

Validación de un método para la determinación de imidacloprid en frutos de guayabo (*Psidium guajava* L.) empleando dispersión de matriz en fase sólida y cromatografía líquida de alta resolución

Validation of a method for the determination of imidacloprid in fruits of guava tree (*Psidium guajava* L.) using matrix solid phase dispersion and liquid chromatography

G. Ettiene^{1*}, R. Bauza², D. Medina¹, N. Silva¹, J. Raga¹, L. Sandoval³, M. Quiros⁴, Y. Petit⁴, I. Dorado⁴ y N. Poleo⁴

¹Departamento de Química, Facultad de Agronomía. ²Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias. ³Instituto de Investigaciones Agronómicas, Facultad de Agronomía Universidad del Zulia. ⁴Departamento Fitosanitario, Facultad de Agronomía Universidad del Zulia, Maracaibo-Venezuela.

Resumen

Se validó un método de análisis para la determinación de imidacloprid en frutos de guayabo (*Psidium guajava* L.) basado en la técnica dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se empleó C₁₈ como agente dispersante y carbón grafitado como fase de limpieza, la desorción se realizó con diclorometano y la cuantificación de los residuos de imidacloprid por HPLC con detección UV. Se obtuvieron altas recuperaciones (> 90%) para imidacloprid a 1,0 µg.g⁻¹, con una alta precisión en términos de repetibilidad (RSD < 5%) y reproducibilidad (RSD < 7%), bajos límites de detección (0,100 µg.g⁻¹) y de cuantificación (0,334 g.g⁻¹). El método validado se aplicó para el análisis de residuos de imidacloprid en frutos de guayabo cultivados en dos plantaciones agrícolas. El método propuesto resultó un procedimiento eficiente, económico y ecológico para análisis rutinarios de imidacloprid en frutos de guayabo.

Palabras clave: dispersión de matriz en fase sólida, neonicotenoides, guayaba, cromatografía líquida.

Recibido el 6-3-2012 ● Aceptado el 5-3-2013

Autor de correspondencia e-mail: gettiene@fa.luz.edu.ve

Abstract

An analytical method was validated for the determination of imidacloprid insecticide in guava (*Psidium guajava* L.) fruits based on the technical matrix solid phase dispersion (MSPD) and liquid chromatography of high resolution (HPLC). C_{18} was used as dispersant agent and a combination of graphitized carbon black like clean-up phase, the insecticide desorption was accomplished with CH_2Cl_2 . Imidacloprid residues was quantified by HPLC with UV detection. Good recoveries ($> 90\%$) for imidacloprid to $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ were obtained. There was a high precision in terms of repeatability ($\text{RSD} < 5\%$) and reproducibility ($\text{RSD} < 7\%$) and low detection limits ($0.100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) and quantification ($0.334 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). The validated method was used to determine imidacloprid levels in guava fruits cultivated in two plantations. The proposed analytical method could be used as an efficient, cheap and ecological procedure in routine determinations of imidacloprid in guava fruits.

Key words: matrix solid phase dispersion, neonicotinoid, imidacloprid, guava, liquid chromatography.

Introducción

Los neonicotenoides son insecticidas sintéticos derivados de la nicotina, que actúan sobre el sistema nervioso central de los insectos, causando su parálisis y muerte. Han sido clasificados según su toxicidad en las categorías II y III, de moderadamente peligrosos a ligeramente peligrosos. (World Health Organization, 2004; Environmental Protection Agency, 2011). Son insecticidas activos contra numerosas plagas de insectos, entre los cuales se incluyen áfidos, mosca blanca, escarabajos y algunas especies lepidópteras (Schäfer, 2008; Jeschke *et al.*, 2011; Raymond *et al.*, 2011).

En el estado Zulia, el insecticida neonicotenoide que se emplea frecuentemente es imidacloprid [1-(6-cloro-3-piridilmetil)-N-nitroimidazolidino-2-ilidenoamina], el cual se aplica para el control de la Mota Blanca del Guayaibo (MBG) (*Capulinia* sp), el cual es un

Introduction

Neonicotenoids are synthetic insecticides derived from nicotine, which act on the central nervous system of the insects, causing their paralysis and death. These have been classified according to their toxicity in categories II and III, mild dangerous to slightly dangerous (World Health Organization, 2004; Environmental Protection Agency, 2011). These are active insecticides used against insect pests, among which are the aphids, whiteflies, beetles and some lepidoptera species (Schäfer, 2008; Jeschke *et al.*, 2011; Raymond *et al.*, 2011).

In Zulia state, the neonicotenoid insecticide frequently employed is imidacloprid [1-(6-chloride-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine], which is applied for the control of whitefly in Guaba (MBG) (*Capulinia* sp), which is a sucker insect that forms colonies in the stem and

insecto chupador que forma sus colonias en el tallo y las ramas de la planta causando su muerte (Cermeli *et al.*, 1997; Geraud-Pouey *et al.*, 1997; Chirinos-Torres *et al.*, 2000; Geraud-Pouey *et al.*, 2001). Sus propiedades fisicoquímicas permiten su empleo frecuente en un amplio rango de aplicaciones técnicas incluyendo tratamiento foliar, de semillas, desinfección del suelo, aplicación en la raíz, entre otros (Jeschke *et al.*, 2011; Raymond *et al.*, 2011). Sin embargo, niveles residuales del insecticida pueden permanecer en diferentes órganos de las plantas, hasta el momento de la cosecha. Lo que pudiera implicar un riesgo potencial de intoxicación para los consumidores del fruto fresco o procesado.

Para garantizar la inocuidad de los frutos de guayabo antes de su consumo, es necesario contar con metodologías analíticas que permitan determinar residuos de imidacloprid, con una alta precisión y exactitud. La complejidad de los frutos puede hacer laboriosa la determinación de insecticidas, por lo que se requiere disponer de estrategias de selectividad en extracción en fase sólida para obtener extractos libres de interferencias para ser separados por HPLC, obtener una alta selectividad, menores límites de detección y factores de concentración adecuados.

Los métodos tradicionales empleados para la determinación de insecticidas se llevan a cabo por procedimientos multi-etapas, basados en extracción con solventes orgánicos mediante partición líquido-líquido seguido de la remoción de los concomitantes a través de varias etapas de limpieza (*clean-up*), aplicando extracción

the branches of the plant, causing death (Cermeli *et al.*, 1997; Geraud-Pouey *et al.*, 1997; Chirinos-Torres *et al.*, 2000; Geraud-Pouey *et al.*, 2001). Its physic-chemical properties allow the frequent use in a wide range of technical applications including the foliar treatment, seeds, disinfection of the soil, application in the root, among others (Jeschke *et al.*, 2011; Raymond *et al.*, 2011). Nevertheless, residual levels of the insecticide might remain in different organs of the plants until the moment of the harvest. This might imply a potential intoxication risk for consumers of fresh or processed fruit.

To guarantee the safety of guava fruits before their consumption, it is necessary to rely on analytical methodologies that allow determining the residues of imidacloprid with accuracy and exactness. The determination of the insecticides might be arduous because of the complexity of the fruits, therefore, it is required to set out selectivity strategies in the extraction for the solid phase to obtain extracts free of interferences, with the aim of dividing them by HPLC, obtain a high selectivity, lower detection limits and adequate concentration factors.

The traditional methods employed for the determination of insecticides are carried out by multi-phase procedures, based on the extraction with organic solvents with liquid-liquid partitions, followed by the removal of the concomitants through the clean-up phases (*clean-up*), applying extraction in solid phase, allocation with immiscible organic dissolvent, absorption and/or allocation chromatography in column or gel

en fase sólida, reparto con disolventes orgánicos inmiscibles, cromatografía de adsorción y/o reparto en columna o cromatografía de permeación de gel (Picó *et al.*, 2003) y finalmente, etapas de concentración previo al análisis instrumental. Estas técnicas de preparación de muestra tradicionales exigen grandes cantidades de muestras (2 a 100 g), así como sorbentes y solventes de alta pureza (Kristenson *et al.*, 2001; Ochiai *et al.*, 2005; Ettiene *et al.*, 2006; Kristenson *et al.*, 2006; Barker, 2007; Quintero *et al.*, 2008; Ettiene *et al.*, 2010). Además, requieren etapas de re-extracción y evaporación del solvente. Todo esto conlleva a un elevado manejo de los extractos y en consecuencia, se convierten en métodos costosos en términos de tiempo y consumo de reactivos, no siendo idóneos para el análisis de rutina (Torres *et al.*, 1996; Albero *et al.*, 2003; Ettiene *et al.*, 2008).

