

Recibido: 15 de enero de 2013 • Aceptado: 15 de abril de 2013

## Desarrollo y optimización de una metodología multiresiduo por método Simplex para el análisis de plaguicidas en miel de abejas

### Resumen

La aplicación de plaguicidas en cultivos cercanos a las zonas de producción apícola puede afectar la supervivencia de las abejas y la calidad de los productos derivados de la colmena; por tanto, es de gran importancia realizar estudios de residualidad de estos agroquímicos en mieles y otros productos apícolas. Para esto es indispensable desarrollar metodologías que permitan detectar y cuantificar la presencia de estos contaminantes en los productos apícolas. Este trabajo muestra los resultados del desarrollo y optimización de una metodología multiresiduo para el análisis de 30 plaguicidas en miel de abejas (organoclorados, organofosforados y piretroides). El método consistió en una extracción líquido-líquido, seguida de un paso de limpieza en fase sólida usando una columna cargada con sílica gel/florisil. El análisis de los plaguicidas fue realizado por cromatografía de gases con detectores de nitrógeno fósforo (NPD) y microcaptura electrónica ( $\mu$ -ECD). La optimización de las variables experimentales presentes en los pasos de pre-tratamiento, extracción y limpieza se realizó mediante el empleo del método Simplex modificado. Con este fin, se escogieron 14 variables las cuales se optimizaron en 21 experimentos. Los resultados mostraron que los porcentajes de recuperación obtenidos para la mayoría de los plaguicidas se encuentran entre 78.8% y 114.5%, con coeficientes de variación inferiores al 20%.

**Palabras clave:** miel, contaminación, plaguicidas, Simplex.

## Development and optimization of a multi-residue method for pesticide analysis in honey bee using Simplex method

### Abstract

Pesticide application near to beekeeping areas can affect the survival of the bees and the quality of the products derived of the hive, therefore it is of great importance to assess the residual of these agrochemicals in honey and other bee products. So many methods have been developed for determining pesticide residues in honey samples. Thus, a multi-residue method to determine 30 pesticides in honey bee (organochlorine, organophosphorus, and pyrethroids) has been developed and optimized. The method is based on a liquid-liquid extraction followed by a clean-up step on a silica gel/florisil solid-phase column. Pesticides were determined by gas chromatography with micro-electron capture ( $\mu$ -ECD) and nitrogen phosphorus detection (NPD). The optimization process was performed using the modified Simplex method, to make this 14 variables were chosen and the optimization was conducted in 21 experiments. The results indicated that the method show recoveries between 78.8 and 114.5% and coefficients of variation below 20%.

**Keywords:** Honey, pollution, pesticides, Simplex.

## Desenvolvimento e otimização de uma metodologia de resíduos múltiplos para o método Simplex para a análise de pesticidas em abelhas

### Resumo

A aplicação de pesticidas em áreas de cultivo próximas a apicultura pode afetar a sobrevivência das abelhas e a qualidade dos produtos da colmeia, por isso é muito importante estudar o efeito residual destes produtos químicos no mel e outros produtos apícolas. Para isso é essencial para o desenvolvimento de metodologias para a análise de contaminantes em produtos de abelha. Este documento mostra os resultados para o desenvolvimento e otimização de um método de resíduos múltiplos para a análise de 30 pesticidas, incluindo pesticidas organoclorados, organofosforados e piretróides mel. O método consistiu em uma extração líquido-líquido, seguido por uma etapa de limpeza, usando uma coluna de fase sólida, cheia de gel de sílica/florisil. Análise de pesticidas foi realizada por cromatografia gasosa com detector de nitrogênio e fósforo (NPD) e microcaptura eletrônico ( $\mu$ -ECD). A otimização das variáveis experimentais presentes nas etapas de pré-tratamento, de extração e limpeza foi efectuada por utilização do método simplex modificado. Para o efeito, foram escolhidas 14 variáveis que foram optimizadas em 21 experiências. Os resultados mostraram que as recuperações obtidas para a maioria dos pesticidas estão entre 78,8% e 114,5%, com coeficientes de variação inferiores a 20%.

**Palavras-chave:** Mel, poluição, agrotóxicos, Simplex.

## Introducción

En la actualidad, la contaminación ambiental es una de las áreas de mayor investigación por parte de la comunidad científica, así como uno de los principales temas de discusión en las diferentes organizaciones y/o entidades gubernamentales que, día a día, emiten nuevas legislaciones en pro de la conservación de los recursos naturales y la protección de la flora y fauna. Adicionalmente, el creciente interés por el consumo de productos inocuos ha inducido a que muchos grupos de investigación centren sus esfuerzos en evaluar la presencia de contaminantes en los alimentos de origen agropecuario, a través de una amplia variedad de herramientas analíticas desarrolladas para identificar y cuantificar la presencia de estas moléculas en dichas matrices.

Los alimentos de origen natural, como los productos apícolas, además de hacer parte de la dieta humana, se utilizan como bioindicadores ambientales debido a que diversos estudios demuestran que las abejas, en el proceso de recolección de néctar, transportan una amplia variedad de contaminantes presentes en la zona que son almacenados y concentrados en la colmena (1). En consecuencia, los productos derivados de la colmena, como la miel, se contaminan con residuos de diversos plaguicidas (2). Adicionalmente, el uso de productos químicos para el control de enfermedades en la colmena es otra fuente importante de contaminantes en los productos apícolas (1, 3). A fin de impedir que mieles contaminadas afecten a los consumidores, algunas organizaciones han establecido límites máximos de residuos para un extenso número de plaguicidas en este alimento (4).

Este panorama ha promovido el desarrollo de métodos multiresiduo que permiten la determinación simultánea de más de un residuo en una extracción simple, reduciendo el tiempo de análisis y el consumo de solventes (3, 5). Para obtener el mejor desempeño de una metodología multiresiduo es indispensable realizar la optimización de las variables experimentales involucradas. Para este fin, se pueden emplear métodos de optimización auto-dirigidos, como el método Simplex, que permite estudiar y mejorar un proceso de extracción multiresiduo que involucra más de una variable experimental, teniendo en cuenta las posibles interacciones entre las mismas y con un número de ensayos razonable, respecto a otros métodos de optimización (6).

