera) colonies in Ontario, Canada**, Apidologie. 41 (2010) 443–450.
- [10] J. Martínez, G. Leal, P. Conget, **Nosema ceranae an emergent pathogen of Apis mellifera in Chile.**, Parasitol. Res. 111 (2012) 601–7.
- [11] M. Hges, R. Martín-Hernández, A. Meana, **Nosema ceranae in Europe: an emergent type C noseiosis**, Apidologie. 41 (2010) 375–392.
- [12] I. Fries, **Nosema ceranae in European honey bees (Apis mellifera).**, J. Invertebr. Pathol. 103 Suppl (2010) S73–9.

- [13] Y.P. Chen, Z.Y. Huang, **Nosema ceranae** , a newly identified pathogen of *Apis mellifera* in the USA and Asia, *Apidologie*. 41 (2010) 364–374.
- [14] M. Tomizawa, J.E. Casida, **Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action.**, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45 (2005) 247–68.
- [15] P. Jeschke, R. Nauen, M. Schindler, A. Elbert, **Overview of the status and global strategy for neonicotinoids.**, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 2897–908.
- [16] S.J. Castle, F.J. Byrne, J.L. Bi, N.C. Toscano, **Spatial and temporal distribution of imidacloprid and thiamethoxam in citrus and impact on *Homalodisca coagulata* populations.**, *Pest Manag. Sci.* 61 (2005) 75–84.
- [17] E.F.S. Authority, **Statement on the findings in recent studies investigating sub-lethal effects in bees of some neonicotinoids in consideration of the uses currently authorised in Europe.**, *EFSA J.* 10 (2012) 2752.
- [18] USEPA, **White Paper in Support of the Proposed Risk Assessment Process for Bees**, 2012.
http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/surfwtr/presentations/epa_whitepaper.pdf
 (acceso Octubre 5, 2015).
- [19] S. Suchail, D. Guez, L.P. Belzunces, **Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*.**, *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (2001) 2482–6.
- [20] J.E. Cresswell, **A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees.**, *Ecotoxicology.* 20 (2011) 149–57.
- [21] E.C. Yang, Y.C. Chuang, Y.L. Chen, L.H. Chang, **Abnormal Foraging Behavior Induced by Sublethal Dosage of Imidacloprid in the Honey Bee (*Hymenoptera: Apidae*),** *J. Econ. Entomol.* 101 (2008) 1743–1748.
- [22] E.-C. Yang, H.-C. Chang, W.-Y. Wu, Y.-W. Chen, **Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage.**, *PLoS One.* 7 (2012) e49472.
- [23] P. Han, C.-Y. Niu, C.-L. Lei, J.-J. Cui, N. Desneux, **Quantification of toxins in a *Cry1Ac* + *CpTI* cotton cultivar and its potential effects on the honey bee *Apis mellifera* L.**, *Ecotoxicology.* 19 (2010) 1452–9.
- [24] V. Mommaerts, S. Reynders, J. Boulet, L. Besard, G. Sterk, G. Smagghe, **Risk**

assessment for side-effects of neonicotinoids against bumblebees with and without impairing foraging behavior., *Ecotoxicology*. 19 (2010) 207–15.

- [25] M. Henry, M. Béguin, F. Requier, O. Rollin, J.-F. Odoux, P. Aupinel, et al., **A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees.**, *Science*. 336 (2012) 348–50.
- [26] M.E. Colin, J.M. Bonmatin, I. Moineau, C. Gaimon, S. Brun, J.P. Vermandere, **A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides.**, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 47 (2004) 387–95.
- [27] C. Alaux, J.-L. Brunet, C. Dussaubat, F. Mondet, S. Tchamitchan, M. Cousin, et al., **Interactions between Nosema microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*).**, *Environ. Microbiol.* 12 (2010) 774–82.
- [28] C. Vidau, M. Diogon, J. Aufauvre, R. Fontbonne, B. Viguès, J.-L. Brunet, et al., **Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by Nosema ceranae.**, *PLoS One*. 6 (2011) e21550.
- [29] Ministerio de Salud, Subsecretaría de Salud Pública, **Resolución Exenta 33 FIJA TOLERANCIAS MÁXIMAS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN ALIMENTOS Y DEJA SIN EFECTO LA RESOLUCION N° 581 EXENTA, DE 1999, Y SUS MODIFICACIONES**, n.d. <http://www.leychile.cl/Navegar?idNorma=1010986> (acceso Septiembre 15, 2015).
- [30] European Parliament, Council of the European Union, **Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC with EEA relevance.**, 2005.
- [31] European Parliament, Council of the European Union, **Reglamento de Ejecución (UE) n° 485/2013 de la Comisión, de 24 de mayo de 2013, por el que se modifica el Reglamento de Ejecución (UE) n° 540/2011 en lo relativo a las condiciones de aprobación de las sustancias activas clotianidina, tiametoxam e imidacloprid**, 2013.
- [32] M. García-Chao, M.J. Agruña, G.F. Calvete, V. Sakkas, M. Llompart, T. Dagnac, **Validation of an off line solid phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of systemic insecticide residues in honey and pollen samples collected in apiaries from NW Spain**, *Anal. Chim. Acta*. 672 (2010) 107–113.