Algunas de las dificultades asociadas con la extracción líquido-líquido y extracción sólido-líquido para la extracción de residuos de plaguicidas en productos agrícolas corresponden a la formación de emulsiones, un elevado consumo de reactivos y por ende grandes cantidades de desechos de análisis (Thurman y Mills, 1998), por tanto, para solventar estas dificultades, Baker (2000) diseñó una técnica de tratamiento de muestra denominada dispersión de matriz en fase sólida (MSPD, por sus siglas en inglés) que permite analizar muestras sólidas, semi-sólidas y viscosas (Baker, 2007). Esta propuesta fue recientemente revisada por Capriotti *et al.* (2010). Este tipo de procedimiento incluye mecanismos de

permeation chromatography (Picó *et al.*, 2003) and finally, concentration phases prior to the instrumental analysis. These preparation techniques of traditional samples require large quantities of samples (2 to 100 g), as well as high purity sorbents and solvents (Kristenson *et al.*, 2001; Ochiai *et al.*, 2005; Ettiene *et al.*, 2006; Kristenson *et al.*, 2006; Barker, 2007; Quintero *et al.*, 2008; Ettiene *et al.*, 2010). Additionally, require re-extraction and evaporation phases of the solvent. The latter causes an elevated handle of the extracts, consequently, become in expensive methods in terms of time and consumption of the reactive, which are not convenient for the routine analysis (Torres *et al.*, 1996; Albero *et al.*, 2003; Ettiene *et al.*, 2008).

Some of the associated difficulties with the liquid-liquid extraction and solid-liquid extraction for the extraction of the pesticides residues in agriculture products, correspond to the formation of emulsions, an elevated consumption of reactive, therefore, important residual quantities of analysis (Thurman and Mills, 1998), thus, to solve these difficulties, Baker (2000) designed a treatment technique of a sample called matrix dispersion in solid phase (MSPD, English acronym) that allow analyzing solid, semi-solid and viscous samples (Baker, 2007). This proposal was recently revised by Capriotti *et al.* (2010). This type of procedure includes homogenization mechanisms of samples, cellular rupture, exhaustive extraction, fractioning and clean-up in a process (García *et al.*, 2005). MSPD is characterized by a low requirement

ra celular, extracción exhaustiva, fraccionamiento y limpieza en un solo proceso (García *et al.*, 2005). La MSPD se caracteriza por un bajo requerimiento de muestra (0,5 a 1 g), poca cantidad de sorbente y bajo consumo de solvente (10 a 25 mL), este último refleja un bajo impacto ambiental.

En lo que a las técnicas de separación se refiere, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es la más empleada para la determinación de residuos de imidacloprid (Vishwakarma *et al.*, 2008). En este sentido, Wu *et al.* (2010) desarrollaron un método para la cuantificación de residuos de imidacloprid en muestras de calabacín y suelos empleando HPLC con detección UV, posteriormente, estudiaron la degradación y los residuos finales del insecticida. Por otra parte, Radišić *et al.* (2009) propusieron un método HPLC en fase reversa para la determinación de residuos de insecticidas (incluido imidacloprid) en jugos de frutas por HPLC-MS. Chander *et al.* (2010) evaluaron niveles residuales de insecticidas neonicotinoides en muestras de algodón empleando HPLC, después de una extracción en fase sólida. Mientras que el desarrollado por Totti *et al.* (2006) se aplicó en miel de abejas previa extracción MSPD. Di Muccio *et al.* (2006) para residuos de insecticidas neonicotinoides en frutas y vegetales por HPLC-MS. No existe en la literatura reportes previos sobre validación de métodos analíticos para la determinación de imidacloprid en frutos de guayabo. Por ello, en este trabajo se validó un método de análisis de alta resolución basado en MSPD-HPLC, para la determinación de residuos de

of the sample (0.5 to 1 g), little quantity of the sorbent and low consumption of the solvent (10 to 25 mL), this last shows a low environmental impact.

Regarding the separation techniques, the high resolution liquid chromatography (HPLC), is the most employed for the residues determination of imidacloprid (Vishwakarma *et al.*, 2008). In this regard, Wu *et al.* (2010) developed a method for the quantification of imidacloprid residues in squash samples and soils using HPLC with UV detection, subsequently, they studied the degradation and the final residues of the insecticide. On the other hand, Radišić *et al.* (2009) proposed a HPLC method in reverse phase for the residues determination of insecticides (including imidacloprid) in fruit juices by HPLC-MS. Chander *et al.* (2010) evaluated residual levels of neonicotinoid insecticides in cotton samples employing HPLC after an extraction in solid phase. Meanwhile, the one developed by Totti *et al.* (2006) was applied in honey with previous extraction MSPD. Di Muccio *et al.* (2006) developed it for residues of neonicotinoids insecticides in fruits and vegetables by HPLC-MS. In the literature there are not previous reports about the validation of analytical methods for the determination of imidacloprid in guava fruits. For this reason, in this research a high resolution method was validated based on MSPD-HPLC, for the determination of imidacloprid residues in guava fruits, and once validated it was applied to samples of guava fruits in two agriculture plantations.

imidacloprid en frutos de guayabo y una vez validado, se aplicó a muestras de frutos de guayabo de dos plantaciones agrícolas.

Materiales y métodos

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Cromatografía adsorbida al Instituto de Investigaciones Agronómicas, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, Maracaibo-Venezuela.

Imidacloprid de alta pureza (99%), Dr. Ehrenstorfer GMBH (Ausburg, Alemania), se empleó para preparar, una disolución en acetonitrilo (2000 mg.L⁻¹) y se conservó en viales de vidrio ámbar en refrigeración (4°C) hasta su uso. Esta solución mostró una adecuada estabilidad durante un año. Las soluciones de trabajo se prepararon diariamente por dilución. Como solvente de desorción se empleó diclorometano (99,9% Fischer Scientific Company), grado analítico HPLC.

Para la MSPD, se emplearon diferentes fases sólidas: C₁₈, octadecilsilano, (Grace, %C=17%, end-capped, tamaño de partícula 50 µm, tamaño de poro 60°A), fenil, (Grace), Aminopropil, (Grace, %C=5%, no end-capped, tamaño de partícula 50 µm, tamaño de poro 60°A), cianopropil, (Grace), diol (Grace), florisil, (Riedel de Häen 60-100 mesh, ASTM), celite, (BDH, Chemical LTD, 30-80 mesh para cromatografía de gases), sílice (Thorn Smith, Chemist para cromatografía de capa fina), alumina, (Riedel de Häen, ácida súper activo para columnas cromatográficas, pH 4,5, 50 a 200 µm, 200 m².g⁻¹), carbón

Materials and methods

The research was carried out in the Chromatography Laboratory of the Agronomic Research Institute, Agronomy Faculty, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

A highly pure Imidacloprid (99%), Dr. Ehrenstorfer GMBH (Ausburg, Germany), was employed to prepare a dilution in acetonitrile (2000 mg.L⁻¹) and kept in vials of amber glass in a refrigerator (4°C) until its use. This solution showed an adequate stability during a year. The labor solutions were prepared daily by dilution. As a desorption solvent was employed dichloromethane (99.9% Fisher Scientific Company), analytical degree HPLC.

For the MSPD, different solid phases were employed: C₁₈, octadecylsilane (Grace, %C=17%, end-capped, size of the particle 50 µm, size of the pore 60°A), phenyl (Grace), Aminopropyl, (Grace, %C=5%, no end-capped, size of the particle 50 µm, size of the pore 60 °A, cyanopropyl (grace), diol (Grace), florisil (Riedel of Häen 60-100 mesh, ASTM), celite, (BDH, Chemical LTD, 30-80 mesh for gases chromatography), silica (Thorn Smith, Chemist for a thin layer chromatography), alumina (Riedel of Häen, super active acid for chromatographic columns, pH 4.5, 50 to 200 µm, 200 m².g⁻¹), graphitized carbon (Alltech associates, Inc 120/400 mesh), active carbon (Fisher Scientific Company).

The phases were conditioned before their use, in the case of florisil, silica and alumina, these were heated (130 °C for 24 h), later, were stored in

grafitado, (Alltech associates, Inc 120/400 mesh), carbón activado (Fisher Scientific Company).

