



**ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN
DE RESIDUOS DE
AGROQUÍMICOS EN
PRODUCTOS DE LA COLMENA
Y SU RELACIÓN CON LAS
ZONAS DE PRODUCCIÓN
APÍCOLA DEL PAÍS**

SEPTIEMBRE 2020

SERIE
FPTA-INIA

89

ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DE RESIDUOS DE AGROQUÍMICOS EN PRODUCTOS DE LA COLMENA Y SU RELACIÓN CON LAS ZONAS DE PRODUCCIÓN APÍCOLA DEL PAÍS

Proyecto FPTA - 320

Líder de proyecto: Verónica Cesio ^{1,3}

Institución Ejecutora: Universidad de la República, Facultad de Química

Equipo Técnico:

Silvina Niell¹, Rosana Díaz², Florencia Jesús¹, Natalia Gérez³, Estela Santos⁴, Jorge Franco⁵, Gastón Notte¹, Héctor Cancela⁶, Horacio Heinzen^{1,3}, Verónica Cesio^{1,3}

¹ Universidad de la República, CENUR Litoral Norte, Ruta 3 km 363, Paysandú, Uruguay

² DIGEGRA, MGAP

³ Universidad de la República, Facultad de Química, Gral. Flores 2124, Montevideo, Uruguay

⁴ Universidad de la República, Facultad de Ciencias, Iguá esq. Mataojo, Montevideo, Uruguay

⁵ Universidad de la República, Facultad de Agronomía, Ruta 3 km 363, Paysandú, Uruguay

⁶ Universidad de la República, Facultad de Ingeniería, Julio Herrera y Reissig 565, Montevideo, Uruguay

Título: ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DE RESIDUOS DE AGROQUÍMICOS EN PRODUCTOS DE LA COLMENA Y SU RELACIÓN CON LAS ZONAS DE PRODUCCIÓN APÍCOLA DEL PAÍS

Equipo Técnico: Silvina Niell, Rosana Díaz, Florencia Jesús, Natalia Gérez, Estela Santos, Jorge Franco, Gastón Notte, Héctor Cancela, Horacio Heinzen, Verónica Cesio

Líder de proyecto: Verónica Cesio

Institución Ejecutora: Universidad de la República, Facultad de Química

Serie: FPTA N° 89

e-ISBN: 978-9974-38-447-7

© 2020, INIA

Editado por la Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología de INIA
Avda. Italia 6201, Edificio Los Guayabos, Parque Tecnológico del LATU, Montevideo, Uruguay.
<http://www.inia.uy>

Quedan reservados todos los derechos de la presente edición. Este libro no se podrá reproducir total o parcialmente sin expreso consentimiento del INIA.

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

Integración de la Junta Directiva

Ing. Agr. José Bonica - Presidente

Ing. Agr. Walter Baethgen - Vicepresidente



Ministerio
**de Ganadería,
Agricultura y Pesca**

Ing. Agr. Rafael Secco

Ing. Agr. Martín Gortari



Ing. Agr. Alberto Bozzo

Ing. Agr. Alejandro Henry



FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA) fue instituido por el artículo 18° de la ley 16.065 (ley de creación del INIA), con el destino de financiar proyectos especiales de investigación tecnológica relativos al sector agropecuario del Uruguay, no previstos en los planes del Instituto.

El FPTA se integra con la afectación preceptiva del 10% de los recursos del INIA provenientes del financiamiento básico (adicional del 4o/oo del Impuesto a la Enajenación de Bienes Agropecuarios y contrapartida del Estado), con aportes voluntarios que efectúen los productores u otras instituciones, y con los fondos provenientes de financiamiento externo con tal fin.

EL FPTA es un instrumento para financiar la ejecución de proyectos de investigación en forma conjunta entre INIA y otras organizaciones nacionales o internacionales, y una herramienta para coordinar las políticas tecnológicas nacionales para el agro.

Los proyectos a ser financiados por el FPTA pueden surgir de propuestas presentadas por:

- a) los productores agropecuarios, beneficiarios finales de la investigación, o por sus instituciones.
- b) por instituciones nacionales o internacionales ejecutoras de la investigación, de acuerdo a temas definidos por sí o en acuerdo con INIA.
- c) por consultoras privadas, organizaciones no gubernamentales o cualquier otro organismo con capacidad para ejecutar la investigación propuesta.

En todos los casos, la Junta Directiva del INIA decide la aplicación de recursos del FPTA para financiar proyectos, de acuerdo a su potencial contribución al desarrollo del sector agropecuario nacional y del acervo científico y tecnológico relativo a la investigación agropecuaria.

El INIA a través de su Junta Directiva y de sus técnicos especializados en las diferentes áreas de investigación, asesora y facilita la presentación de proyectos a los potenciales interesados. Las políticas y procedimientos para la presentación de proyectos son fijados periódicamente y hechos públicos a través de una amplia gama de medios de comunicación.

El FPTA es un instrumento para profundizar las vinculaciones tecnológicas con instituciones públicas y privadas, a los efectos de llevar a cabo proyectos conjuntos.

De esta manera, se busca potenciar el uso de capacidades técnicas y de infraestructura instalada, lo que resulta en un mejor aprovechamiento de los recursos nacionales para resolver problemas tecnológicos del sector agropecuario.

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria contribuye de esta manera a la consolidación de un sistema integrado de investigación agropecuaria para el Uruguay.

A través del Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA), INIA ha financiado numerosos proyectos de investigación agropecuaria a distintas instituciones nacionales e internacionales. Muchos de estos proyectos han producido resultados que se integran a las recomendaciones tecnológicas que realiza la institución por sus medios habituales.

En esta serie de publicaciones, se han seleccionado los proyectos cuyos resultados se considera contribuyen al desarrollo del sector agropecuario nacional. Su relevancia, el potencial impacto de sus conclusiones y recomendaciones, y su aporte al conocimiento científico y tecnológico nacional e internacional, hacen necesaria la amplia difusión de estos resultados, objetivo al cual se pretende contribuir con esta publicación.

PRÓLOGO

Las abejas son fundamentales para el desarrollo de la vida y la supervivencia de las especies en la tierra tal como las conocemos. Se ha intentado calcular el aporte que ellas realizan a las actividades productivas, estimándose que el 70% de las especies vegetales que el hombre cultiva como fuente de alimento y fibras, dependen de la polinización para completar su ciclo vital.

La revolución verde de mediados del siglo pasado ha significado un avance cualitativo y cuantitativo en la calidad y en los volúmenes de la producción agrícola. Este avance se ha sustentado entre otros factores, en el empleo de agroquímicos que protegen los cultivos y controlan plagas y enfermedades, notablemente hongos patógenos e insectos dañinos: langostas, orugas, áfidos entre otros. Pero los agroquímicos impactan también en “poblaciones no blanco”, aquellos organismos que no son perjudiciales para las actividades humanas pero que igualmente son afectados por estos compuestos como habitantes del agroecosistema, donde la mayoría de las veces cumplen un rol importante para asegurar su sustentabilidad. Esta situación se ha tornado más dramática en los últimos 20 años, desde la adopción de un modelo agrícola basado en el no laboreo de la tierra, donde el empleo sistemático de agroquímicos es el pilar que sustenta esta práctica. Éstos “productos protectores de plantas” pueden afectar el normal desarrollo y actividad de las abejas así como de otros insectos benéficos. Se han observado pérdidas de colmenas en Estados Unidos desde 1948 y esta situación, también reportada en Europa y América Latina, se ha agravado en todo el mundo al intensificarse el uso continuado de la tierra en ciclos productivos ininterrumpidos cultivos de invierno/cultivos de verano, intentando maximizar el retorno económico de la actividad. Esta práctica ha llevado a un incremento de la presencia de residuos de agroquímicos en los diferentes compartimentos ambientales tal como se ha venido constatando en diversas partes del mundo. En Uruguay, la adopción como práctica sistemática del uso continuado del suelo tiene relativamente poco tiempo y existen escasos datos que permitan evaluar esta contaminación difusa de nuestro ambiente agrícola. Evaluar de una manera integrada el efecto global de las prácticas agrícolas sobre la sustentabilidad de los agroecosistemas es complejo y se han propuesto diversos modelos matemáticos para estimarlo.

