



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

MASTER EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**PUESTA A PUNTO Y VALIDACIÓN DE
UN PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE
NEONICOTINOIDES EN ABEJAS (*Apis
mellifera*) POR HPLC-MS/MS**

Trabajo fin de Máster
Valencia, Septiembre 2012

Enrique Sanz Gallur

Directores:
Bernardo Peris Palau
Isabel Escriche Roberto
Marisol Juan Borrás



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

PUESTA A PUNTO Y VALIDACIÓN DE UN PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE NEONICOTINOIDES EN ABEJAS (*Apis mellifera*) POR HPLC-MS/MS

Sanz Gallur Enrique, Juan Borrás Marisol, Peris Palau Bernardo, Escriche Roberto Isabel

RESUMEN

En este trabajo se ha puesto a punto y validado un método para la determinación, en abejas, de residuos de cuatro pesticidas del grupo de los neonicotinoides (imidacloprid, acetamiprid, thiamethoxam y methiocarb) mediante la técnica LC-MS/MS. De los dos métodos de extracción ensayados: líquido-líquido y QuEChERS, se seleccionó el segundo por ser más sencillo, económico, rápido y eficaz; además de reducir considerablemente la utilización de disolventes. La metodología QuEChERS-LC-MS/MS se validó según las directrices de la International Conference on Harmonisation y el Documento de la SANCO 10684/2009, obteniéndose buenos resultados para los 4 analitos estudiados. Se alcanzaron límites de cuantificación de 1,7 ng/g para el thiamethoxam, 1,1ng/g para imidacloprid, 0,9 ng/g para acetamiprid y 0,5 ng/g para methiocarb. Se obtuvieron buenas recuperaciones para los 5 niveles estudiados, oscilando entre 70-120% con precisiones de <20% en la mayoría de los casos. El procedimiento analítico desarrollado se aplicó a 22 muestras de abejas (n=3), resultando que 16 de ellas fueron positivas a alguno de los residuos de los pesticidas evaluados; concretamente en 2 muestras se cuantificó thiamethoxam, en 6 imidacloprid, en 15 acetamiprid y en 7 methiocarb.

PALABRAS CLAVE: Neonicotinoides; Abejas; HPLC-MS/MS; Validación.

1. INTRODUCCIÓN

La apicultura es una actividad agropecuaria cuya práctica consiste en el manejo de abejas melíferas y colmenas, principalmente para la obtención de miel y la polinización de ecosistemas. También, se obtienen otros productos que poseen un papel secundario, pero no menos importantes como son: cera, jalea real, propóleos y polen. Además, debemos tener en cuenta otros aspectos tales como la producción de reinas, abejas y pequeños enjambres, incluso veneno para determinadas terapias, que están adquiriendo en los últimos años un notable protagonismo y que generan ingresos adicionales a los apicultores.

En la Comunidad Valenciana es una actividad tradicional muy arraigada, que la convierte en la tercera comunidad autónoma con mayor censo a nivel nacional. Según el último censo Registro de Explotaciones Ganaderas (REGA) (MARM, 2011) se hallan registradas 394.125 colmenas de las 2.533.270 contabilizadas en todo el territorio nacional, suponiendo un 15,5 % detrás de Extremadura y Andalucía. Esta situación en "el ranking" nacional se debe básicamente a unas idóneas condiciones climáticas y botánicas que la hacen especialmente apta para el desarrollo de este aprovechamiento agropecuario. A pesar de estas excelentes características los apicultores que en su mayoría son profesionales, 1646 de un total de 1727 practica en sus explotaciones el fenómeno de la trashumancia, tanto dentro de la propia comunidad autónoma como hacia otras del resto del territorio español (MARM, 2011).

La trashumancia, en lo que a nuestro territorio autonómico se refiere, ya antiguo, tiene una raíz rigurosamente botánica, que consiste en que las distintas comunidades vegetales que forman el tapiz vegetal de España entran en período de máxima floración de una forma progresiva. Este tipo de práctica cultural permite un mayor aprovechamiento de las distintas floraciones. Las colmenas pasan el invierno en sus propios lugares de origen aprovechando la

floración de los matorrales seriales o romerales, que tras las lluvias otoñales se encuentran en un segundo período de óptimo floral. Hacia la segunda quincena del mes de febrero, se trasladan las colmenas a los regadíos costeros en donde comienza el óptimo de floración de los cítricos. Llegado este punto, comienza en el período Mayo-Junio la gran marcha migratoria, que tiene marcadas diferencias, en las tres provincias que componen la comunidad. Los apicultores de Alicante trasladan sus colmenas, en una primera etapa, hacia la región murciana, buscando la floración de los limoneros; posteriormente, llevan sus colmenas más al sur hacia las grandes extensiones dedicadas al cultivo del girasol donde pasan todo el verano, al ser la floración muy intensa. Los apicultores de Castellón trashuman subiendo los montes de Teruel para adentrarse en la Meseta por Soria, finalizando el recorrido en Burgos. Este itinerario permite que las abejas aprovechen el óptimo de floración más tardío que se produce en los matorrales seriales (tomillar-pradera) de esta zona. En cambio los apicultores de Valencia, desde siempre, prefieren trasladarse hacia Castilla-La Mancha en la época estival (Junio-Julio). En esta región se aprovechan los matorrales seriales, tanto los salviares como los jarales. Ya hacia el final del verano, los apicultores valencianos, regresan con sus colmenas a los romerales levantinos. Entrado el otoño comienza la época de las grandes lluvias, lo que permite a los romerales alcanzar un segundo óptimo fenológico de floración (Sanchís y col., 1993).

Si bien la apicultura es un sector minoritario en comparación con otros sectores ganaderos, debemos señalar la inestimable labor que desempeñan las abejas como agentes polinizadores, tanto de la flora silvestre como de cultivos agrícolas, reportando a la agricultura beneficios tanto de forma directa, a través de los productos que se obtienen, como indirecta en su papel ecológico. En este sentido, cualitativamente, el sector apícola se configura como uno de los mejores modelos de producción sostenible, donde confluyen intereses económicos y sociales ya que contribuye por una parte a la fijación de la población en el medio rural, en zonas donde el desempeño de otras actividades es complicado, así como medioambientales, ya que se trata de una producción totalmente respetuosa con el medio ambiente, a la vez que facilita la polinización, función que contribuye al equilibrio ecológico, así como a la mejora y al mantenimiento de la biodiversidad (MARM, 2010).

