

Trabajo Fin de Grado

Facultad de Ciencias Experimentales



Grado en Química

Distribución de pesticidas en sistemas de abejas, polen, cera y miel. Análisis por LC-MS/MS

Soraya El Hichou Moreno
Curso académico 2016-2017
15 de Septiembre

Tutor/es
Dr. Amadeo Rodríguez Fernández-Alba
Departamento de Química y Física
Dr. María Jesús Martínez Bueno
Departamento de Química y Física

Distribución de pesticidas en sistemas de abejas, polen, cera y miel. Análisis por LC-MS/MS

Memoria del Trabajo Fin de Grado en Química presentada por
Soraya El Hichou Moreno

Almería, 15 de Septiembre de 2017

Fdo: Soraya El Hichou Moreno

Fdo: Amadeo Rodríguez Fernández-Alba

Fdo: María Jesús Martínez Bueno

MEMORIA

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. ABSTRAC.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	4
3.1. LAS ABEJAS COMO BIOINDICADORES	4
3.2. PROBLEMÁTICA AMBIENTAL Y SOCIOECONÓMICA	5
3.2.1. La despoblación de las colmenas	5
3.2.2. Consecuencias económicas	7
3.2.3. Pesticidas como factor de riesgo	8
3.3. LEGISLACIÓN.....	11
3.4. ANÁLISIS DE PESTICIDAS EN ABEJAS Y SUS PRODUCTOS.....	11
3.4.1. Métodos de extracción	13
3.4.1.1. Extracción asistida con sonda de ultrasonidos	14
3.4.2. Cromatografía de líquidos.....	15
3.4.3. Espectrometría de masas	16
3.4.3.1. Ionización electrospray (ESI).....	18
3.4.3.2. Analizador triple cuadrupolo (QqQ)	20
4. OBJETIVOS.....	21
5. MÉTODOS EXPERIMENTALES	22
5.1. ADQUISICIÓN DE MUESTRAS	22
5.2. REACTIVOS Y EQUIPOS.....	22
5.2.1. Reactivos	22
5.2.2. Instrumentación y equipos	22
5.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	23
5.3.1. En abejas	23
5.3.2. En polen, cera y miel.....	24
5.4. MÉTODO DE ANÁLISIS	25
5.5. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS.....	26
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
6.1. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS.....	26
6.1.1. Validación del método en abejas.....	26
6.1.2. Validación del método en polen, cera y miel.....	26
6.2. ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES	27

6.2.1. Determinación y cuantificación	28
6.2.2. Resultados análisis	30
7. CONCLUSIONES	35
8. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	36

1. RESUMEN

En los últimos años el descenso en la población de abejas, uno de los principales polinizadores, está siendo muy acusado. Uno de los factores con los que se relaciona este fenómeno es el creciente uso de pesticidas, en especial los de la familia de neonicotinoides, los cuáles afectan al sistema nervioso de los insectos. Este hecho ha supuesto el desarrollo de nuevos métodos de análisis para la determinación de pesticidas en abejas y sus productos.

Este trabajo aplica un método de análisis de pesticidas ya validado a muestras reales de abejas, cera, polen y miel, con el fin de determinar cómo se distribuyen los pesticidas en estos sistemas. Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto que la cera es la matriz que contiene más cantidad de pesticidas.

Palabras clave: *Pesticidas, abejas, productos de la colmena, cromatografía de líquidos, espectrometría de masas.*

2. ABSTRAC

In recent years the decline in the bees population, one of the main pollinators, is being highly accused. One of the factors that is related to this phenomenon is the increasing use of pesticides, especially those of the neonicotinoid family, which affect the nervous system of insects. This has led to the development of new methods of analysis for the determination of pesticides in bees and their products.

This paper apply a validated pesticide analysis method to a real sample of bees, wax, pollen and honey in order to determine how to distribute the pesticides in these systems. The results show that honeybee wax comb is the matrix with the highest amount of pesticides.

Key words: *Pesticides, bees, hive products, liquid chromatography, mass spectrometry.*

3. INTRODUCCIÓN

3.1. LAS ABEJAS COMO BIOINDICADORES

Las abejas melíferas cuyo nombre científico es *Apis mellifera* juegan un papel principal como polinizadores, además de su importancia por la producción de miel y cera. Es una de las especies de abejas más comunes, puesto que posee una gran capacidad para adaptarse al medio¹. Además, presentan un importante valor económico y la gestión humana sobre esta especie recibe el nombre de apicultura.

Aunque no sólo las abejas cumplen el papel de polinizadores y es importante contar con otras especies de polinizadores ante la evidencia del riesgo que corren el principal tipo de polinizador, las abejas. Por ello, resulta de interés realizar estudios acerca de estos otros polinizadores como pueden ser moscas, escarabajos, polillas, mariposas, avispas, hormigas, pájaros y murciélagos. Un estudio determinó que este otro tipo de polinizador puede llegar a realizar el 25-50% del número total de visitas a las flores, no son tan eficaces como las abejas, pero juegan un papel significativo en la producción de cultivos, por lo que proporcionan un servicio valioso y seguro potencial contra la disminución de la población de abejas².

Los polinizadores también suponen un componente importante para la conservación de la biodiversidad, pues hacen posible la diseminación de las semillas, por tanto, la pérdida de los principales polinizadores podría suponer la pérdida de un gran número de especies vegetales.

Por todos estos motivos la conservación de esta especie es de vital importancia y en los últimos años se está viendo amenazada por diversos factores, uno de ellos el uso de pesticidas en la agricultura. Las abejas son sensibles a los pesticidas y responden a su uso en el ambiente muriendo o reteniendo los residuos en su organismo³.

Las abejas cubren una amplia área (hasta 7 km²) en su búsqueda de néctar y polen, por ello el uso de abejas y sus productos (polen, cera y miel) como bioindicadores de la contaminación ambiental ha sido de gran interés en los últimos años. Los estudios han demostrado que el nivel de contaminación de las colmenas por los plaguicidas está estrechamente relacionado con la proximidad de la fuente de contaminación y la duración de la exposición (García-Chao et al., 2010, Mullin et al., 2010, Chauzat et al., 2011, Panseri et al., 2014, Malhat et al., 2015). Entre las diferentes matrices evaluadas, se ha indicado que el polen es la mejor para evaluar la presencia de residuos de plaguicidas

¹ Rader, R., Bartomeus, I., Garibaldi, L.A., (...), Viana, B.F., Woyciechowski, M. Non-bee insects are important contributors to global crop pollination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2016**, 113(1), 146-151.

² Miller-Struttman, N.E., Geib, J.C., Franklin, J.D., (...), Hedrick, E., Galen, C. Functional mismatch in a bumble bee pollination mutualism under climate change. *Science*, **2015**, 349(6255), 1541-1544.

³ Baldi Coronel, Bertha; Vallejos, Omar; Pancrazio, Gastón; Lopez Muller, Nadia; Goldaracena, Carlos; Taus, María. Empleo de la abeja melífera como bioindicador de contaminación ambiental con herbicidas en áreas cultivadas con soja en la Provincia de Entre Ríos y su relación con el contenido residual en la miel. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, **2014**, Suplemento vol.4.

ambientales, ya que es fácil de recoger y frecuentemente está contaminado (Chauzat et al., 2006, 2011)⁴.

La necesidad de controlar esta contaminación ambiental está suponiendo para la ciencia nuevos desafíos en los últimos años por la necesidad de desarrollar métodos de análisis sensibles, selectivos y fiables para matrices complejas como son las abejas y sus productos. La matriz de abeja se considera compleja porque la presencia de cera, de naturaleza lipofílica, adherida a su cuerpo puede conducir a importantes interferencias cromatográficas⁵. La miel es una de las matrices más complejas de alimentos de origen animal, pues contiene monosacáridos, ácidos orgánicos, aceites esenciales, colorantes, residuos de polen de abeja y cera⁶.

Por todo ello, queda en evidencia la importancia de que se lleven a cabo análisis multiresiduos de pesticidas, los cuales nos permitan tener una idea de la contaminación de las colmenas y poder relacionar éstos con la disminución de las poblaciones de abejas.

3.2. PROBLEMÁTICA AMBIENTAL Y SOCIOECONÓMICA

3.2.1. La despoblación de las colmenas

La despoblación de las colmenas tiene lugar desde hace décadas, tanto en Estados Unidos como en Europa. En una revisión sobre el estado de las colmenas se estimó con datos de la FAO que las pérdidas desde 1961 a 2007 fueron de 26.5% en Europa y de hasta 49.5% en Estados Unidos⁷. Pero en los últimos años este hecho ha sido más acusado.

En el otoño de 2004 apicultores de todo el mundo comienzan a alertar de pérdidas masivas en sus colmenas. Entre un 30 y 90% de las abejas adultas desaparecen, quedando únicamente la reina y las crías. Ni rastro del resto de la colonia, no hay cadáveres, ni abejas enfermas; simplemente, se desvanecen. El fenómeno se denomina síndrome del colapso de las colonias (CDD por sus siglas en inglés, Colony Collapse Disorder) y afecta tanto a colmenas de abeja de la miel, como a las abejas silvestres⁸. Pero no fue hasta 2006 cuando se habló por primera vez de este término.

Los datos europeos del proyecto EPILOBEE mostraron que las tasas anuales de mortalidad de las colonias notificadas entre 2012 y 2014 alcanzaron hasta el 36%. Los datos de los Estados Unidos mostraron que las pérdidas anuales de las colonias reportadas

⁴ de Oliveira, R.C., Queiroz, S.C.D.N., da Luz, C.F.P., Porto, R.S., Rath, S. Bee pollen as a bioindicator of environmental pesticide contamination. *Chemosphere*, **2016**, 163, 525-534.

⁵ Fernández, M., Picó, Y., Girotti, S., Mañes, J. Analysis of organophosphorus pesticides in honeybee by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 49(8), 3540-3547.

⁶ Gbylik-Sikorska, M., Sniegocki, T., Posyniak, A. Determination of neonicotinoid insecticides and their metabolites in honey bee and honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **2015**, 990, 132-140.

⁷ vanEngelsdorp, D., Meixner, M.D. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, **2015**, 103(SUPPL. 1), S80-S95.

⁸ URL: <http://www.abc.es/sociedad/colapso-abejas/>

por los apicultores alcanzaron hasta el 45%. Los mismos datos mostraron que los apicultores comerciales en los Estados Unidos reportan mayor flotación de colonias de abejas en el verano que en el invierno. Las pérdidas de verano suelen estar relacionadas con incidentes de envenenamiento. El mecanismo de CCD sigue siendo desconocido, pero hay un acuerdo entre los científicos que hay varios factores que podrían interactuar las posibles causas de las pérdidas de las colonias⁹.

Para acabar con este problema es importante identificar el factor que lo provoca, por lo que se están realizando estudios para ver cómo afectan distintos factores a las colmenas. Se sospecha que es una mezcla de factores los que lo causan, pues cualquier cambio puede causar el estrés en la colmena, como demuestra un estudio reciente, que presenta el modelo de una colmena de abejas en funcionamiento y la somete a estrés externo. El modelo predice que la tensión constante dependiendo de la densidad con que actúe puede resultar en interrupciones repentinas catastróficas en el comportamiento dinámico y el eventual colapso de la colmena¹⁰.

Los factores de estrés que afectan a las abejas son múltiples en su naturaleza y origen y pueden agruparse en cuatro amplias clases: física, química, biológica y nutricional. Los factores de estrés físicos se rigen en su mayoría por cambios ambientales (por ejemplo, el cambio climático, la fragmentación y destrucción del hábitat), mientras que los estresantes químicos incluyen principalmente compuestos de naturaleza antropogénica (usados en agricultura, actividades urbanas/ industriales/ mineras, apicultura, jardinería, etc.) así como contaminantes de origen natural (por ejemplo, mico toxinas, alcaloides vegetales, etc.). Los factores de estrés biológicos incluyen plagas de abejas y enfermedades exóticas, mientras que los factores de estrés nutricional pueden expresarse como un cambio en el estado nutricional de la abeja (por ejemplo, proteínas, lípidos, azúcares, vitaminas y minerales). Uno de los desafíos en la evaluación de riesgos ambientales es incluir los efectos combinados de estos factores de estrés en los esquemas de evaluación de riesgo. Por este motivo la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA por sus siglas en inglés) está desplegando recursos y esfuerzos para avanzar hacia un enfoque holístico de evaluación de riesgos de múltiples factores de estrés en las abejas¹¹.

Otro estudio muestra la relación que hay entre la mortalidad en las colmenas y la variabilidad climática. Se investigaron las correlaciones estadísticas entre las variables climáticas mensuales y las tasas de mortalidad invernal y los resultados indican que las condiciones climáticas más cálidas y más secas del año anterior iban acompañadas de una mayor mortalidad invernal¹².

⁹ Kiljanek, T., Niewiadowska, A., Semeniuk, S., (...), Borzęcka, M., Posyniak, A. Multi-residue method for the determination of pesticides and pesticide metabolites in honeybees by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry-Honeybee poisoning incidents. *Journal of chromatography. A*, **2016**, 1435, 100-114.

¹⁰ Ross D. Booton, Yoh Iwasa, James A.R. Marshall, Dylan Z. Childs. Stress-mediated Allee effects can cause the sudden collapse of honey bee colonies. *Journal of Theoretical Biology*, **2017**, 420, 213-219.

¹¹ Rortais, A., Arnold, G., Dorne, J.-L., (...), Szentes, C., Verdonck, F. Risk assessment of pesticides and other stressors in bees: Principles, data gaps and perspectives from the European Food Safety Authority. *Science of the Total Environment*, **2017**, 587-588, 524-537.

¹² Matthew Switanek, Karl Crailsheim, Heimo Truhetz, Robert Brodschneider. Modelling seasonal effects of temperature and precipitation on honey bee winter mortality in a temperate climate. *Science of the Total Environment*, **2017**, 579, 1581-1587.

Las causas más visibles que pueden explicar este fenómeno es el uso extendido en la actualidad de pesticidas usados en la agricultura sobre todo los insecticidas, que pueden afectar a las abejas por su exposición directa o bien indirectamente a través del polen y néctar que recolectan las abejas obreras y llevan a la colmena. También una de las principales causas es el ácaro *Varroa destructor*, el cual también es tratado con pesticidas, en este caso acaricidas como amitraz, cumafós, tau-fluvalinato, flumetrín y acrinatrín; otro de los problemas son las resistencias que se producen¹³.