El proyecto FPTA 320 intentó dar una respuesta a estos interrogantes y hacer un aporte a la sustentabilidad no solo de los agroecosistemas sino también de la producción apícola, generando insumos a través de protocolos analíticos especialmente desarrollados para este fin; para el estudio de la inocuidad de los productos de la colmena y el cumplimiento de las exigencias de mercados internacionales sobre los residuos de pesticidas que estos productos puedan contener. Se tomó como hipótesis de trabajo, que en la búsqueda de alimento las abejas son verdaderos monitores de la presencia de pesticidas en el ambiente, que los transportan a la colmena donde los almacenan. Para realizar esta tarea, se reunió un grupo de trabajo interdisciplinario que involucró organismos gubernamentales como la DIGEGRA-MGAP, diversas facultades de la UdelaR y productores apícolas que pusieron sus colmenas y conocimientos a nuestra disposición para hacer posible el desarrollo exitoso del proyecto.

Esperamos que este primer impulso al estudio de la compleja interacción entre las abejas y los agroecosistemas sirva de base para su profundización y comprensión, para contribuir al desarrollo conjunto, armónico, y sustentable de las actividades agrícolas y apícolas en nuestro país.

Silvina Niell, Horacio Heinzen, María Verónica Cesio.

Índice general

INTRODUCCIÓN.....	11
EXPERIMENTAL.....	13
<i>Metodologías de preparación de muestras para el análisis multiresiduo de pesticidas</i>	13
<i>Condiciones para los análisis cromatográficos:</i>	14
<i>Resultados y discusión</i>	15
<i>Validación del método</i>	18
<i>Monitoreo de residuos de pesticidas en productos de la colmena 24</i>	24
<i>Análisis de residuos de pesticidas en el total de los muestreos del proyecto</i>	27
<i>La colmena como monitor ambiental de la aplicación de pesticidas en agroecosistemas</i>	27
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

Equipo Técnico:

Silvina Niell, Rosana Díaz, Florencia Jesús, Natalia Gérez, Estela Santos, Jorge Franco, Gastón Notte, Héctor Cancela, Horacio Heinzen, Verónica Cesio

ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DE RESIDUOS DE AGROQUÍMICOS EN PRODUCTOS DE LA COLMENA Y SU RELACIÓN CON LAS ZONAS DE PRODUCCIÓN APÍCOLA DEL PAÍS

Proyecto FPTA 320

Período de Ejecución: May. 2014 - May. 2017

INTRODUCCIÓN

Hace algunos años, productores apícolas franceses con apiarios emplazados a 4000 m de una planta de biogás que estaba procesando desechos provenientes de una fábrica de M&M'S® encontraron que sus abejas producían miel azul, debido al color utilizado en la cubierta del confeti [1]. Este ejemplo tan sorprendente muestra el potencial de las abejas para comunicar la información ambiental que colectan en su búsqueda de polen, néctar y agua. En su recorrido ellas toman los diferentes contaminantes, entre ellos agroquímicos que fueron aplicados en el campo, los llevan consigo y los almacenan en la colmena. El compartimiento final de almacenamiento en la colmena de estos xenobióticos depende fundamentalmente de sus propiedades fisicoquímicas. Los productos de la colmena pueden ser herramientas poderosas para monitorear residuos de pesticidas originados durante los distintos ciclos de producción de los agroecosistemas.

Existen varios reportes en la bibliografía que muestran la ocurrencia de pesticidas en productos de la colmena y tratan de buscar una relación entre los agroquímicos aplicados en las zonas que se observaron colmenas devastadas [2]–[8]. La disminución de abejas en las colmenas es también un problema muy importante no solo para los apicultores sino también para los granjeros y productores que dependen de la polinización para tener éxito en sus actividades agrícolas.

Hasta ahora los hallazgos se han focalizado en la salud de las abejas y se le ha prestado muy poca atención al comportamiento de las abejas como centinelas del estatus del ambiente en un determinado agroecosistema. Como se ha señalado anteriormente, en búsqueda de una explicación para el despoblamiento de colmenas se realizaron estudios extensos sobre residuos de pesticidas en abejas y colmenas en Norte América y otras partes del mundo y se pudo demostrar la presencia de cantidades importantes de residuos de pesticidas en ellas. De las diferentes clases de pesticidas las más encontradas fueron los insecticidas y los fungicidas, siendo estos últimos los más ubicuos en los apiarios de Norte América. Clorotalonil, estrobilurinas así como algunos azoles fueron los más frecuentemente determinados. La relación entre estos paquetes de pesticidas utilizados y la salud de las abejas es una pregunta abierta que merece una aproximación múltiple para resolver esta problemática. Al mismo tiempo, la amplia gama de residuos encontrados sustenta la idea de que las abejas colectan lo que está en el ambiente, lo que les imprime una característica ideal como monitoras del mismo [2], [9]–[17].

La disponibilidad de abejas y de los derivados de la colmena provee suficientes muestras para realizar este estudio, pero la complejidad química de estas matrices hace que la determinación de los residuos de pesticidas en ellas sea un desafío analítico importante. Para poder analizar sistemáticamente las abejas y los productos de la colmena es

necesario desarrollar protocolos analíticos sencillos para la determinación simultánea de los compuestos de interés en estas matrices. Entre los métodos modernos para el análisis de residuos de pesticidas, el método de QuEChERS, el acrónimo por sus siglas en inglés de Rápido, Fácil, Barato, Eficiente, Robusto y Seguro se presenta con un elevado potencial para cumplir este cometido.

El método de QuEChERS fue desarrollado en principio para la determinación de residuos de pesticidas en frutas y hortalizas [18] y posteriormente fue aplicado a un sin número de matrices diferentes probando que es un esquema con gran plasticidad y que puede ser adaptado al propósito. Esta ductilidad se ha visto reflejada en los dos métodos oficiales en la actualidad para el análisis de residuos; el método AOAC 2007.1 y el método European Standard EN 15662, donde el uso de adsorbentes como amina primaria y secundaria (PSA), sílica gel silanizada (RP-C18) y carbono grafitizado (GCB) son recomendados dependiendo del tipo de matriz y el tipo de pesticida a analizar. Variaciones de QuEChERS, han sido reportadas por el grupo de trabajo, para el análisis de residuos de pesticidas en abejas, polen, cera y miel [19]–[22]. Recientemente, en el marco del proyecto INIA-FPTA 320, nuestro grupo de trabajo desarrolló y reportó una metodología para el análisis de residuos de pesticidas en cera de abejas que optimizó una combinación de cantidades exactas de sales, temperatura de extracción, cantidad de muestra y dos pasos de limpieza: primero una precipitación en frío de los componentes apolares de la matriz durante la noche (*freeze out*), y luego una limpieza dispersiva utilizando PSA, RP-C18 y GCB como adsorbentes [20]. Este enfoque para la preparación de muestra se mostró más eficiente que el tratamiento por Dispersión de la Matriz en Fase Sólida (MSPD, por sus siglas en inglés), que también fue evaluado y presentó mayor cantidad de coextractivos que

deterioraron el sistema cromatográfico luego de algunas inyecciones.