Las fases se acondicionaron antes de su uso, en el caso de florisil, sílice y alumina se realizó por calentamiento (130°C por 24 h), seguidamente, se almacenaron en un desecador, hasta su uso. En el caso de aminopropil, diol, CN, C₁₈ y C₈, la activación se realizó con metanol.

Optimización

Método de extracción y de limpieza

El procedimiento MSPD para muestras de frutos de guayabo (*Psidium guajava* L.), se realizó en el modo *off-line*, siguiendo las etapas propuestas por Baker (2000). Para la extracción, una porción de muestras de frutos (2,0 g), se colocó en un mortero (25,0 mL de capacidad) y seguidamente, se mezcló suavemente con 0,5 g de las diferentes fases sólidas de dispersión por 2 min, hasta obtener una mezcla homogénea. Esta mezcla se introdujo en un cartucho de polipropileno de 6 mL conteniendo la fase de limpieza (carbón grafitado) y sulfato de sodio anhidro. Posteriormente, se adicionaron al cartucho 10,0 mL de diclorometano para la desorción de los analitos. El extracto recolectado se evaporó hasta sequedad con una corriente de N₂ a 35°C y los residuos se disolvieron en 1,0 mL de la fase móvil acetonitrilo/agua (25:75% v/v). La desorción del analito se realizó empleando un sistema de extracción en fase sólida (Manifold SPE), conectado a una bomba de vacío.

Análisis cromatográfico de las muestras

Una porción de 20 µL de los extractos fue directamente analizada en

a desiccant until their usage. In the case of aminopropyl, diol CN, C₁₈ and C₈, the activation was done using methanol.

Optimization

Extraction and clean-up method

The MSPD procedure for samples of guava fruits (*Psidium guajava* L.), was done off-line, following the phases proposed by Baker (2000). For the extraction, a portion of fruit samples (2.0 g) was put in a mortar (25.0 mL of capacity) subsequently; it was mixed softly with 0.5 g of the different solid dispersion phases for 2 min, until obtaining a homogenous mix. This mix was introduced in a polypropylene cartridge of 6 mL, containing the clean-up phase (graphitized carbon) and anhydrous sodium sulphate. Afterwards, were added 10.0 mL of dichloromethane to the sorption cartridge of the analytes. The extract collected, evaporated until dried with a stream of N₂ at 35 °C and the residues dissolved in 1.0 mL of the mobile phase acetonitrile/water (25:75% v/v). The sorption of the analyte was done employing an extraction system in the solid phase (Manifold SPE), connected to a vacuum pump.

Chromatographic analysis of the samples

A portion of 20 µL of the extracts was directly analyzed in a liquid chromatographer (Shimadzu, SCL 10^a), equipped by a quartered pump (Shimadzu 10A), an UV/vis detector (Shimadzu SPD-10A) and a column C₁₈, Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm ID x 250 mm x 5 µm). Different proportions of CAN/water were evaluated to obtain an adequate separation of

un cromatógrafo líquido (Shimadzu, SCL 10A), equipado con una bomba cuaternaria (Shimadzu 10A), un detector UV/vis (Shimadzu SPD-10A) y una columna C₁₈, Zorbax SB-C₁₈ (4,6 mm ID x 250 mm x 5 µm). Se evaluaron diferentes proporciones de ACN/agua para obtener una adecuada separación de imidacloprid. Los datos cromatograficos se procesaron en un computador con el software Cromat 1.1 (Sistema Xgasoft, C.A). Se prepararon curvas de calibración de imidacloprid a partir de soluciones estándar de imidacloprid en un intervalo de concentraciones entre 0,50 a 10,00 µg.mL⁻¹.

Los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) instrumentales, se determinaron empleando la regresión lineal propuesta por Miller y Miller (2002). Para $LOD = Y - Y_B = 3S_B$ y para $LOQ = Y - Y_B = 10S_B$.

Estudio de recuperación

Para determinar la eficiencia de la extracción, una porción de 1,0 g de muestras de frutos se fortificó con 200 µL de una solución de adición estándar, a un nivel de concentración de 1,0 mg.kg⁻¹, que representó la concentración máxima permisible establecida por la FAO/OMS (Codex Alimentarius; 2000). Seguidamente, la muestra fortificada se almacenó por un periodo de 30 min, para que ocurrieran las interacciones del insecticida con la matriz. Las muestras fortificadas y no fortificadas se sometieron a la MSPD de acuerdo al método de extracción descrito anteriormente. Las muestras no fortificadas se emplearon como blancos.

Para estudiar la influencia del estado de madurez en la recuperación de imidacloprid, se realizaron ensayos

imidacloprid. The chromatographic data was processed in a computer with software Cromat 1.1 (Xgasoft, C.A system). Calibration curves of imidacloprid were prepared after standard solutions of imidacloprid in a concentration interval from 0.50 to 10.00 µg.mL⁻¹.

The detection limits (LOD) and instrumental quantification (LOQ) were determined employing the lineal regression proposed by Miller and Miller (2002). For $LOD = Y - Y_B = 3S_B$ and for $LOQ = Y - Y_B = 10S_B$.

Recovery research

To determine the efficiency of the extraction, a portion of 1.0 g of the samples of fruits was fortified with 200 µL of a solution of standard addition, at a concentration level of 1.0 mg.kg⁻¹, which presented the maximum permissible concentration established by FAO/OMS (Codex Alimentarius; 2000). Subsequently, the fortified sample, stored for 30 min, with the aim of allowing the interactions between the insecticide and the matrix. The fortified and non-fortified samples were submitted to MSPD according to the extracting method described before. The non-fortified samples were employed as white.

To study the influence of the ripening phase in the recovery of imidacloprid, essays were done in fruits samples in two ripening phases: physiological ripeness and ripening for the consumption.

The data obtained during the optimization was analyzed with descriptive statistical considering the mean, relative standard deviation and correlation coefficient of the calibration curves of the insecticide,

en muestras de frutos en dos estados de maduración: madurez fisiológica y madurez de consumo.

Los datos obtenidos durante la optimización se analizaron con estadística descriptiva considerando la media, desviación estándar relativa y coeficiente de correlación de las curvas de calibración del insecticida, empleando el programa estadístico SAS, versión 8.0 (Statistical Analysis System, 1999). La precisión analítica, en términos de repetibilidad y reproducibilidad, se evaluó a través de las desviaciones estándares relativas (RSD) para tres repeticiones. La selectividad del método se evaluó sobre muestras blanco de frutos.

Resultados y discusión

Optimización

En la figura 1 se presenta un cromatograma de imidacloprid obtenido con las condiciones óptimas de separación (cuadro 1). La proporción de ACN/agua (25:75% v/v), permitió una selectividad adecuada, para lograr un pico simétrico de imidacloprid.

Una vez optimizada la separación de imidacloprid se llevaron a cabo los correspondientes estudios de precisión instrumental. Para ello se realizaron cinco inyecciones consecutivas de estándares puros del insecticida a dos niveles de concentración (0,50 y 1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), el mismo día (repetibilidad) y en días diferentes (reproducibilidad).

Los valores de RSD de los tiempos de retención oscilaron entre 0,31 a 0,40% para la repetibilidad y entre 0,72 y 0,75% para la reproducibilidad. Asimismo, los valores de RSD para las áreas de pico oscilaron entre 4,71 y 5,62% para la repetibilidad y entre 5,34

employing the statistical software SAS, 8.0 (Statistical Analysis System, 1999). The analytical accuracy, in terms of repeatability and reproduction, was evaluated through standard relative deviations (RSD) for three replications. The selectivity of the method was evaluated on white samples of fruits.

Results and discussion

Optimization

Figure 1 presents a chromatogram of imidacloprid obtained with the optimum conditions of division (table 1). The ACN/water proportion (25:75% v/v), allowed an adequate selectivity, to obtain a symmetric peak of imidacloprid.

Once optimized the separation of imidacloprid, the following accuracy instrumental studies were carried out. For this, five consecutive injections of pure standards of the insecticide were carried out at two concentration levels (0.50 and 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), the same day (repeatability) and in different days (reproducibility).

The values of RSD of the retention times oscillated from 0.31 to 0.40% for the repeatability, and from 0.72 to 0.75% for the reproducibility. Likewise, the RSD values for the peak areas oscillated from 4.71 to 5.62% for the repeatability, and from 5.34 to 6.08% for the reproducibility. The calibration curves showed a determination coefficient (R^2) of 0.9948, for $n=4$.