Los polinizadores generan la reproducción de cerca del 85% de las plantas con flores, y el 35% de la producción agrícola mundial. La gran mayoría de polinizadores son insectos, incluyendo las abejas, avispas, escarabajos, hormigas, mariposas, y polillas (también algunas especies de aves y murciélagos) (Hopwood y col., 2012). La abeja de la miel es, hoy en día, la más abundante y su porcentaje puede llegar al 60-95% de todos los polinizadores. Las colonias de la abeja melífera se encuentran, en la actualidad, casi exclusivamente en las colmenas que mantienen los apicultores, por lo tanto, la abundancia de este importante polinizador va ligada a la cabaña apícola existente en cada zona. La actividad de estos insectos polinizadores genera en la producción agraria valenciana más de 495 millones de euros, aproximadamente el 39% del total. Se ha dicho que la abeja melífera es el polinizador mayoritario, representando en el entorno agrícola el 80% de todos los polinizadores. Con este valor, podemos estimar que la abeja de miel puede generar anualmente unos 396,45 millones de euros en el sector agrario valenciano. Los productos derivados de la apicultura pueden suponer unos 15-20 millones de euros anuales, por tanto, la polinización que llevan a cabo las abejas supera en más de 30 veces el valor de los productos apícolas (Calatayud y Simó, 2012).

En lo que respecta a la producción de miel, como producto principal, la UE-27 constituye en su conjunto, en el año 2010, después de China, la segunda potencia apícola mundial, valorado en producción total de miel (FAO, 2010). La apicultura proporciona ingresos a más de 600.000 ciudadanos de la UE, ascendiendo el volumen económico del sector apícola de la UE a unos 15.000

millones de euros anuales. En el conjunto de la UE-27, según los datos de la Comisión de la Unión Europea y estadísticas del MARM, España es el principal productor apícola, tomando el número de colmenas como medida de producción. En cuanto al censo apícola de la Comunidad Valenciana, y con respecto al conjunto de comunidades autónomas y regiones de España, ésta se sitúa en primera posición en producción de miel. La Subdirección General de Estadística señala que, en 2009 la Comunidad Valenciana produjo 7.396 Tm de miel, representando el 22,9% de la producción total de miel en España. Es importante destacar que el 35% de la miel producida en la Comunidad Valenciana es miel de azahar (MARM, 2010).

La miel de azahar, junto con la miel de romero, es la miel más emblemática de la Comunidad Valenciana. Por ello, la Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación, redactó la resolución de 19 de diciembre de 2001, en la que se publicaban las reglamentaciones de calidad de la "Miel de Azahar" y la "Miel de Romero", para su distinción con la marca de calidad "CV" (CAPA, 2002). Sin embargo, y a pesar del propósito de la administración por otorgar a estas mieles un valor añadido y protección en el mercado apícola, en contrapartida encontramos en el mismo ámbito autonómico el Decreto 40/93, de 8 de marzo, del Gobierno Valenciano, sobre medidas experimentales para limitar la polinización cruzada en plantaciones de cítricos, popularmente conocido como el decreto de la "Pinyolà", aprobado en 1993 y prorrogado hasta día de hoy, mediante decretos anuales, que ha puesto serios impedimentos a este sector para producir la tan preciada miel de azahar (CAPA, 1993).

Durante este último año y siguiendo las líneas marcadas por el Gobierno Valenciano se dicta el *"Acuerdo de 23 de marzo de 2012, del Consell, por el que se aprueban medidas para limitar la polinización cruzada entre plantaciones de cítricos"* (CAPA, 2012). Contempla dos medidas encaminadas a eliminar a los polinizadores que habitan el entorno de las zonas cítricas para prevenir la aparición de semillas en los frutos de ciertas variedades híbridas de mandarino. Se fija en primer término la prohibición de asentar colmenas a menos de 4 kilómetros de las plantaciones de cítricos durante la época de floración, con algunas excepciones en que deben cumplirse ciertos requisitos. En la práctica, esta limitación destierra al sector apícola valenciano y lo condena a perder su principal fuente de ingresos, la miel de azahar. Además en el apartado séptimo del Decreto de la "Pinyolà", se establece la suspensión de la prohibición de los tratamientos fitosanitarios durante la floración, impuesta por el artículo 3 de la Orden de 20 de marzo de 1984, de la Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación (CAPA, 1984). Esta medida tiene un impacto muy negativo sobre las poblaciones de abejas y el resto de polinizadores por la mortandad que esto conlleva. La época de floración de los cítricos, en plena primavera, coincide con la floración de otras plantas y con el momento de la reproducción de los insectos polinizadores, lo que los hace más sensibles a la acción de los insecticidas (Calatayud y Simó, 2012).

Así, si los apicultores valencianos han venido sufriendo durante estas dos últimas décadas los perjuicios ocasionados por la prohibición de fijar asentamientos de colmenares en plantaciones de cítricos en el ámbito del territorio de la Comunidad Valenciana debido a la promulgación de la normativa de limitación de la polinización cruzada, a partir del año 2006 se le añade una nueva problemática. Se empiezan a detectar la aparición de una persistente pérdida de colonias de abejas (*Apis mellifera*), tanto en nuestra región como en el resto del mundo, un fenómeno que se conoce como Síndrome de Colapso de la Colmena, en adelante SCC, lo cual ha suscitado la enorme preocupación a nivel mundial debido a las pérdidas de este importante polinizador, habiendo sido destacado en un reciente informe de Naciones Unidas (UN News Centre, 2011). El SCC se caracteriza comúnmente por la repentina desaparición de las abejas (obreras específicamente) y aunque en la actualidad se desconocen las causas algunos autores indican que se trata de una problemática multifactorial en la que confluyen una serie de

condiciones que provocan la muerte de un número elevado de abejas y por consiguiente la pérdida de la colmena.

En este sentido, cualquier factor que causa una elevada mortalidad en abejas pecoreadoras resulta en un comportamiento de pecoreo precoz en abejas jóvenes. El pecoreo es una actividad que entraña riesgos para las abejas, y las pecoreadoras precoces, además de menos efectivas, son más débiles que las abejas que han tenido una transición normal. Consecuentemente, cuanto menor es la edad media de las pecoreadoras, el ratio de mortalidad aumenta, lo que acelera el decaimiento de la población. Un comienzo precoz del pecoreo reduce la población de abejas encargadas del cuidado de las crías; la colonia no puede mantener una producción suficiente de cría para remplazar las pérdidas de abejas en el campo, y la población se desploma (Khoury y col., 2011).