Así mismo también se desarrolló una metodología para analizar residuos de pesticidas en abejas utilizando una extracción con acetonitrilo y una limpieza dispersiva con diferentes combinaciones de adsorbentes logrando optimizar el desempeño del método para los analitos del estudio [21]–[23]. Si comparamos polen, abejas y cera con miel, esta última es una matriz más simple en su composición química. Sumado a esto por ser una matriz de importancia como alimento, la miel ha sido ampliamente estudiada por lo que existen diferentes protocolos de análisis. QuEChERS EN 15662 oficial fue validado en las condiciones del laboratorio sin problemas para la determinación de residuos de pesticidas en miel [19].

Durante el proyecto FPTA 320 se desarrollaron y validaron, los métodos para analizar residuos de pesticidas en las matrices seleccionadas para el estudio: abejas, miel, cera y polen con un alcance de compuestos seleccionados de acuerdo a los paquetes tecnológicos utilizados en el país y a los reportes de positivos de organismos de control como los de la Unión Europea.

Al comienzo del proyecto se seleccionaron diferentes sistemas productivos y ambientes naturales y se establecieron en ellos, con la colaboración de DIGEGRA apicultura, apiarios perfectamente identificados los que fueron controlados desde el punto de vista sanitario durante todo el período del estudio (Figura 1). Se diagramó un plan de muestreo estacional durante todo el proyecto. Se realizaron las determinaciones en las muestras obtenidas de los muestreos estacionales realizados desde 2014 a 2017 en los nueve ambientes estudiados para las 4 matrices del estudio con los métodos validados.



Figura 1. Muestreo en uno de los apiarios seleccionados para el proyecto.

Después de estudiar los datos preliminares se evaluó si las variaciones observadas durante las diferentes estaciones en los perfiles de residuos de pesticidas en las distintas matrices de la colmena dentro de un agroecosistema eran significativas. Luego se realizaron análisis estadísticos para confirmar la viabilidad de las colmenas como monitores ambientales.

EXPERIMENTAL

Metodologías de preparación de muestras para el análisis multiresiduo de pesticidas

Abejas [21], [22]

A 2 g de abejas homogeneizadas se le adicionaron 5 mL de agua y 10 mL de acetonitrilo (MeCN), agitando vigorosamente durante 1 min. Se agregaron 1 g de cloruro de sodio (NaCl), 1 g de citrato sódico tribásico dihidrato ($\text{Na}_3\text{citrato}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$),

0,5 g citrato sódico dibásico sesquihidrato ($\text{Na}_2\text{HCitrato}\cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$) y 4 g de sulfato de magnesio anhidro (MgSO_4), agitando nuevamente y centrifugando luego. Se realizó un proceso de *freeze-out* colocando el extracto en el freezer ($-18\text{ }^\circ\text{C}$) hasta el día siguiente y luego filtrando con embudo y algodón. Posteriormente se llevó a cabo otra etapa de *clean-up* del extracto mediante extracción dispersiva en fase sólida (d-SPE): PSA y C18 25 mg mL^{-1} y MgSO_4 : GCB (59:1) 150 mg mL^{-1} , se agitó en *vórtex* y se centrifugó. Una alícuota de 1 mL de extracto filtrada se inyectó en LC-MS/MS. Otra alícuota de 4 mL a sequedad bajo corriente de N_2 , se redisolvió en 1 mL de AcOEt para inyectar en GC-MS.

Para la obtención de las muestras de cera, polen y miel para análisis, se partió de muestras de panales de las que fueron separadas estas tres matrices (Figura 2).



Figura 2. Muestras de cera, polen y miel obtenidas a partir de muestras de panales.

Miel [19], [21]

A 5 g de miel homogeneizada pesados se le adicionaron 10 mL de agua y 10 mL de MeCN, agitando vigorosamente. Se agregaron 1 g de NaCl, 1 g de $\text{Na}_3\text{Citrato}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de $\text{Na}_2\text{HCitrato}\cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ y 4 g de MgSO_4 , agitando nuevamente durante 1 min y el tubo se centrifugó 5 min a 5000 rpm. El *clean-up* del extracto se llevó a cabo mediante agregado de PSA y C18 25 mg mL^{-1} y MgSO_4 150 mg mL^{-1} , se agitó en *vortex* y se centrifugó. Se tomó una alícuota de 1 mL de extracto y se filtró (0,45 μm) para inyectar en LC-MS/MS. Otra alícuota de 4 mL a sequedad bajo corriente de N_2 a 45 °C; se redisolvió en 1 mL de AcOEt para inyectar en GC-MS.

Cera [20]

A 2 g de cera homogeneizada se le adicionaron 10 mL de MeCN y se llevó a baño de agua a 80 °C. Una vez que la cera se fundió, el tubo se agitó vigorosamente durante 10-15 segundos y se colocó de nuevo en el baño de agua para fundir nuevamente. Este procedimiento se repitió cuatro veces. Luego, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó. Se realizó una etapa de *freeze-out* (-18 °C) durante 2 h y posteriormente se filtró el extracto. Se adicionaron 3 mL de hexano y se agitó vigorosamente durante 30 s. La etapa final de purificación se llevó a cabo mediante *d-SPE*: PSA y C18 25 mg mL^{-1} , se agitó en *vortex* y se centrifugó. Se tomó una alícuota de 1 mL de extracto que filtrada se inyectó en LC-MS/MS. Otra alícuota de 4 mL a sequedad bajo corriente de N_2 , se redisolvió en 1 mL de AcOEt para inyectar en GC-MS.

Polen [21]

A 5 g de polen homogeneizado pesados se le adicionaron 5 mL de agua y 10 mL de MeCN, agitando vigorosamente durante 1 min. Se agregaron 1 g de acetato de sodio (NaOAc), 4 g de MgSO_4 y 100 μL de ácido acético (HAc), agitando nuevamente y se centrifugó. El *clean-up* del extracto se llevó a cabo mediante el agregado de: PSA y C18 50 mg mL^{-1} y MgSO_4 150 mg mL^{-1} , se agitó en *vortex* y se centrifugó. Se tomó una alícuota de 1 mL de extracto que luego de filtrar se inyectó en LC-MS/MS. A otra alícuota de 4 mL se le agregaron 2 mL de tolueno y se concentró a sequedad bajo corriente de N_2 ; finalmente, se redisolvió el extracto en 1 mL de AcOEt para inyectar en GC-MS.

Condiciones para los análisis cromatográficos:

LC-MS/MS

El análisis por LC-MS/MS se realizó con un equipo de Agilent 1200 LC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) acoplado a un sistema 4000 QTRAP® MS/MS de Sciex (Framingham, Massachusetts, USA) operado en modo Scheduled® MS/MS. La separación se realizó en una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm) de Agilent Technologies. Se empleó un gradiente con una fase móvil compuesta por A: ácido fórmico 0,1 % en agua; B: acetonitrilo. Se utilizó un flujo constante de 600 $\mu\text{L min}^{-1}$ comenzando con 10 % B al momento de la inyección, manteniéndose durante 1 min; se cambió gradualmente a 100 % B durante 15 min. Esta composición de eluente

se mantuvo durante 10 min y luego se cambió en a las condiciones iniciales (10 % componente B) hasta completar 35 min post inyección. El volumen de inyección fue 5 μ L. La detección en MS/MS se realizó en modo monitoreo de reacción múltiple (MRM) usando una interfase de ionización por electrospray (ESI) en modo de ionización positiva. El voltaje de ionización fue 4500 V, el gas de nebulización fue nitrógeno a 70 psi, y el curtain gas fue nitrógeno a 30 psi. La evaporación por solvente en la fuente fue asistida por un gas para secado (nitrógeno calentado a 425 °C/ 50 psi). Se realizaron numerosos experimentos utilizando soluciones de analitos por separado para determinar las transiciones MRM óptimas, energías de colisión y potenciales de *declustering* para cada compuesto individualmente.