- [33] P. Fidente, S. Seccia, F. Vanni, P. Morrica, **Analysis of nicotinoid insecticides residues in honey by solid matrix partition clean-up and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry**, J. Chromatogr. A. 1094 (2005) 175–178.
- [34] C. Pirard, J. Widart, B.K. Nguyen, C. Deleuze, L. Heudt, E. Haubruge, et al., **Development and validation of a multi-residue method for pesticide determination in honey using on-column liquid-liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry**, J. Chromatogr. A. 1152 (2007) 116–123.
- [35] L. Wiest, A. Buleté, B. Giroud, C. Fratta, S. Amic, O. Lambert, et al., **Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection**, J. Chromatogr. A. 1218 (2011) 5743–5756.
- [36] D. Tomasini, M.R.F. Sampaio, S.S. Caldas, J.G. Buffon, F. a. Duarte, E.G. Primel, **Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified QuEChERS method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry**, Talanta. 99 (2012) 380–386.
- [37] P. Jovanov, V. Guzsvány, M. Franko, S. Lazić, M. Sakač, B. Šarić, et al., **Multi-residue method for determination of selected neonicotinoid insecticides in honey using optimized dispersive liquid–liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry**, Talanta. 111 (2013) 125–133.
- [38] G.P. de Pinho, A.A. Neves, M.E.L.R. de Queiroz, F.O. Silvério, **Optimization of the liquid-liquid extraction method and low temperature purification (LLE-LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography**, Food Control. 21 (2010) 1307–1311.
- [39] Z. Bargańska, M. Ślebioda, J. Namieśnik, **Pesticide residues levels in honey from apiaries located of Northern Poland**, Food Control. 31 (2013) 196–201.
- [40] G. Tanner, C. Czerwenka, **LC-MS/MS analysis of neonicotinoid insecticides in honey: Methodology and residue findings in Austrian honeys**, J. Agric. Food Chem. 59 (2011) 12271–12277.
- [41] J. Luis Vilchez, R. El-Khattabi, R. Blanc, A. Navalón, **Photochemical-fluorimetric method for the determination of the insecticide imidacloprid in water samples**, Anal. Chim. Acta. 371 (1998) 247–253.
- [42] J.. Vilchez, M.. Valencia, A. Navalón, B. Molinero-Morales, L.. Capitán-Vallvey,

Flow injection analysis of the insecticide imidacloprid in water samples with photochemically induced fluorescence detection, Anal. Chim. Acta. 439 (2001) 299–305.