Tal y como hemos comentado anteriormente el Síndrome de Colapso de Colmena ha sido asociado a una larga lista de agentes, entre los que cabría destacar: biológicos (el ácaro *Varroa*, el *Virus de la parálisis aguda*, la *Nosema ceranae*); químicos (exposición a insecticidas), factores ambientales de estrés, calentamiento global, etc. (vanEngelsdorp y col., 2009). Así, el cambio climático y la desnutrición asociada a las fuentes de alimentos de monocultivo, se consideran importantes factores en el despoblamiento.

Entre todos los plaguicidas usados en agricultura, los más temidos por los apicultores y objeto de frecuentes estudios en los últimos años, son los pesticidas sistémicos del grupo neonicotinoides. Estas sustancias son potencialmente tóxicas para las abejas y en este sentido señaladas por muchos investigadores como agentes directamente implicados en el Síndrome de Colapso de la Colmena (Khoury y col., 2011; Krupke y col., 2012; Lu y col., 2012; Wu y col., 2011).

Los neonicotinoides son insecticidas sintéticos similares en estructura y acción a la nicotina, un compuesto natural obtenido de plantas que fue ampliamente usado como insecticida antes de la Segunda Guerra Mundial. Se usan para el control de plagas en cultivos y plantas ornamentales, como pulgones, escarabajos de las hojas, termitas y parásitos de animales domésticos como piojos. Estos insecticidas son sistémicos, lo que significa que pueden ser absorbidos y transportados a través de la planta, ofreciendo protección contra insectos. Las plantas absorben estos compuestos por las raíces o las hojas, y los tejidos vasculares los transportan a los tallos, hojas, flores y frutos. Paralizan los insectos mediante el bloqueo químico específico de vías de transmisión del impulso nervioso en el sistema nervioso central de los insectos (Hopwood y col., 2012), y se piensa que producen una alteración en su capacidad para orientarse y regresar a la colmena.

Este tipo de residuos ha pasado a ser una de las principales preocupaciones para las autoridades sanitarias, tanto en el ámbito de la salud pública (por su posible presencia en miel y polen) como en el ámbito veterinario (por la mortandad que se piensa están ocasionando en las abejas). De hecho, la polémica por el controvertido uso de estos pesticidas ha llegado hasta la Comisión Europea, quien requirió a la European Food Safety Authority (EFSA) un informe donde se evaluase la toxicidad en abejas, teniendo en cuenta el nivel de exposición actual a estos pesticidas y los efectos tóxicos descritos en artículos publicados en revistas de gran prestigio (EFSA Journal, 2012). Sin embargo, la EFSA, en sus informes, pone sobre la mesa ciertas dudas sobre la toxicidad de estos pesticidas a las dosis supuestamente empleadas, ya que las dosis utilizadas en los estudios son superiores a las dosis reales a las que las abejas pueden

estar expuestas, en base a los usos admitidos en la UE y las autorizaciones concedidas por los Estados miembros.

Así pues, la toxicidad aguda en abejas provocada por estos pesticidas ya ha sido estudiada, fijándose la LD₅₀ en 280 ppb para Imidacloprid, 99.000 ppb para Acetamiprid,... (EPA-OPP Pesticide Ecotoxicity Database [<http://www.ipmcenters.org/Ecotox/DataAccess.cfm>]). En el mismo, se concluye la necesidad de seguir investigando, adecuando los estudios a las dosis reales de exposición, haciendo especial hincapié en el conocimiento de los efectos subletales con dosis bajas de pesticidas y sus efectos a largo plazo.

El estudio de estos residuos requiere el empleo de técnicas analíticas complejas, lo que precisa de personal cualificado, y el uso de equipos muy sofisticados y costosos que no se encuentran disponibles en cualquier laboratorio. Cada compuesto químico tiene una naturaleza singular, que puede implicar un comportamiento distinto ante la técnica empleada, y por tanto la necesidad de emplear variaciones en las técnicas. Así mismo, el tipo de matriz sobre la cual se pretenda estudiar dichos residuos tiene igualmente efecto sobre el comportamiento de estos compuestos. Además, todavía no se han establecido métodos oficiales para la determinación de estos pesticidas, y los métodos empleados son técnicas recomendadas. Y por otro lado, son muy pocos los estudios en los que se ha trabajado en la identificación de pesticidas en la matriz abeja (Krupke y col., 2012; Totti y col., 2005; Wiest y col., 2011).

Existen diversas técnicas de extracción de pesticidas en las distintas matrices de la colmena, como son la extracción en fase sólida, extracción líquido-líquido o extracción en fase dispersiva (QuEChERS); y todos ellos como fase previa al análisis y cuantificación por cromatografía líquida o de gases, con el empleo de diferentes tipos de detectores. Actualmente la técnica de elección es HPLC-MS/MS ya que permite la cuantificación en matrices biológicas con una alta sensibilidad y selectividad ($\mu\text{g}/\text{kg}$). Sin embargo, para garantizar la calidad y poder comparar los resultados analíticos, es fundamental la validación del método de análisis (International Conference on Harmonisation, Documento SANCO/10684/2009).

Por todo lo anteriormente expuesto, el objetivo de este trabajo ha sido la puesta a punto y validación de un método para la determinación en abejas de residuos de cuatro de los pesticidas del grupo de los neonicotinoides (imidacloprid, acetamiprid, thiamethoxam y methiocarb) más comúnmente utilizados en la Comunidad Valenciana.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materia prima

En el presente estudio se utilizaron 22 muestras de abejas sospechosas de haber sido intoxicadas, recogidas durante la primavera del presente año 2012. Éstas fueron proporcionadas por los técnicos de apiADS, procedentes Valencia, de los términos municipales de Montroi (14), Sagunto (2), Barxeta (2), Villamarchante (1), Loriguilla (1), Chiva (1) y Xátiva (1).

Para llevar a cabo la puesta a punto y validación de la metodología se utilizaron abejas vivas "blanco" libres de residuos de los pesticidas que se pretenden analizar, procedentes de una zona "libre" de tratamientos agrícolas (montes de Ayora), cedidas por Apicultura Rafa Cerdá. La ausencia de residuos se confirmó antes del estudio de validación analizando estas muestras "blanco".