GC-MS

El análisis por GC-MS se realizó con un equipo de Shimadzu GC-MS-QP2010 Ultra (Kyoto, Japón). La separación se realizó en una columna Rtx®-5MS (5% methylsiloxane; 30 m; 0,25 mm id; 0,25 μ m) de Restek (Bellefonte, PA, USA). El programa de temperatura utilizado fue el siguiente: 120 °C desde 0 a 5 min; 120-190 °C a 10 °C min^{-1} ; 190 °C durante 1 min; 190-250 °C a 5 °C min^{-1} ; 250 °C 5 min; 250-300 °C a 5 °C min^{-1} ; 300 °C por 5 min ($t = 45$ min). El gas carrier fue Helio. La temperatura del inyector fue 280 °C, el flujo constante a 1 mL min^{-1} , la temperatura de la interfase 280 °C y el volumen de inyección fue 1 μ L. La detección fue realizada en modo SIM (*Single Ion Monitoring*) utilizando los iones previamente seleccionados para cada compuesto.

Resultados y discusión

El primer paso fue seleccionar los pesticidas a analizar. Esto se realizó en base a los registros y manifiestos de uso de los pesticidas empleados en el país. El número de pesticidas seleccionados fue 45. De ellos, 41 se analizaron en miel, 41 en cera, 34 en polen y 41 en abejas.

Para el estudio de la distribución de residuos de agroquímicos en productos de la colmena y su relación con las zonas de producción apícola del país fueron necesarios el desarrollo y la validación de las metodologías de análisis de residuos de pesticidas en abejas, miel, polen y cera. Tal como se mencionó anteriormente, se tomó como base para el desarrollo analítico la metodología QuEChERS, en sus dos versiones principales,

empleando métodos de extracción basados en el uso de *buffer* citrato (miel, cera, abejas) y acetato (polen).

Para el primer desarrollo de una metodología para el análisis multiresiduo de pesticidas en cera de abejas basada en QuEChERS utilizando LC-MS/MS y GCxGC-TOF [20] se realizó un estudio del impacto de la cantidad de muestra y del tamaño de partícula de la misma sobre las recuperaciones de residuos de pesticidas.

La extracción se realizó con la cera fundida y se pudo observar que la distribución de pesticidas entre la fase de acetonitrilo y la fase de cera de abejas fundida depende de la relación de volumen de las fases y de la lipofiliidad de los pesticidas como se refleja por sus valores de log Kow. El aumento del volumen de la fase de cera de abejas afectará el reparto en el equilibrio de los pesticidas, y en consecuencia las recuperaciones de los mismos, siendo los lipofílicos los más afectados. La caída en las recuperaciones fue más pronunciada para los pesticidas con un fuerte carácter lipofílico como el DDT, DDE y el bromopropilato (valores log Kow de 6,91; 6,36 y 5,4 respectivamente) que más bien permanecen en la cera líquida en lugar de particionarse hacia la fase de acetonitrilo. A partir de los resultados de este experimento se consideró que una proporción de 2 g de muestra de cera para 10 mL de acetonitrilo era un buen compromiso con casi todos los pesticidas relevantes para su determinación en esta matriz. La misma proporción muestra:acetonitrilo también se encuentra reportada para la extracción de aceites vegetales [24].

La escasa capacidad del acetonitrilo para disolver ceras y lípidos es por un lado beneficioso, ya que excluye posibles coextractivos de la matriz en los extractos de residuos de pesticidas. Por otro lado, el pobre poder de disolución de los compuestos de baja polaridad en acetonitrilo limita considerablemente su idoneidad para la extracción de pesticidas apolares incorporados en lípidos o en la cera. Asegurar una buena accesibilidad del disolvente de extracción a los pesticidas incorporados en la cera es clave para lograr buenas recuperaciones y un amplio alcance del método. Se evaluó por lo tanto la importancia de fundir la cera para obtener la óptima accesibilidad de los residuos ocluidos en la misma y se verificó cómo el tamaño de partícula afecta la extractabilidad. Para el estudio se fundió

una cierta cantidad de cera y se fortificó con una mezcla de pesticidas cubriendo una amplia gama de polaridades al nivel de $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$. De esta forma se aseguró una distribución homogénea de los residuos. Luego se llevó a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$, se molió en un molino de cuchillas agregando hielo seco y finalmente se tamizó obteniendo las fracciones 125-250, 250-500, 500-1000 μm . Luego 2 g de cada fracción se extrajeron con acetonitrilo durante 1 o 15 min por triplicado y a dos temperaturas: ambiente y $50 \text{ }^\circ\text{C}$ y otros 2 g se extrajeron a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ fundiendo de esta manera la cera. Los resultados de este experimento demostraron el efecto positivo de una buena disminución de tamaño de partícula (mayor superficie de contacto) y el de las mayores temperaturas en los porcentajes de recuperación, siendo el óptimo la extracción a $80 \text{ }^\circ\text{C}$.

La cera de abejas se compone de compuestos altamente lipofílicos tales como ésteres de alcoholes alifáticos de cadena larga, con ácidos grasos e hidroxiácidos grasos que son responsables de dos terceras partes de su composición total, además de hidrocarburos de cadena larga y niveles de trazas de carotenoides. En base a su baja solubilidad en acetonitrilo, no se espera que tales compuestos altamente lipofílicos estén presentes en niveles notables en los extractos finales. Debido a ello se busca eliminarlos fácilmente durante el paso de limpieza del extracto, ya sea mediante el *freeze out* (congelación) de los extractos, para reducir aún más su solubilidad y causar la precipitación de lípidos, o por medio de una limpieza dispersiva usando adsorbentes tipo RP-C18. La cera de abejas también contiene compuestos más polares como ácidos grasos libres de cadena larga (que constituyen aproximadamente el 12 % de la cera de abeja), hidroxiácidos grasos libres y alcoholes grasos alifáticos libres. A pesar de que poseen restos polares, estas moléculas son también altamente lipofílicas lo que limita su solubilidad en acetonitrilo. En menor grado tales compuestos también se pueden eliminar a través del *freeze out* o del uso de adsorbentes como RP-C18 pero para la purificación de los ácidos grasos la amina PSA es una buena solución. Algunos de los pigmentos polares procedentes de las flores visitadas por las

abejas (por ejemplo antocianidinas) también se pueden eliminar en el paso de purificación.

Se llevaron a cabo experimentos para evaluar la medida en que los coextractivos de la cera de abejas se pueden eliminar a través del *freeze out* y / o el uso de d-SPE C_{18} y / o PSA. La eficiencia de la limpieza se evaluó no sólo en base al residuo seco remanente después de la evaporación del extracto sino también mediante la observación de cromatogramas utilizando un equipo GCxGC-TOF. También se evaluó cómo la adición de agua a los extractos crudos puede afectar la eliminación de coextractivos. Se esperaba un efecto positivo en la eliminación de los compuestos lipofílicos, debido a un aumento de la polaridad del disolvente y un efecto negativo sobre la eficiencia de la purificación dispersiva utilizando PSA debido a la interferencia de agua con la formación de enlaces de hidrógeno. Como puede verse en la Tabla 1, luego de evaluar las diferentes combinaciones de condiciones, la limpieza utilizando PSA demostró ser la más adecuada para eliminar la mayor fracción de coextractivos a partir de los extractos iniciales (se eliminó aproximadamente 70-75% del residuo seco). Como puede verse en la Figura 3, el PSA también elimina de manera efectiva ácidos grasos que presentaban grandes picos en el cromatograma. La extracción dispersiva utilizando además C_{18} y un *freeze out* posterior tuvo un efecto similar eliminando entre 15 y 20 % de residuo seco cuando no se añadió agua, y entre 25 y 30 % cuando se añadió agua. Sin embargo, los cromatogramas observados en GC-MS/MS parecían similares para ambos tratamientos. La adición de agua fue ligeramente beneficiosa en todos los experimentos para contribuir a eliminar los lípidos, pero se consideró que en general no era de gran utilidad, ya que implica la adición de otros dos pasos en la preparación de la muestra (agua y MgSO_4). Finalmente, la combinación de *freeze out* seguido de d-SPE con C_{18} y PSA rindió los mejores resultados, ya que garantiza la eliminación de los lípidos que se redisuelven debido al aumento de la temperatura durante la filtración del extracto. De la solución obtenida se toma una alícuota y se limpia después con RP- C_{18} y PSA y se inyecta en GC o LC-MS/MS