En otro estudio se ha investigado los efectos de un pesticida neonicotinoide, el imidacloprid, y el ácaro varroa individualmente. El estudio proporciona pruebas claras de que la exposición a dosis subletales de imidacloprid podría ejercer un efecto significativamente negativo sobre la salud y la supervivencia de las abejas melíferas y se observó el aumento de enfermedades víricas cuando la colonia era infectada por el ácaro varroa, posiblemente por la disminución del sistema inmunológico¹⁴.

3.2.2. Consecuencias económicas

La dependencia económica en todo el mundo de estos polinizadores es indudable, además de por su labor en la agricultura, por las ganancias de muchos países por la producción de miel de esta especie de abeja. En 1997 se realizó el primer cálculo global resultando un valor económico de 117 mil millones de dólares (88 mil millones de euros). En 2009 fue de 153 mil millones de dólares (115 mil millones de euros) y el cálculo más reciente, ha sido de 265 mil millones de euros¹⁵.

Un estudio determinó que la dependencia económica en el sector de la agricultura y otras industrias para Estados Unidos era de 24,5 a 44,9 mil millones de dólares¹⁶. En China existen numerosos informes regionales de descensos de algunos polinizadores económicamente importantes, como las abejas melíferas y abejas solitarias. A escala global, se estima que el valor económico total en China de esta actividad es cercano a los 200 mil millones de dólares¹⁷.

La Unión Europea es el segundo productor de miel tras China con una producción de 250000 toneladas al año y un número de colmenas estimado en 16 millones entre 2014-2016, siendo España, Francia, Grecia, Rumanía e Italia los países con mayor número de

¹³ Al Toufailia, H., Scandian, L., Ratnieks, F.L.W. Towards integrated control of varroa: 2) comparing application methods and doses of oxalic acid on the mortality of phoretic *Varroa destructor* mites and their honey bee hosts. *Journal of Apicultural Research*, **2015**, 54(2), 108-120.

¹⁴ Abbo, P.M., Kawasaki, J.K., Hamilton, M., (...), Liu, J., Chen, Y.P. Effects of Imidacloprid and *Varroa destructor* on survival and health of European honey bees, *Apis mellifera*. *Insect Science*, **2017**, 24(3), 467-477.

¹⁵ El declive de las abejas. Peligros para los polinizadores y la agricultura de Europa. Nota técnica de la Unidad Científica de Greenpeace Revisión 1/2013.

¹⁶ Chopra, S.S., Bakshi, B.R., Khanna, V. Economic Dependence of U.S. Industrial Sectors on Animal-Mediated Pollination Service. *Environmental Science and Technology*, **2015**, 49(24), 14441-14451.

¹⁷ Teichroew, J.L., Xu, J., Ahrends, A., (...), Tan, K., Xie, Z. Is China's unparalleled and understudied bee diversity at risk? *Biological Conservation*, **2017**, 210, 19-28.

colmenas¹⁸. Además, España es el principal país productor de miel en la Unión Europea (UE), posicionándose entre los 12 primeros del mundo¹⁹.

Por consiguiente, el decaimiento de la población de abejas melíferas supone una gran pérdida económica, tanto en la apicultura como en la agricultura.

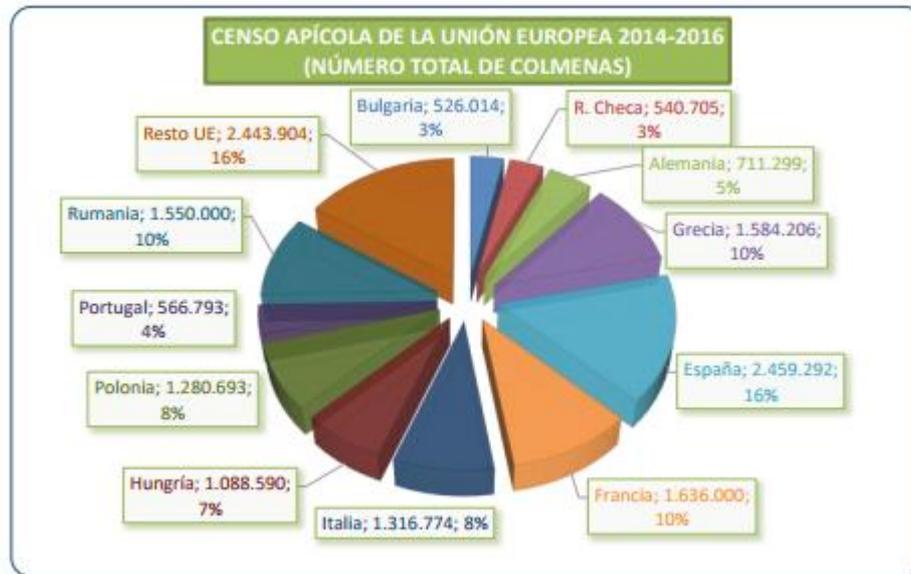


Figura 1. Censo apícola en la Unión Europea 2014-2016. Fuentes: Comisión de la Unión Europea y estadísticas del MAGRAMA. Elaboración: S.G. Productos Ganaderos.

3.2.3. Pesticidas como factor de riesgo

En numerosos estudios se ha relacionado el uso de pesticidas, concretamente insecticidas de la familia de los neonicotinoides con la desaparición de abejas. Los neonicotinoides son un grupo relativamente nuevo de sustancias activas que interfieren con las vías neuronales colinérgicas nicotínicas de los insectos actuando agonísticamente sobre los receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChR), resultando en una sobre activación de las neuronas colinérgicas y la posterior parálisis y muerte de los insectos. Los fenilpirazoles son insecticidas sistémicos extremadamente activos que actúan interrumpiendo el sistema nervioso central de los insectos. Específicamente, estos insecticidas inhiben el canal de cloruro de ácido gamma-aminobutírico (GABA) y el receptor del neurotransmisor inhibitorio glutamato, dando lugar a hiperexcitación, convulsiones y parálisis, que conducen a la muerte de los insectos. Los insecticidas piretroides son sustancias utilizadas para controlar un amplio espectro de plagas en las

¹⁸ INFORME DE LA COMISIÓN AL PARLAMENTO EUROPEO Y AL CONSEJO sobre la aplicación de las medidas relativas al sector apícola del Reglamento (UE) n.º 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo por el que se crea la organización común de mercados de los productos agrarios COM/2016/0776 final.

¹⁹ Yániz¹, J.L., Ángel-Beamonte¹, E., Martín-Ramos¹, P., Sales¹, E. y Santolaria¹, P. ESTUDIO MORFOMÉTRICO DE LA ABEJA MELÍFERA (*Apis mellifera iberiensis*) EN LA PROVINCIA DE HUESCA. 2017 (<http://acteon.webs.upv.es/CONGRESOS/AIDA%202017/17.pdf>)

producciones vegetales. Dependiendo de su estructura, estas sustancias actúan sobre el sistema nervioso periférico o central de los insectos mediante el bloqueo de los canales de sodio y potasio y por la activación del canal de calcio de la membrana neuronal²⁰.

La evaluación del riesgo de estos pesticidas es importante, tanto para la supervivencia de las abejas como para la salud humana, pues consumimos productos apícolas como la miel. Este problema va más allá puesto que abejas sanas son capaces de aprovechar la miel de una población de abejas debilitada o que incluso haya abandonado su colmena, este fenómeno se llama “robo”²¹ y es importante tenerlo en cuenta, ya que una colmena abejas sanas pueden recolectar la miel de una colmena que ha sido expuesta a pesticidas que han tenido consecuencias nefastas sobre la colmena.

Un estudio ha demostrado que la abeja melífera prefiere comer más de soluciones de sacarosa tratadas con los neonicotinoides más comúnmente usados, imidacloprid (IMD), thiamethoxam (TMX), y clothianidin (CLO) que la sacarosa sola. Este trabajo muestra que las abejas no pueden controlar su exposición a los neonicotinoides en los alimentos y, por tanto, el tratamiento de los cultivos en flor con IMD y TMX presenta un riesgo considerable para las abejas que se alimentan²².

Para comprobar el efecto de los neonicotinoides en un estudio se entrenó a abejas en edad de forrajeo para aprender a asociar aroma floral con una recompensa que contiene concentraciones de néctar relevante de IMD y TMX y probaron sus recuerdos olfativos a corto y largo plazo. Resultó que ninguna de las soluciones mejoró la tasa de aprendizaje olfativo y algunas de ellas lo deterioraron. Los datos muestran que los impactos negativos de las dosis bajas de IMD y TMX no requieren exposición a largo plazo y sugieren que los impactos de los neonicotinoides en el olfato son mayores que sus efectos en la memoria²³.

Menos estudiados son los efectos potenciales de los neonicotinoides en las abejas reinas, que pueden estar expuestas indirectamente a través de compartir alimentos. Un estudio evaluó los efectos sobre la productividad de la reina, para ello se alimentaron con imidacloprid (0, 10, 20, 50 y 100 ppb) pequeñas colonias de diferentes tamaños (1500, 3000 y 7000 abejas) en almíbar durante tres semanas. Se encontraron efectos adversos del imidacloprid sobre las reinas (puesta de huevos y actividad locomotora), abejas obreras (actividades forrajeras e higiénicas) y desarrollo de colonias (producción de crías y depósitos de polen) en todas las colonias tratadas. Algunos efectos fueron menos evidentes a medida que aumentó el tamaño de la colonia, lo que sugiere que las poblaciones de colonias más grandes pueden actuar como un tampón para la exposición a pesticidas. Estos datos sugieren que se debería reducir la exposición a los neonicotinoides

²⁰ Paradis, D., Bérail, G., Bonmatin, J.-M., Belzunces, L.P. Sensitive analytical methods for 22 relevant insecticides of 3 chemical families in honey by GC-MS/MS and LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2014**, 406(2), 621-633.

²¹ Kaufmann, A., Kaenzig, A. Contamination of honey by the herbicide asulam and its antibacterial active metabolite sulfanilamide. *Food Additives and Contaminants*, **2004**, 21(6), 564-571.

²² Kessler, S.C., Tiedeken, E.J., Simcock, K.L., (...), Stout, J.C., Wright, G.A. Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides. *Nature*, **2015**, 521(7550), 74-76.

²³ Wright, G.A., Softley, S., Earnshaw, H. Low doses of neonicotinoid pesticides in food rewards impair short-term olfactory memory in foraging-age honeybees. *Scientific Reports*, **2015**, 5,15322.

a principios de la primavera cuando las colonias son más pequeñas y las reinas son más vulnerables a la exposición²⁴.

Se ha observado que fipronil, imidacloprid y tiametoxam causan una disminución significativa de las colonias de abejas en muchos países desde la última década. El dimetoato es un acaricida cuyo uso está indicado para algunos cultivos como cítricos, tomates y manzanas. Pertenece a la clase de organofosfatos, y tiene un efecto tóxico más agudo en los seres humanos y otros mamíferos que los pesticidas organoclorados. Los fungicidas carbendazina y tebuconazol son ampliamente utilizados en diversos cultivos como cítricos, cebollas, arroz y melocotones, que son también fuentes importantes de polen y néctar para las abejas. Los acaricidas amitraz y t-fluvalinato se utilizan directamente en las colmenas, para el control de *Varroa destructor*²⁵.

El imidacloprid actúa interfiriendo con la transmisión de estímulos en el sistema nervioso, provocando un bloqueo en al menos un tipo de vía neuronal nicotínica que es más abundante en insectos que en animales de sangre caliente. Esto hace que el imidacloprid sea mucho más tóxico para los insectos que para otras especies. Además, el imidacloprid tiene una afinidad muy específica con los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR). Su unión conduce a la acumulación de acetilcolina, dando como resultado la parálisis y la muerte de los insectos²⁶.

Un estudio demuestra que los compuestos imidacloprid, thiametoxam y dinotefuran son los más tóxicos para la abeja, con valores de DL₅₀ de toxicidad aguda tan bajos como 18 ng/abeja para imidacloprid, 30 ng para tiametoxam y 75 ng para dinotefuran. Otros estudios han mostrado una mayor DL₅₀ aguda de imidacloprid a las abejas tan altas como 200 ng/abeja. Esta diferencia puede deberse a una variación en la capacidad de desintoxicación de las colonias de abejas. Se obtuvo una mortalidad del 50% después de 8 días de exposición al imidacloprid o a cualquiera de sus metabolitos durante el cual cada abeja ingirió acumulativamente el valor tan bajo 0,1 ng/abeja de la sustancia tóxica. El estudio también mostró que la mortalidad aumentó con dosis bajas, cayó con dosis intermedias, y subió de nuevo con altas dosis²⁷.

Un estudio reciente ha evaluado los residuos de plaguicidas en ceras españolas para determinar su incidencia. La cera se examinó para 58 plaguicidas. Los acaricidas aplicados en la colmena tuvieron una contribución a la carga media de plaguicidas superior al 95%. Los compuestos ampliamente más utilizados son acaricidas, como cumafos (100%), fluvalinato (86%) y amitraz (83%), y fueron los pesticidas más frecuentemente detectados con concentraciones máximas de 26.858, 3.593 y 6.884 ng/g, respectivamente. Clorfenvinfos, acrinatrina y flumethrin, también acaricidas, se detectaron en 77, 71 y 54%, respectivamente. La frecuencia de los plaguicidas utilizados

²⁴ Wu-Smart, J., Spivak, M. Sub-lethal effects of dietary neonicotinoid insecticide exposure on honey bee queen fecundity and colony development. *Scientific Reports*, **2016**, 6, 32108.

²⁵ Tomasini, D., Sampaio, M.R.F., Caldas, S.S., (...), Duarte, F.A., Primel, E.G. Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified QuEChERS method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*, **2012**, 99, 380-386.

²⁶ Kamel, A. Refined methodology for the determination of neonicotinoid pesticides and their metabolites in honey bees and bee products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2010**, 58(10), 5926-5931.