**Tabla 1.** Concentración de la solución de plaguicidas empleada en el estudio.

Compuesto	Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Compuesto	Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$
4,4'-DDD	0,72	Endosulfan $\beta$	0,78
4,4'-DDT	0,62	Fenitroton	0,80
Acefato	26,65	Folpet	5,45
$\alpha$ -HCH	0,72	Flumetrina	5,28
Azoxitrobin	6,14	$\tau$ -Fluvalinato	3,54
$\beta$ -HCH	0,62	Heptenofos	11,44
Cimoxanil	19,53	Hexaconazol	1,44
Cipermetrina	3,19	Malation	1,42
Clorotalonil	0,26	Metalaxil	17,90
Clorpirifos	1,25	Metamidofos	7,78
Cumafós	3,66	Monocrotofos	12,49
Diclorvos	5,71	Parationmetil	1,01
Difenoconazol	3,20	Profenofos	0,30
Dimetoato	0,92	Propargite	154,18
Endosulfan $\alpha$	0,78	Tiabendazol	45,65

El método Simplex ha sido utilizado ampliamente para la optimización inequívoca de diferentes procedimientos analíticos; particularmente en aquellos casos en los que existe interdependencia entre las variables que se desean optimizar. En comparación con otros métodos de optimización, que se basan en diseños experimentales o superficies de respuestas, el método Simplex generalmente permite llegar al punto óptimo de forma más simple y rápida. Por estos motivos este método se ha empleado exitosamente en la optimización de diversos sistemas: condiciones de operación de instrumentación analítica (7), métodos de separación cromatográfica (8), cristalización de proteínas (9), extracción de contaminantes en suelos mediante fluidos supercríticos (10), entre otros usos.

De esta manera, el presente trabajo describe los resultados obtenidos en el desarrollo de una metodología multiresiduo para el análisis de plaguicidas en miel de abejas y su posterior optimización mediante el método Simplex. La metodología se basa en una extracción con metanol/acetato de etilo, limpieza con florisil/silica y análisis cromatográfico mediante GC/ $\mu$ -ECD/NPD.

## Materiales y métodos

### Materiales de referencia, reactivos y soluciones

Se trabajó con estándares de plaguicidas de pureza mayor al 95%, proveniente de las casas comerciales Dr. Ehrenstorfer y Chemservice. Las soluciones madre fueron preparadas en concentraciones cercanas a 1000  $\mu\text{g/mL}$  en acetato de etilo y almacenadas en frascos ámbar a  $-20^\circ\text{C}$ . La mezcla de plaguicidas se preparó tomando diferentes volúmenes de cada una de las soluciones madre hasta obtener las concentraciones que se presentan en la Tabla 1. Esta solución se almacenó en un frasco ámbar a  $-20^\circ\text{C}$ . Los solventes empleados en este estudio fueron J.T. Baker grado HPLC y grado residuos. El florisil y la silica empleados corresponden a grado residuos (60-100 mesh), activados previamente con calentamiento a  $150^\circ\text{C}$  por 4 horas. El sulfato de sodio anhidro (12-60 mesh) igualmente fue secado a  $150^\circ\text{C}$  por 4 horas.

### Instrumentos y equipos

La extracción se realizó en un agitador de rotación universal marca Heidolph modelo Reax-2<sup>®</sup>. La determinación y cuantificación de los plaguicidas se realizó en un cromatógrafo de gases HP6890<sup>®</sup> plus, equipado con un inyector automático 7683 Agilent Technologies (Palo Alto, CA, EE.UU.) con control electrónico de presión y un inyector *split/splitless*, el cual se conectó a través de una columna capilar sin fase estacionaria (1 m; 0.32 mm d.i.) a un divisor de flujo de cuarzo en forma de 'Y', unido a una columna capilar HP-5 (30 m; 0.32 mm d.i.; 0.25  $\mu\text{m}$ ) acoplada a un detector de micro-captura electrónica  $^{63}\text{Ni}$  ( $\mu$ -ECD) y a una columna capilar HP-50 (30 m; 0.32 mm d.i.; 0.25  $\mu\text{m}$ ) acoplada a un detector de nitrógeno-fosforo (NPD) en paralelo. Las condiciones de operación fueron: gas de transporte nitrógeno, volumen de inyección 2  $\mu\text{L}$ , temperatura del inyector de  $256^\circ\text{C}$ , inyección en modo *splitless* pulsado con presión de pulso de 152 kPa durante 0.8 min, tiempo de purga de 0.6 min y flujo de purga de 40 mL/min. La temperatura del detector  $\mu$ -ECD fue de  $310^\circ\text{C}$  con flujo de gas auxiliar (nitrógeno) de 10 mL/min. El detector NPD se trabajó a  $330^\circ\text{C}$  con flujos constantes de gas auxiliar (nitrógeno), hidrógeno y aire de 3,10 y 60 mL/min, respectivamente. El programa de temperatura del horno inició a  $52^\circ\text{C}$  (0 min), incrementándose la temperatura a una velocidad de  $4^\circ\text{C}/\text{min}$  hasta alcanzar  $100^\circ\text{C}$ , consecutivamente se aumentó la temperatura hasta  $110^\circ\text{C}$  a  $2^\circ\text{C}/\text{min}$ , a continuación se incrementó

hasta 130°C a una velocidad de 20°C/min, luego se llevó hasta 195°C a 4°C/min y finalmente se llegó a una temperatura de 280°C a una velocidad de 5°C/min.

## Desarrollo de la metodología

Se utilizó una muestra blanco compuesta por mieles provenientes de cuatro regiones de Colombia. Estas muestras de miel fueron cosechadas en regiones donde las aplicaciones de plaguicidas son muy bajas o nulas. Fueron analizadas por cromatografía de gases y se confirmó que no presentaban presencia de ninguno de los plaguicidas en estudio.

Para la fortificación de las muestras, se pesaron 1000 g de miel blanco en un tubo de fondo cónico de 50 mL, se adicionaron 32 µL de la mezcla de plaguicidas que se presenta en la Tabla 1 y, posteriormente, se dejaron las muestras en reposo por un tiempo de 20 min con el propósito de permitir la evaporación del solvente.

**Pre-tratamiento.** Esta etapa consistía en disolver la miel con el propósito de reducir su viscosidad y mejorar la extracción de los plaguicidas. Para esto, se ensayó la adición de diferentes cantidades de metanol, 1 mL de agua, 1 mL de buffer de citratos (pH 5.5 y concentración de 0.15 g/mL) y/o 1 mL de buffer de citratos (pH 5.5 y concentración de 0.15 g/mL) con cloruro de sodio (0.5 g/mL).