Tabla 1. Residuo seco del extracto derivado de emplear distintos procedimientos de cleanup

	Residuo seco por mL de extracto [mg]	Comparado al residuo seco en el extracto crudo (=100%)	Comparado a la cantidad inicial de muestra (200 mg/mL=1000‰)
Sin <i>clean-up</i> (Extracto crudo)	3,12	100%	15,6
<i>freeze out</i> 1 h	2,80	90	14,0
<i>freeze out</i> 2 h	2,72	87	13,6
<i>freeze out</i> 4 h	2,60	83	13,0
+3 % H ₂ O <i>freeze out</i> 1 h	2,75	88	13,7
+3 % H ₂ O <i>freeze out</i> 2 h	2,78	89	13,9
+6 % H ₂ O <i>freeze out</i> 2 h	2,60	83	13,0
+10 % H ₂ O <i>freeze out</i> 2 h	2,40	77	12,0
PSA (25 mg/mL)	1,16	37	4,3
PSA (50 mg/mL)	1,15	37	4,1
+ 3 % H ₂ O PSA/MgSO ₄ (25/150 mg/mL)	1,00	32	5,0
+ 6 % H ₂ O PSA/MgSO ₄ (25/150 mg/mL)	0,97	31	4,9
C18 (25 mg/mL)	2,65	85	13,3
C18 (50 mg/mL)	2,55	82	12,7
+ 3 % H ₂ O C18/MgSO ₄ (25/150 mg/mL)	2,40	77	12,0
+ 6 % H ₂ O C18/MgSO ₄ (25/150 mg/mL)	2,32	74	11,6
+ 10 % H ₂ O C18/MgSO ₄ (25/150 mg/mL)	2,17	70	10,9
+ 3 % H ₂ O <i>freeze out</i> 2 h/filtración/PSA/MgSO ₄ (25/150 mg/mL)	0,80	26	4,0
PSA/C18 (25/25 mg/mL)	0,85	27	4,3
<i>Freeze out</i> /PSA (25 mg/mL)	0,77	25	3,8
<i>Freeze out</i> /PSA/C18 (25/25 mg/mL)	0,71	23	3,5

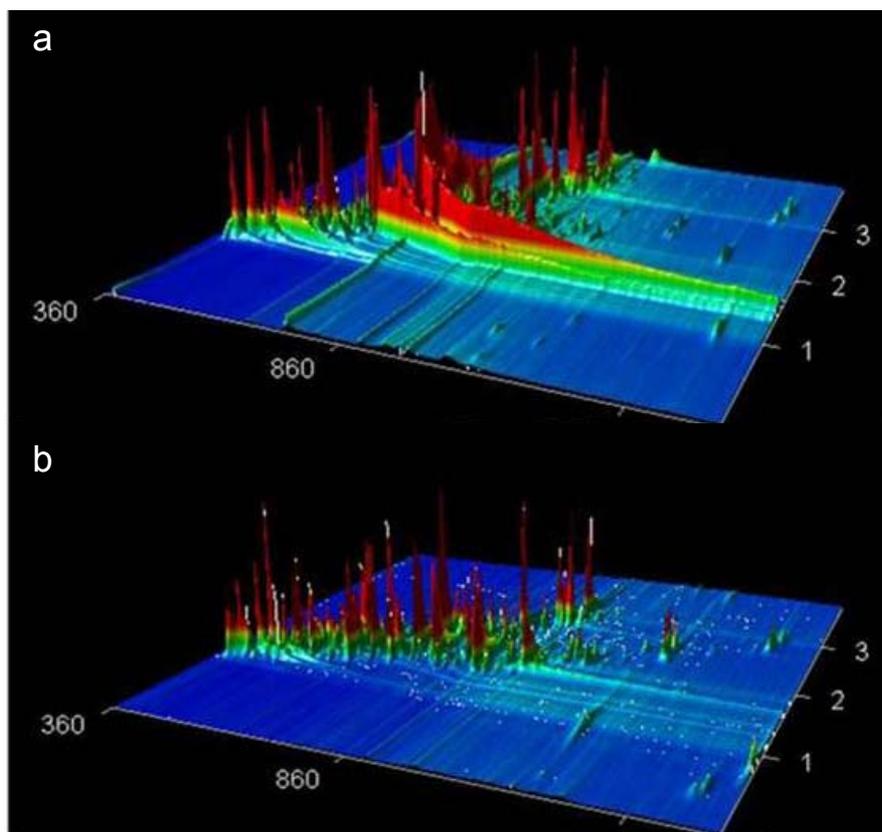


Figura 3. Gráficos para la evaluación del mejor procedimiento de limpieza entre: a) primer extracto (sin cleanup); y b) extracto luego de dSPE con PSA

Validación del método

Después de seleccionar la metodología se procedió a la validación completa del método de acuerdo con las directrices de la DG-SANTE [25]. Todas las muestras se analizaron por quintuplicado para evaluar la exactitud (% de recuperación) y la repetitividad (% RSD) del procedimiento.

Se tomaron límites de reporte (RL, por sus siglas en inglés) como los más bajos niveles validados con éxito, es decir, los niveles que alcanzaron recuperaciones aceptables (70-120%) y RSD < 20 %. Se utilizó la calibración con ajuste por matriz, mientras que para las curvas de calibración utilizando LC-MS/MS fueron construidas utilizando tanto en disolvente como ajustadas a la matriz en cinco niveles 0,001; 0,002; 0,01; 0,02 y 0,05 g mL⁻¹ que corresponde a 0,005; 0,01; 0,05; 0,1 y 0,25 mg kg⁻¹ de cera de abejas. El análisis GCxGC-TOF se llevó a cabo utilizando un estándar interno isotópicamente marcado (ISTD) mientras que no se utilizó ISTD utilizando LC-MS/MS.

Se utilizaron los estándares de calibración en un disolvente puro para evaluar los efectos de

la matriz (EM) en LC-MS/MS. El efecto matriz fue evaluado y calculado como el porcentaje de la diferencia entre la pendiente de la curva en matriz con respecto a la pendiente de la curva en solvente.

En LC-MS/MS los EM fueron pronunciados y variables entre analitos como se muestra en la Tabla 2. El clean up d-SPE con PSA contribuyó a reducir el EM (boscalid -10 a -1; imidacloprid -50 a 3; tebuconazol de -33 a 9, dimetoato de 20 a -2; carbaril de -20 a 3; tiacloprid de -25 a 1. Cuando el EM es alto se recomienda el uso de calibración en matriz (preparado a partir de extractos de matriz blanco si se encuentra disponible) o el método de adiciones estándar para obtener una cuantificación confiable.

Las recuperaciones de las determinaciones para los pesticidas evaluados en ambos sistemas cromatográficos según su compatibilidad estuvieron en casi todos los casos entre 70 y 120 % con RSDs debajo de 20 % (Tablas 2 y 3). La excepción fue hexitiazox que no mostró recuperaciones y / o RSD aceptables en ninguno de los niveles estudiados.

Tabla 2. Porcentajes de recuperación, RSDs y LOQs de los pesticidas analizados por LC-MS/MS (n=5 réplicas).