2.2 Reactivos y materiales

Los estándares de los pesticidas neonicotinoides (imidacloprid, acetamiprid, thiamethoxam y methiocarb) fueron obtenidos en Dr. Ehrenstorfer (Alemania), todos ellos de calidad cromatográfica. Otros reactivos utilizados fueron: metanol, acetona, acetonitrilo, diclorometano, ácido fórmico 99-100%, cloruro sódico y sulfato de sodio anhidro, sulfato de magnesio, cloruro sódico (Prolabo); n-hexano y cloruro de amonio (Panreac); ácido orto-fosfórico 85% (Fluka), tierra de diatomeas Celite® 545 y sodio citrato dibásico sesquihidrato (Sigma-Aldrich); sulfato de magnesio, PSA (Supelco) y adsorbente C18 (Agilent Technologies). El agua bidestilada se obtenía de un sistema de agua Milli-Q (Millipore Corp., Billerica, MA). Los reactivos fueron de calidad P.A. y los disolventes HPLC.

2.3 Aparatos

El trabajo se llevó a cabo en un HPLC Agilent 1200 SL series Rapid Resolution, equipado con un desgasificador, una bomba binaria, un inyector automático y un compartimento termostatzado de columna, acoplado a un detector de triple cuadrupolo Agilent LC/MS 6410 con fuente de ionización ESI. El equipo disponía de una columna Zorbax Eclipse XDB-98 (4,6 x 50 mm, 1,8 micras) suministrada por Agilent Technologies, Inc. (Wilmington, DE). Se utilizó un vortex Maxi MixII Mixer de Barnstead (Iowa, USA), un Ultra-Turrax IKA T25 D digital (Germany), una centrifugadora Centronic-BL II de Selecta (España), un rotavapor Heidolph (Germany) y un agitador IKA RT 10 power (Germany).

2.4 Preparación de las disoluciones patrones

Disolución stock (1 mg/mL). Para cada estándar de pesticida se preparó una disolución stock, tomando 25 mg y aforando a 25 mL en metanol. Estas disoluciones se conservaron a -20°C.

Disolución de trabajo I (10 µg/mL). De cada una de las disoluciones stock se pipeteó 0.1 mL y se aforó a 10 mL con metanol. De esta forma se obtuvo el mix de 4 pesticidas de 10 µg/mL.

Disolución de trabajo II (1 µg/mL). De la disolución anterior se pipeteó un volumen de 1 mL en un matraz de 10 mL y se aforó con metanol. De esta forma se obtuvo el mix de 4 pesticidas de 1 µg/mL. Con esta solución se fortificó el blanco de abejas.

Ambas disoluciones de trabajo se conservaban a +4°C hasta su utilización.

2.5 Métodos de extracción de los residuos de la muestra

Se consideraron dos métodos de extracción:

2.5.1. Líquido-Líquido (Totti y col., 2005)

Se pesaban 3 g de abejas, se adicionaba una cantidad determinada de la solución de trabajo II, se dejaba reposar durante 5 min y se machacaban en un mortero. Seguidamente, se le añadía 80 mL de acetona y se mezclaba en un agitador durante 5 min. La mezcla se hacía pasar por un embudo de Buchner, donde se filtraba con una capa de Celite, en el que quedaban retenidas las partes sólidas de las abejas y demás impurezas. Al líquido filtrado se le añadía 100 mL de una solución coagulante (10 g de cloruro de amonio, 20 mL de ácido orto-fosfórico y 800 mL de agua), se dejaba en reposo durante 30 min, agitándolo ocasionalmente de forma manual,

y nuevamente era filtrado con Celite. La muestra se diluía con 100 mL de una solución de NaCl 2% y se extraía con 100 mL de diclorometano en un embudo de decantación. Una vez reposado se recogía el diclorometano, donde habían quedado retenidos los analitos. Se hacía una segunda extracción repitiendo el procedimiento anterior, pero en este caso utilizando 50 mL de diclorometano. A las dos fracciones unificadas se les añadía sulfato de sodio anhidro para eliminar posibles restos de agua y se filtraba con papel de filtro (1 μm). La muestra se llevaba a sequedad en rotavapor a 45°C. Finalmente, se reconstituía con 1,5 mL de metanol, y se filtraba a través de un filtro de nylon de 0,45 μm . Se inyectaban 5 μL del reconstituido en un sistema LC-MS/MS.

2.5.2. Método QuEChERS (Wiest y col., 2011)

Se pesaban 5g de abejas (39-44 abejas) en un tubo Falcon de 50 ml y se adicionaba una cantidad determinada de la solución de trabajo II. Tras reposar durante 5 min, se añadían 10 mL de acetonitrilo y se mezclaba con el Ultraturrax durante aproximadamente 1 min. A continuación se añadían 3 mL de agua bidestilada, 6 mL de hexano y el contenido del tubo 1 (4 g sulfato de magnesio, 1 g cloruro sódico y 500 mg sodio citrato dibásico sesquihidrato). Rápidamente se agitaba manualmente durante 20 segundos, y durante 1 min en el vortex, seguidamente se centrifugaba a 5000 r.p.m. durante 10 min. Se cogían 6 mL de la fase intermedia (correspondiente al acetonitrilo) y se llevaban al tubo 2 (900 mg sulfato de magnesio, 150 mg PSA y 150 mg C18), el cual se agitaba en el vortex durante 1 min y se centrifugaba a 5000 r.p.m. durante 10 min. Se cogían 3 mL del sobrenadante, y se llevaban a sequedad con N_2 a 40°C. El extracto se reconstituía con 200 μL de metanol. De estos 200 μL , 100 μL se mezclaban con 900 μL de fase móvil A (agua bidestilada con 0,5% de ácido fórmico) (los otros 100 μL se conservaban en nevera por si fuese necesario repetir el análisis). La mezcla anterior se pasaba por un filtro de nylon de 0,22 μm y se inyectaba 5 μL en el sistema HPLC-MS/MS.

2.6. HPLC-MS/MS

Para la separación cromatográfica, la muestra se vehiculaba en una fase móvil consistente en agua bidestilada con un 0.5% de ácido fórmico (fase A) y metanol (fase B). La elución comenzaba con un gradiente inicial de 10% de B, que alcanzaba un 95 % de B en 4 min y se mantenía constante hasta el minuto 13, volviendo a las condiciones iniciales en 2 min, para permanecer constante hasta el minuto 18. El flujo de la fase móvil era de 0,4 mL/min, y la columna se mantenía a una temperatura constante de 35°C.

Todos los pesticidas fueron detectados con ionización en electrospray en modo positivo. Para el gas de nebulización y de colisión (nitrógeno) se puso un caudal de 10 L/min y de 3 L/min respectivamente. La presión del nebulizador se ajustó a 40psi, y la temperatura de secado del gas a 300°C. Se trabajó con un voltaje de capilar de 3000 V.