**Extracción.** Se realizaron diferentes ensayos en los que se evaluaron varias fases extractantes, tales como acetato de etilo, metanol, hexano o mezclas acetato de etilo:n-hexano (3:2, 4:1) y acetato de etilo:metanol (4:1, 1:1 y 1:4); en esta evaluación se encontró que la fase extractante que mejores resultados ofrecía corresponde al acetato de etilo; asimismo, en estos ensayos se encontró que al realizar una doble extracción se obtiene el mayor número de compuestos con porcentajes de recuperación superiores al 70% (11). De esta manera, la extracción se realizó como se detalla a continuación: la primera extracción se realizó con 10 mL de acetato de etilo y agitación mecánica por 15 min. Posterior a ello, se

centrifugó la mezcla de extracción y se recolectó la fase orgánica en un balón pera. Para la segunda etapa de extracción se adicionaron 5 mL de acetato de etilo y se dejó nuevamente en agitación. Se centrifugó la mezcla de extracción y se recolectó la fase orgánica para ser combinada con el extracto de la primera extracción. Se concentró la mezcla en un rota- evaporador hasta obtener aproximadamente 1 mL de extracto y se adicionaron 2 g de sulfato de sodio anhidro.

**Limpieza.** La limpieza de los extractos se realizó mediante el empleo de dos técnicas, la primera correspondió a cromatografía de permeación en gel (CPG), cuyas condiciones se encuentran reportadas en otros estudios (12). La segunda técnica que se empleó correspondió a cromatografía clásica en columna (CCC), para lo cual se evaluaron distintas fases móviles y diferentes fases adsorbentes. El procedimiento general para esta técnica se detalla a continuación: al interior de una columna de vidrio con llave para el control del flujo y un tapón de algodón ubicado en la parte inferior, se adicionaron 10 mL de n-hexano. A continuación se agregaron en la columna 2 g de sulfato de sodio anhidro, 2 g de fase estacionaria (silica gel desactivada y/o florisil) y 3 g de sulfato de sodio anhidro, de tal forma que no quedaran burbujas de aire. El n-hexano en exceso se expulsó de la columna sin permitir que la fase sólida se seque. Se cargó la columna con el extracto orgánico y se eluyó con la fase móvil a evaluar. El extracto se concentró en el rota- evaporador hasta alcanzar un volumen aproximado de 0.2 mL y luego se llevó a un volumen de 1.0 mL.

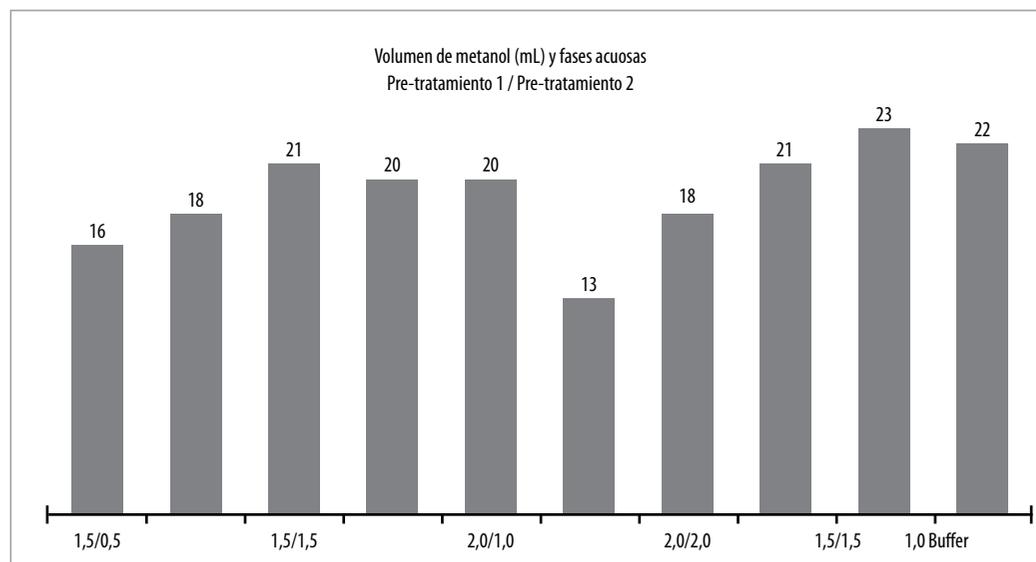
## Optimización de la metodología

La construcción del Simplex de partida se realizó con base en los resultados experimentales obtenidos a partir de los ensayos llevados a cabo en el desarrollo de la metodología, siguiendo el método descrito en la literatura (7, 13). La Tabla 2 muestra las variables experimentales seleccionadas ( $k = 14$ ), el tamaño de paso y las condiciones de referencia utilizadas para la construcción del Simplex de partida.

**Tabla 2.** Variables estudiadas, rangos, condiciones de partida y tamaño de paso empleados para la construcción del simplex.

Etapa	Variable	Parámetro experimental	Unidades	Condición de partida	Rango	Tamaño de paso
Pre-tratamiento	A	pH	-	5.5	5 - 7	0.5
	B	Vol. de buffer Citratos	mL	1	0 - 5	0.5
	C	Conc. buffer Citratos	g/mL	0.15	0 - 1	0.1
	D	Vol. de metanol	mL	1.5	0 - 3	0.5
Extracción 1	E	Vol. de AcOEt	mL	10	0 - 30	1
	F	Tiempo de extracción	min.	15	5 - 60	3
Extracción 2	G	Vol. de metanol	mL	1.5	0 - 3	0.5
	H	Vol. de AcOEt	mL	5	0 - 30	1
	I	Tiempo de extracción	min.	15	5 - 60	3
Limpieza	J	Masa de silica	g	1	0 - 5	1
	K	Desactivación de la silica	%	15	0 - 70	2
	L	Masa de Florisil	g	1	0 - 5	1
	M	Vol. de hexano	mL	7	0 - 20	2
	N	Vol. de AcOEt	mL	7	0 - 20	2

**Figura 1.** Número de plaguicidas con porcentajes de recuperación entre 70 y 120% en función de la adición de metanol y agua, buffer citratos y buffer citratos/NaCl para el pre-tratamiento del proceso de extracción.



## Resultados y discusión

### Desarrollo de la metodología: pre-tratamiento y extracción

En el caso de la miel de abejas, algunos reportes de literatura concuerdan en que, durante el proceso de extracción líquido-líquido (ELL), es posible aumentar el porcentaje de recuperación de un amplio número de plaguicidas (14). Una de las principales opciones consiste en la disolución previa de la miel de abejas en agua o en metanol. En este sentido, se decidió ensayar la adición de metanol en el paso de pre-tratamiento con el propósito de mejorar la recuperación de algunos compuestos, respecto a los resultados obtenidos de la ELL directa con diversos solventes (11). La Figura 1 presenta un resumen de los resultados obtenidos en el pre-tratamiento con metanol previo a la extracción para los 30 plaguicidas bajo estudio en miel.