A LOD of 0,100 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ was obtained, as well as a LOQ of 0,334 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, lower to LMRs established by FAO/OMS for imidacloprid (1,0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), in

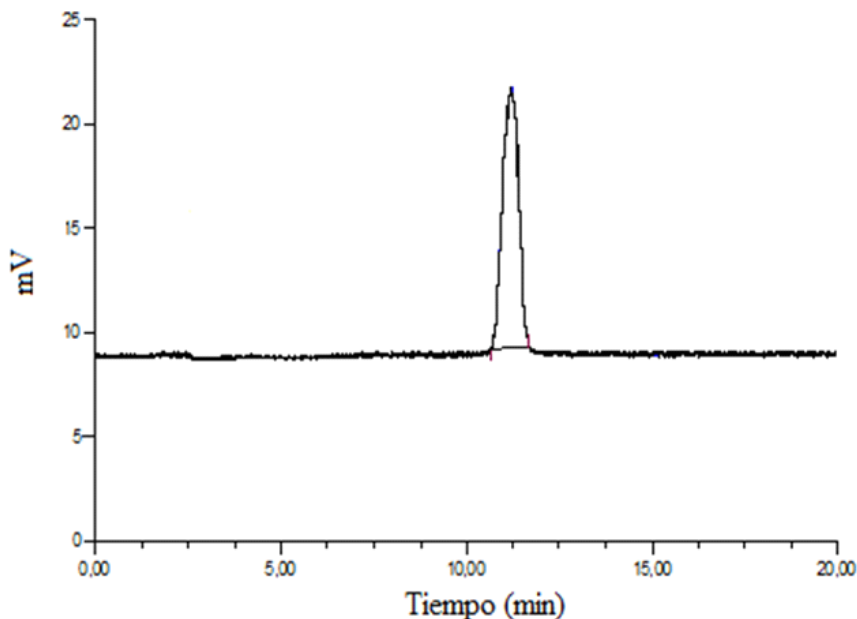


Figura 1. Cromatograma HPLC-UV en fase reversa a 270 nm de imidacloprid ($1,00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), empleando como fase móvil: ACN/ H_2O (25:75% v/v).

Figure 1. HPLC-UV chromatogram in reverse phase at 270 nm of imidacloprid ($1,00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), employing as mobile phase: ACN/ H_2O (25:75% v/v).

y 6,08% para la reproducibilidad. Las curvas de calibración mostraron un coeficiente de determinación (R^2) de 0,9948, para $n=4$.

Se obtuvo un LOD de $0,100 \mu\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ y un LOQ de $0,334 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, me-

guava, which makes feasible the determination of residues of this insecticide with the optimum conditions obtained for HPLC and specifically for the samples of guava fruits.

Cuadro 1. Condiciones óptimas obtenidas con HPLC-UV.

Table 1. Optimum conditions established with HPLC-UV.

Fase móvil	ACN/ Agua (25:75% v/v)
Flujo ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	1,0
Inyección (μL)	20
Longitud de onda de detección (nm)	270
Columna	Zorbax SB-C ₁₈ 4.6x250mm (5 μm)

nores al LMRs establecido por la FAO/OMS para imidacloprid (1,0 mg.kg⁻¹), en guayabo, lo que hizo factible la determinación de residuos de este insecticida con las condiciones óptimas obtenidas por HPLC y específicamente para muestras de frutos de guayabo.

Estudio de recuperación

En la figura 2 se muestran los porcentajes de recuperación de imidacloprid obtenidos en frutos de guayabo con las fases de dispersión. Cuatro fases sólidas polares inorgánicas: florisil, celite, alumina y sílice, tres fases polares enlazadas: diol, CN y NH₂ y tres fases no polares enlazadas: C₈, C₁₈ y fenil, en todos los

Recovery study

Figure 2 shows the recovery percentages of imidacloprid obtained in guava fruits with dispersion phase. Four inorganic polar solid phases: florisil, celite, alumina and silica, the bounded polar phases: diol, CN and NH₂ and three un-polar bounded phases: C₈, C₁₈ and phenyl, in all the cases were employed as graphitized carbon clean-up phase. It was observed that the highest recovery was obtained with (91.24%). For the rest of the un-polar bounded phases, were obtained recovery percentages higher than 73%. With C₈ was obtained 89.56% and with phenyl 74,26%.

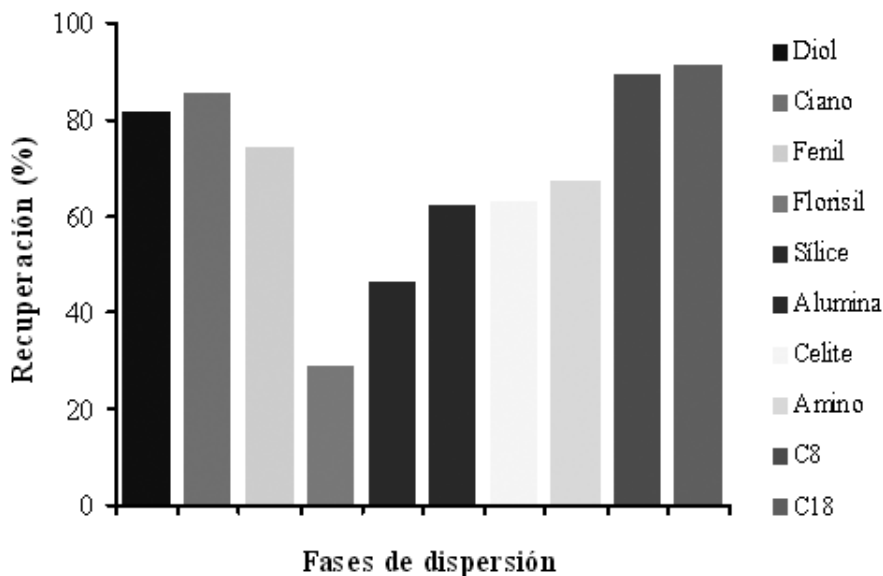


Figura 2. Influencia de la fase de dispersión en la recuperación de imidacloprid en frutos de guayabo (*Psidium guajava* L.), empleando como fase de limpieza carbón grafitado.

Figure 2. Influence of the dispersion phase in the recovery of imidacloprid in guava fruits (*Psidium guajava* L.), employing as clean-up phase graphitized carbon.

casos se empleó como fase de limpieza carbón grafitado. Se observó que la mayor recuperación se obtuvo con C_{18} (91,24%). Para el resto de las fases enlazadas no polares se obtuvieron porcentajes de recuperación superiores a 73%. Con C_8 se obtuvo un 89,56% y con fenil 74,26%.

Con respecto a las fases polares enlazadas, se observaron recuperaciones satisfactorias con diol (81,66%) y CN (85,66%). Sin embargo, para amino las recuperaciones resultaron bajas (67,36%).

Por otra parte, las fases polares inorgánicas arrojaron las menores recuperaciones: florisil (28,71%), sílice (46,10%), alumina (62,43%) y celite (62,68%), posiblemente debido a una mayor afinidad de imidacloprid en esas fases polares, lo que impidió su completa desorción con CH_2Cl_2 .

Considerando que la mayor recuperación de imidacloprid se obtuvo con C_{18} , se estudió la influencia de la cantidad de C_{18} en la recuperación del insecticida imidacloprid. Se realizaron ensayos con 1,0 g de C_{18} y con 0,5 g. Los porcentajes de recuperación resultaron ligeramente superiores con 1,0 g de C_{18} (91,54%) que con 0,5 g (91,24%). La prueba de t no detectó diferencias significativas ($P > 0,05$), para los promedios obtenidos. En tal sentido, para el resto de las aplicaciones se empleó 0,5 g de esta fase.

La polaridad del solvente de desorción es uno de los factores clave en la MSPD (Baker 2000; Baker 2007; Capriotti *et al.*, 2010), puesto que el solvente determina la eficiencia de la extracción y la limpieza del extracto final, por lo tanto, su influencia en la recuperación de imidacloprid en fru-

Regarding the bounded polar phases, satisfactory recoveries were observed with diol (81.66%) and CN (85.66%). However, for amino the recoveries were low (67.36%).

On the other hand, the inorganic polar phases showed the lowest recoveries: florisil (28.71%), silica (46.10%), alumina (62.43%) and celite (62.68%), maybe due to a higher affinity to imidacloprid in these polar phases, which impelled its complete desorption with CH_2Cl_2 .