2.7. Cuantificación

La cuantificación de los pesticidas se llevó a cabo representando las áreas de los picos de los iones producto (MRM) que presentaban mayor intensidad frente a su concentración nominal, mediante curvas de calibrado obtenidas fortificando la matriz "blanco de abejas". Los rangos de calibración fueron de 5, 10, 20, 30 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para el método de extracción líquido-líquido, y de 5, 10, 20, 30 y 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para el método con QuEChERS, en la Figura 1 se muestra como ejemplo un cromatograma con los 8 MRM obtenidos en un blanco fortificado.

El tratamiento de la información proporcionada de los cromatogramas se realizó con el software del espectrómetro de masas (MassHunter), que integraba los iones producto para cada analito.

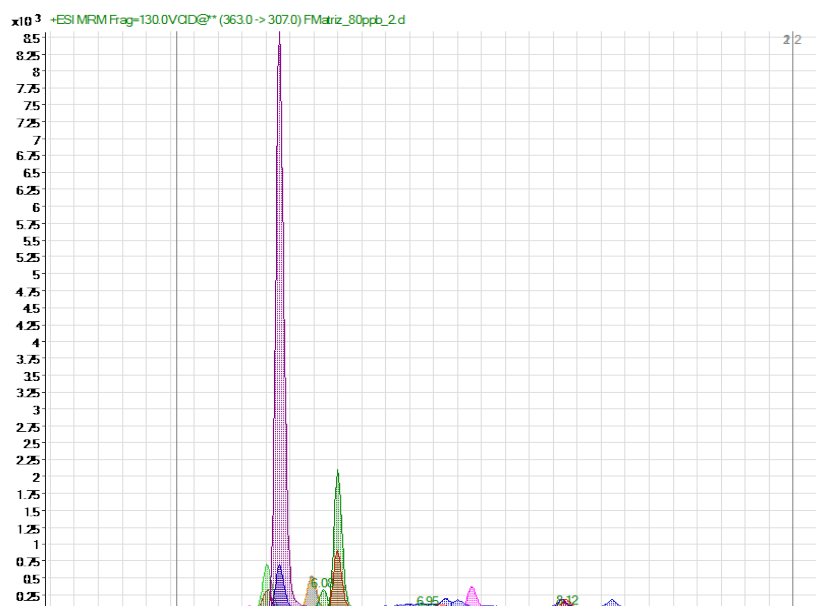


Figura 1. Cromatograma de los iones totales (TIC) obtenido a partir de una matriz fortificada con 80 ng/g de patrones de pesticidas.

2.8. Validación del método

La validación del método se llevó a cabo siguiendo las directrices descritas en la Guía para la Validación de Procedimientos Analíticos de la IHC (International Conference on Harmonisation) y en el documento de la SANCO 10684/2009. Se evaluaron los siguientes parámetros: linealidad (curva de calibrado), exactitud (% recuperación), precisión (reproducibilidad y repetibilidad), límite de detección (DL) y límite de cuantificación (QL).

La linealidad es el parámetro que permite expresar la capacidad del método analítico para dar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra (R^2). Para evaluar la linealidad del método se construyeron diferentes curvas de calibrado mediante la fortificación de la muestra "blanco", a la que se adicionaron volúmenes adecuados de la disolución de trabajo II; para obtener concentraciones finales de 5, 10, 20, 30 y 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$. El experimento se hizo por triplicado.

La exactitud es el grado de concordancia entre el resultado del ensayo y un valor de referencia aceptado, y se obtiene determinando la veracidad y la precisión. La veracidad es el grado de concordancia existente entre el valor medio obtenido de una gran serie de resultados y un valor de referencia aceptado. Sólo puede establecerse mediante material de referencia certificado (CRM), y si no se dispone de CRM, en lugar de la veracidad puede determinarse la recuperación. La recuperación de un analito se refiere a la eficiencia de la extracción en un proceso analítico, y se expresa como porcentaje de analito obtenido luego del proceso de extracción. Para el cálculo de la recuperación se fortificaron muestras "blanco" en un rango de concentraciones de 5, 20, y 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (muestras enriquecidas). Paralelamente se realizó una serie de extracciones de matriz blanco sin fortificar para obtener una cantidad necesaria de extracto de la matriz abeja, a diferentes porciones de este extracto se les adicionaron cantidades

necesarias de la disolución de trabajo II, para obtener concentraciones de 5, 20, y 80 µg/kg (matrix matched). El cálculo de la recuperación se obtuvo comparando los resultados obtenidos de la muestra enriquecida y el valor obtenido en la matrix matched (que se toma como valor real). Los valores de aceptación para la recuperación deben estar comprendidos entre 70 y 120% (SANCO/10684/2009).

La precisión describe la cercanía (grado de dispersión) entre resultados de ensayos independientes obtenidos en condiciones estipuladas (predeterminadas). La precisión suele expresarse como imprecisión y calcularse como desviación estándar de los resultados de los ensayos. Se puede calcular en dos términos: 1. repetibilidad (CVr), un mismo operador obtiene resultados de ensayos independientes con el mismo método e idénticas muestras de análisis, en el mismo laboratorio y con el mismo equipo; y 2. reproducibilidad (CVR), donde operadores diferentes obtienen resultados de ensayos independientes con el mismo método e idénticas muestras de ensayo, en días distintos o distintos equipos. Para su cálculo se fortificaron muestras blanco a 5, 10, 20, 30 y 80 µg/kg, y se sometieron al proceso de extracción en un mismo día para los cálculos de la repetibilidad, y en días diferentes, con dos operadores distintos para el cálculo de la reproducibilidad. En ambos casos las muestras se hicieron por triplicado.

El límite de detección (DL) es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto; y el límite de cuantificación (QL) es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con una adecuada precisión y exactitud. DL y QL se expresan como:

$$DL = \frac{3.3\sigma}{S} \quad y \quad QL = \frac{10\sigma}{S}$$

Donde: σ = desviación estándar de la respuesta
S = pendiente de la curva

La pendiente S se obtuvo de la curva de calibrado de cada uno de los 4 pesticidas. La estimación de σ se llevó a cabo mediante la medición del "ruido" de la línea base en el intervalo de tiempo donde se espera encontrar cada pesticida. Para ello, se analizaron un número apropiado de muestras "blanco" y se calcularon las desviaciones estándar de todas las respuestas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Selección de los iones producto y confirmación de la presencia de los analitos en las muestras

La primera etapa en la realización del estudio fue la selección de las transiciones de monitorización (MRM) y de los parámetros específicos utilizados para cada pesticida evaluado. Para ello se realizó una amplia revisión bibliográfica y se usaron las transiciones utilizadas por diversos autores (Blasco y col., 2011; Wiest y col., 2011; Vanhoenacker y col., 2012) (Tabla 1).