	0,2 mg kg ⁻¹		0,1 mg kg ⁻¹		0,01 mg kg ⁻¹		LOQ (mg kg ⁻¹)	Rango lineal (mg kg ⁻¹)	Coeficiente de correlación lineal (r ²)	Efecto matriz (%)
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec(%)	RSD (%)				
Amitraz	73	2	77	4	85	13	0,01	0,005-0,25	0,999	-2
Atrazina	89	4	94	4	97	13	0,01	0,006-0,24	0,999	-
Azoxistrobin	110	3	111	4	112	14	0,01	0,005-0,25	0,997	24
Boscalid	98	6	103	8	105	24	0,1	0,005-0,25	0,999	5
Carbaryl*	104	4	111	5	165	6	0,1	0,005-0,25	0,995	4
Carbaryl#					112	2				
Carbendazim	72	4	78	6	100	15	0,01	0,005-0,25	0,999	32
Carboxin	104	4	108	6	107	9	0,01	0,005-0,25	0,999	-6
Clorpirifos-etil*	92	6	105	6	218	15	0,1	0,005-0,25	0,999	-13
Clodinafop-propargil	104	1	105	5	104	14	0,01	0,005-0,25	0,999	88
Cumafos*	144	3	229	4	1679	8	-	0,005-0,25	0,999	24
Cihalotrina-lambda	92	16	100	9	no detectado		0,1	0,005-0,25	0,999	-23
Dimetoato	102	6	106	6	107	7	0,01	0,005-0,25	0,997	2
Epoxiconazol	94	4	106	7	no detectado		0,1	0,005-0,25	0,999	-33
Fenpropatrina	95	7	102	11	159	15	0,1	0,006-0,24	0,997	-
Flutriafol	101	11	114	15	no detectado		0,1	0,005-0,25	0,998	-55
Hexitiazox*	182	4	323	5	2800	3	-	0,005-0,25	0,999	-41
Hexitiazox#					87	8				
Imidacloprid	108	7	106	8	100	9	0,01	0,005-0,25	0,996	-0,1
Iprodiona	108	27	123	24	no detectado		0,2	0,005-0,25	0,997	-7
Linuron	96	6	99	5	107	15	0,01	0,005-0,25	0,999	-41
Metalaxil	107	3	109	5	113	15	0,01	0,005-0,25	0,997	-20
Metomilo	111	8	127	4	113	12	0,01	0,005-0,25	0,999	-21
Metoxifenozid*	107	4	111	5	146	7	0,1	0,005-0,25	0,999	-15
Metoxifenozid#					116	18				
Metolaclor	96	3	103	2	120	17	0,01	0,005-0,25	0,999	-20
Metribuzin	102	7	111	7	no detectado		0,1	0,005-0,25	0,999	-3
Miclobutanil	106	5	102	10	123	14	0,1	0,005-0,25	0,998	-7
Ometoate	96	11	104	8	111	6	0,01	0,005-0,25	0,992	-33
Pendimetalin	81	19	83	19	no detectado		0,1	0,06-0,24	0,995	-
Pirimicarb	108	3	114	4	111	11	0,01	0,005-0,25	0,999	-10
Profenofos	89	6	94	6	92	18	0,01	0,005-0,1	0,999	-32
Piraclostrobin	102	4	106	5	112	14	0,01	0,005-0,25	0,999	-33
Tebuconazol	98	11	99	5	103	27	0,1	0,005-0,25	0,999	2
Tebufenozide	96	4	99	5	104	15	0,01	0,005-0,25	0,998	-25
Tetraconazol	103	7	104	6	111	23	0,1	0,005-0,25	0,996	-22
Tiacloprid	113	7	120	5	108	18	0,01	0,005-0,25	0,999	-7
Tiametoxan	103	14	103	7	106	15	0,01	0,005-0,25	0,999	13
Tiodicarb	90	5	85	7	107	12	0,01	0,005-0,25	0,999	-25
Tiofanato-metil	94	5	91	7	97	15	0,01	0,005-0,25	0,997	-22
Triflumuron	91	5	98	10	104	12	0,01	0,005-0,25	0,999	-46

* Pesticidas presentes originalmente en las muestras de cera usada para fortificar. # Experimento de recuperación a 0,01 en extracto blanco de cera (Colección de Farmacognosia)

Tabla 3. Recuperaciones, RSDs y LOQs de los pesticidas analizados por GCxGC-TOF (n=5 réplicas).

	0,2 mg kg ⁻¹		0,1 mg kg ⁻¹		LOQ (mg kg ⁻¹)	Rango lineal (mg kg ⁻¹)	Coeficiente de correlación lineal (r ²)	Efecto matriz (%)
	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)				
Bromopropilato*	83	4	102	9	0,1	0,025-1	0,992	139
Clorfenvinfos	91	10	80	6	0,1	0,25-1	0,998	15
DDE, p,p	61	21	73	4	0,1	0,025-1	0,98	144
DDT, p,p	103	3	108	17	0,1	0,025-1	0,995	127
Diazinon	81	4	94	12	0,1	0,25-1	0,999	155
Endosulfan alfa	120	10	158	18	0,2	0,25-1	0,999	245
Endosulfan beta	88	12	104	40	0,2	0,25-1	0,997	89
Endosulfan sulfato	71	11	84	8	0,1	0,25-1	0,997	61
Lindano	93	5	101	7	0,1	0,05-1	0,999	185
Forato	106	5	112	9	0,1	0,25-1	0,999	283
Piperonil butóxido*	95	1	102	10	0,1	0,025-1	0,999	79
Propargite*	76	13	284	28	0,2	0,25-1	0,998	-32
Trifluralin	79	13	85	16	0,1	0,25-1	0,999	188
Tau-Fluvalinato*	-	-	-	-	-	0,25-1	0,999	23

* Pesticidas presentes en la muestra de cera usada para fortificar

Cumafos y tau-fluvalinato se re estudiaron a niveles más altos (0,2 y 0,1 mg kg⁻¹) porque se usan directamente en la colmena para proteger las abejas de los ácaros y es necesario tener un método para su control. Se obtuvieron buenos resultados para tau-fluvalinato al nivel 0,2 mg kg⁻¹ (102 % recuperación y 5 % RSD) y para cumafos en ambos niveles (103 y 109 % de

recuperación; 4 y 10 % RSDs respectivamente). Al ser la cera un producto natural, es frecuente que haya diferencias en la composición entre distintas muestras. En la Tabla 4 se observan los datos de validación para un grupo de pesticidas seleccionados. Estos datos muestran la adecuación y robustez del método para esta matriz compleja.

Tabla 4. Porcentajes de recuperación y RSDs (n=5) de un grupo seleccionado de pesticidas a 0,1 mg kg⁻¹ en distintas muestras ensayadas

	Cera comercial de Alemania		Cera comercial de Uruguay		Cera de la colección de Farmacognosia	
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)
Azoxistrobin	111	4	88	4	99	7
Boscalid	103	8	76	6	107	7
Carbaril	111	5	84	3	93	4
Clorpirifos-etil	105	6	77	6	94	11
Dimetoato	106	6	86	3	94	10
Imidacloprid	106	8	86	3	93	3
Tebuconazol	99	5	77	1	78	10
Tiacloprid	120	5	82	2	99	12
Tiametoxan	103	7	86	3	98	20

La cera de abejas es un reservorio de largo plazo de contaminantes por sus propiedades fisicoquímicas, almacena residuos de pesticidas a los que la colmena ha estado expuesta. Por lo tanto, el análisis de esta matriz compleja dará información relevante sobre la sustentabilidad de agroecosistemas específicos.

Así mismo en el marco del proyecto se publicó el trabajo: Adaptabilidad de QuEChERS para el análisis de residuos de pesticidas en productos de la colmena buscando el desarrollo de un monitor de la sustentabilidad de los agroecosistemas [21].