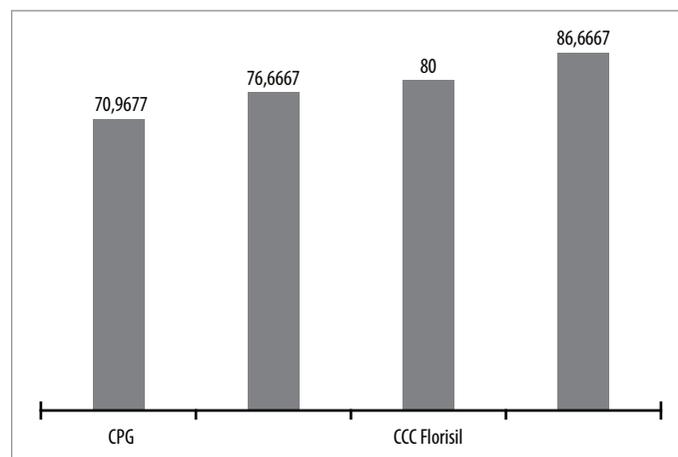
La Figura 1 muestra que la adición de metanol durante la fase de pre-tratamiento de la miel, aumenta el número de plaguicidas extraídos con porcentajes de recuperación entre 70% y 120%. Esto se debe a la reducción de la viscosidad de la miel cuando es disuelta en metanol, lo cual facilita el contacto entre la matriz y el solvente de extracción; adicionalmente, la presencia de metanol durante el proceso de extracción aumenta la polaridad de la fase extractante, lo que permite recuperar un mayor número de plaguicidas polares y medianamente polares. La Figura 1 muestra, así mismo, que los mejores desempeños se alcanzaron al usar 3 mL de metanol, siendo más eficiente la adición de 1,5 mL de metanol antes de la primera extracción y 1,5 mL de metanol antes de la segunda extracción. Por último, se observa que adiciones superiores a 3 mL de metanol generan un descenso en el número de plaguicidas recuperados, lo cual se atribuye a la co-extracción de compuestos de la matriz que interfieren en la detección mediante  $\mu$ -ECD que impiden identificar y cuantificar algunos plaguicidas como 4,4'-DDT, heptenofos, diclorvos, cimoxanil,  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH, dimetoato, clorotalonil, metilparation y profenofos.

Estos ensayos presentan un bajo desempeño en la extracción de los plaguicidas organoclorados, razón por la cual se decidió realizar una modificación en la constante dieléctrica del medio en la etapa de pre-tratamiento. Esta modificación se realizó mediante la adición de 1 mL de agua, 1 mL de buffer de citratos (pH 5.5 y concentración de 0.15 g/mL) y 1 mL de buffer de citratos (pH 5.5 y concentración de 0.15 g/mL) con cloruro de sodio (0.5 g/mL); estos resultados también se presentan en la Figura 1.

Adicionalmente, la Figura 1 permite observar que los pre-tratamientos con agua y con buffer citratos/NaCl mostraron un buen desempeño; sin embargo, la extracción con buffer citrato ofreció el mayor número de plaguicidas con porcentajes de recuperación entre 70% y 120%. Esto se explica porque la adición del buffer regula el pH y evita pérdidas por hidrólisis de algunos plaguicidas, los cuales, por lo general son estables bajo condiciones similares en un rango de pH entre 5 y 7; adicionalmente, esta fase reduce la viscosidad de la miel lo que facilita el proceso de transporte de los plaguicidas desde la matriz hasta la fase extractante.

De esta manera, la metodología de pre-tratamiento y la extracción incluyen la adición de 1.5 mL de metanol previo a la adición del acetato de etilo (en cada una de las etapas), la adición de 1 mL de buffer de citratos (pH = 5.5 y concentración = 0.15 g/mL), adición de 10 mL de acetato de etilo en la primera extracción, agitación durante 15 min, centrifugación, una segunda extracción con 5 mL de acetato de etilo, agitación por 15 min y centrifugación. Finalmente, se reúnen los dos extractos de acetato de etilo, se concentran hasta aproximadamente 1 mL en un evaporador rotatorio y se someten al proceso de limpieza.

Bajo las condiciones citadas previamente se presentaron algunos inconvenientes tales como la pérdida de los plaguicidas polares heptenofos, diclorvos, metamidofos, acefato, cimoxanil y monocrotofos; además, se dificultó la identificación y cuantificación de los compuestos



**Figura 2.** Porcentajes de plaguicidas con porcentajes de recuperación entre 70 y 120%, obtenidos para cada uno de los ensayos de limpieza mediante CPG (cromatografía de permeación en geles) y CCC (cromatografía en columna clásica).

organoclorados  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH, endosulfan  $\alpha$  y endosulfan  $\beta$  por la elución de interferentes. Por lo tanto, se decidió implementar un proceso de limpieza con el propósito de reducir algunas de estas limitaciones.

### Desarrollo de la metodología: limpieza

En análisis de residuos de plaguicidas, la limpieza de los extractos previa al análisis instrumental es uno de los pasos determinantes en el desarrollo de una metodología analítica. Las técnicas más empleadas para esta etapa corresponden a la extracción líquido-líquido (ELL), extracción en fase sólida (EFS), cromatografía en columna clásica (CCC) y cromatografía de permeación en geles (CPG). Debido a la constante dieléctrica del acetato de etilo y la diversidad de propiedades fisicoquímicas de los analitos, se decidió no emplear la ELL como método de limpieza, pues es una de las técnicas que presentan menor eficiencia (15). Por otro lado,

la EFS con cartuchos se descartó por los costos que implica, pues no se pueden emplear fases estacionarias convencionales, sino que, de acuerdo a algunas publicaciones, se emplean fases estacionarias modificadas (15-17). Por lo anterior, se decidió evaluar la CPG y la CCC como técnicas de limpieza.

Los resultados mostraron que mediante CPG se obtenían porcentajes de recuperación aceptables para la mayoría de los plaguicidas evaluados; sin embargo, en el detector de  $\mu$ -ECD se presentaba una gran cantidad de interferentes que imposibilitan el análisis de algunos compuestos como: heptenofos, diclorvos, cimoxanil,  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH dimeato, clorotalonil, clorpirifos, metilparation y fenitrotion; por lo cual el empleo de CPG fue descartado.

La evaluación de CCC se realizó para diferentes combinaciones de fase estacionaria y fase móvil, las cuales se escogieron de acuerdo a reportes de literatura (3, 14, 18). Algunas de las fases móviles ensayadas corresponden a: acetonitrilo, n-hexano, acetato de etilo, mezclas de ace-

**Tabla 3.** Valores experimentales que conformaron los vértices del Simplex en el proceso de optimización de la metodología multiresiduo para analizar plaguicidas en miel.