Considering that the highest recovery of imidacloprid was obtained with C_{18} , the influence of the quantity of C_{18} was studied in the recovery of the insecticide imidacloprid. Essays with 1.0 g of C_{18} and 0.5 g were carried out. The recovery percentages resulted slightly superior with 1.0 g of C_{18} (91.54%) than with 0.5 g (91.24%). The *t* test did not detect significant differences ($P > 0.05$) for the obtained averages. On this matter, for the rest of the applications, 0.5 of this phase was employed.

The polarity of the desorption solvent is one of the key factors in the MSPD (Baker 2000; Baker 2007; Capriotti *et al.*, 2010), because the solvent determines the efficiency of the extraction and clean-up of the final extract, therefore, its influence in the recovery of imidacloprid in guava fruits, was studied. In figure 3 are presented the recoveries obtained. The lower desorption of imidacloprid was obtained with the mix water/CAN (85:15% v/v) for the dispersion phases (30.12, 68.43 and 40.36%, respectively). On the other hand, the extracts obtained with this mix presented problems for their

tos de guayabo, fue estudiada. En la figura 3 se presentan las recuperaciones obtenidas. La menor desorción de imidacloprid se obtuvo con la mezcla agua/ACN (85:15% v/v), para las tres fases de dispersión (30,12, 68,43 y 40,36%, respectivamente). Por otra parte, los extractos obtenidos con esta mezcla, presentaron problemas para su evaporación por la alta proporción de agua, lo que prolongó el tiempo de análisis.

La mayor desorción de imidacloprid se obtuvo para ciano (90,22%), con ACN/MeOH (95:5% v/v), ligeramente superior a la obtenida con

evaporation due to the high proportion of water, which extended the time of analysis.

The highest desorption of imidacloprid was obtained for ciano (90.22%) with ACN/MeOH (95:5% v/v), slightly superior to the one obtained with CH_2Cl_2 . For the rest of the phases, high recoveries with CH_2Cl_2 were obtained, similar to the ones obtained before. The low recovery percentages obtained with the mix ACN/MeOH (95:5% v/v) for the phases with diol and phenyl, did not correspond with the expected, since ACN presented a significant advantage

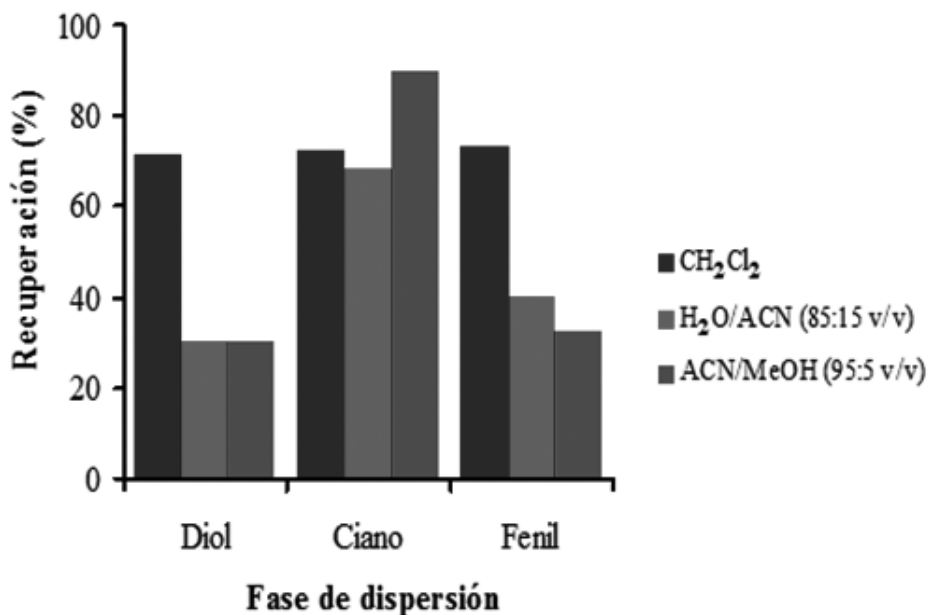


Figura 3. Influencia del solvente de desorción en la recuperación de imidacloprid en muestras de frutos de guayabo (*Psidium guajava* L.).

Figure 3. Influence of the desorption solvent in the recovery of imidacloprid in samples of guava fruits (*Psidium guajava* L.).

CH_2Cl_2 . Para el resto de las fases, se obtuvieron altas recuperaciones con CH_2Cl_2 , similares a las obtenidas anteriormente. Los bajos porcentajes de recuperación obtenidos con la mezcla ACN/MeOH (95:5% v/v), para las fases diol y fenil, no correspondieron con lo esperado, dado que ACN, presentó una ventaja significativa sobre otros solventes de desorción empleados en el análisis de residuos de insecticidas, teniendo una fuerte habilidad de disolución y miscibilidad en agua (Anastassiades y Lehotay, 2003). Sin embargo, para imidacloprid en esta matriz no resultó adecuada.

Los procesos de limpieza con diferentes fases pueden ser requeridos para la extracción de frutos y vegetales debido a la presencia de interferencias en materiales de plantas tales como clorofila, constituyentes aceitosos, sustancias ácidas y tejidos resinosos de las plantas, entre otros (Di Muccio *et al.*, 2006). En este sentido, es importante destacar, que los frutos de guayabo se caracterizaron por ser complejos en su composición, presentaron las siguientes características químicas que posiblemente actuaron como interferentes propios de la matriz: carbohidratos (fructosa, sacarosa, almidón, pectinas de alto contenido de metoxilo), pigmentos (clorofila, carotenoides), agua (74 a 87%), vitaminas A, B3, C, G4), ácidos (ascórbico, fumárico, málico), taninos y fibras (Yusof y Mohamed, 1987; Yahia e Higuera, 1993). Analizando la composición química de la matriz, se infirió que los componentes fueron en su mayoría de naturaleza polar y requirieron ser eliminados del extracto antes de ser sometidos al análisis instrumental. En este trabajo se

on other desorption solvents employed in the residues analysis with insecticides, with a strong ability of dissolution and miscibility in water (Anastassiades and Lehotay, 2003). However, it was not adequate in this matrix for imidacloprid.

The clean-up processes with different phases can be required for the extraction of fruits and vegetables, due to the presence of interferences in materials of plants, such as chlorophyll, oily constituents, acid substances, resin tissues of plants, among others (Di Muccio *et al.*, 2006). In this matter, it is important to mention that guava fruits characterized by being complex in their composition, and presented the following chemical characteristics that could have acted as own interfering elements of the matrix: carbohydrates (fructose, sucrose, starch, pectin with high content of methoxyl), pigments (chlorophyll, carotenoids), water (74 to 87%), vitamins A, B3, C, G4), acids (ascorbic, fumaric, malic), tannins and fibers (Yusof and Mohamed, 1987; Yahia and Higuera, 1993). When analyzing the chemical composition of the matrix, it was inferred that the components had, in most of the cases, polar nature and required to be eliminated from the extract before submitting them to the instrumental analysis. In this research, was studied the influence of the active carbon as clean-up phase in the extraction of the insecticide imidacloprid in guava fruits, for this, extractions with active and inactive carbon were done (figure 4), employing as dispersion phases diol cyano and phenyl.

It was observed the reduction of the recovery of imidacloprid by effect

estudió la influencia del carbón activado como fase de limpieza, en la extracción del insecticida imidacloprid en frutos de guayabo, para ello, se realizaron extracciones con carbón activado y sin carbón activado (figura 4), empleando como fases de dispersión, diol, ciano y fenil.

Se observó la disminución de la recuperación de imidacloprid por efecto del carbón activado. Los porcentajes de recuperación para las tres fases con carbón activado, resultaron similares: diol (71,82%), ciano (72,25%) y fenil (73,23%). Esta baja recuperación, podría deberse a posibles interacciones que estableció el imidacloprid con la fase. Esta fase carbonácea se caracterizó por ser predominantemente

of the active carbon. The recovery percentages for the three phases with active carbon resulted to be similar: diol (71.82%), cyano (72.25%) and phenyl (73.23%). This low recovery might be due to possible interactions established by imidacloprid with the phase. This carbon phase characterized by being mainly hydrophobic in all its structure, it had an irregular shape with elevate porosity which granted it high superficial area ($1200 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) (Di Corcia *et al.*, 1993). This would explain the total retention of the pigments present in the extract ; however, the analyte of interest showed a high affinity for this type of carbon, therefore, it could not be fully removed from the MSPD system.