Dado que los métodos para determinación de residuos en miel y cera ya habían sido publicados,

se validaron los métodos para abejas y polen, las otras matrices de la colmena definidas luego de haber realizado un estudio comparativo de posibles métodos de extracción y purificación utilizando un esquema de evaluación similar a lo explicado para cera. Luego de seleccionados los mejores métodos para ambas matrices y de acuerdo con el documento SANTE de la Unión Europea sobre el control de la calidad de los procedimientos analíticos se analizaron diferentes niveles de concentración por quintuplicado en matrices blanco de abejas (0,2; 0,1; 0,05; 0,01; 0,001 y 0,0001 mg kg⁻¹) y de polen (0,05; 0,01; 0,001; 0,0001 mg kg⁻¹) para evaluar la exactitud (% de recuperación) y repetitividad (% RSD) del procedimiento (Tablas 5 y 6).

Tabla 5. Porcentaje de recuperaciones, RSDs (Desviaciones Estándar Relativas) y LOQs (Límite de Cuantificación) y LD50 (Dosis Letal) de los pesticidas analizados en abejas (n=5 réplicas). nd=no detectado

Pesticida	0,2 mg kg ⁻¹		0,1 mg kg ⁻¹		0,05 mg kg ⁻¹		0,01 mg kg ⁻¹		0,001 mg kg ⁻¹		0,0001 mg kg ⁻¹		LOQ mg kg ⁻¹	LD50 µg abeja ⁻¹	Rango	Coeficiente Correlación	Efecto matriz (%)
	% rec	RSD (%)	% rec	RSD (%)	% rec	RSD (%)	% rec	RSD (%)	% rec	RSD (%)	% rec	RSD (%)					
Acetamiprid	93	7	96	4	92	3	102	6	87	14	nd	nd	0,0010	8	0,002-0,1	0,999	-1
Azoxistrobin	104	14	109	4	95	6	102	2	102	6	118	16	0,0001	25	0,002-0,1	0,999	-3
Boscalid	80	5	85	5	92	2	99	2	119	11	nd	nd	0,0010	100	0,002-0,1	0,998	-6
Carbaril	94	5	98	4	92	4	94	4	96	0	nd	nd	0,0010	0,14	0,002-0,1	0,999	28
Carbendazim	73	4	73	6	46	7	69	19	80	8	nd	nd	0,0010	50	0,002-0,1	0,999	3
Clorpirifos etil	104	1	111	10	93	10	90	14	94	28	75	32	0,0100	0,024	0,002-0,1	0,999	-12
Clotianidín	92	6	94	4	99	6	118	24	92	20	nd	nd	0,0010	0,004	0,002-0,1	0,999	6
Cumafos	98	3	102	8	77	7	71	4	128	31	nd	nd	0,0100	-	0,002-0,1	0,998	-12
Dimetoato	95	6	99	4	97	3	97	3	94	3	84	12	0,0001	0,12	0,002-0,1	0,999	7
Haloxifop metil	102	6	106	5	94	8	97	7	103	5	113	9	0,0001	-	0,002-0,1	0,999	-2
Hexitiázox	114	10	119	8	90	5	104	12	103	12	nd	nd	0,0010	112	0,002-0,1	0,998	-26
Imazalil	101	6	111	5	92	6	94	30	nd	Nd	nd	nd	0,0500	35,1	0,002-0,1	0,999	1
Imidacloprid	94	5	103	4	88	5	105	14	nd	Nd	nd	nd	0,0100	0,0037	0,002-0,1	0,999	2
Iprodiona	71	2	74	6	84	5	102	10	nd	Nd	nd	nd	0,0100	25	0,002-0,1	0,998	-4
Metomil	96	6	96	4	94	3	98	7	102	3	89	14	0,0001	0,16	0,002-0,1	0,999	-3
Piraclostrobin	103	4	107	5	90	11	97	3	74	3	nd	nd	0,0010	73,1	0,002-0,1	0,999	1
Tebuconazol	92	4	94	6	87	2	96	6	99	8	nd	nd	0,0010	83	0,002-0,1	0,999	-6
Tiacloprid	92	5	96	5	97	5	101	7	75	8	nd	nd	0,0010	17,3	0,002-0,1	0,999	-2
Tiametoxan	97	8	106	7	91	10	106	10	114	22	nd	nd	0,0010	0,005	0,002-0,1	0,999	2

Tabla 6. Porcentajes de recuperación, RSDs (Desviaciones Estándar Relativas) y LOQs (Límites de cuantificación) de los pesticidas analizados en polen (n=5 réplicas). nd=no detectado

Pesticida	0,05 mg kg ⁻¹		0,01 mg kg ⁻¹		0,001 mg kg ⁻¹		0,0001 mg kg ⁻¹		LOQ (mg kg ⁻¹)	Rango Lineal (mg L ⁻¹)	Coeficiente de Correlación Lineal (r ²)	Efecto matriz (%)
	% Rec	% RSD	% Rec	% RSD	% Rec	% RSD	% Rec	% RSD				
Acetamiprid	86	3	88	4	119	8	nd	nd	0,0010	0,005 - 0,1	0,999	-44
Azoxistrobin	84	5	98	5	198	19	85	17	0,0001	0,005 - 0,1	0,999	43
Boscalid	89	7	82	19	127	13	nd	nd	0,0100	0,005 - 0,1	0,991	-1
Carbaril	87	4	87	7	138	3	92	12	0,0001	0,005 - 0,1	0,999	-45
Carbendazim	80	2	86	5	126	16	121	7	0,0001	0,005 - 0,1	0,998	29
Clotianidin	90	5	82	6	104	14	nd	nd	0,0010	0,005 - 0,1	0,997	-26
Cumafos	94	3	96	3	175	8	100	10	0,0001	0,005 - 0,1	0,998	-41
Dimetoato	84	3	87	5	115	7	84	8	0,0001	0,005 - 0,1	0,998	-44
Haloxifop metil	87	2	95	4	163	3	78	24	0,0100	0,005 - 0,1	0,999	-14
Hexitiazox	98	11	116	4	373	19	nd	nd	0,0100	0,005 - 0,1	0,994	-58
Imazalil	87	5	72	12	nd	Nd	nd	nd	0,0100	0,005 - 0,1	0,998	-44
Imidacloprid	84	6	73	7	97	17	nd	nd	0,0010	0,005 - 0,1	0,997	-50
Iprodiona	92	7	104	6	139	8	92	20	0,0001	0,005 - 0,1	0,995	-36
Metomil	87	3	83	6	111	6	66	11	0,0010	0,005 - 0,1	0,999	-23
Metsulfuron metil	79	3	84	3	125	2	105	7	0,0001	0,005 - 0,1	0,998	11
Piraclostrobin	86	11	95	1	193	5	95	27	0,0100	0,005 - 0,1	0,999	-38
Tebuconazol	86	4	89	6	160	20	124	24	0,0100	0,005 - 0,1	0,998	13
Tiacloprid	87	2	91	3	131	14	nd	Nd	0,0100	0,005 - 0,1	0,999	-46
Tiametoxan	96	4	90	7	nd	Nd	nd	Nd	0,0100	0,005 - 0,1	0,998	-15

Los límites de cuantificación (LOQ) fueron considerados como en las metodologías validadas anteriormente. Es de destacar que para cada pesticida, el límite de cuantificación encontrado fue menor que el correspondiente LD50 reportado. Si se considera que el peso de una abeja es de aproximadamente 100 mg, se necesita un factor de 10 para convertir µg/abeja a mg kg⁻¹ por lo que hubo que obtener LOQs muy bajos (0,0001 mg kg⁻¹) lo que se pudo lograr para varios pesticidas, en particular azoxistrobin y dimetoato en ambas matrices, lo cual es importante considerando que las concentraciones encontradas en las muestras reales eran cercanas a este nivel.