Proceso		Pre-tratamiento				Extracción 1		Extracción 2			Limpieza					
Variables		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	
Vértices		-	mL	g/mL	mL	mL	min	mL	mL	min	g	%	g	mL	mL	
Simplex de partida $S_1$	$S_1$	5,5	1,0	0,15	1,5	10,00	15,0	1,5	5	15,0	1	15	1	7	7	
	$S_2$	5,9	1,1	0,16	1,57	10,15	15,4	1,57	5,15	15,4	1,15	15,29	1,15	7,3	7,3	
	$S_3$	5,6	1,4	0,16	1,57	10,15	15,4	1,57	5,15	15,4	1,15	15,29	1,15	7,3	7,3	
	$S_4$	5,6	1,1	0,24	1,57	10,15	15,4	1,57	5,15	15,4	1,15	15,29	1,15	7,3	7,3	
	$S_5$	5,6	1,1	0,16	1,93	10,15	15,4	1,57	5,15	15,4	1,15	15,29	1,15	7,3	7,3	
	$S_6$	5,6	1,1	0,16	1,57	10,85	15,4	1,57	5,15	15,4	1,15	15,29	1,15	7,3	7,3	
	$S_7$	5,6	1,1	0,16	1,57	10,15	17,6	1,57	5,15	15,4	1,15	15,29	1,15	7,3	7,3	
	$S_8$	5,6	1,1	0,16	1,57	10,15	15,4	1,93	5,15	15,4	1,15	15,29	1,15	7,3	7,3	
	$S_9$	5,6	1,1	0,16	1,57	10,15	15,4	1,57	5,85	15,4	1,15	15,29	1,15	7,3	7,3	
	$S_{10}$	5,6	1,1	0,16	1,57	10,15	15,4	1,57	5,15	17,6	1,15	15,29	1,15	7,3	7,3	
	$S_{11}$	5,6	1,1	0,16	1,57	10,15	15,4	1,57	5,15	15,4	1,85	15,29	1,15	7,3	7,3	
	$S_{12}$	5,6	1,1	0,16	1,57	10,15	15,4	1,57	5,15	15,4	1,15	16,70	1,15	7,3	7,3	
	$S_{13}$	5,6	1,1	0,16	1,57	10,15	15,4	1,57	5,15	15,4	1,15	15,29	1,85	7,3	7,3	
	$S_{14}$	5,6	1,1	0,16	1,57	10,15	15,4	1,57	5,15	15,4	1,15	15,29	1,15	8,7	7,3	
	$S_{15}$	5,6	1,1	0,16	1,57	10,15	15,4	1,57	5,15	15,4	1,15	15,29	1,15	7,3	8,7	
Reflexiones	$S_n$	$S_w$														
	$S_{16}$	$S_{15}$	5,6	1,1	0,17	1,61	10,23	15,7	1,61	5,23	15,7	1,23	15,45	1,23	7,4	5,8
	$S_{17}$	$S_3$	5,6	0,7	0,17	1,62	10,24	15,7	1,62	5,24	15,7	1,24	15,47	1,24	7,5	7,0
	$S_{18}$	$S_1$	5,7	1,1	0,19	1,71	10,42	16,2	1,71	5,42	16,2	1,42	15,83	1,42	7,8	7,3
	$S_{19}$	$S_{13}$	5,7	1,0	0,18	1,65	10,31	15,9	1,65	5,31	15,9	1,31	15,62	0,50	7,6	7,0
	$S_{20}$	$S_5$	5,7	1,0	0,18	1,25	10,31	15,9	1,65	5,31	15,9	1,31	15,62	1,31	7,6	7,0
$S_{21}$	$S_8$	5,7	1,0	0,19	1,45	10,39	16,2	1,70	5,39	16,2	1,39	15,78	1,39	7,8	6,9	

A: pH; B: Volumen buffer citratos; C: Concentración buffer citratos; D y G: Volumen de metanol; E, H y N: Volumen de AcOEt;

F e I: Tiempo de extracción; J: Masa de sílica; K: Desactivación de la sílica; L: Masa de Florisil; M: Volumen de hexano.

Sn: Vértices producto de la reflexión; Sw: Vértices descartados por baja respuesta.

tato de etilo/n-hexano y acetato de etilo/metanol. El mejor desempeño durante la evaluación de la limpieza por CCC se obtuvo al realizar la elución con 15 mL de acetato de etilo/n-hexano (1:1).

La Figura 2 resume los resultados de los diferentes ensayos de limpieza. Esta figura muestra que: i) las tres fases estacionarias permiten obtener porcentajes de recuperación en el rango de aceptación de la Unión Europea; no obstante, la fase estacionaria conformada por Silica/ Florisil (1:1) presenta un mayor número de compuestos con porcentajes de recuperación dentro de este rango, en comparación con las demás fases; ii) el número de compuestos con porcentajes de recuperación entre 70% y 120% obtenidos con CPG es el más bajo debido al gran número de interferencias presentes durante la evaluación cromatográfica; iii) el desempeño de la silica durante la limpieza es ligeramente inferior al del Florisil, lo cual se debe a que esta última fase estacionaria es capaz de retener un mayor contenido de moléculas polares, entre estos los azúcares.

De acuerdo a los resultados mostrados en la Figura 2, el mayor número de compuestos con mejores porcentajes de recuperación se obtienen al emplear 2 g de Florisil/silica (1:1) como fase estacionaria y 15 mL de n-hexano-acetato de etilo (1:1) como solvente de elución.

Finalmente, como resultado de los experimentos llevados a cabo en el desarrollo de la metodología, las tres fases que la componen son: i) *pre-tratamiento* de la miel, la cual consiste en la disolución de la miel en buffer citratos y en metanol; ii) *extracción* 1 y 2, realizadas con acetato de etilo y asistidas con agitación mecánica; y, iii) *limpieza* mediante CCC, empleando Florisil y silica gel desactivada como fase estacionaria y n-hexano: acetato de etilo como fase móvil para la elución.

### Optimización de la metodología

Como se mencionó anteriormente, mediante los ensayos realizados en la etapa de desarrollo del método se logró establecer las variables de mayor impacto en el desempeño de la metodología, al igual que las condiciones iniciales para construir el Simplex de partida.

Así, la Tabla 2 muestra las 14 variables incluidas en la optimización de los tres pasos analíticos. En esta tabla es posible observar que los tamaños de paso empleados para las diferentes variables fueron establecidos de tal manera que el desplazamiento en el sistema fuera moderado, debido a que los ensayos preliminares realizados durante el desarrollo de la metodología multiresiduo indicaron que se estaba trabajando a

condiciones cercanas al punto óptimo, pues se estaban recuperando la mayoría de los plaguicidas; sin embargo, el método presentaba coeficientes de variación altos y un gran número de interferentes en la detección por  $\mu$ -ECD.