- [43] K. Araujo, G. Ettiene, M. Hernández, A.C.H. Pérez, **Desarrollo de un método en línea para la determinación del insecticida imidacloprid en muestras de agua empleando detección por fluorescencia inducida fotoquímicamente** **Development of an online method for the determination of the insecticide imidacloprid**, Rev. La Fac. Agron. LUZ. 29 (2012) 542–559.
- [44] J. López Flores, a. Molina Díaz, M.L. Fernández de Córdova, **Development of a photochemically induced fluorescence-based optosensor for the determination of imidacloprid in peppers and environmental waters**, Talanta. 72 (2007) 991–997.
- [45] E. Sanchez, B.R. Kowalski, **Generalized rank annihilation factor analysis**, Anal. Chem. 58 (1986) 496–499.
- [46] K.S. Booksh, B.R. Kowalski, **Theory of Analytical Chemistry**, Anal. Chem. 66 (1994) 782A–791A.
- [47] R.G. Brereton, **Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry**, Analyst. 125 (2000) 2125–2154.
- [48] G.M. Escandar, H.C. Goicoechea, A. Muñoz de la Peña, A.C. Olivieri, **Second- and higher-order data generation and calibration: A tutorial**, Anal. Chim. Acta. 806 (2014) 8–26.
- [49] R. Bro, **Multi-way Analysis in the Food Industry. Models, algorithms and applications**. Ph. D. Thesis. Universidad de Amsterdam. 1998.
- [50] R. Bro, **PARAFAC. Tutorial and applications**, Chemom. Intell. Lab. Syst. 38 (1997) 149–171.
- [51] C.M. Andersen, R. Bro, **Practical aspects of PARAFAC modeling of fluorescence excitation-emission data**, J. Chemom. 17 (2003) 200–215.
- [52] R. Tauler, **Multivariate curve resolution applied to second order data**, Chemom. Intell. Lab. Syst. 30 (1995) 133–146.
- [53] H. Abdollahi, R. Tauler, **Uniqueness and rotation ambiguities in Multivariate Curve Resolution methods**, Chemom. Intell. Lab. Syst. 108 (2011) 100–111.

- [54] A.K. Smilde, R. Tauler, J. Saurina, R. Bro, **Calibration methods for complex second-order data**, *Anal. Chim. Acta.* 398 (1999) 237–251.
- [55] G.C. Derringer, S. RR, **Simultaneous Optimization of Several Response Variable**, *J. Qual. Technol.* 12 (1980).
- [56] A.C. Olivieri, **On a versatile second-order multivariate calibration method based on partial least-squares and residual bilinearization: Second-order advantage and precision properties**, *J. Chemom.* 19 (2005) 253–265.
- [57] A.C. Olivieri, G.M. Escandar, A.M. de la Peña, **Second-order and higher-order multivariate calibration methods applied to non-multilinear data using different algorithms**, *TrAC Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 607–617.
- [58] J. Jaumot, R. Gargallo, A. de Juan, R. Tauler, **A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB**, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 76 (2005) 101–110.
- [59] A.C. Olivieri, H.-L. Wu, R.-Q. Yu, **MVC2: A MATLAB graphical interface toolbox for second-order multivariate calibration**, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 96 (2009) 246–251.
- [60] D.M. Haaland, E. V. Thomas, **Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information**, *Anal. Chem.* 60 (1988) 1193–1202.
- [61] J. Christensen, L. Nørgaard, R. Bro, S.B. Engelsen, **Multivariate autofluorescence of intact food systems.**, *Chem. Rev.* 106 (2006) 1979–94.
- [62] C. Cid, **Desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de imidacloprid en agua mediante microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) y fluorescencia inducida fotoquímicamente asociado a calibración multivariada.**, Tesis, Universidad de Chile, 2014.
- [63] P.N. Moza, K. Hustert, E. Feicht, A. Kettrup, **Photolysis of imidacloprid in aqueous solution**, *Chemosphere.* 36 (1998) 497–502.
- [64] W. Zheng, W. Liu, **Kinetics and mechanism of the hydrolysis of imidacloprid**, *Pestic. Sci.* 55 (1999) 482–485.
- [65] D. Redlich, N. Shahin, P. Ekici, A. Friess, H. Parlar, **Kinetic Study of the Photoinduced Degradation of Imidacloprid in Aquatic Media**, *CLEAN – Soil, Air, Water.* 35 (2007) 452–458.
- [66] T. Ding, B.K. Lavine, **Separation of imidacloprid and its degradation products**