Tabla 1. Transiciones MRM y parámetros

Compuesto	Ion Precursor	Ion producto 1 (cuantitativo)	Ion producto 2 (cualitativo)	Fragmentor	Collision Energy
Acetamiprid	223	223>126	223>56	100	15(1) 15(2)
Imidacloprid	256,1	256,1>209,3	256,1>175,4	90	15(1) 20(2)
Methiocarb	226	226>169	226>121	70	5(1) 10(2)
Thiamethoxam	292	292>211	292>181	85	4(1) 16(2)

La confirmación de la presencia de los analitos en las muestras se realizó de acuerdo a las premisas descritas en la guía de la SANCO 10684/2009. En este sentido, se comprobaba en todas las muestras objeto de estudio que: a) El tiempo de retención de cada analito presente en la muestra coincidía con el tiempo de retención del correspondiente estándar en matriz fortificada, con una tolerancia de $\pm 2.5\%$; este tiempo de retención se debía cumplir para las 2 transiciones (cualificador y cuantificador). b) En las muestras estaban presentes las dos transiciones (iones producto) elegidas para cada analito c) El ratio del área del ion producto 1 y del ión producto 2 estaba dentro de una tolerancia de $\pm 20\%$ a $\pm 50\%$, dependiendo de las intensidades relativas de los iones.

3.2. Evaluación del efecto matriz

Se evaluó la presencia de "efecto matriz" en la matriz abeja. Esta determinación es de vital importancia ya que la ionización de los analitos de interés, en el espectrómetro de masas, puede verse interferida por los múltiples componentes de la matriz, reduciendo o aumentando la respuesta de estos analitos en comparación con la de los estándares en disolventes (Wiest y col., 2011; Blasco y col., 2011).

Para llevar a cabo esta determinación se consideró un rango de concentraciones de los 4 compuestos comprendido entre 5 a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Estas se prepararon (con la disolución de trabajo II) tanto en disolvente puro como fortificando extractos de muestras "blanco" de abejas (exenta de los compuestos). En la Figura 2 se han representado, para cada compuesto las distintas concentraciones frente a las respuestas (áreas) obtenidas tanto con el disolvente como con la matriz. Para todos los pesticidas analizados se observa una clara diferencia entre las pendientes obtenidas en ambos casos (disolvente y matriz) y por lo tanto la existencia de efecto de la matriz. Con esto se concluye la necesidad compensar este efecto matriz, utilizando extractos de abeja para construir las curvas de calibración.

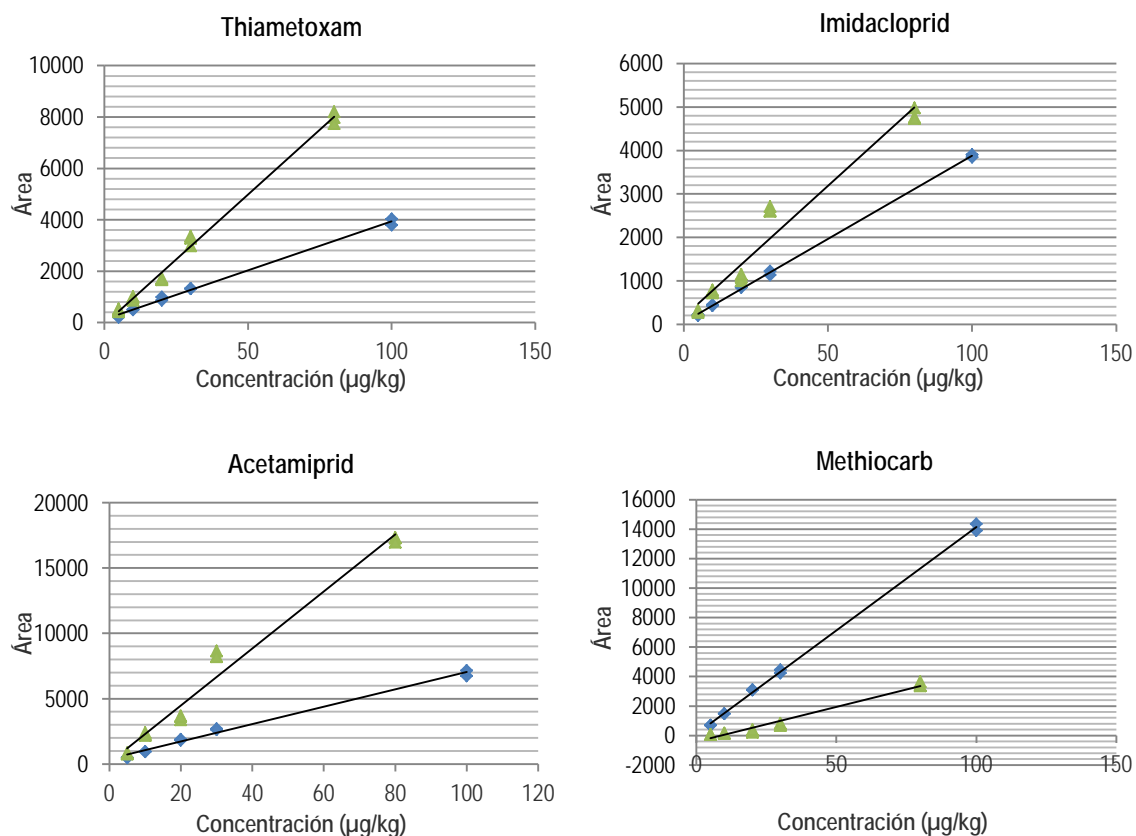


Figura 2. Efecto matriz sobre los pesticidas. ◆ Curva de calibrado en metanol. ▲ Curva de calibrado en matriz.

3.3. Resultados de la Validación

La Tabla 2 muestra los parámetros de la validación obtenidos al aplicar la metodología de extracción con QuEChERS y detección y cuantificación por LC-MS/MS.

En el caso de la linealidad se tomó como valor de aceptación un coeficiente de regresión (R^2) mayor a 0,99. Las curvas presentaron un comportamiento lineal en el rango estudiado (5 a 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$) para los cuatro pesticidas estudiados, con coeficientes de regresión siempre superiores a 0,99 (R^2). Con estos resultados se puede afirmar que la respuesta del equipo es proporcional a la concentración de cada analito.