En la Tabla 3 se muestran los 15 experimentos que conforman el Simplex de partida ( $S_1$  a  $S_{15}$ ), al igual que las proyecciones resultantes realizadas durante el proceso de optimización de la metodología.

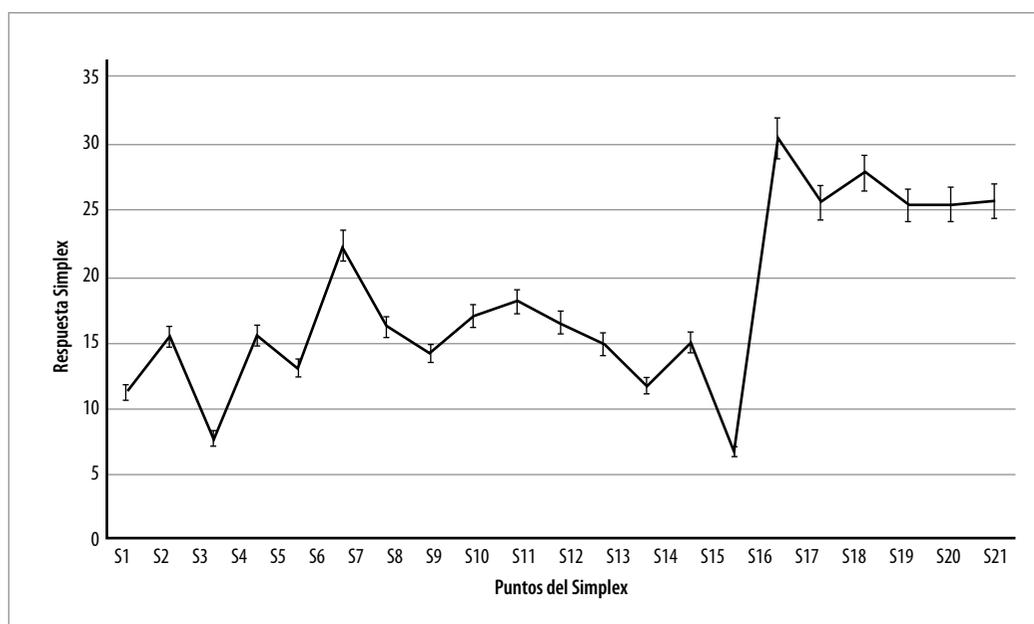
Para la optimización mediante el método Simplex, es fundamental definir una respuesta que permita evaluar los diferentes ensayos y así, continuar con las proyecciones correspondientes (6). Por tanto, la expresión 1 corresponde a la respuesta empleada para evaluar cada uno de los vértices del Simplex.

$$\text{Respuesta Simplex} = \frac{\sum N \cdot P_r}{R} \quad [\text{ecuación 1}]$$

En la Ecuación 1,  $N$  es el número de plaguicidas extraídos con porcentaje de recuperación entre 70% y 120%, el cual es el criterio de aceptación del documento SANCO de la Unión Europea para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos (19);  $P_r$  es el valor promedio del porcentaje de recuperación de los plaguicidas extraídos y  $R$  es el ruido normalizado obtenido al dividir el ruido cromatográfico de los blancos de miel en el ruido cromatográfico del acetato de etilo, en los rangos de tiempo que eluyen los plaguicidas. Como se observa en la Ecuación 1, la respuesta del Simplex es adimensional.

La Ecuación 1 muestra que cada uno de los términos incluidos en esta respuesta permite evaluar algún parámetro de interés. Por ejemplo, como se trata de una extracción multiresiduo, se hace necesario tener una medida del número de compuestos que el método pueda extraer adecuadamente, por lo cual se incluyó el término  $N$ . Por otro lado, como el rango de 70% a 120% resulta muy amplio, se adicionó a la ecuación el promedio de los porcentajes de recuperación obtenidos; así, al tratarse de una optimización, se tiene en cuenta el número de plaguicidas recuperados y la eficiencia del método para extraer dichos compuestos. Finalmente, se decidió incluir el ruido presente en los perfiles cromatográficos debido a que, por la baja especificidad y selectividad del detector  $\mu$ -ECD, los compuestos presentes en la miel que se coextraen generalmente ocasionan interferencias en la detección. De tal forma, mediante la inclusión de esta relación de ruidos se asegura que se obtenga un método más específico, lo que a su vez asegura unos mejores límites de detección.

**Figura 3.** Respuesta obtenida para los diferentes ensayos realizados en la optimización por método Simplex ( $n=3$ ).



mala calidad, reemplazar

**Figura 4.** Cromatogramas ( $\mu$ -ECD) de condiciones iniciales y óptimas determinado con Simplex (ver detalle).

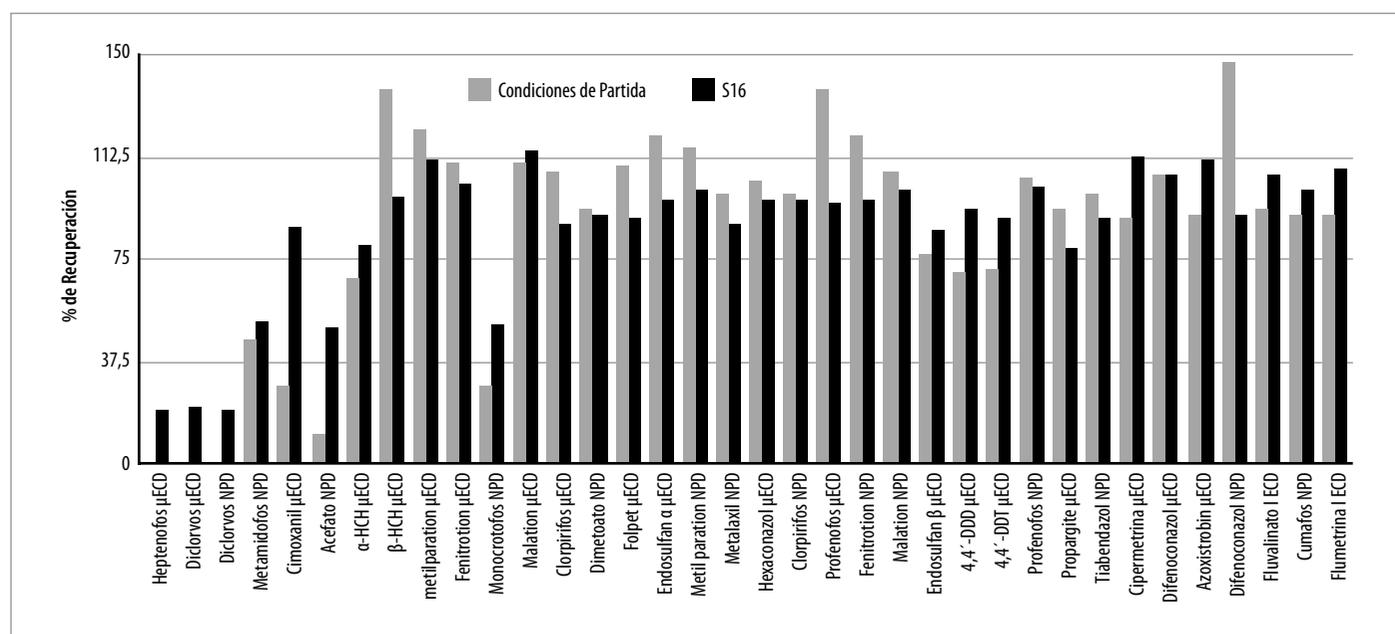
En la Figura 3 se muestra la respuesta obtenida para cada vértice efectuado, después de realizar la extracción e inyección cromatográfica del Simplex de partida. La Figura 3, muestra que solamente los puntos  $S_3$  y  $S_{15}$  exhiben una respuesta inferior a la obtenida para el punto de partida  $S_1$ . Esto indica que la adición de un alto volumen de buffer en la extracción (ver Tabla 3,  $S_3$ ) o un aumento considerable de la polaridad de la fase de elución durante la limpieza (ver Tabla 3,  $S_{15}$ ), reducen la eficiencia de estas dos etapas experimentales.