- using reversed phase liquid chromatography with water rich mobile phases.**, J. Chromatogr. A. 1218 (2011) 9221–6.
- [67] N. Schippers, W. Schwack, **Photochemistry of imidacloprid in model systems.**, J. Agric. Food Chem. 56 (2008) 8023–9.
- [68] P. Jovanov, V. Guzsvány, S. Lazić, M. Franko, M. Sakač, L. Šarić, et al., **Development of HPLC-DAD method for determination of neonicotinoids in honey**, J. Food Compos. Anal. 40 (2015) 106–113.
- [69] M. Gbylik-Sikorska, T. Sniegocki, A. Posyniak, **Determination of neonicotinoid insecticides and their metabolites in honey bee and honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry.**, J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 990 (2015) 132–40.
- [70] J. Vichapong, R. Burakham, S. Srijaranai, **In-coupled syringe assisted octanol–water partition microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of neonicotinoid insecticide residues in honey**, Talanta. 139 (2015) 21–26.
- [71] P. Jovanov, V. Guzsvány, M. Franko, S. Lazić, M. Sakač, B. Šarić, et al., **Multi-residue method for determination of selected neonicotinoid insecticides in honey using optimized dispersive liquid-liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry.**, Talanta. 111 (2013) 125–33.
- [72] K.M. Kasiotis, C. Anagnostopoulos, P. Anastasiadou, K. Machera, **Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC-MS/MS screening: reported death incidents in honeybees.**, Sci. Total Environ. 485-486 (2014) 633–42.
- [73] M.W. Kujawski, Ź. Bargańska, K. Marciniak, E. Miedzianowska, J.K. Kujawski, M. Śleboda, et al., **Determining pesticide contamination in honey by LC-ESI-MS/MS – Comparison of pesticide recoveries of two liquid–liquid extraction based approaches**, LWT - Food Sci. Technol. 56 (2014) 517–523.
- [74] N. Gao, X. Guo, K. Zhang, D. Hu, **High-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrography methods for the determination of imidacloprid, chlorpyrifos, and bifenthrin residues in tea leaves.**, Instrum. Sci. Technol. 42 (2014) 267–277.
- [75] G. Ettiene, R. Bauza, M.R. Plata, A.M. Contento, A. Ríos, **Determination of neonicotinoid insecticides in environmental samples by micellar electrokinetic chromatography using solid-phase treatments.**, Electrophoresis. 33 (2012) 2969–77.
- [76] F. Sánchez-Bayo, R. V. Hyne, **Detection and analysis of neonicotinoids in river waters – Development of a passive sampler for three commonly used insecticides**, Chemosphere. 99 (2014) 143–151.

- [77] M.A. Rodríguez-Delgado, S. Malovaná, J.P. Pérez, T. Borges, F.J. García Montelongo, **Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection.**, J. Chromatogr. A. 912 (2001) 249–57.
- [78] A. Kulmyrzaev, Èric Dufour, **Determination of lactulose and furosine in milk using front-face fluorescence spectroscopy**, Lait. 82 (2002) 725–735.
- [79] I. Birlouez-Aragon, M. Nicolas, A. Metais, N. Marchond, J. Grenier, D. Calvo, **A Rapid Fluorimetric Method to Estimate the Heat Treatment of Liquid Milk**, Int. Dairy J. 8 (1998) 771–777.
- [80] European Parliament, Council of the European Union, **COMMISSION REGULATION (EC) No 839/2008 of 31 July 2008 amending Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards Annexes II, III and IV on maximum residue levels of pesticides in or on certain products**, 2005. (acceso Septiembre 16, 2015).
- [81] K. Chamberlain, A.A. Evans, R.H. Bromilow, **1-Octanol/Water Partition Coefficient (K_{ow}) and pK_a for Ionisable Pesticides Measured by apH-Metric Method**, Pestic. Sci. 47 (1996) 265–271.
- [82] L. Sánchez-Hernández, D. Hernández-Domínguez, J. Bernal, C. Neusüß, M.T. Martín, J.L. Bernal, **Capillary electrophoresis–mass spectrometry as a new approach to analyze neonicotinoid insecticides**, J. Chromatogr. A. 1359 (2014) 317–324.
- [83] S.-H. Zhu, H.-L. Wu, B.-R. Li, A.-L. Xia, Q.-J. Han, Y. Zhang, et al., **Determination of pesticides in honey using excitation–emission matrix fluorescence coupled with second-order calibration and second-order standard addition methods**, Anal. Chim. Acta. 619 (2008) 165–172.
- [83] M.C. Mahedero, N.M. Díaz, a Muñoz de la Peña, a Espinosa Mansilla, D. González Gómez, D. Bohoyo Gil, **Strategies for solving matrix effects in the analysis of sulfathiazole in honey samples using three-way photochemically induced fluorescence data.**, Talanta. 65 (2005) 806–13.
- [84] A. Muñoz de la Peña, A. Espinosa Mansilla, D. González Gómez, A.C. Olivieri, H.C. Goicoechea, **Interference-free analysis using three-way fluorescence data and the parallel factor model. Determination of fluoroquinolone antibiotics in human serum.**, Anal. Chem. 75 (2003) 2640–6.