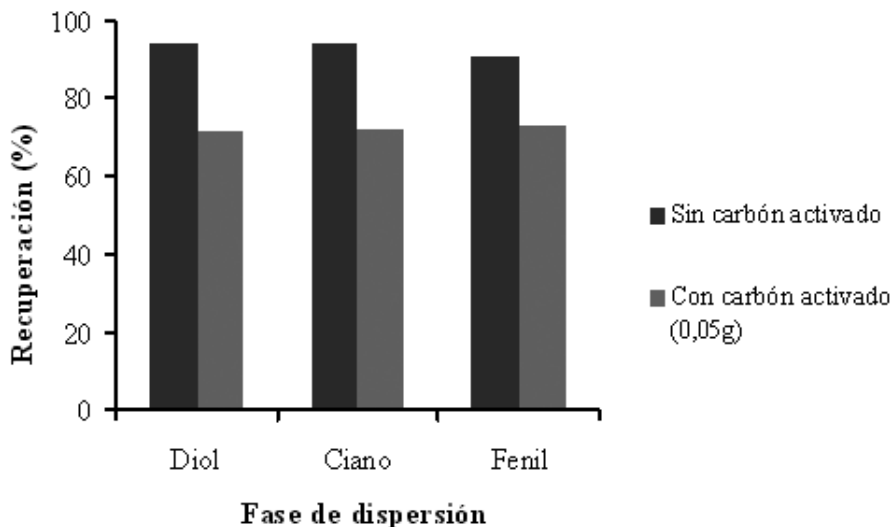


Figura 4. Influencia del carbón activado como fase de limpieza en la recuperación de imidacloprid en muestras de frutos de guayabo (*Psidium guajava* L.).

Figure 4. Influence of active carbon as clean-up phase in the recovery of imidacloprid in samples of guava fruits (*Psidium guajava* L.).

hidrofóbica en toda su estructura, presentó forma irregular con elevada porosidad que le confirió alta área superficial ($1200 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) (Di Corcia *et al.*, 1993). Esto explicaría la retención total de los pigmentos presentes en el extracto; sin embargo, el analito de interés mostró cierta afinidad por este tipo de carbón, por lo que no se pudo remover totalmente del sistema MSPD.

Los porcentajes de recuperación obtenidos con carbón activado, resultaron menores a los obtenidos con carbón grafitado. Posiblemente debido a que el carbón grafitado presentó una estructura regular de anillos aromáticos fusionados, que le permitieron también ser útiles para la remoción de pigmentos. Carbón grafitado ha sido clasificado como un sorbente no específico y generalmente de naturaleza hidrofóbica. En su estructura, los átomos de carbono se encuentran formando capas paralelas, apiladas unas sobre otras, esta disposición le confiere un comportamiento en fase reversa; sin embargo, este material sortivo no sólo tiene un carácter hidrofóbico y alta área superficial para la sorción, además tiene el potencial para formar interacciones específicas con analitos muy polares debido a que este contiene complejos carbono-oxígeno (sitios cargados positivamente) que actúan como sitios de intercambio de aniones en presencia de medios acidificados (Thurman y Mills, 1998; Lehotay *et al.*, 2005). Sin embargo, la interacción de imidacloprid con el carbón grafitado fue de menor intensidad que con carbón activado.

Estudios realizados demostraron una alta efectividad del carbón

The recovery percentages obtained with active carbon, resulted lower than the obtained with graphitized carbon. This may be due to the fact that the graphitized carbon presented a regular structure of aromatic fusion rings that made it useful for removing the pigments. The graphitized carbon has been classified as a non specific sorbent, with a normally hydrophobic nature. In its structure, the carbon atoms form parallel layers piled ones against the others, this disposition confers it a behavior in a reverse phase; however, this absorbing material does not only have hydrophobic characteristics with high superficial area for the sorption, it also has the potential to form specific interactions with very polar analytes, since these contain complexes with carbon-oxygen (positively charged) that act as interchange areas of anions in presence of acidified means (Thurman and Mills, 1998; Lehotay *et al.*, 2005). However, the interaction of imidacloprid with the graphitized carbon had a lower intensity than with the active carbon.

Researches done proved a high effectiveness of graphitized carbon as a clean-up phase in comparison to the active carbon, for the removal of pigments of leaves and stems of guava (Ettiene *et al.*, 2010) in the extraction of organophosphorated insecticides of intermediate polarity. The authors reported an adequate desorption of the insecticides with an ethyl acetate/acetone mix (90:10% v/v). The efficiency and selectivity of the extraction procedure in the recovery of insecticides can be affected by the physiological phase of the fruit.

grafitado como fase de limpieza en comparación con carbón activado, para la remoción de los pigmentos de hojas y tallos de guayabo (Ettiene *et al.*, 2010) en la extracción de insecticidas organofosforados de polaridad intermedia. Los autores reportaron una adecuada desorción de los insecticidas con una mezcla de acetato de etilo/acetona (90:10% v/v).

La eficiencia y selectividad del procedimiento de extracción en la recuperación de los insecticidas puede verse afectada por el estado fisiológico del fruto. Considerando la necesidad de analizar frutos de guayabo en diferentes estados de madurez, se estudió la influencia del estado de madurez en la recuperación del insecticida imidacloprid en frutos de guayabo. Los ensayos de recuperación se realizaron empleando frutos de guayabo a madurez de consumo y fisiológica.

En la figura 5 se presentan los resultados obtenidos, en la cual se observó en la mayoría de los casos una disminución en la recuperación del insecticida en los frutos a madurez fisiológica. En el caso de diol, el efecto fue contrario, se obtuvo una sobrerrecuperación de imidacloprid en el fruto a madurez fisiológica (158,34%), con respecto al fruto maduro (81,86%), posiblemente por la coelución de interferencias de la matriz como pigmentos, azúcares, entre otros.

En función de los resultados descritos del método MSPD-HPLC para muestras de frutos de guayabo, se proponen varias alternativas de aplicación de la MSPD para este tipo de matriz, las cuales se presentan en el cuadro 2.

Considering the necessity of analyzing the guava fruits in different ripening phases, was studied the influence of the ripening phase in the recovery of the imidacloprid insecticide in guava fruits. The recovery essays were carried out employing guava fruits with physiological and consumption ripening.

Figure 5 presents the results obtained, where was observed in most of the cases a reduction in the recovery of the insecticide in fruits with physiological ripening. In the case of diol, the effect was the opposite; an over-recovery of imidacloprid was obtained in the fruit tending to the physiological ripening (158.34%), in relation to the ripened fruit (81.86%), maybe due to the interferences coelution of the matrix such as pigments, sugars, among others.

In function of the results described of the method MSPD-HPLC for samples of guava fruits, some alternatives for applying MSPD are proposed, for this type of matrix, which are presented in table 2.

It can be observed that MSPD presented some alternatives of solid phases for the dispersion of the fruits' sample: C₁₈, C₈, CN, phenyl and diol, in combination with graphitized carbon as clean-up phase, dichloromethane as desorption solvent, but alternatively, ACN/MeOH (95:5) as desorption solvent, when CN was employed as dispersion phase.

Validation

Once optimized the separation of HPLC, as well as the extraction method MSPD, were carried out the correspondent accuracy researches of the method with the chemical and ins-

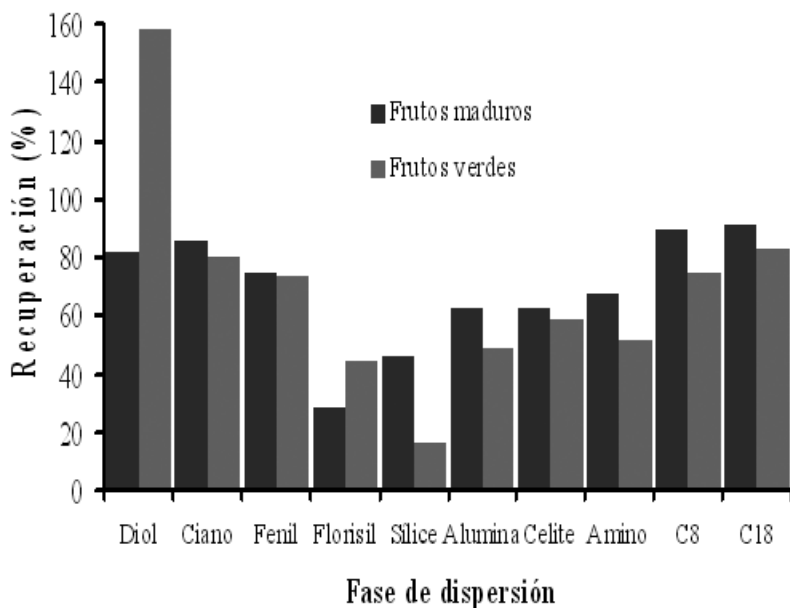


Figura 5. Influencia del estado de madurez del fruto de guayabo (*Psidium guajava* L.), en la recuperación de imidacloprid empleando como fase de limpieza carbón grafitado.