De igual manera, en la Figura 3 se puede observar que la respuesta obtenida para las reflexiones ( $S_{16}$  a  $S_{21}$ ) supera en valor de cualquiera de los vértices del Simplex de partida. Además, la reflexión  $S_{16}$  aumentó la respuesta al doble, si se compara con el punto de partida  $S_1$ . Esto implica que los movimientos del Simplex generaron una mejora considerable del sistema. A pesar de esto, los últimos cinco experimentos no presentaron una tendencia creciente, por lo cual se decidió detener el Simplex en el vértice  $S_{21}$  y tomar las condiciones experimentales de  $S_{16}$  como las condiciones definitivas para el método multiresiduo.

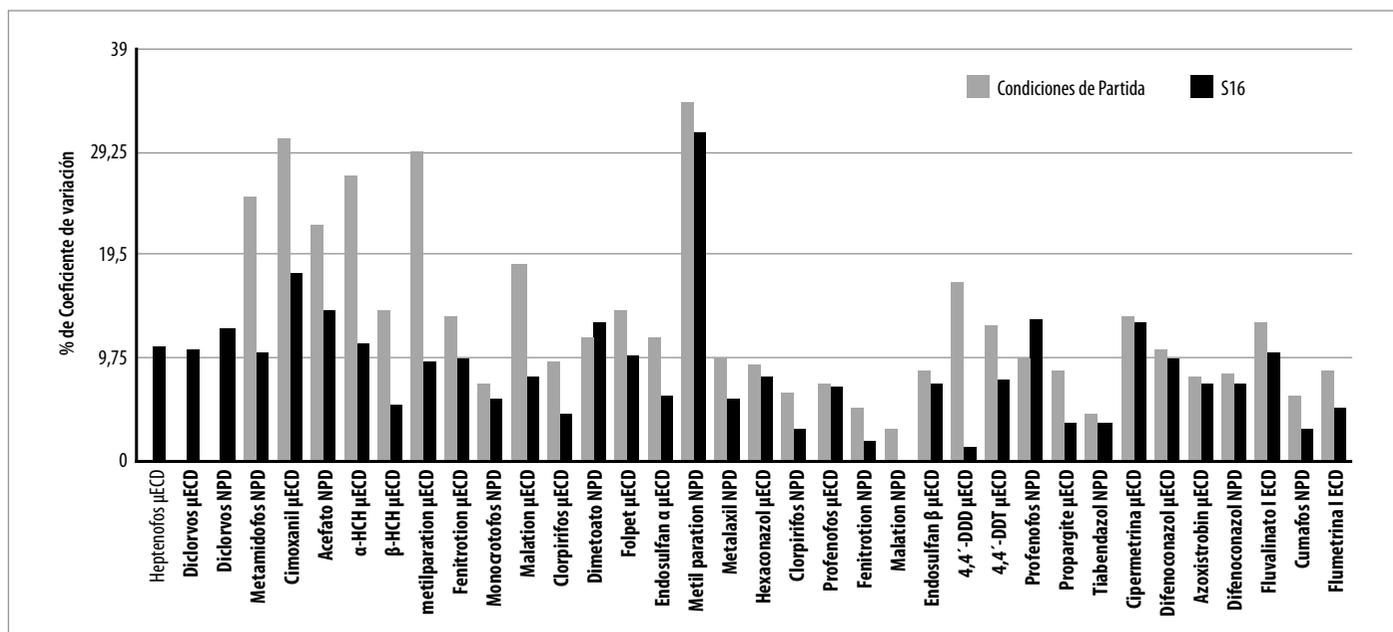
### Evaluación de la optimización

La evaluación de la optimización se realizó comparando los resultados obtenidos para las condiciones experimentales de partida contra las condiciones determinadas en el vértice  $S_{16}$  (ver Tabla 3). De esta manera, el primer punto en comparación correspondió a la especificidad de la metodología; así, la Figura 4 muestra los cromatogramas obtenidos para la muestra blanco en las dos condiciones mencionadas.

La Figura 4 muestra como en el vértice  $S_{16}$  se redujo considerablemente el número de interferencias presentes en el detector  $\mu$ -ECD, siendo notable para los tiempos de retención entre 10 minutos y 32 minutos. Este cambio indica que el Simplex permitió obtener una mejora en la fase de limpieza del método multiresiduo. Esta reducción de coeluyentes en el análisis instrumental tiene un impacto directo en los valores obtenidos para los límites de detección y cuantificación de la metodología; así mismo, reduce considerablemente el deterioro del sistema



**Figura 5.** Comparación de los porcentajes de recuperación obtenidos en diversos pesticidas entre las metodologías inicial ( $S_1$ , barras grises) y optimizada ( $S_{16}$ , barras en negro) mediante Simplex (señales por  $\mu$ -ECD y NPD).



**Figura 6.** Coeficientes de variación obtenidos en diversos pesticidas al comparar las metodologías inicial (S1, barras grises) y optimizada (S16, barras en negro) mediante Simplex (señales por  $\mu$ -ECD y NPD).

cromatográfico, pues la miel es una matriz con un alto contenido de carbohidratos y otros compuestos que suelen acumularse en el sistema de inyección (20).