²⁷ Bonmatin, J.M., Moineau, I., Charvet, R., (...), Colin, M.E., Bengsch, E.R. A LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens. *Analytical Chemistry*, **2003**, 75(9), 2027-2033.

en los cultivos fue del 40% para el clorpirifos, el 29% para el diclorofenilo, el 9% para el malatión, el 6% para el fentonio sulfóxido y el 3% para el azinfos-metilo, el carbendazim, el etion, el hexythiazox, el imazalil y el piriproxifeno²⁸.

3.3. LEGISLACIÓN

Ante el riesgo que supone el uso de pesticidas altamente o moderadamente tóxicos para las abejas, la Unión Europea ha tomado medidas para combatir el gran problema del colapso de las colonias. Algunas de las cuales son²⁹:

- En 2010 la Comisión Europea intensificó los esfuerzos para mitigar la mortalidad de las abejas.
- En 2011 la Comisión designa un laboratorio de referencia de la UE para la salud de las abejas mediante el Reglamento (UE) no 87/2011. Tras algunos cambios, por razones de claridad y simplificación de la legislación de la UE, el Reglamento (UE) n° 87/2011 fue derogado por el Reglamento (UE) n° 415/2013.
- En 2012 la Comisión destina 3,3 millones de euros a los estudios sobre las pérdidas de colmenas de abejas.
- En 2013 la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) identifica los riesgos para las abejas de tres insecticidas neonicotinoides (clotianidina, imidacloprid y tiametoxam).
- En diciembre de 2013 la Comisión restringió el uso de 3 neonicotinoides (clotianidina, imidacloprid y tiametoxam) durante un período de dos años a partir del 1 de diciembre de 2013.
- En 2013 la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) evaluó el riesgo para las abejas del fipronil cuando se utiliza como tratamiento de semillas para el maíz.
- En 2013 la UE adopta medidas adicionales sobre el fipronil para proteger mejor las abejas de Europa. Una propuesta de la Comisión para restringir el uso del fipronil, un insecticida recientemente identificado como un riesgo agudo para la población europea de abejas, fue respaldada por expertos de los Estados miembros reunidos el 16 de julio de 2013. Prohibición del fipronil para el tratamiento de semillas (Reglamento de la CE 781/2013).

3.4. ANÁLISIS DE PESTICIDAS EN ABEJAS Y SUS PRODUCTOS

En la actualidad se han desarrollado y validado numerosos métodos de análisis de pesticidas en abejas, cera, polen y miel. La mayoría de ellos implican como método de extracción un QuEChERS o una modificación de este seguido de cromatografía de gases (GC) o cromatografía de líquidos (LC) o ambas, para complementar resultados, acopladas a espectrometría de masas, normalmente masas en tándem (MS/MS). La GC es apropiada para compuestos volátiles o semivolátiles mientras que la LC lo es para compuestos

²⁸ Calatayud-Vernich, P., Calatayud, F., Simó, E., Picó, Y. Occurrence of pesticide residues in Spanish beeswax. *Science of the Total Environment*, **2017**, 605-606, 745-754.

²⁹ URL: https://ec.europa.eu/food/animals/live_animals/bees/health_en

polares o de polaridad intermedia y termolábiles. A continuación, se muestran algunos de los trabajos desarrollados en los últimos años.

Malgorzata Gbylik-Sikorska y col.³⁰ desarrollaron un método para la determinación de neonicotinoides y sus metabolitos en abejas y miel por LC-MS/MS. La extracción en abejas implicó una mezcla de acetonitrilo y acetato de etilo seguido de una etapa de limpieza en cartuchos empacados con alumina (Sep-Pak Alumina N Plus Long). Las muestras de miel se disolvieron en una mezcla de acetonitrilo y acetato de etilo con adición de tietilamina al 20% en acetonitrilo y la limpieza de los extractos con cartuchos Strata X-CW. Las recuperaciones medias de los analitos oscilaron entre el 85,3% y el 112,0%, con una repetitividad entre el 2,8-11,2% y unos límites de cuantificación en el intervalo de 0,1-0,5 µg/kg.

Cotton, J. y col.³¹ desarrollaron un método para la detección y caracterización química de contaminantes en miel mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (LC/ESI-HRMS) asociada con herramientas de tratamiento de datos desarrolladas para estudios de metabolómica. En este trabajo se indica que la implementación de métodos basados en la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS), incluyendo el tiempo de vuelo (TOF), resonancia de ciclotrón de iones de transformada de Fourier (FT-ICR) e instrumentos basados en Orbitrap, que operan en modo de exploración completa, han mejorado las capacidades de cribado, permitiendo no sólo los análisis específicos, sino también retrospectivos para la detección de moléculas no preseleccionadas. Se logró la separación cromatográfica de 83 xenobióticos de interés en 30 min. La precisión intraensayo fue satisfactoria con desviaciones estándares relativas (RSD) por debajo del 15%. La linealidad se evaluó en el intervalo de 0,01 a 1000 µg/kg y el coeficiente de determinación (r^2) fue > 0,99 para todos los compuestos. Los valores de límites de detección (LOD) oscilaron entre 0,1 y 10 µg/kg.

Kiljanek, T. y col.³² desarrollaron un método para la determinación de 200 plaguicidas y metabolitos de plaguicidas en muestras de abejas. La extracción se basó en el método QuEChERS tamponado. Las muestras de abejas se extrajeron con acetonitrilo que contenía ácido acético al 1% y luego se sometieron a una etapa de limpieza mediante extracción dispersiva en fase sólida (dSPE) usando un adsorbente tradicional como una amina primaria/secundaria (PSA) y un nuevo adsorbente denominado Z-Sep. En este trabajo se optimizó el método de extracción y se indicó que debía evitarse la combinación de PSA y tampón de citrato para no perder fungicidas ácidos, como es la familia de los triazoles, durante el análisis y se recomendaba emplear el método QuEChERS tamponado con acetato. las recuperaciones resultaron ser mucho mejores cuando se usó Z-Sep + PSA que cuando se usó PSA + C18 en la etapa de limpieza.

³⁰ Gbylik-Sikorska, M., Sniegocki, T., Posyniak, A. Determination of neonicotinoid insecticides and their metabolites in honey bee and honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **2015**,990, 132-140.

³¹ Cotton, J. Leroux, F., Broudin, S., (...), Ducruix, C., Junot, C. High-resolution mass spectrometry associated with data mining tools for the detection of pollutants and chemical characterization of honey samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2014**, 62(46), 11335-11345.

³² Kiljanek, T., Niewiadowska, A., Semeniuk, S., (...), Borzęcka, M., Posyniak, A. Multi-residue method for the determination of pesticides and pesticide metabolites in honeybees by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry-Honeybee poisoning incidents. *Journal of chromatography. A*, **2016**, 1435, 100-114.

Martel, A.-C. y col.³³ desarrollaron un método multi-residuo para la determinación de cinco insecticidas neonicotinoides en abejas melíferas mediante LC-ESI-MS/MS. El método implica la extracción de plaguicidas usando acetonitrilo y hexano junto con una etapa de limpieza en cartucho de florisil. Las recuperaciones se situaron entre 93,3 y 104,0% con desviación estándar relativa (RSD) inferior al 20% y un límite de cuantificación (LOQ) de 0,5 ng/g.

3.4.1. Métodos de extracción

Los métodos de extracción suelen combinar la extracción líquido-líquido (LLE) y la extracción en fase sólida (SPE) o la dispersión de matriz en fase sólida (MSDP). La SPE se basa en la retención de los analitos seleccionados sobre los adsorbentes del cartucho y su posterior elución con un disolvente apropiado y la MSPD consiste en la dispersión de la matriz sobre un adsorbente libre y su empaquetamiento homogéneo sobre una columna antes de la elución de compuestos con disolvente orgánico, permitiendo así la extracción de muestras semisólidas y sólidas³⁴.

Sin duda el método de extracción QuEChERS (siglas de rápido, fácil, barato, eficaz, robusto y seguro), desarrollado por Anastassiades, Mastovska y Lehotay (2002), es la alternativa más apropiada³⁵ para análisis multi-residuo de pesticidas. El método QuEChERS original consta de dos etapas, una etapa “salting out” que consiste en una micro-extracción líquido-líquido que usa acetonitrilo como solvente orgánico y cloruro de sodio y sulfato de magnesio anhidro, que ayuda a que los analitos pasen a la fase orgánica gracias a que retiene el agua, y otra etapa de “clean-up” que consiste en una SPE dispersiva (dSPE) con sulfato de magnesio anhidro y PSA para eliminar los componentes de la matriz no deseados³⁶, pues tiene la capacidad de retener ácidos orgánicos polares, azúcares y ácidos grasos.

Para hacer frente a matrices complejas como son las abejas, cera, polen y miel, se han producido modificaciones en el método original. Algunas de las modificaciones incluyen el uso de acetonitrilo con ácido acético al 1% y sales de citrato o acetato para tamponar. También en la etapa de limpieza se usan adsorbentes como amina primaria/secundaria (PSA), octadecilsilano (C18), florisil y negro de carbón grafitizado (GCB). El GCB es útil para la eliminación de pigmentos, pero retiene plaguicidas planares. Los nuevos adsorbentes prometedores son los de sílice recubiertos con dióxido de zirconio Z-Sep. Debido a la presencia de sitios de ácido de Lewis, sitios de base ácido de Bronsted y

³³ Martel, A.-C., Lair, C. Validation of a highly sensitive method for the determination of neonicotinoid insecticides residues in honeybees by liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **2011**, 91(10), 978-988.

³⁴ Pirard, C., Widart, J., Nguyen, B.K., (...), De Pauw, E., Focant, J.-F. Development and validation of a multi-residue method for pesticide determination in honey using on-column liquid-liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2007**, 1152(1-2), 116-123.

³⁵ Tette, P.A.S., Da Silva Oliveira, F.A., Pereira, E.N.C., (...), De Abreu Glória, M.B., Fernandes, C. Multiclass method for pesticides quantification in honey by means of modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, **2016**, 211, 130-139.

³⁶ José Juan Rivero Marabé. Trucos y consejos en el desarrollo de métodos multicomponentes por GCMSMS. Agilent Technologies, **2013**.

grupo de octadecilsilano en la superficie de estos nuevos materiales, son un buen adsorbente de ácidos grasos y proteínas⁹.

En este trabajo, la extracción de pesticidas en abejas se ha llevado a cabo mediante una extracción asistida por una sonda de ultrasonidos combinada con una modificación del método de extracción QuEChERS, empleando un tampón de citrato y una etapa de limpieza con el adsorbente Z-Sep. Para la extracción de pesticidas en cera, polen y miel se ha realizado un QuEChERS con tampón citrato.

3.4.1.1. Extracción asistida con sonda de ultrasonidos

En la actualidad, la búsqueda de tecnologías no contaminantes y consideradas “verdes”, ha supuesto la búsqueda de nuevos métodos como la extracción asistida con ultrasonidos (UEA), la cual emplea menos solventes y energía. En esta técnica se produce el efecto de cavitación, que favorece la liberación de los compuestos a extraer y mejora el transporte de masa. Se puede aplicar a extracciones en hierbas, aceites, proteínas y componentes bioactivos de plantas³⁷.

Las ondas sonoras son vibraciones mecánicas en un sólido, líquido o gas. El ultrasonido tiene una frecuencia más alta que la gama audible a los seres humanos. Las ondas sonoras son diferentes a las ondas electromagnéticas, ya que estas pueden pasar a través del vacío, mientras que las ondas sonoras deben viajar a través de la materia, pues implican ciclos de expansión y compresión que viajan a través de un medio. La expansión separa las moléculas, mientras que la compresión las une. En un líquido, el ciclo de expansión produce una presión negativa. Si el ultrasonido es lo suficientemente fuerte, el ciclo de expansión puede crear burbujas o cavidades en el líquido. Cuando las burbujas se forman, crecen y sufren un colapso implosivo se produce el fenómeno de "cavitación"³⁸.

La figura 2 muestra un diagrama esquemático de la extracción asistida por ultrasonidos.

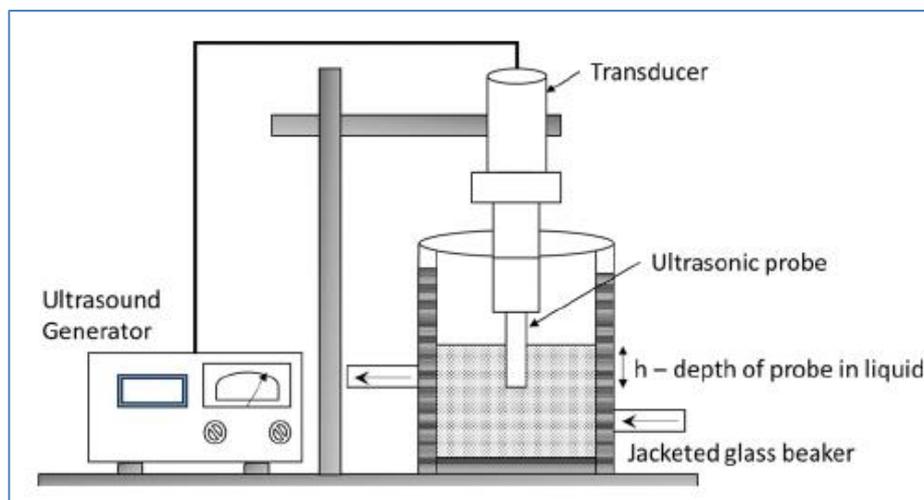


Figura 2. Esquema de una UAE. Fuente: researchgate.

³⁷ Robles Ozuna, L.E; Ochoa-Martínez, L.A. ULTRASONIDO Y SUS APLICACIONES EN EL PROCESAMIENTO DE ALIMENTOS. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, **2012**, vol. 13, núm. 2, 109-122.

³⁸ J.LLuque-GarcíaM.DLuque de Castro. Ultrasound: a powerful tool for leaching. TrAC Trends in Analytical Chemistry, **2003**, Vol. 22, Issue 1, 41-47.

Por tanto, el uso de una sonda de ultrasonidos en la extracción puede mejorar considerablemente la extracción de analitos en matrices complejas y disminuir el tiempo de análisis.