Figure 5. Influence of the ripening phase of guava fruit (*Psidium guajava* L.), in the recovery of imidacloprid employing as clean-up phase graphitized carbon.

Puede observarse que MSPD presentó varias alternativas de fases sólidas para la dispersión de las muestras de frutos: C₁₈, C₈, CN, fenil y diol, en combinación con carbón grafitado como fase de limpieza, diclorometano como solvente de desorción, pero alternativamente, ACN/MeOH (95:5) como solvente de desorción, cuando se empleó CN como fase de dispersión.

Validación

Una vez optimizada la separación HPLC, así como el método de extracción MSPD, se llevaron a cabo los correspondientes estudios de precisión del método con las condiciones químicas e instrumentales seleccionadas a partir

instrumental selected conditions after three samples of fruits. For this, MSPD extractions were done in fruits of fortified white guava with imidacloprid at a concentration of 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (value of LMRs).

The selectivity of the MSPD-HPLC method was studied injecting white samples of fruits obtained in the experimental plantation of the Socialist Center for Fruit and Beekeeping Development (CESID-Fruit and Beekeeping) of Corpozulia, and from the commercial plantation of the farm RFA, where none interfering chromatographic signs were observed at the retention time of imidacloprid,

Cuadro 2. Propuesta de alternativas de aplicación del método MSPD-HPLC, para imidacloprid en frutos de guayabo.**Table 2. Alternative proposals of application of the method MSPD-HPLC for imidacloprid in guava fruits.**

Fase de dispersión	C ₁₈	C ₈	CN	Fenil	Diol
Solvente	CH ₂ Cl ₂	CH ₂ Cl ₂	CH ₂ Cl ₂ ACN/MeOH (95:5% v/v)	CH ₂ Cl ₂	CH ₂ Cl ₂
Fase de limpieza			Carbón grafitado		
Estado de madurez		Madurez de consumo/madurez fisiológica			

de tres muestras de frutos. Para ello se realizaron extracciones MSPD en muestras de frutos de guayabo blanco fortificadas con imidacloprid a una concentración de 1,0 µg.g⁻¹ (valor de LMRs).

La selectividad del método MSPD-HPLC se estudió inyectando blancos de muestras de frutos obtenidos de la plantación experimental del Centro Socialista de Desarrollo Frutícola y Apícola (CESID-Frutícola y Apícola) de Corpozulia y de la plantación comercial de la granja RFA, en los cuales no se observaron señales cromatográficas interferentes al tiempo de retención de imidacloprid, lo que sugirió que no hubo compuestos en las matrices que pudieran dar una señal falso positiva y se descartó la influencia de la matriz en la recuperación de imidacloprid.

Una vez realizada la extracción de los extractos fortificados, se realizaron tres inyecciones consecutivas y se midieron los tiempos de retención y las áreas de pico de las tres inyecciones de los extractos de muestras extraídas el mismo día (repetibilidad) y en días diferentes (reproducibilidad) y se calcularon los correspondientes por-

which suggested that there were not compounds in the matrixes that might sight a false positive, and the influence of the matrix in the recovery of imidacloprid was discarded.

Once done the extraction from the fortified extracts, three consecutive injections were done, and the retention times were measured and the peak areas of the three injections of the sample extracts, extracted the same day (repeatability) and in different days (reproducibility), and the corresponding recovery percentages were calculated. A high accuracy was obtained with RSD values lower to 7%. The RSD value for the retention times were 0.40% for the repeatability and 0.75% for the reproducibility, likewise, the RSD value, for the peak areas were 5.62% for repeatability and 6.08% for the reproducibility.

The LOD and LOQ of the MSPD-HPLC method were obtained based on the LOD and LOQ, instruments previously measured in the optimization phase of the separation, for this were considered the final volume of the extract (2.0 mL) and the quantity of the sample employed in the extraction (1.0 g). A low detection limit

centajes de recuperación. Se obtuvo una alta precisión con valores de RSD menores a 7%. El valor de RSD para los tiempos de retención fueron 0,40% para la repetibilidad y 0,75% para la reproducibilidad, asimismo, el valor de RSD para las áreas de pico fueron 5,62% para la repetibilidad y 6,08% para la reproducibilidad.

Los LOD y LOQ, del método MSPD-HPLC, se obtuvieron con base en los LOD y LOQ, instrumentales previamente calculados en la etapa de optimización de la separación, para ello se consideró el volumen final del extracto (2,0 mL) y la cantidad de muestra empleada en la extracción (1,0 g). Se obtuvo un bajo límite de detección 0,100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y de cuantificación, 0,334 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, resultando menores a los límites máximos residuales para imidacloprid establecidos en el Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 2000).

La exactitud del método se evaluó en función de los porcentajes de recuperación obtenidos para las tres muestras fortificadas a 1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. En todos los casos se obtuvieron valores superiores al 90%. En el cuadro 3, se presentan las figuras analíticas de mérito obtenidos para el método MSPD.

Aplicación del método

La aplicación del método validado se realizó en la determinación de niveles residuales del insecticida imidacloprid en frutos de guayabo provenientes del CESID y de la granja RFA, el muestreo se realizó en el periodo febrero-julio de 2010, durante el cual se recolectaron 53 muestras de frutos de guayabo. La determinación de los niveles residuales, se llevó a cabo

was obtained 0.100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ as well as the quantification 0.334 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, being lower than the maximum residual limits for imidacloprid, established on the Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 2000).

The accuracy of the method was evaluated in function of the recovery percentages obtained for the three fortified samples at 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. In all the cases, values superior to 90% were obtained. In table 3 are presented the analytical figures of the merit obtained for the MSPD method.

Application of the method

The application of the validated method was done in the determination of residual levels of the imidacloprid insecticide in guava fruits coming from CESID and the farm RFA, the sampling was done from february-july of 2010, during this time 53 samples of guava fruits were collected. The determination of the residual levels was done employing the method MSPD-HPLC proposed in the current research with 1.0 g of the sample, 0.5 g of C_{18} as dispersion phase, 0.05 g of graphitized carbon as a clean-up phase and 10 mL of CH_2Cl_2 as desorption solvent.

None imidacloprid levels were detected in any of the samples of the analyzed fruits, corresponding to the five samplings. All the analyzed samples were under the LOQ obtained by the method MSPD-HPLC. On the other hand, according to the values suggested by the commission of the Codex Alimentarius (FAO/OMS), for the maximum limit of residues (LMRs), the analyzed samples did not exceed the limits established for guava fruits 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, which proved the

Cuadro 3. Figuras analíticas de mérito del método MSPD-HPLC para imidacloprid.**Table 3. Merit analytical figures of the method MSPD-HPLC for imidacloprid.**

Insecticida	Nivel ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Repetibilidad (RSD %, $n=5$)		Reproducibilidad (RSD %, $n=5$)	
		t_r^d	Área de pico	t_r^d	Área de pico
Imidacloprid	1,00	0,40	5,62	0,75	6,08
LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Ecuación	S_y/x^a	S_c^b	S_b^c
0,100	0,334	$y=2,35^e x+6,4^e$	182464,29	223472,21	32640,21

a: Error estándar de la estimación, intervalos de confianza de la pendiente y de la ordenada calculados al 95% de nivel de confianza, b: Desviación estándar de la ordenada de origen, c: Desviación estándar de la pendiente, d: Tiempo de retención, e: $\times 10^3$

empleando el método MSPD-HPLC propuesto en este trabajo con 1,0 g de muestra, 0,5 g de C_{18} como fase de dispersión 0,05 g de carbón grafitado como fase de limpieza y 10 mL de CH_2Cl_2 como solvente de desorción.

No se detectaron niveles de imidacloprid en ninguna de las muestras de frutos analizadas, correspondientes a los cinco muestreos. Todas las muestras analizadas estuvieron por debajo del LOQ obtenido para el método MSPD-HPLC. Por otra parte, de acuerdo con los valores sugeridos por la comisión del Codex Alimentarius (FAO/OMS), para el límite máximo de residuos (LMRs), las muestras analizadas no excedieron los límites establecidos para frutos de guayabo $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, con lo cual se demostró la inocuidad de los mismos, de tal manera, que podrían ser consumidos sin representar riesgo alguno para la salud.

harmless of these, thus, these can be consumed without representing a risk for the health.