Las Figuras 5 y 6 muestran los porcentajes de recuperación y los coeficientes de variación de los plaguicidas obtenidos bajo las condiciones experimentales de partida y las condiciones que generaron la mejor respuesta  $S_{16}$ . En la Figura 5 se observa que mediante el método optimizado se logró obtener porcentajes de recuperación dentro del rango de aceptación del documento SANCO para los plaguicidas cimoxanil,  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH, endosulfán  $\alpha$ , profenofos, endosulfán  $\beta$ , fenitrotion y difenoconazol. Así mismo, se mejoró considerablemente la recuperación de los plaguicidas organoclorados 4,4'-DDD y 4,4'-DDT en comparación con el método inicial. Por otro lado, en la Figura 5, se encuentra que compuestos muy polares como acefato, diclorvos, heptenofos, monocrotofos y metamidofos presentaron recuperaciones bajas, lo cual se atribuye a su alta polaridad; sin embargo, al comparar los valores obtenidos se encuentra que en todos los casos mediante el método optimizado se obtienen mayores recuperaciones, respecto a las condiciones de partida.

Finalmente, la Figura 6 muestra que en la mayoría de los casos, a excepción de dimetoato y profenofos, se presentan coeficientes de variación más bajos al utilizar el método optimizado. Así mismo, se observa que para algunos compuestos como cimoxanil, metilparatión, entre otros, con la optimización se logra disminuir los coeficientes de variación a valores inferiores a 20%, criterio de aceptación de la Unión Europea.

## Conclusiones

Se desarrolló una metodología multiresiduo para el análisis de plaguicidas en la miel que se fundamenta en una doble extracción con acetato de etilo y limpieza mediante cromatografía clásica de columna (CCC), empleando como fase estacionaria una mezcla de silica-Florisil (1:1). El análisis de los extractos se realizó mediante cromatografía de gases con detectores NPD y  $\mu$ -ECD en paralelo.

La optimización mediante el método Simplex permitió determinar

las condiciones experimentales capaces de duplicar el desempeño del método de extracción en comparación con las condiciones de partida. Para este fin se requirieron 21 ensayos, dentro de los cuales seis correspondieron a movimientos de proyección. El experimento  $S_{16}$  mostró los mejores resultados respecto a especificidad, precisión y exactitud, puesto que se logró una reducción de la cantidad de interferentes en el análisis instrumental, aumentaron los porcentajes de recuperación para 9 de 30 plaguicidas y disminuyeron los coeficientes de variación para 25 de los 30 plaguicidas extraídos. Finalmente, después de la optimización, el método multiresiduo permite el análisis adecuado de 27 de los 30 plaguicidas extraídos de la miel.

## Agradecimientos

Expresamos nuestros agradecimientos al proyecto "Selección de Indicadores Físicoquímicos Mediante Aplicación de Nariz Electrónica para la Catalogación de Productos Apícolas" financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

## Referencias

- Bogdanov, S. *Contaminants of Bee Products*. Apidologie. 2006, **37**: p.1-18.
- Balayannis, G., Balayannis, P. *Bee Honey as an Environmental Bio-indicator of Pesticides' Occurrence in Six Agricultural Areas of Greece*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 2008, **55**: p.462-470.
- Rial-Otero, R., Gaspar, E. M., Moura, I., Capelo, J. L. *Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: An overview*. Talanta. 2007, **71**: p.503-514.
- Unión Europea. Reglamento (CE) No 396/2005 del parlamento europeo y del consejo de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de ori-

- gen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo y posteriores modificaciones. 2005.
5. Ahmed, F. E. *Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks*. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2001, **20**: p.649-661.
  6. Walters, F. H., Parker Jr, L. R., Morgan, S. L. Deming, S. N. *Sequential simplex optimization*. first ed. Florida: CRC Press LLC, 1991
  7. Ahumada, D., Guerrero, J. A. *Optimización del inyector de temperatura programada en el análisis de residuos de plaguicidas mediante el método simplex*. Revista Colombiana de Química. 2010, **39**: p.221-236.
  8. Kuppithayanant, N., Rayanakorn, M., Wongpornchain, S., Prapamontol, T. Deming, R. *Enhanced sensitivity and selectivity in the detection of polycyclic aromatic hydrocarbons using sequential simplex optimization, the addition of an organic modifier and wavelength programming*. Talanta. 2003, **6**: p.879-888.
  9. Prater, B. D., Tuller, S. C. Wilson, L. J. *Simplex optimization of protein crystallization conditions*. Journal of crystal growth. 1999, **196**: p.674-684.
  10. Santos-Delgado, M. J., Crespo-Corral, E. Polo-Díez, L. M. *Determination of herbicides in soil samples by gas chromatography: optimization by the simplex method*. Talanta. 2000, **53**: p.367-377.
  11. Rodríguez, L. D., Díaz, M. A. Guerrero, D. J. *Metodología para analizar residuos de plaguicidas en miel usando cromatografía de gases*. XXIX Congreso Latinoamericano de Química CLAQ. 2010.
  12. Valencia, E. M., Guerrero, J. A. *Limpieza por cromatografía de permeación por gel en la determinación de residuos de n-metilcarbamatos en fresa*. Revista Colombiana de Química. 2008, **37**: p.161-172.
  13. Villaveces, C. J. L., Arias, P. H. *La optimización de procesos químicos con ayuda del Simplex*. Química E Industria. 1987, **13**: p.2 - 14.
  14. Kujawski, M. W., Namiesnik, J. *Challenges in preparing honey samples for chromatographic determination of contaminants and trace residues*. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2008, **27**: p.785-793.
  15. Blasco, C., Vazquez-Roig, P., Onghena, M., Masia, A. Picó, Y. *Analysis of insecticides in honey by liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry: Comparison of different extraction procedures*. Journal of Chromatography A. 2011, **1218**: p.4892-4901.
  16. Kujawski, M. W., Namiesnik, J. *Levels of 13 multi-class pesticide residues in Polish honeys determined by LC-ESI-MS/MS*. Food Control. 2011, **22**: p.914-919.
  17. Amendola, G., Pelosi, P. Dommarco, R. *Solid-phase extraction for multi-residue analysis of pesticides in honey*. Journal of Environmental Science and Health Part B. 2011, **46**: p.24-34.
  18. Jin, Z. et al. *Determination of Multiple Pesticide Residues in Honey Using Gas Chromatography-Electron Impact Ionization-Mass Spectrometry*. Chinese Journal of Chromatography. 2006, **24**: p.440-447.
  19. SANCO. *Method Validation and quality Control Procedures for pesticide residues analysis in food and feed*. 2009. [citado: 2013 02 Febrero], Disponible en: [http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf)
  20. Walorczyk, S., Gnusowski, B. *Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in honeybees using acetonitrile-based extraction and gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry*. Journal of Chromatography A. 2009, **1216**: p.6522-6531.