3.4.2. Cromatografía de líquidos

El rendimiento de la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) ha demostrado un gran éxito en el análisis multi-residuos de plaguicidas en matrices complejas. Esta técnica proporciona información sobre el ion característico de cada analito, así como dos o más transiciones de estos iones, útiles para cuantificar y confirmar los analitos³⁵.

La cromatografía de líquidos es una técnica que se basa en un método físico de separación de analitos polares, de polaridad intermedia o de baja volatilidad. La separación es posible gracias a la distinta afinidad que presentan los analitos entre dos fases inmiscibles. En este tipo de cromatografía líquida la fase estacionaria es un sólido (columna) y la fase móvil es un líquido (eluyente). La fase móvil pasa a través de la columna en condiciones de alta presión impulsada por una bomba, a lo largo de la columna no deben producirse impulsos, para ello el instrumento cuenta con un amortiguador de impulsos. Cuanto más alta sea la presión mayor será la capacidad separativa (resolución cromatográfica) del instrumento, diferenciando así entre HPLC (de sus siglas en inglés, High Performance Liquid Chromatography) y UHPLC (de sus siglas en inglés, Ultra High Pressure Liquid Chromatography).

La muestra debe estar limpia, ser soluble en la fase móvil y no debe reaccionar con ningún componente del sistema cromatográfico. Los disolventes de la fase móvil deben ser de grado HPLC, puesto que una impureza en la fase móvil sería detectada y aumentaría la línea de base, lo que supondría una menor sensibilidad. La fase móvil fluye arrastrando consigo los analitos, los cuales se repartirán entre ambas fases en función de sus coeficientes de distribución, produciendo de esta manera procesos de adsorción y desorción continuos a la fase estacionaria. El instrumento también contiene un dispositivo de mezcla que permite trabajar con una fase móvil compuesta de distintos disolventes y así funcionar en modo gradiente, variando tanto la composición como el flujo de la fase móvil durante el análisis, lo que mejora la separación cromatográfica. La figura 3 muestra el esquema de un LC.

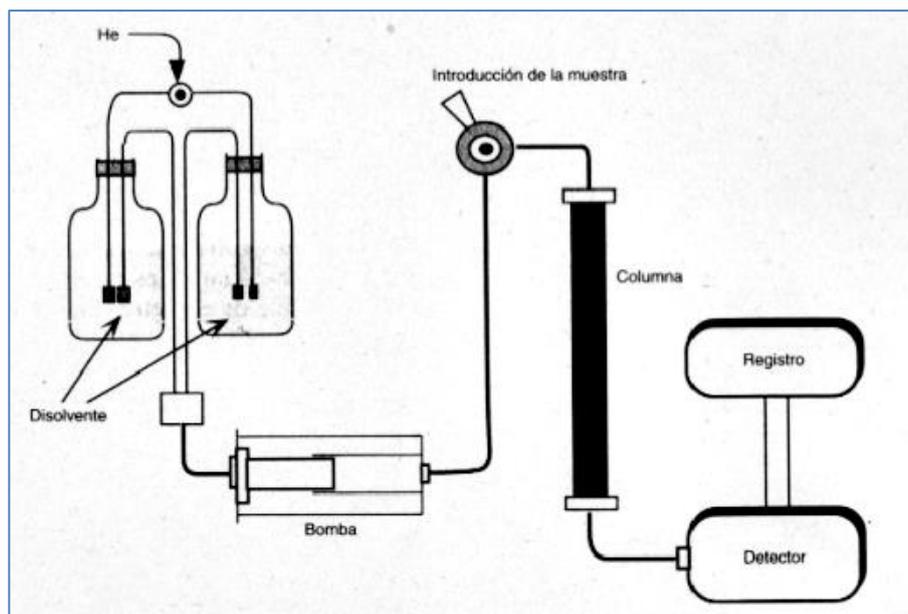


Figura 3. Componentes principales de un LC. Fuente: Skoog, Leary. 2000.

En LC existen dos modos de trabajo:

- Fase normal: la FE es polar y la FM es no polar.
- Fase reversa: la FE es no polar y la FM es polar.

La fase reversa es la que más se utiliza y la FE suele ser sílice químicamente modificada con grupos no-polares como hidrocarburos saturados: C18 octadecil, C8 octil, C4 tetrametil y C2 dimetil y la FM suele tratarse de mezclas: agua/disolventes orgánicos (CH₃OH, THF, CH₃CN)³⁹.

En los últimos años los avances en análisis han hecho posible menores tiempos de análisis, el uso de menor cantidad de muestra y de disolventes orgánicos. Estos avances han sido posibles gracias a la UHPLC o a la micro-LC.⁴⁰

3.4.3. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica muy potente, que acoplada a GC o LC puede ser utilizada para⁴¹:

- Identificar compuestos desconocidos.
- Cuantificar materiales conocidos.
- Elucidar la estructura química de las moléculas.

De esta manera el espectrómetro de masas como sistema de detección cromatográfico nos permite la detección y cuantificación de sustancias.

³⁹ URL: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/5.5Cromatografiadeliquidios_7806.pdf

⁴⁰ Farré, M., Pérez, S., Gonçalves, C., Alpendurada, M.F., Barceló, D. Green analytical chemistry in the determination of organic pollutants in the aquatic environment. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, **2010**, 29(11), 1347-1362.

⁴¹ JoséRodríguez. Seminario de Espectrometría de masas para usuarios del SUIC. **2010**.

La MS se basa en la obtención de iones a partir de moléculas neutras en fase gaseosa. Posteriormente estos iones se separan de acuerdo con su relación masa/carga (m/z) y, por último, son detectados mediante el detector adecuado.

Como en espectrometría de masas se trabaja con iones en fase gaseosa, antes de introducirse la muestra en el espectrofotómetro de masas, la sustancia debe estar en fase gaseosa e ionizada (de no encontrarse en ese estado), por lo que es necesario una fuente de iones.

El espectrómetro de masas debe ser capaz de⁴²:

1. Vaporizar sustancias con volatilidades muy distintas.
2. Transformar las moléculas neutras gaseosa en iones.
3. Separar los iones en función de su m/z .
4. Detectar los iones formados y registrar la información.

Por tanto, el espectrómetro de masas debe contar con un sistema de introducción de muestras, una fuente de iones, un analizador para separar los iones y un detector y registrador. La figura 4 muestra el esquema general de un espectrómetro de masas.

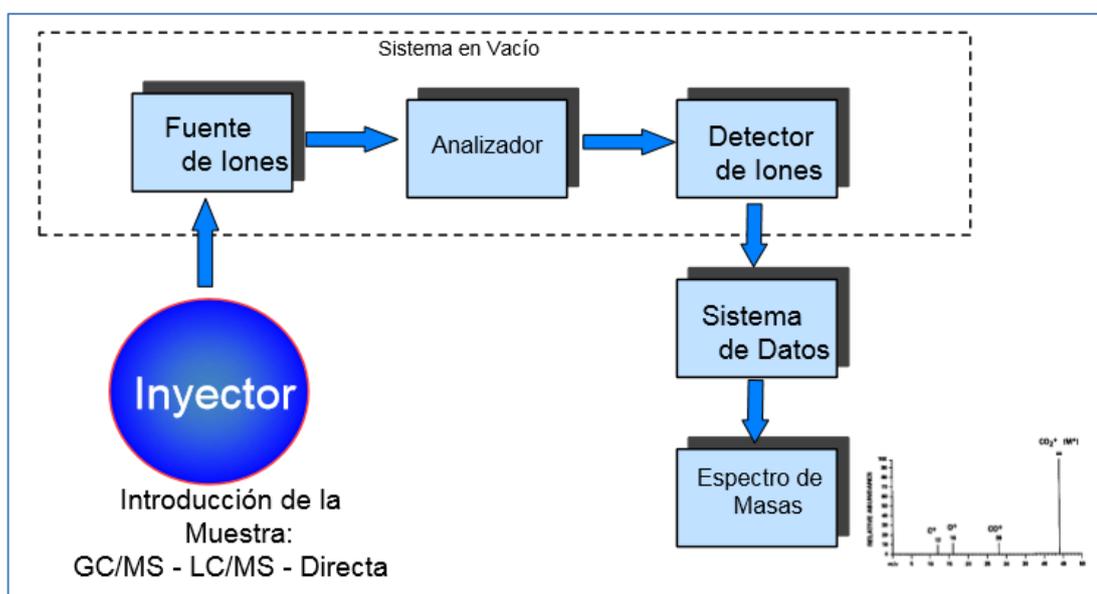


Figura 4. componentes generales de un espectrómetro de masas.

Existen diversas fuentes de iones y analizadores, sin embargo, en el análisis de pesticidas mediante LC-MS las fuentes de ionización más comúnmente utilizadas son las de ionización a presión atmosférica (API), destacando la ionización química a presión atmosférica (APCI) y la ionización por electrospray (ESI)⁴³. Tanto ESI como APCI al ser métodos de ionización blanda, generan iones moleculares intactos o pocos fragmentos durante la primera ronda de ionización, por lo que son ideales en campos de investigación como el análisis de pesticidas, desarrollo de fármacos, el monitoreo de enfermedades y el análisis de alimentos, bebidas y productos herbales. La APCI genera iones más

⁴² http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf

⁴³ URL: <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8249/4/T5masas.pdf>

fragmentados, mientras que la ESI genero más aductos⁴⁴. Ambas fuentes trabajan a presión atmosférica y no en alto vacío, por lo que alcanzan un altísimo rendimiento. Como interfase para HPLC, tienen la ventaja de aceptar todo el flujo procedente de un cromatógrafo líquido de alta presión convencional, de 1 a 4 mL/min., lo que incide favorablemente sobre la sensibilidad del proceso LC-MS. En general, ionizan la muestra a presión atmosférica, eliminan el disolvente, se ioniza el analito y se traslada los iones al MS.

En cuanto a los analizadores, su principal característica es su capacidad de resolución (capacidad de discriminar los diferentes iones). Cuanta más resolución tenga, mayor capacidad tendrá de discriminar entre iones de masa similar, así pueden distinguirse los analizadores de resolución unitaria y los de alta resolución. Los analizadores más usados en LC para el análisis de pesticidas en alimentos son en la actualidad el triple cuadrupolo (QqQ), la trampa de iones (IT), el tiempo de vuelo (TOF) y el orbitrap, siendo los dos últimos de alta resolución de masas (HRMS).

En este trabajo de Fin de Grado se ha utilizado una fuente de iones ESI y un analizador triple cuadrupolo para llevar a cabo los análisis de las muestras reales estudiadas, por lo que a continuación se incluye una descripción más detallada sobre las principales características de ambos.

3.4.3.1. Ionización electrospray (ESI)

En la ionización ESI se rocía (nebuliza) el eluyente del LC en una cámara de nebulización a presión atmosférica en presencia de un campo electrostático fuerte y de gas de secado calentado. Se aplica una tensión de 3-6 KV entre el capilar de entrada de la muestra y el contraelectrodo. Por efecto del intenso gradiente de campo eléctrico presente, la muestra emerge del capilar de entrada en forma de un aerosol de pequeñas gotas, que adquieren una carga eléctrica muy elevada. Al avanzar estas gotas por la cámara de desolvatación, llega un momento en que su tamaño es tan pequeño, que las fuerzas coulombianas de repulsión entre los iones con múltiple carga generados en su interior son capaces de vencer la tensión superficial, momento en que los iones escapan a la fase gaseosa denominándose a este proceso evaporación iónica.

Una característica de esta técnica es que, al producir una enorme abundancia de iones con carga múltiple, pueden determinarse masas moleculares de moléculas muy grandes como proteínas⁴³. Por este motivo esta técnica se ha convertido en una de las más importantes para el análisis de biomoléculas de pesos superiores a 100.000 Daltons⁴⁵. Es apropiada tanto para moléculas pequeñas (glucosa) como para biomoléculas mayores (proteínas, oligonucleótidos, etc.)⁴⁶.

⁴⁴ Commisso, M., Anesi, A., Dal Santo, S., Guzzo, F. Performance comparison of electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization in untargeted and targeted liquid chromatography/mass spectrometry based metabolomics analysis of grapeberry metabolites. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2017**, 31(3), 292-300.

⁴⁵ URL: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/masas_10832.pdf

⁴⁶ Espectrometría de masas Fundamentos y teoría. Agilent Technologies. **2016**. (http://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/public/5991-5857_Agilent_MS_Theory_ES.pdf)

Esta técnica será seleccionada cuando⁴¹:

- Se trata con compuestos iónicos, o polímeros/biopolímeros que en disolución adquieren múltiples cargas (péptidos, proteínas...).
- Se trata con compuestos termolábiles con grupos funcionales ionizables en disolución, o de los que se pueden obtener sus sales sódicas (ESI^-) o sus clorhidratos (ESI^+).
- Se utilizan técnicas que requieran trabajar a nano o micro-flujos.

La figura 5 muestra el esquema de una fuente ESI y la figura 6 el proceso de ionización en una ESI.

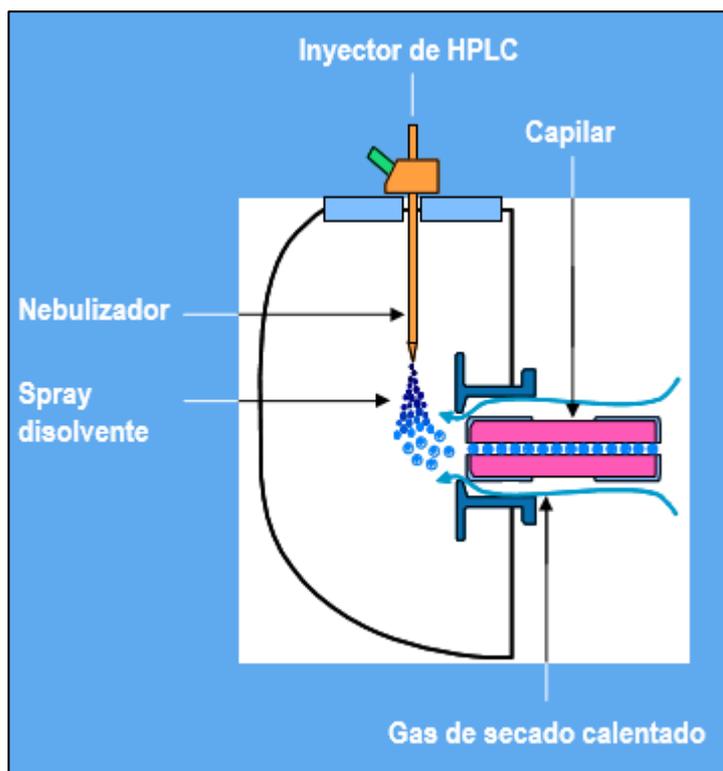


Figura 5. Esquema de una fuente de ionización por electrospay. Fuente: Espectrometría de masas Fundamentos y teoría. Agilent Technologies.