Según el documento de la SANCO/10684/2009, la recuperación debe estar comprendida entre 70 y 120%. Como se observa en la Tabla 2, los resultados presentados demuestran que para todos los pesticidas estudiados y en los 3 niveles se obtuvieron valores aceptables, y en su mayoría muy próximos al 100%. La única excepción ha sido el thiamethoxam, ya que para el nivel intermedio (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) presentó un porcentaje de recuperación ligeramente superior, de 121%, valor que ha sido considerado como satisfactorio, dada su proximidad al 120%.

La repetibilidad (CVr) y la reproducibilidad (CVR) del método se evaluó a cinco niveles diferentes. Los valores de CVr y CVR deben ser en ambos casos $\leq 20\%$ (SANCO/10684/2009). En términos generales, los resultados de repetibilidad y reproducibilidad (Tabla 2) demuestran que la técnica empleada es precisa, puesto que los valores se encuentran en la mayoría de los casos dentro del límite marcado, a excepción, para el nivel 1 del thiamethoxam, imidacloprid y acetamiprid, cuyos valores son ligeramente superiores al 20% (<27%), tanto para el estudio de

repetibilidad como de reproducibilidad. Para el caso del methiocarb se observa que para el nivel 3 y 4, se supera el 20 %, con resultados de 23.9% y 23.4% respectivamente, aunque en este caso solo para el estudio de la precisión entre días (CV_R). Con los resultados obtenidos podemos decir que el método ensayado tiene resultados satisfactorios en cuanto a que es repetitivo y reproducible, y por lo tanto se puede afirmar que es preciso en el rango ensayado.

Los límites de detección y de cuantificación fueron bastante satisfactorios, estando en todos los casos el límite de detección por debajo de 0.6 ng/g, y el límite de cuantificación por debajo 1.7 ng/g. El methiocarb con un LD de 0.2 ng/g y un LQ de 0.5 ng/g es el que presentó mejores valores de detección.

Tabla 2. Parámetros de la validación

Compuesto	LD (ng/g)	LQ (ng/g)	Recuperación			CVr%					CVR%				
			5ng/g	20ng/g	80ng/g	5ng/g	10ng/g	20ng/g	30ng/g	80ng/g	5ng/g	10ng/g	20ng/g	30ng/g	80ng/g
Thiamethoxam	0,6	1,7	84	121	106	21,0	12,3	2,0	1,0	6,6	26,8	13,2	9,9	9,8	9,1
Imidacloprid	0,4	1,1	85	113	102	22,9	15,8	7,5	0,5	1,3	21,7	17,6	11,3	6,8	8,7
Acetamiprid	0,3	0,9	74	111	102	12,1	13,3	0,6	4,3	5,2	21,3	14,0	12,4	8,7	5,9
Methiocarb	0,2	0,5	91	91	85	14,7	6,7	11,6	9,2	0,8	19,0	16,9	23,9	23,4	11,7

3.4 Análisis de las muestras

Todas las muestras de abejas proporcionadas por los técnicos de apiADS fueron sometidas a los dos métodos de extracción de residuos descritos en los apartados 2.5.1 y 2.5.2. La posterior identificación y cuantificación de los analitos se llevó a cabo en ambos casos por LC-MS/MS. La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos para las 22 muestras de abejas analizadas. Se observa que cuando se aplica la extracción de los analitos con el método QuEChERS la eficacia en la detección y cuantificación de los cuatro pesticidas estudiados es mayor que con el método líquido-líquido. Con este último procedimiento se encontró en 1 muestra thiamethoxam y en 7 imidacloprid. Con el método QuEChERS se obtuvo mayor número de muestras positivas y concentraciones superiores. En este sentido se detectaron positivos en 1 muestra para el thiamethoxam, en 6 para el imidacloprid, en 15 para acetamiprid y en 7 para el ethiocarb. En definitiva el método QuEChERS, se seleccionó por ser más eficaz, sencillo, económico, rápido y además de reducirse considerablemente con él la utilización de disolventes.

Es importante mencionar que en la metodología de extracción propuesta se introdujo una modificación en lo que se refiere a la cantidad de muestra de abejas con las que se realiza la extracción. En el método líquido-líquido se siguió el procedimiento marcado, pesando 3 g de abejas; sin embargo, en el método QuEChERS se decidió analizar las muestras tomando un número constante de 40 abejas. La decisión de este cambio fue motivada por el hecho de que se observó que las muestras, al ser recogidas en distintos periodos de tiempo, presentaban diferentes estados de desecación y descomposición y que por lo tanto su peso difería considerablemente. De hecho para un mismo peso de abejas se observaba una gran disparidad en el número de abejas, que en ciertas muestras llegaba a ser el triple. Para poder comparar los resultados obtenidos, en ambos casos se expresaron los resultados en ng de compuesto por g de abeja.

Tabla 3. Resultados obtenidos en las muestras aplicando los métodos de extracción QuEChERS y líquido-líquido.

Muestra	Thiametoxam (ng/g de abeja)		Imidacloprid (ng/g de abeja)		Acetamiprid (ng/g de abeja)		Methiocarb (ng/g de abeja)	
	QuEChERS	Liq-liq	QuEChERS	Liq-liq	QuEChERS	Liq-liq	QuEChERS	Liq-liq
Barxeta 01	nd	nd	nd	nd	193	14	nd	nd
Barxeta 02	nd	nd	nd	nd	180	33	53	nd
Chiva	nd	nd	nd	nd	10	6	1	nd
Loriguilla	nd	nd	nd	nd	18	15	nd	nd
Montroi 01	nd	nd	179	nd	1	nd	nd	nd
Montroi 02	nd	nd	2864	nd	1	nd	nd	nd
Montroi 03	nd	nd	138	nd	51	nd	nd	nd
Montroi 04	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Montroi 05	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Montroi 06	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Montroi 07	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Montroi 08	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Montroi 09	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Montroi 10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	74	nd
Montroi 11	nd	nd	nd	nd	190	nd	nd	nd
Montroi 12	nd	nd	125	nd	347	nd	24	nd
Montroi 13	nd	nd	150	nd	700	nd	38	nd
Montroi 14	9	nd	23	nd	211	nd	nd	nd
Sagunto 01	nd	nd	nd	nd	4	5	nd	nd
Sagunto 02	nd	nd	nd	nd	23	1	nd	nd
Villamarchante	nd	1	nd	nd	71	72	46	nd
Xativa	nd	nd	nd	nd	1	nd	40	nd

nd, no detectado

4. CONCLUSIONES

El procedimiento QuEChERS ha resultado más eficaz que el líquido-líquido para la extracción de los residuos de 4 neonicotinoides (thiametoxam, imidacloprid, acetamiprid y methiocarb) de matrices de abejas. Además de facilitar considerablemente el trabajo analítico con este procedimiento, se reduce de forma drástica la utilización de reactivos y disolventes.