Conclusions

It has been developed and validated a methodological proposal of MSPD-HPLC for physiological ripened guava fruits and fruits with ripening consumption with different alternatives of dispersion phases: C_{18} , C_8 , CN, phenyl and diol, in combination to graphitized carbon as clean-up phase, dichloromethane as desorption solvent, but alternatively ACN/MeOH (95:5%) as desorption solvent, when was employed CN as dispersion phase. In all the cases, a high accuracy, exactness and sensitiveness were employed lower to the values established in LMRs.

End of english version

Conclusiones

Se ha desarrollado y validado una propuesta metodológica MSPD-HPLC para frutos de guayabo fisiológicamente maduros y a madurez de consumo con varias alternativas de fases de dispersión: C₁₈, C₈, CN, fenil y diol, en combinación con carbón grafitado como fase de limpieza, diclorometano como solvente de desorción, pero alternativamente, ACN/MeOH (95:5%) como solvente de desorción, cuando se empleó CN como fase de dispersión. En todos los casos se obtuvo una alta precisión, exactitud y sensibilidad menor a los valores establecidos en los LMRs.

Literatura citada

- Albero, B., C. Sánchez-Brunete, J. Tadeo. 2003. Determination of organophosphorus pesticides in fruit juices by Matrix Solid-Phase Dispersion and Gas Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 51:6915-6921.
- Anastassiades; M., Lethotay, S., 2003, Método fácil y rápido para la extracción y partición, llamado dispersión de la matriz en fase sólida para la determinación de residuos de plaguicidas en productos del campo. *Assoc. Off. Anal. Chem.*, 86: 412-431.
- Barker, S. 2000. Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis. *J. Chromatogr. A.* 880:63-68. Baker, S. 2007. Matrix solid-phase dispersion (MSPD), *J. Biochem. Biophys. Method*, 70, 151-162.
- Cermeli, M., F. Geraud-Pouey. 1997. *Capulinia* sp. cercana a jaboticabae von Ihering (Hemiptera: Coccoidea, Ericoccodea) nueva plaga del guayabo en Venezuela. *Agronomía Tropical* 47(1):115-123.
- Capriotti, A., C. Cavaliere, P. Giansanti, R. Gubbiotti, R. Samperi, A. Laganà. 2010. Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. *J. Chromatogr. A.* 1217:2521-2532. Chander, M., Yogesh K., Jyotsana M., Navneet S. 2010. Multiresidue analysis of neonicotinoids by solid-phase extraction technique using high-performance liquid chromatography. *Environ Monit Assess* 165:573-576.
- Chirinos-Torres, L., F. Geraud-Pouey, D. Chirinos, C. Fernández, M. Guerrero, G. Fernández, R. Fuenmayor. 2000. Efecto de insecticidas sobre *Capulinia* cercana a jaboticabae von Ihering (Hemiptera: Ericoccodea) y sus enemigos naturales en el municipio Mara, estado Zulia, Venezuela. *Bol. Entomol. Venezuela* 15(1):1-16.
- Codex Alimentarius. 2000. Pesticide Residue in Food-Maximum Residues Limits. Vol 2B, 2nd Ed. FAO/WHO, Rome, Italy. Di Corcia, A.R., A. Samperi, S. Marcomini, S. Stelluto. 1993. Graphitized carbon black extraction cartridges for monitoring polar pesticides in water. *Anal Chem.* 65(7):907-912.
- Di Muccio, A., P. Findente, D. Attard Barbini, R. Dommarco, S. Seccia, P. Morrica. 2006. Application of solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry to the determination of neonicotinoid pesticide residues in fruit and vegetables. *J. Chromatogr A.* 1108:1-6.
- Ettiene, G., S. Ortega, J. Sepúlveda, D. Medina, y I. Buscema. 2006. Dissipation of organophosphorus pesticides in green onion (*Allium fistulosum* L.), cultivated in forced system called "barbacoas". *Bull Environ Contam Toxicol.* 76:415-421.
- Ettiene, G., S. Ortega, D. Medina, J. Sepúlveda, L. Sandoval. 2008. Optimización y validación de un método de extracción y limpieza en fase sólida para la determinación de insecticidas organofosforados en cebollón (*Allium fistulosum* L.) y cilantro (*Coriandrum sativum* L.). *Rev. Fac. Agron. (LUZ).* 25:550-569.

- Ettiene, G., P. García, R. Bauza, D. Medina, y L. Sandoval. 2010. Validación de un método para la determinación de insecticidas organofosforados en hojas y tallos de guayabo (*Psidium guajava* L.), usando extracción ultrasónica y limpieza en fase sólida. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 27:88-113.
- Environment Protection Agency (EPA). Label Review Manual. US. Office of prevention. Pesticides and toxic substances. Office of pesticide programs. www.epa.gov/oppfead1/labeling/lrm/chap-07.htm. 2007. Consulted June 2011.
- García de Llasera, M., L. Gómez-Almaraz, A. Vera-Avila. 2005. Matrix solid-phase dispersion extraction and determination by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection of residues of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in tomato fruit. J. Chromatogr. A. 1093:139-146.
- Geraud-Pouey, F., D. Chirinos, G. Romay. 2001. Efecto físico de las exfoliaciones de la corteza del guayabo (*Psidium guajava*) sobre *Capulinia* sp. cercana a *jaboticabae* von Ihering (Hemiptera: Eriococcidae). Entomotropica 16(1):21-27.
- Geraud-Pouey F., D. Chirinos. 1999. Desarrollo poblacional de la Mota Blanca del Guayabo *Capulinia* sp. (Hemiptera: Eriococcidae) sobre las especies de *Psidium* bajo condiciones de laboratorio. Rev. Fac. Agron (LUZ), Supl 1:23-29.
- Jeschke, P., R. Nauen, M. Schindler, A. Elbert. 2011. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59(7):2897-2908.
- Kristenson, E., G. Haverkate, C. Slooten, L. Ramos, R. Vreuls, U. Brinkman. 2001. Miniaturized automated matrix solid-phase dispersion extraction of pesticides in fruit followed by gas chromatographic-mass spectrometric analysis. J. Chromatogr. A. 917:277-286.
- Kristenson, E., L. Ramos, U. Brinkman. 2006. Recent advances in matrix solid-phase dispersion. Trends Anal. Chem. 25(2):96-111.
- Lehotay, S., K. Mastovska. 2005. Evaluation of two phase and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. J. AOAC Int. 88(2):630-638. Miller, N., J. Miller. 2002. Estadística y quimiometría para química analítica. Cuarta edición, editorial Prentice Hall, España. pp. 111-152.
- Wu, M., J. Cai, J. Yao, B. Dai, Y. Lu. 2010. Study of imidaclothriz residues in cabbage and soil by HPLC with UV detection.. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 84:289-293.
- Ochiai, N., K. Sasamoto, H. Kanda, T. Yamagami, F. David, B. Tienpont, P. Sandra. 2005. Optimization of a multi-residue screening method for the determination of 85 pesticides in selected food matrices by stir bar sorptive extraction and thermal desorption GC-MS. J. Sep. Sci. 28:1083-1092.
- Picó, J., y Y. Font. 2003. Revisión de los métodos de determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en alimentos. Rev. Toxicol. 20:166-175.
- Quintero, A., M. Caselles, G. Ettiene, N. Colmenares, T. Ramírez, D. Medina. 2008. Monitoring of organophosphorus pesticide residues in vegetables of a agricultural area in Venezuela, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 81:393-396.
- Radišić, M., S. Grujić, T. Vasiljević y M. Laušević. 2009. Determination of selected pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Chem. 113(2):712-719.
- Raymond A., C. y J. A. Bethke. 2011. Impact of neonicotinoid insecticides on natural enemies in greenhouse and interiorscape environments. Pest Management Science 67(1):3-9. Schäfer, B. Nicotin u die neonicotenoide. 2008. Chemie in unserer Zeit 42:408-424.

Statistical Analysis System. 1999. Versión 8.0, SAS Institute. Totti, S., M. Fernández, S. Ghini, Y. Picó, E. Fini, J. Mañez, S. Girotti. 2006. Application of matrix solid phase dispersion to the

determination of imidacloprid, carbaryl, aldicarb, and their main metabolites in honeybees by liquid chromatography-mass spectrometry detection. *Talanta* 69:724-729.