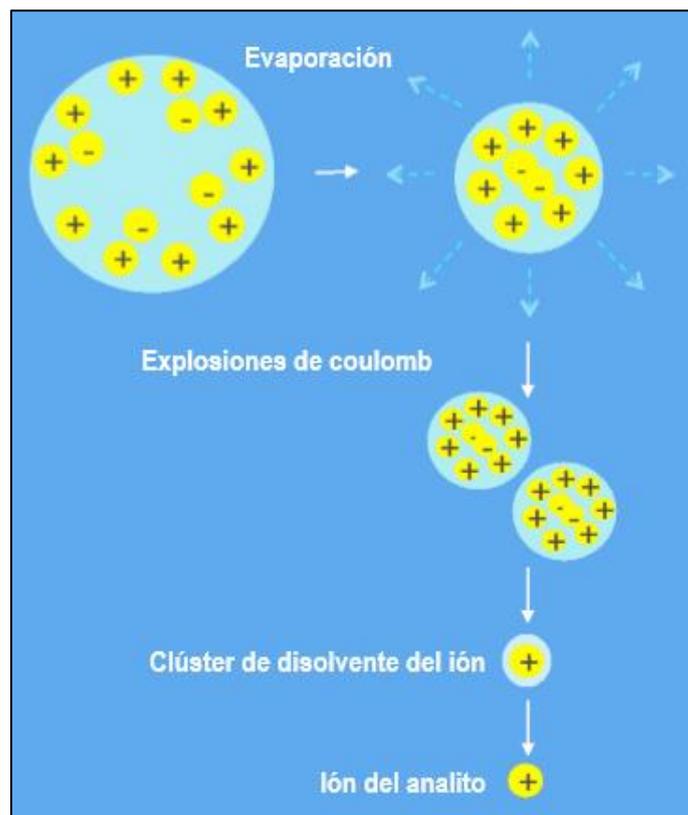


Figura 6. Proceso de ionización en una ESI. Fuente: Espectrometría de masas Fundamentos y teoría. Agilent Technologies.

3.4.3.2. Analizador triple cuadrupolo (QqQ)

Un cuadrupolo consiste en dos pares de barras de molibdeno exactamente paralelas entre sí, controladas por la combinación de potenciales de radiofrecuencia (rf) y corriente continua (dc).

Solo un ion de una masa específica puede pasar a través del cuadrupolo cuando se aplica un campo oscilatorio de rf y dc, llegando al detector (generalmente un multiplicador de electrones o un fotomultiplicador)⁴⁷. El tiempo de vida de un ion desde su formación hasta su detección es de 50 a 100 microsegundos, al emplear tiempos de barrido bajos (< 100 ms)⁴⁸, es particularmente útil para realizar barridos de picos cromatográficos a tiempo real.

El analizador triple cuadrupolo está compuesto por tres cuadrupolos simples orientados uno detrás de otro, como muestra la figura 7.

⁴⁷ Espectrometría de masas Espectrometría de masas. D'Amico Sistemas S.A. 2013.

⁴⁸ D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman. Principios de Análisis Instrumental. McGraw-Hill. 5ta Edición. 2001, pp. 557

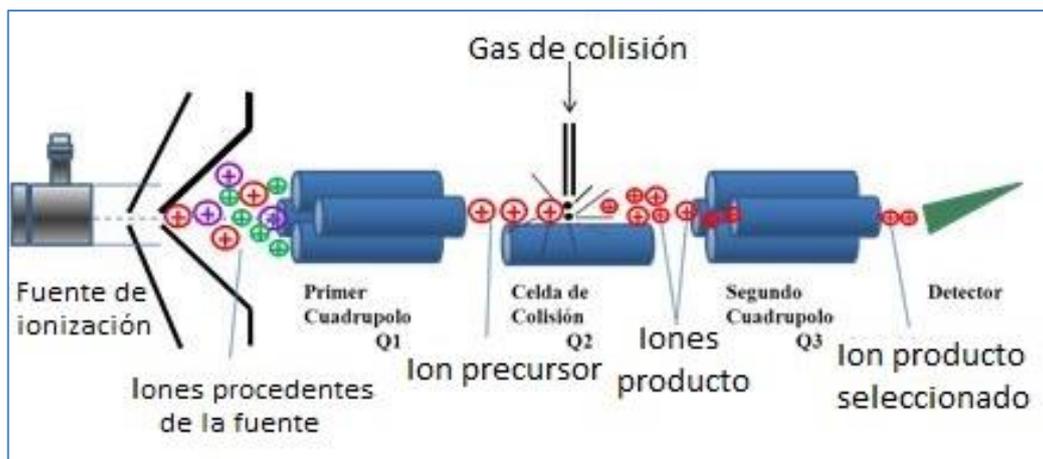


Figura 7. Esquema de un QqQ. Fuente: Estación Experimental del Zaídin.

El analizador está formado por tres cuadrupolos (Q1-Q3), los cuales se pueden configurar de distinto modo, lo que hace posible que se pueda operar de diversos modos, para dar distinto tipo de información⁴⁶. El funcionamiento general es el siguiente:

- Q1: se utiliza como filtro para la masa/carga (m/z) específica (ión precursor).
- Q2: se utiliza como celda de colisión para fragmentar el ión precursor con gas de colisión y generar iones producto.
- Q3: se utiliza para aislar los iones producto bien con una m/z específica (SRM o MRM) o bien en modo de barrido (barrido del ión producto).

Q1 y Q3 pueden ser seleccionados para trabajar en modo full scan (barrido completo) o en modo SIM (monitoreo de del ion seleccionado). En el modo SIM se monitoriza un ión precursor con m/z específica y en el modo full scan el analizador de masas cuadrupolar escanea secuencialmente permitiendo el paso por el detector de una m/z cada vez.

Una de las formas más comunes de operar para la adquisición de datos y la que se ha utilizado en este trabajo, es en modo SRM o MRM, que consiste en que los iones precursores con una m/z determinada seleccionados en Q1, pasan a la celda de colisión donde se formarán los fragmentos iónicos. Q3 se configura para una m/z de fragmento iónico específico. Este modo es muy sensible y se utiliza para realizar cuantificaciones⁴⁶.

4. OBJETIVOS

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado de Química ha sido la aplicación de dos métodos multi-residuo ya validados a muestras reales de abeja, polen, cera y miel para tener una visión global de la contaminación en colmenas comparando la presencia y cantidad de pesticidas en las distintas matrices.

Los objetivos específicos de este trabajo han sido:

1. Determinación de los pesticidas más frecuentemente empleados en apicultura y su incidencia en las matrices analizadas.
2. Evaluación de la distribución de los pesticidas seleccionados en función del tipo de matriz: abeja, polen, cera o miel.
3. Estudio de la distribución de pesticidas en función del lugar de procedencia de las muestras.

5. MÉTODOS EXPERIMENTALES

5.1. ADQUISICIÓN DE MUESTRAS

Se recogieron 21 muestras procedentes de 5 colmenares de distintos lugares de Andalucía: colmenar 1 IFAPA, Córdoba; colmenar 2 Arroyo Pedroches, Córdoba; colmenar 3 Finca Naranjos, Córdoba; colmenar 4 Finca Almendros, La Higuera, JAÉN y colmenar 5 Villares, Córdoba.

De cada colmenar se tomaron 4 tipos de muestras: abejas, polen, cera y miel, las cuales son constituyentes de la colmena. De la colmena 1 se tomaron 2 muestras de cera, pues tenían un color claramente diferente y resultaba interesante analizarlas por separado.

5.2. REACTIVOS Y EQUIPOS

5.2.1. Reactivos

Los estándares de plaguicidas de calidad analítica, incluyendo 12 productos de alta pureza (> 98%), suministrados por Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania) y Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Los patrones internos marcados isotópicamente, diclorvos-d6, malatión-d10, carbendazim-d3 y dimetoato-d6 fueron suministrados por Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania) y por CDN isótopos (Quebec, Canadá). Los estándares se almacenaron a -30°C. Las disoluciones patrón de plaguicidas (1000-2000 mg/L) fueron preparadas en acetonitrilo y se almacenaron en frascos de vidrio ámbar con tapa de rosca en la oscuridad a -20°C.

El acetonitrilo de grado HPLC ultra-gradiente se obtuvo de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El citrato trisódico dihidratado se adquirió de Fluka (Steinheim, Alemania). El cloruro de sodio se adquirió de J.T. Baker (Deventer, Países Bajos). El hidrogeno citrato disódico sesquihidratado se obtuvo de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El sulfato de magnesio anhidro fue suministrado por Panreac (Barcelona, España). PSA y Z-Sep se obtuvieron de Supelco (Bellefonte, PA). Se utilizó un sistema de agua ultra-pura Milli-Q-Plus de Millipore (Milford, MA, EUA) durante todo el estudio para obtener el agua de grado HPLC utilizada durante los análisis e hidratar las muestras. El ácido fórmico (98% de pureza) fue adquirido de Fluka (Buchs, Suiza).

5.2.2. Instrumentación y equipos

Para llevar a cabo el proceso de extracción de pesticidas en abejas se empleó un ultrasonido Sonopuls HD 3100 de Bandelin electronic GmbH & Co. KG (Berlín, Alemania). También se utilizó un agitador magnético agitax y una centrifuga Orto Alresa Digicen 21.

Para el análisis de las muestras se utilizó un cromatógrafo de líquidos (UHPLC) Shimadzu Nexera X2 (Kioto, Japón) acoplado a un espectrómetro de masas Shimadzu LC-MS 8060 (Kioto, Japón), empleando como fuente de ionización la ESI.

5.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

5.3.1. En abejas

Para la extracción de pesticidas en abejas se llevó a cabo una sonicación para mejorar la extracción y una modificación del método QuEChERS con tampón citrato en la que se incluye en la etapa de limpieza zirconio. El procedimiento fue el siguiente:

En un tubo falcón de 50 mL se pesó 2 g de muestra de abejas y se le adicionó 5 mL de agua destilada, se agitó manualmente y dejó reposar 5 min. A continuación, se le adicionaron 5 mL de acetonitrilo y 10 μ L de estándar interno. Seguidamente, con la sonda de ultrasonidos a la mezcla se le aplicó un pulso de 12 s con paradas de 2 s durante 2:20 min y una amplitud del 75%.

Se le añadieron las sales de extracción: 2 g de sulfato de magnesio, 0.5 g de cloruro sódico, 0.5 g citrato trisódico dihidratado y 0.25 g de hidrogeno citrato disódico sesquihidratado. Se agitó automáticamente durante 4 min y a continuación se centrifugó 5 min a 3500 rpm.

Se tomaron unos 3 mL de la fase superior y se traspasaron a un tubo falcón de 15 mL que contenía las sales para la etapa de limpieza: 125 mg de PSA, 125 mg de Z-sep y 750 mg de sulfato de magnesio. Posteriormente se agitó durante 30 segundos con el vortex y se llevó a cabo una segunda centrifugación durante 5 min a 3500 rpm.

Finalmente, a 3 mL de la fase superior se le adicionaban 30 μ L de ácido fórmico al 5% en acetonitrilo y se agitaba vigorosamente con el vortex durante 30 segundos.

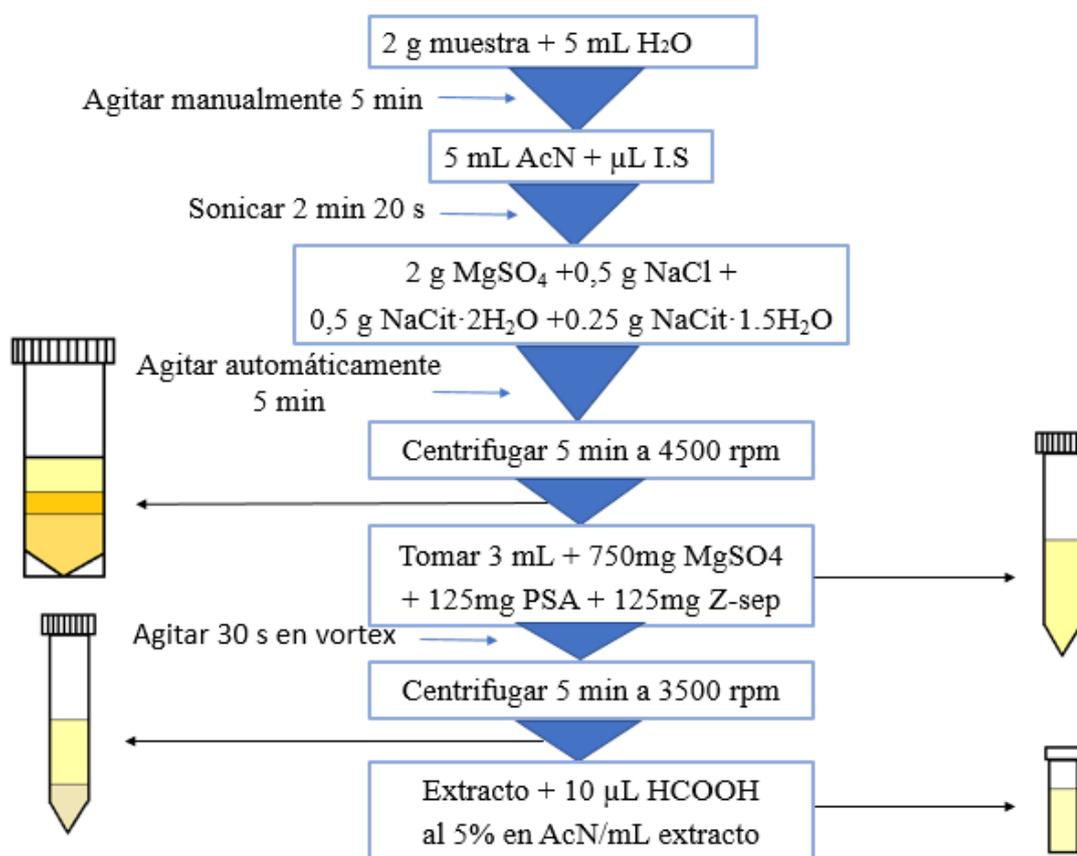


Figura 8. Esquema del procedimiento de extracción seguido para abejas. Fuente: elaboración propia.