La utilización de una técnica analítica tan sensible como es LC-MS/MS ha hecho posible la cuantificación en abejas de concentraciones de analitos de hasta 1ng/g.

Para evitar el efecto que presenta la matriz en la respuesta del equipo, se recomienda realizar la cuantificación de los analitos construyendo las curvas de calibración con fortificado de blancos (abejas sin los analitos).

En relación a la cantidad de muestra de abejas con las que se realiza la extracción se recomienda tomar un número constante de abejas (aprox 40 ejemplares) en lugar de pesarlas, ya que al presentar diferentes estados de desecación y descomposición su peso difiere considerablemente.

5.-BIBLIOGRAFÍA

1. Blasco, C; Vazquez-Roig, P.; Onghena, M.; Masia, A; Picó, Y; 2011. Analysis of insecticides in honey by liquid chromatography–ion trap–mass spectrometry: Comparison of different extraction procedures. *Journal of Chromatography A*, 1218 4892– 4901.
2. Calatayud, F. & Simó, E.2010. Importancia de las abejas melíferas y otros insectos como agentes polinizadores de las plantas cultivadas y silvestres de la Comunidad Valenciana. <http://www.apids.es/index.php/apitemas/8-apipolinizacion-y-flora/30-importancia-de-las-abejas-meliferas-y-otros-insectos-como-agentes-polinizadores-de-las-plantas-cultivadas-i-silvestres-de-la-comunidad-valenciana> (consultado 12 de septiembre de 2012).
3. CAPA. 1984. Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación. Generalitat Valenciana. *Orden de 20 de marzo de 1984, por la que se establece la normativa reguladora de las medidas especiales a adoptar en los emplazamientos apícolas y tratamiento fitosanitarios sobre plantas en floración*. DOGV nº 158 19.04.1984.
4. CAPA. 1993. Consellería de Agricultura y Pesca. Generalitat Valenciana. Decreto 40/1993, de 8 de marzo del Govern Valencià sobre medidas experimentales para limitar la polinización cruzada en plantaciones de cítricos. DOGV nº 1992 26.03.1993.
5. CAPA. 2002. Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación. Generalitat Valenciana. 2002. *Resolución de 19 de diciembre de 2001, por la que se publican las Reglamentaciones de calidad de la "Miel de Azahar" y la "Miel de Romero", para su distinción con la marca de calidad "CV"*. DOGV nº 4.167 14.01.2002. 881-8841.
6. CAPA. 2012. Consellería de Agricultura, Pesca, Alimentación y Agua. Generalitat Valenciana. 2012. Acuerdo de 23 de marzo de 2012, del Consell, por el que se aprueban medidas para limitar la polinización cruzada entre plantaciones de cítricos. DOCV nº 6.741 26.03.2012.
7. EFSA. 2012. Statement on the findings in recent studies investigating sub-lethal effects in bees of some neonicotinoids in consideration of the uses currently authorised in Europe. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2752.pdf>
8. European Commission. 2009. DG SANCO. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document No. SANCO/10684/2009. http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf
9. FAO. 2010. Statistic FAO. (consultado julio 2012) <http://faostat.fao.org/site/569/default.aspx#ancor>
10. Hopwood, J.; Vaughan, M.; Shepherd, M.; Biddinger, D.; Mader, E.; Hoffman Black, S. & Mazzacano, C. 2012. Are neonicotinoids killing bees?. The Xerces Society for Invertebrate Conservation.
11. International Conference on Harmonisation (ICH), Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), 2005.

12. Khoury, D.S.; Myerscough, M.R. & Barron, A.B. 2011. A Quantitative Model of Honey Bee Colony Population Dynamics. PLoS ONE journal 6(4): e18491. doi:10.1371/journal.pone.0018491.
13. Krupke C. H.; Hunt, G. J.; Eitzer, B.D.; Andino, G.; Given K. 2012. Multiple routes of pesticides exposure for honey bees living near agricultural fields. PloS ONE 7(1): e29268. doi:10.1371/journal.pone.0029268
14. Lu, C.; Warchol, K.M. & Callahan, R.A. 2012. *In situ* replication of honey bee colony collapse disorder. Bulletin of Insectology 65 1. 99-106.
15. MARM. 2010. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.2010. Programa nacional de medidas de ayuda a la apicultura, España 2011-2013. Madrid, (consultado julio de 2012).
http://www.magrama.gob.es/app/vocwai/documentos/Adjuntos_AreaPublica/PNA%202011-2013.pdf
16. MARM. 2011. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. 2010. Subdirección general de productos ganaderos. El sector de la miel en cifras. Principales indicadores económicos en 2011. (consultado julio 2012)
. http://www.magrama.gob.es/app/vocwai/documentos/Adjuntos_AreaPublica/INDICADORES%20ECON%C3%93MICOS%20SECTOR%20MIEL%202011.pdf
17. Sanchís, E.; Peris, J. B. & Roig, C. 1993. Importancia de la trashumancia apícola valenciana a la meseta castellano-manchega. Revista de estudios albacetenses, nº. 32, 213-222.
18. Totti, S.; Fernández, M.; Ghini, S.; Picó, Y.; Fini, F.; Mañes, J. & Girotti, S. (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.
19. UN News Centre. 2011. Humans must change behaviour to save bees, vital for food production – UN report. (consultado agosto 2012)
<http://www.un.org/apps/news/story.asp?NewsID=37731&Cr=unep&Cr1>
20. Vanhoenacker, G.; David, F.; Sandra, P. (2012). Determination of pesticides in baby food by UHPLC/MS/MS using the Agilent 1290 Infinity LC system and the Agilent 6460 triple quadrupole LC/MS. Research Institute for Chromatography, Belgium. Application Note, Agilent.
21. Wiest, L.; Buletéa, A.; Girouda, B.; Frattaa, C.; Amica, S.; Lambertb, O.; Pouliquenb, H. & Arnaudguilhema, C. 2011. Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. Journal of Chromatography A, 1218; 5743– 5756.