5.3.2. En polen, cera y miel

La extracción de pesticidas en polen, cera y miel se realizó siguiendo un mismo método de extracción, el método QuEChERS con tampón citrato. Pero en el caso de la miel se llevó a cabo un procesamiento previo de la muestra, pues fue necesario separar la miel del resto del panal. Para ello, el panal triturado con la miel se calentó a 40 ° C y posteriormente se centrifugó, quedando la miel en la fase inferior del tubo, la cual se retiró para el posterior análisis.

En un tubo falcón de 50 mL se pesó 10 g de muestra y se le adicionó 10 mL de agua destilada, se agitó manualmente y dejó reposar 5 minutos, tras la espera se le adicionó 10 mL de acetonitrilo y 10 μ L de estándar interno y se agitó automáticamente durante 4 minutos.

Se le añadieron las sales de extracción: 4 g de sulfato de magnesio, 1 g de cloruro sódico, 1 g citrato trisódico dihidratado y 0.5 g de hidrogeno citrato disódico sesquihidratado. Se agitó automáticamente durante 4 minutos a 40°C y a continuación se centrifugó 5 minutos a 4500 rpm.

Se tomaron unos 5 mL de la fase superior y se adicionaron a un tubo falcón de 15 mL que contenía las sales del clean-up: 125 mg de PSA y 750 mg de sulfato de magnesio. Posteriormente se agitó durante 30 segundos con el vortex y se llevó a cabo una segunda centrifugación durante 5 minutos a 3500 rpm.

Finalmente, a 4 mL de la fase superior se le añadían 40 μ L de ácido fórmico al 5% en acetonitrilo y se agitaba vigorosamente con el vortex durante 30 segundos.

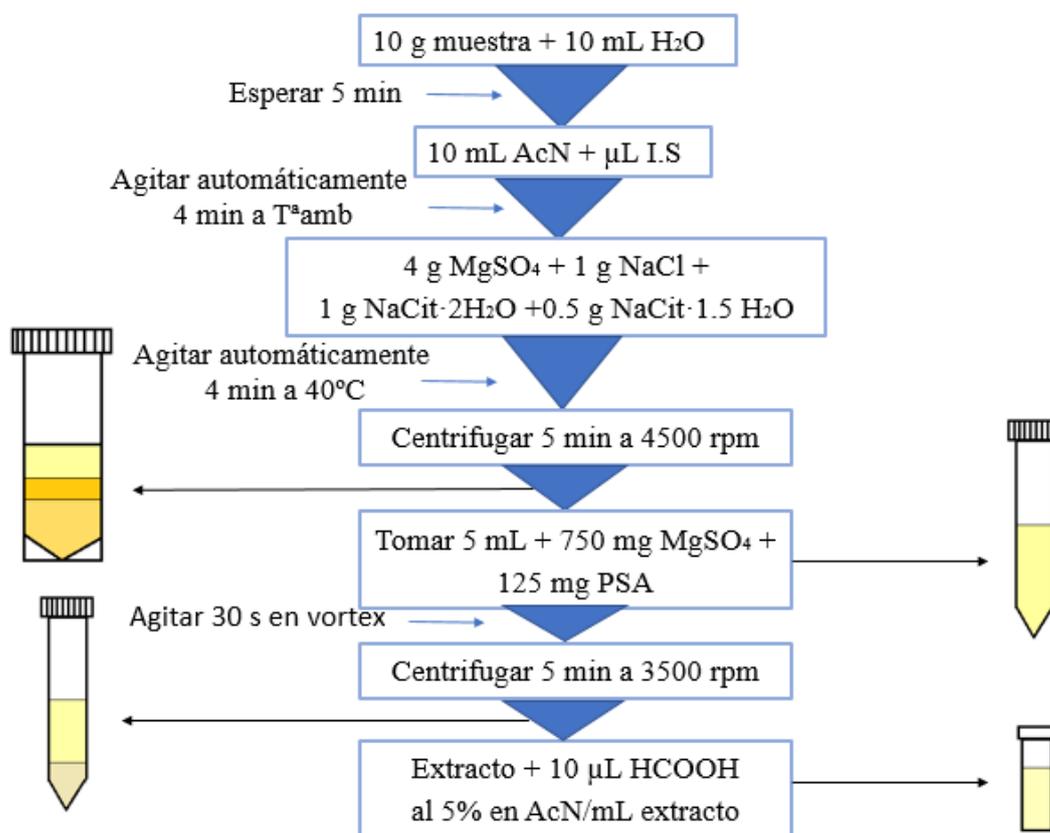


Figura 9. Esquema del procedimiento de extracción seguido para cera, polen y miel. Fuente: elaboración propia.

5.4. MÉTODO DE ANÁLISIS

El análisis se realizó en un cromatógrafo de líquidos (UHPLC) Shimadzu Nexera X2 (Kioto, Japón) acoplado a un espectrómetro de masas Shimadzu LC-MS 8060 (Kioto, Japón), empleando la ESI como fuente de ionización.

Para la separación de los analitos se empleó una columna Shimadzu C8 (150mmx2,1mm) con partículas empacadas de 3 μ m que se mantuvo en el interior del horno del cromatógrafo a una temperatura de 30°C.

La fase móvil empleada estaba compuesta por una disolución A con un 98% de metanol, 2% de agua ultrapura, 0,1% de ácido fórmico y 5mM de formiato amónico y una disolución B con un 98% de agua ultrapura, 2% de metanol, 0,1% de ácido fórmico y 5mM de formiato amónico.

La separación de los analitos se llevó a cabo con un flujo de fase móvil de 0,3mL/min y empleando el siguiente gradiente: 20% de la disolución A (condiciones iniciales), se mantiene durante 2 minutos, aumenta de manera lineal hasta un 100% en el minuto 13 del cromatograma y se mantiene durante 2 minutos, transcurrido este tiempo el método vuelve al 20% de la disolución A y permanece durante 4 minutos, tiempo suficiente para regresar a las condiciones iniciales de cara a la siguiente inyección. El tiempo total del método es de 19 minutos. La figura 10 muestra el gradiente de flujo de la fase móvil.

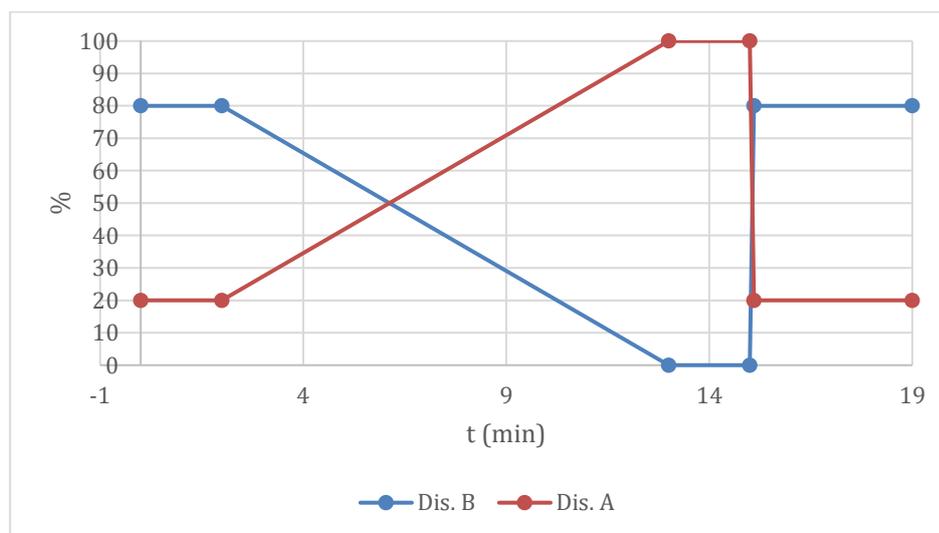


Figura 10

El espectrómetro de masas estaba equipado con una fuente ESI equipada con un liner de solvatación (DL) encargado de trasladar los iones al triple cuadrupolo. El voltaje de la fuente de ionización es de 4000V y esta se encuentra a una temperatura de 300°C, el flujo del gas nebulizador empleado fue 3 L/min. La temperatura del Heated Block es de 400°C y 250°C para el desolvation liner (DL).

El sistema de adquisición MRM se basaba en la adquisición de dos transiciones por plaguicida, una transición para la cuantificación y otra para la identificación. Labsolutions Realtime Analysis (versión 5.89) fue el software empleado para la adquisición, mientras que para la cuantificación de los resultados se utilizó Labsolutions Insight v.2.0.

5.5. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS

Los dos métodos que se han utilizado, tanto el de abejas como el de cera, polen y miel han sido validados anteriormente, y se encuentran publicados o en proceso de revisión.⁴⁹ Ambos métodos se evaluaron en términos de recuperación, precisión (como repetibilidad y reproducibilidad, RSD), efecto matriz, límites de cuantificación (LOQs) y límites de detección (LODs) siguiendo la guía SANTE⁵⁰ (SANTE/11945/2015). La recuperación y la precisión del método de extracción se determinaron con extractos fortificados a dos niveles: 5 y 50 µg/kg.

Los LOQs del método analítico desarrollado fueron establecidos como la concentración mínima que se puede cuantificar con exactitud y precisión aceptables (SANTE/11945/2015).

El estándar interno dimetoato-d6 se utilizó en la inyección de las muestras para probar la robustez global del análisis. El dimetoato-d6 se añadió justo antes de la etapa de análisis, para comprobar posibles variaciones en el volumen de inyección. La robustez del sistema de LC y su capacidad para soportar largas ejecuciones analíticas se evaluó como una función de la reproducibilidad tanto del área del pico como del tiempo de retención.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS

6.1.1. Validación del método en abejas

El efecto matriz resultó ser menor al 20% para la mayoría de los pesticidas. En cuanto a las recuperaciones, para un nivel de 5 µg/kg y de 50 µg/kg se obtuvieron recuperaciones entre el 70-120% para la mayoría de pesticidas⁵¹.

6.1.2. Validación del método en polen, cera y miel

Los valores de recuperación fueron de 70-120% con una recuperación media del 92,9% a los 50 µg/kg. Los valores de recuperación oscilaron entre 63,6 y 127,7% a los 5 µg/kg. La mayoría de los valores de RSD fueron alrededor de 6-14%.

La mayoría de los compuestos (95,8%) mostraron LOQs de 5 µg/kg, lo que confirmaba la alta sensibilidad del método analítico⁵⁰.

⁴⁹ Herrera López, S., Lozano, A., Sosa, A., Hernando, M.D., Fernández-Alba, A.R., Screening of pesticide residues in honeybee wax comb by LC-ESI-MS/MS. A pilot study. *Chemosphere*, **2016**, 163, 44-53.

⁵⁰ Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945.pdf

6.2. ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES

Se analizaron 21 muestras: 5 de abejas, 6 de cera, 5 de miel y 5 de polen procedentes de distintos lugares de Andalucía y recogidas en la misma época del año. La siguiente tabla muestra la procedencia y la fecha de recogida de cada una de las muestras:

Nº	LUGAR	MUNICIPIO	FECHA	MUESTRAS
1	IFAPA	CÓRDOBA	29-mar	1A, 1Ca, 1Cb, 1M, 1P
2	ARROYO PEDROCHES	CÓRDOBA	29-mar	2A, 2C, 2M, 2P
3	FINCA NARANJOS	CÓRDOBA	31-mar	3A, 3C, 3M, 3P
4	FINCA ALMENDROS	LAHIGUERA, JAÉN	09-abr	4A, 4C, 4M, 4P
5	VILLARES	CÓRDOBA	15-abr	5A, 5C, 5M, 5P

Para llevar a cabo el análisis por cromatografía de líquidos, las muestras se prepararon de la siguiente manera: en un vial de inyección se adicionaron 400 μL de agua ultrapura de grado HPLC, 100 μL de extracto de muestra y 10 μL del estándar de inyección dimetoato-d6.

Para las abejas el rango de trabajo se estableció entre 1-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y se realizó una recta de calibrado en matriz con los estándares a los siguientes niveles de concentración: 1, 10, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Para la cera, miel y polen el rango de trabajo se estableció entre 10-500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y se realizó una recta de calibrado en matriz con los estándares a los siguientes niveles de concentración: 10, 50, 100 y 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Para preparar las rectas de calibrado en matriz se tomaron 50 μL de la muestra que se consideró como blanco y se evaporó con una corriente de gas nitrógeno. El extracto de matriz se recompuso con 50 μL del estándar interno a las concentraciones respectivas a los distintos puntos de la recta de calibrado. Se le adicionó 200 μL de agua ultrapura y 5 μL del estándar de inyección dimetoato-d6.

En cromatografía de líquidos fueron detectados por encima del nivel de cuantificación del método (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) un total de 9 pesticidas, los cuáles fueron: boscalid, coumaphos, fluazifop, paraoxon-methyl, propargite, propiconazole, tetraconazole, DMF y DMPF.

6.2.1. Determinación y cuantificación

Para la identificación de cada uno de los pesticidas se tuvo en cuenta el tiempo de retención y los criterios recomendados por la Unión Europea en la guía SANTE/11945/2015 según la cual, la relación de las transiciones de cuantificación/confirmación (SRM_1/SRM_2) en la muestra y en el estándar previamente inyectado no debe diferir más de $\pm 30\%$ ⁵⁰.

La figura 11 muestra los cromatogramas de 2,4-dimetilfenil-N'-metilformamidina (DMPF) y 2,4-dimetilformamida (DMF) correspondientes al estándar y a una muestra real de abeja. Se observa que la relación entre las transiciones SRM_1/SRM_2 en la muestra y en el estándar no varía más de $\pm 30\%$ y, por tanto, se puede confirmar que se trata de ambos metabolitos del pesticida.

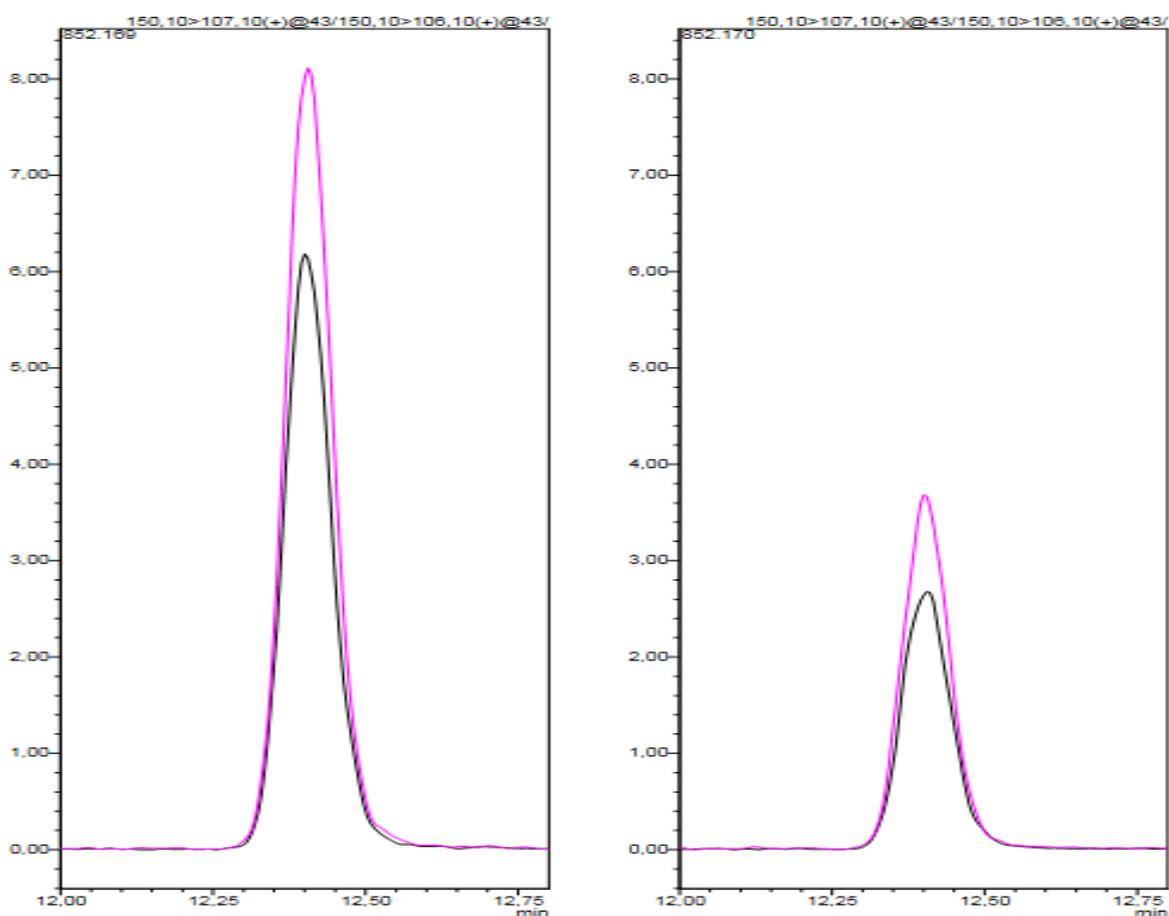


Figura 11. Cromatogramas de DMPF y DMF correspondientes al estándar y a la muestra real de abeja.

La figura 12 muestra los cromatogramas de DMPF y DMF correspondientes al estándar y a una muestra real de miel. Se observa que la relación entre las transiciones SRM_1/SRM_2 en la muestra y en el estándar no varía más de $\pm 30\%$ y, por tanto, se puede confirmar que se trata de ambos metabolitos del pesticida.

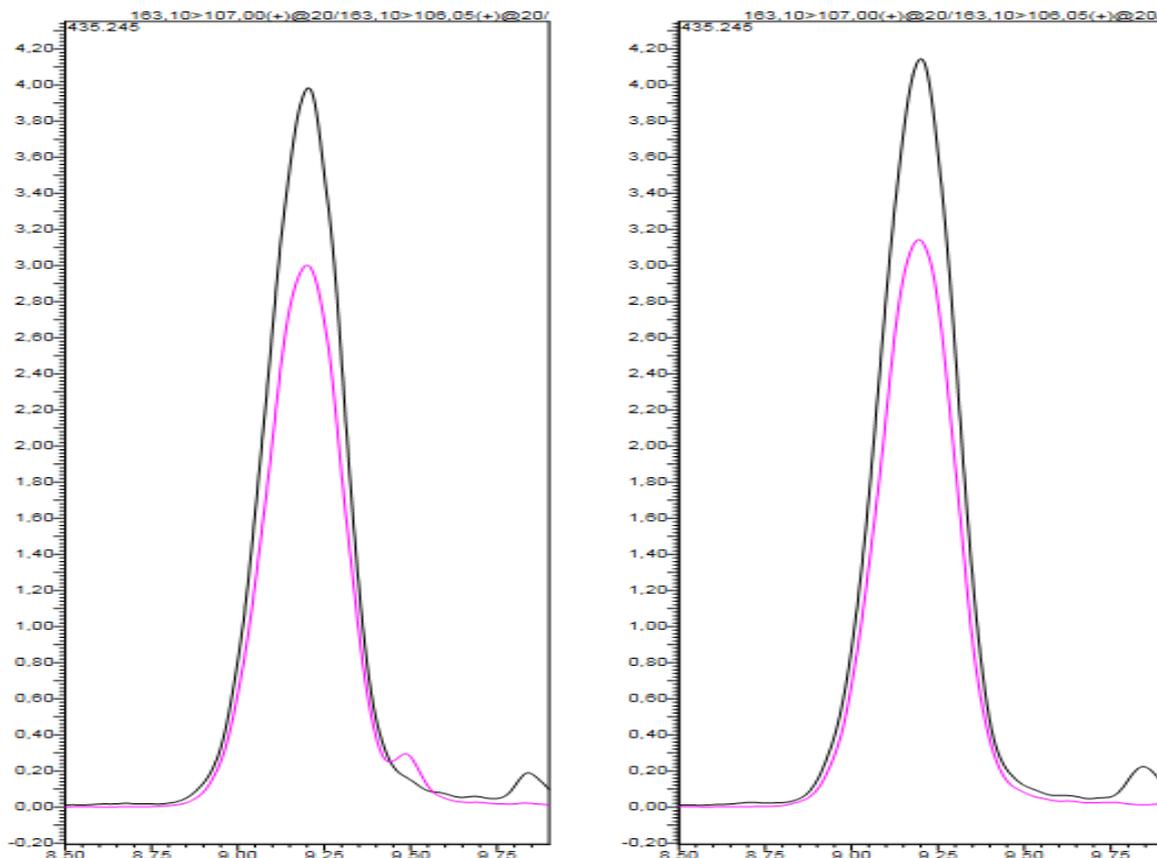


Figura 12. Cromatogramas de DMPF y DMF correspondientes al estándar y a la muestra real de miel.

Para la cuantificación, se usó el método de estándar interno. Se comprobó que las rectas de calibrado en matriz para cada uno de los pesticidas eran lineales en los rangos de concentración indicados (para las abejas de 1-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y para la cera, polen y miel de 10-500 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

La figura 13 muestra la recta de calibrado en matriz de cera para el propiconazole, en la que se observa una buena linealidad.

Correlation coefficient: $R^2 = 0,9994254$ $R = 0,9997126$
 Calibration curve: Curve type: ---- | Zero: ---- | Weighting: ---- | Equation: $y = 52436,950899x + 496266,48929$

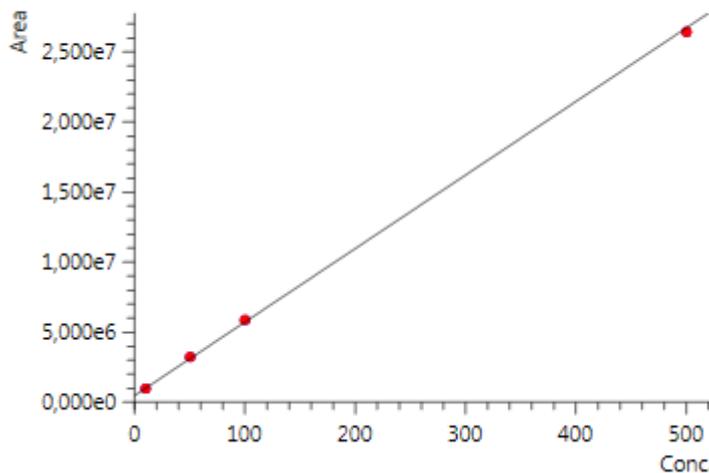


Figura 13. Recta de calibrado en cera para el propiconazole en el rango de 10-500 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Una vez que se comprobó la linealidad de las rectas de calibrado en matriz, conociendo el área obtenida correspondiente a la transición de cuantificación (SRM₁) para la muestra problema, por interpolación en la recta de calibrado, se obtuvo las concentraciones. Como tanto las muestras como la recta de calibrado fueron diluidas 1:5, la concentración obtenida es la concentración en la muestra.

En el caso de las abejas para obtener la concentración en la muestra fue necesario multiplicar por un factor de 2.5, ya que durante el tratamiento de la muestra 2 g de abejas fueron hidratadas con 5 mL de agua, en cambio para la cera, miel y polen se usaron 10 g de muestra y 10 mL de agua.

Aquellas muestras en que el área resultó ser muy grande (mayor al rango de trabajo establecido en la recta de calibrado) tuvieron que ser diluidas y reinyectadas para poder cuantificarlas.

6.2.2. Resultados análisis

La siguiente tabla resumen recoge los datos de aquellos pesticidas detectados en las distintas matrices analizadas, el número de muestras de cada matriz en los que se han detectado, así como el rango de concentraciones a los que fueron encontrados:

Pesticidas	Nº muestras detectadas y concentraciones (µg/kg)							
	Abejas		Miel		Polen		Cera	
	Muestras	Rango conc.	Muestras	Rango conc.	Muestras	Rango conc.	Muestras	Rango conc.
Boscalid	-	-	-	-	1/5	18	-	-
Cumafós	-	-	4/5	6 - 36	5/5	63 - 2419	6/6	30 - 11765
Fluazifop	-	-	-	-	1/5	68	-	-
Paraoxon-metil	-	-	-	-	4/5	8 - 12	1/6	6
Propargite	-	-	-	-	-	-	1/6	19
Propiconazol	-	-	-	-	-	-	4/6	7 - 25
Tetraconazol	-	-	-	-	1/5	61	5/6	3 - 142
DMF (Amitraz)	2/5	51 - 58	5/5	45 - 541	4/5	36 - 1183	6/6	29 - 13941
DMPF (Amitraz)	2/5	52 - 117	4/5	27 - 107	5/5	32 - 948	6/6	7 - 1575
Carga total	279		1128		5903		39902	

El amitraz, cumafós, paraoxon metil (metabolito principal del paration metil) y propargite son insecticidas y acaricidas; boscalid, propiconazol y tetraconazol son fungicidas y el fluazifop es un herbicida.

La tabla 1 muestra los valores de concentraciones observados (µg/kg) para cada uno de los pesticidas detectados en las muestras reales analizadas (cera, miel, polen y abejas).

Muestras	Pesticidas y su concentración ($\mu\text{g}/\text{kg}$)								
	Boscalid	Coumatalos	Fluazifop	Paraoxon-methyl	Propargite	Propiconazole	Tetraconazole	DMF	DMPF
C1a		407					54	29	19
C1b		30					16	33	7
C2		2957			19	7	142	219	39
C3		3991				11	3	75	13
C4		11765				21		13941	1565
C5		4254		6		25	11	191	54
M1		19						115	15
M2		36						94	24
M3		6						541	107
M4		11						45	
M5								87	27
P1	18	530	68	9				1183	948
P2		2419					61	34	36
P3		85		8				36	32
P4		63		12					35
P5		77		8				70	170
A1									
A2									
A3								58	117
A4									
A5								51	52

Tabla 1. Concentración de pesticidas en muestras reales (cera, polen, miel y abejas).

De la cera de la colmena 1 se tomaron dos muestras C1a y C1b debido a que presentaban un color claramente distinto (la muestra C1a era más oscura) y resultó interesante analizar ambas y, en efectivo, los análisis concluyeron que la C1a presentaba un nivel mucho más alto de cumafós. Para el siguiente análisis de datos en función de la carga total de pesticidas según matrices y lugares de procedencia de las muestras, se hizo una media de la carga de cada pesticida para las muestras C1a y C1b.

1) Carga total de pesticidas en función de la matriz:

El siguiente gráfico muestra la carga total de pesticidas en cada matriz. Como se observa en la figura 14, la matriz con mayor cantidad de pesticidas es la cera, esto puede ser debido a su naturaleza lipofílica, pues retiene mejor los pesticidas, además los panales de cera suelen ser usados durante mucho tiempo, siendo recomendado un periodo máximo de tres años⁵¹, por lo que podría deberse a su acumulación. Le sigue el polen, que entre las matrices de la colmena ha sido indicada como la mejor para evaluar la presencia de pesticidas⁴. Además, el polen puede dar una idea de contaminación en el periodo más corto (unos tres días) y, por tanto, permite la determinación de contaminaciones agudas⁵². Las abejas son la matriz en que menos cantidad de pesticidas hay.

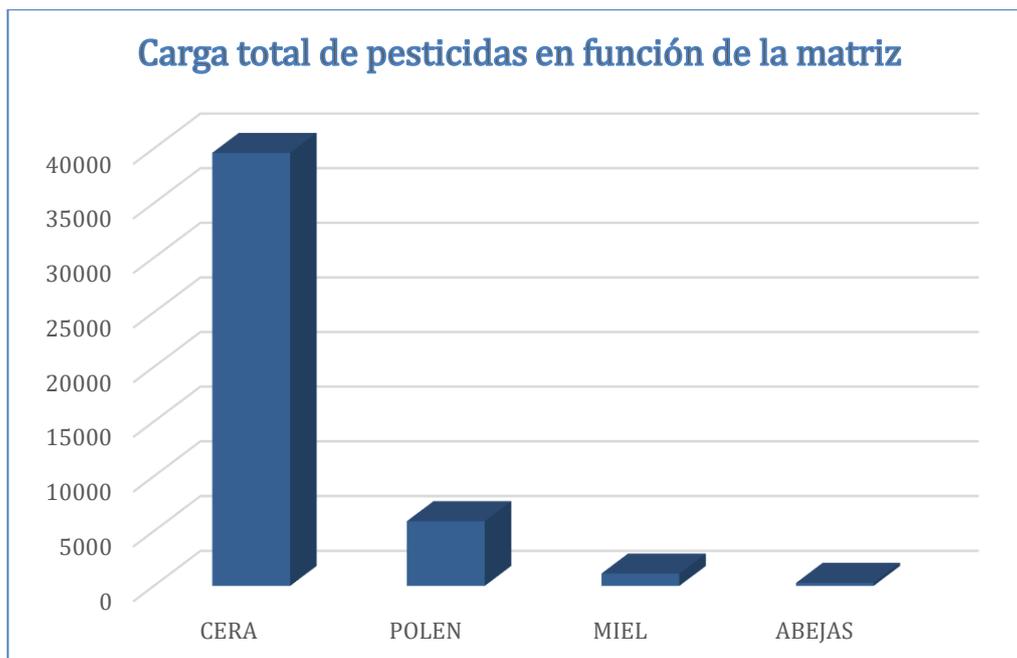


Figura 14

2) Carga total de pesticidas en función del lugar de procedencia:

El siguiente gráfico muestra la carga total de pesticidas por matriz en función de los distintos lugares de los que procedían las muestras. Como muestra la figura 15 el lugar con mayor carga de pesticidas es la finca Almendros, que corresponde a la provincia de Jaén, las demás muestras procedían de distintos sitios de la provincia de Córdoba y todas presentan una carga total de pesticidas similar. Pero como puede verse en el gráfico, la cera era básicamente la responsable de esos elevados niveles en la provincia de Jaén.

Solamente en dos de los lugares fueron detectados pesticidas en abejas, en la finca Naranjos (Córdoba) y en Villares (Córdoba), mientras que en las demás matrices (cera, miel y polen) se detectaron pesticidas en todos los lugares.

⁵¹ <http://food4farmers.org/wp-content/uploads/2012/08/ciclo.pdf>

⁵² Wiest, L., Buleté, A., Giroud, B., (...), Pouliquen, H., Arnaudguilhem, C. 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*, **2011**, 1218(34), 5743-5756.

En la mayoría de los lugares la matriz con mayor carga de pesticidas fue la cera, en la finca Naranjos la carga de pesticidas en cera y polen era similar, mientras que IFAPA (Córdoba) era el único lugar en que la matriz con mayor carga de pesticidas era el polen.

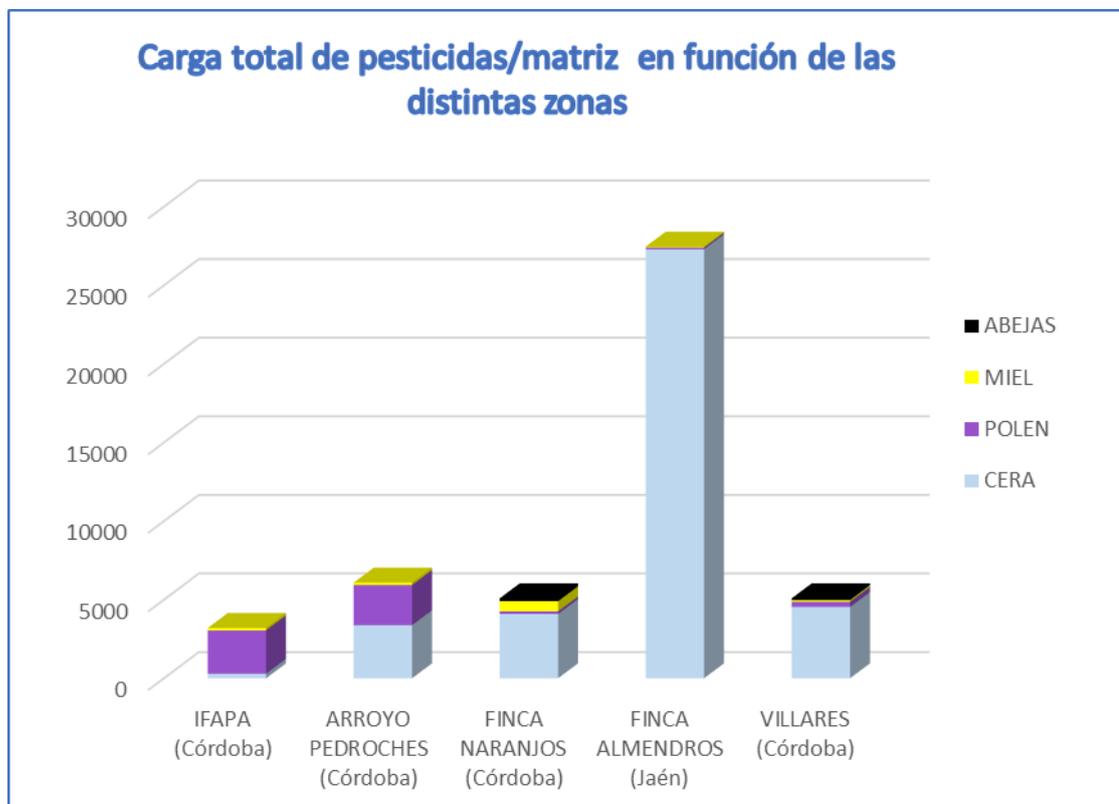


Figura 15

3) Pesticidas más usados y su presencia en las distintas matrices:

El siguiente gráfico muestra todos los pesticidas detectados y la carga total en cada una de las matrices analizadas. Como se puede observar en la figura 16 los pesticidas con más carga y, por tanto, más utilizados son cumafós, DMF y DMPF, ambos metabolitos del amitraz. Se trata de acaricidas e insecticidas de la familia de los neonicotinoides usados para el tratamiento de la varroasis. Todos los pesticidas vuelven a presentar mayor carga en la cera.

En abejas sólo se han detectado DMF y DMPF, los cuales se presenta en todas las matrices. Cumafós está presente en cera, polen y miel. Las matrices que mayor número de pesticidas contienen son la cera y el polen, ambas presentan 7 de los 9 pesticidas detectados, pero con poca carga a excepción de cumafós, DMF y DMPF.

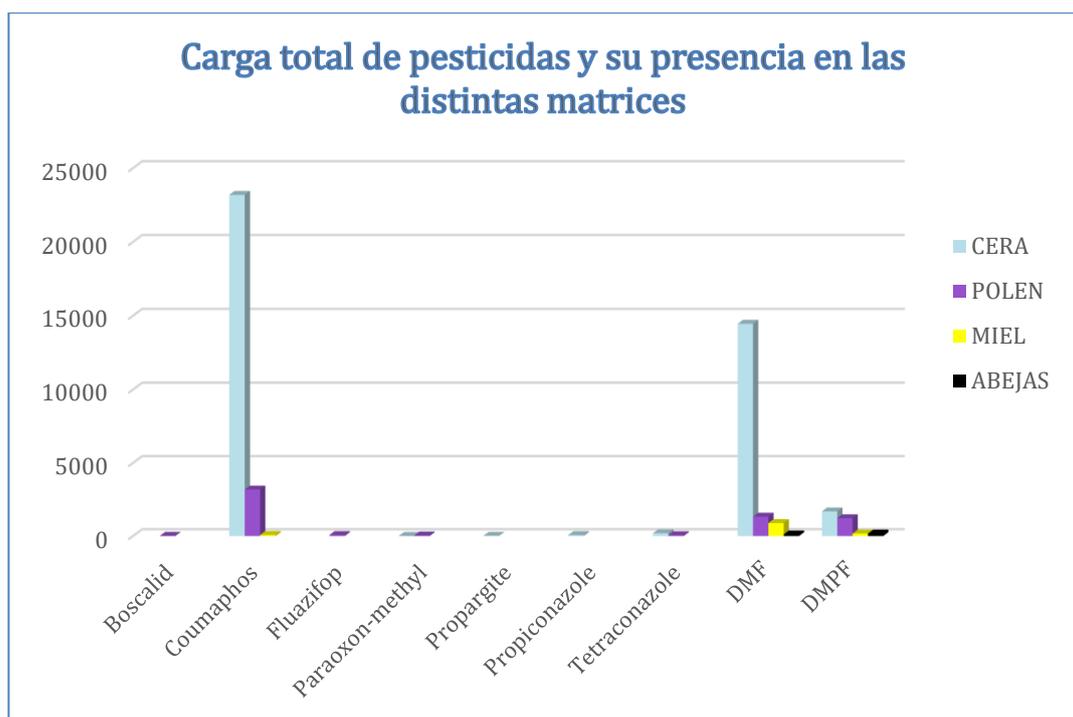


Figura 16

Los resultados generales obtenidos en este trabajo coinciden con los de otros autores. En un estudio realizado en Francia se analizaron 142 muestras de miel, 145 de abejas y 130 de polen, hallándose amitraz y cumafós en todas las matrices, estando en mayor concentración en el polen⁵³.

En España, un estudio determinó amitraz en 60 muestras de cera analizadas⁴⁹ y otro estudio en el que se analizaron 41 muestras de polen se detectó un promedio de 6 pesticidas por muestra, estando cumafós presente en el 73,2% de las muestras analizadas⁵³. Otro estudio determinó que el plaguicida más utilizado era el cumafós²⁸.

En un estudio en Valencia se analizaron 5 muestras de abejas que se sospechaba que habían muerto por envenenamiento. En todas ellas se detectó cumafós y en una de ellas se detectó hasta cuatro metabolitos de cumafós a niveles superiores a los del cumafós padre.

De cara a los resultados obtenidos, es de vital importancia la realización de análisis multi-residuo en abejas y sus productos para poder llevar un control de la contaminación ambiental que afecta tanto a estos polinizadores como a los seres humanos a través de productos de consumo como la miel.

En lo relacionado con la miel y su consumo, todas las muestras cumplían el nivel máximo de residuos (MRLs) establecido por la Unión Europea, a excepción de la muestra 3 cuyo MRL para el amitraz es de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ⁵⁴ y contenía 541 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de su metabolito DMF.

⁵³ Vázquez, P.P., Lozano, A., Uclés, S., Ramos, M.M.G., Fernández-Alba, A.R. A sensitive and efficient method for routine pesticide multiresidue analysis in bee pollen samples using gas and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.*, **2015**, 1426, 161-173.

⁵⁴ EU Pesticides database.

Dado que el amitraz es de la familia de los neonicotinoides⁵⁵, uno de los principales factores que se relaciona con la muerte de las abejas, resulta interesante comprobar si la dosis de amitraz presente en las abejas está por debajo de la dosis letal media (DL50). Para el amitraz la DL50 es de 12000 ng/abeja⁵⁶ o lo que es lo mismo 12 µg/abeja. Así, en dos de las muestras, A3 y A5, se detectaron dos de los metabolitos del Amitraz. En A3 había 58µg/kg de DMF y 175 µg/kg de DMPF (carga total 175 µg/kg) y en A5 había 51µg/kg de DMF y 52 µg/kg de DMPF (carga total 103 µg/kg). Como las abejas tienen un peso medio de 0.1 g, la dosis en las abejas de la muestra A3 era de 0.0175 µg/abeja y en las de la muestra A5 de 0.013 µg/abeja. Por tanto, tenían una dosis por debajo de la DL50.

$$\frac{175 \mu\text{g}}{1 \text{ kg}} \cdot \frac{1 \text{ kg}}{1000 \text{ g}} \cdot \frac{0.1 \text{ g}}{1 \text{ abeja}} = 0.0175 \mu\text{g/abeja}$$

$$\frac{103 \mu\text{g}}{1 \text{ kg}} \cdot \frac{1 \text{ kg}}{1000 \text{ g}} \cdot \frac{0.1 \text{ g}}{1 \text{ abeja}} = 0.013 \mu\text{g/abeja}$$

7. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, la cera es la matriz que más carga de pesticidas tiene, seguida del polen, miel y abejas. Esto puede explicarse por la naturaleza lipofílica de la cera, que retiene pesticidas liposolubles como es el cumafós y el amitraz. Otra explicación puede ser la acumulación de pesticidas por el uso repetido de un mismo panal. La cera y el polen son las matrices que más número de pesticidas tienen.

En cuanto a los pesticidas con mayor carga, éstos son el amitraz y cumafós, sobre todo en la cera y polen. Esto puede deberse al uso voluntario de apicultores de estos pesticidas directamente sobre el panal para el control de la varroasis.

De acuerdo con la procedencia de las muestras, la provincia de Jaén es la que mayor carga de pesticidas tiene, pero toda la carga se debe a la cera.

⁵⁵ <http://www.ugr.es/~ajerez/publicaciones/3.pdf>

⁵⁶ http://www.mieldemalaga.com/data/neonicotinoides_versus_abejasAGP130504.pdf

8. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

CDD	Síndrome de colapso de las colmenas
D _L 50	Dosis letal media para el 50 % de la población
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
EFSA	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
MAGRAMA	Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente
GC	Cromatografía de gases
LC	Cromatografía de líquidos
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
UHPLC	Cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución
RSD	Desviación estándar relativa
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LLE	Extracción líquido-líquido
SPE	Extracción en fase sólida
dSPE	Extracción en fase sólida dispersiva
MSDP	Dispersión de matriz en fase sólida
UEA	Extracción asistida con ultrasonidos
FE	Fase estacionaria
FM	Fase móvil
MS	Espectroscopía de masas
MS/MS	Espectroscopía de masas en tándem
API	Ionización a presión atmosférica
APCI	Ionización química a presión atmosférica
ESI	Ionización por electrospray
TOF	Tiempo de vuelo
IT	Trampa de iones
QqQ	Triple cuadrupolo
SIM	Monitoreo de del ion seleccionado
MRM	Multiple reaction monitoring
IFAPA	Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
MRL	Nivel máximo de residuos