Se comprobó linealidad y se evaluaron los efectos de la matriz, calculados como la diferencia porcentual entre las curvas de mayor ajuste contra las correspondientes curvas de calibración en solvente.

Los efectos de la matriz fueron variables de un analito a otro (Tablas 5 y 6), particularmente en el caso del análisis de polen. Esto se explica por el hecho de que los efectos de la matriz dependen de si el analito de interés coeluye con coextractivos de la matriz. Como se observaron efectos de la matriz, en este trabajo se utilizó para la cuantificación el método de calibración por matriz. En la Figura 4 se puede observar un cromatograma con hallazgos de varios positivos.

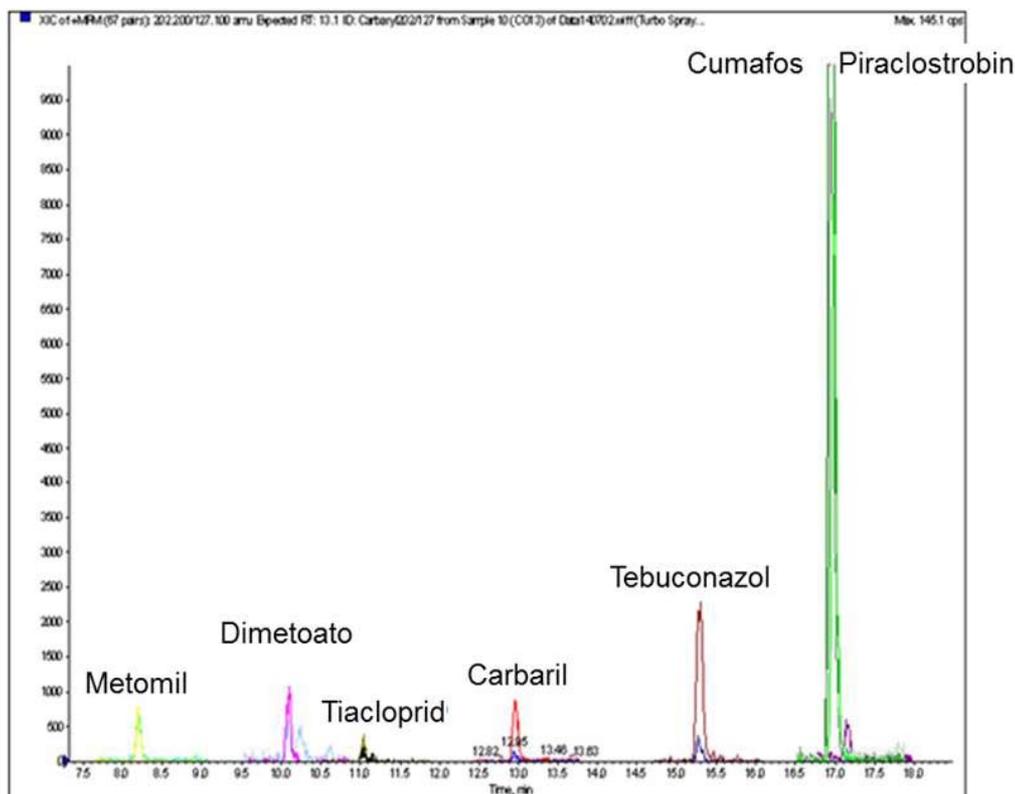


Figura 4. Cromatograma mostrando varios hallazgos positivos en muestras reales de polen de abejas analizadas por LC-MS/MS

Monitoreo de residuos de pesticidas en productos de la colmena

Con todas las metodologías específicamente desarrollados para abejas, miel, cera y polen, validadas en las condiciones de trabajo del laboratorio, se realizaron 463 análisis de las muestras reales provenientes de los apiarios previamente establecidos e identificados al comienzo de la investigación colocados en distintos agroecosistemas y se continuó la evaluación de las mismas cuatro matrices durante todo el período del proyecto.

Se encontraron insecticidas: por ejemplo, tiacloprid, imidacloprid, metomil, carbaril, fungicidas como azoxistrobin, piraclostrobin, tebuconazol, hexitiazox y herbicidas como por ejemplo haloxifop-metil a niveles entre 0,0001 y 0,01 mg kg⁻¹ (Tabla 7).

En la Figura 5 se presenta una gráfica detallada de la frecuencia de hallazgos positivos para cada matriz, donde la prevalencia de fungicidas es clara. Es de resaltar que todas las muestras contenían estrobilurinas como azoxistrobin y piraclostrobin.

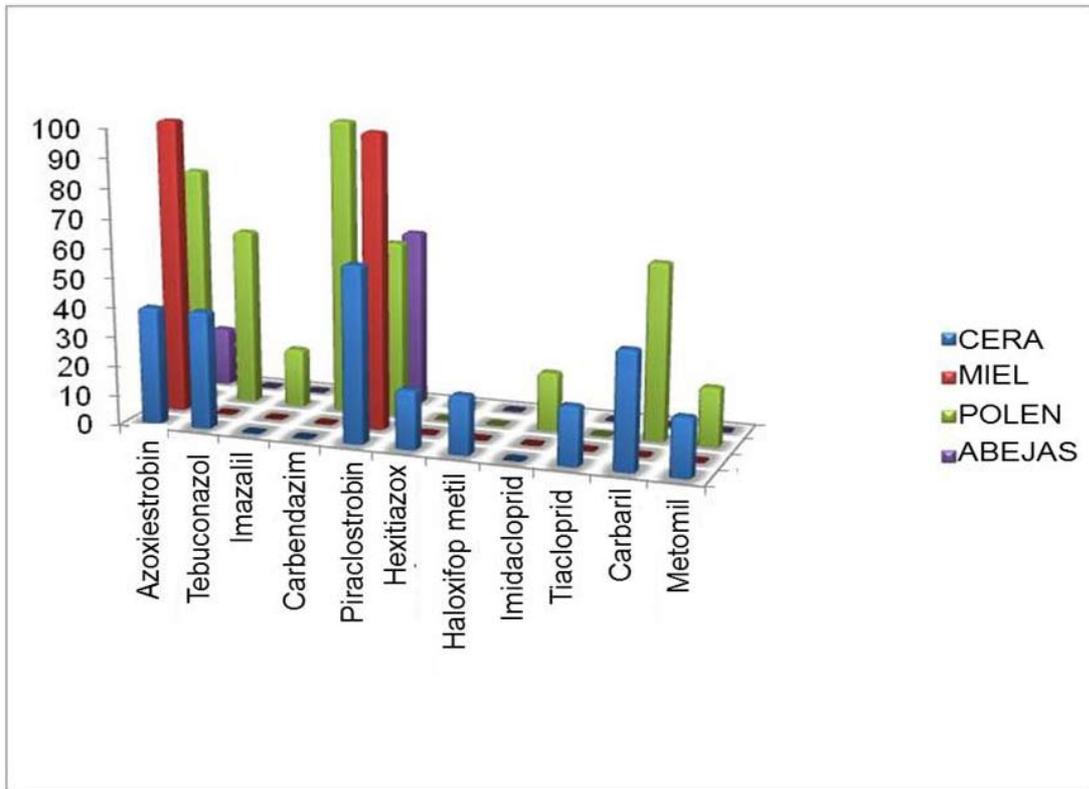


Figura 5. Frecuencia de hallazgos positivos en las cuatro matrices de la colmena analizadas.

La peculiaridad de la alta ocurrencia de fungicidas en productos de la colmena no ha sido explicada aún. Los fungicidas poseen un pKa y un pKow intermedio, de donde puede inferirse la causa de su ubicuidad en las diferentes matrices relacionadas con la colmena: ceras, polen y abejas. La presencia de pesticidas en el polen se origina directamente de lo aplicado sobre los cultivos. Dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas los residuos pueden difundir hacia otros compartimentos de la colmena, fundamentalmente hacia la cera y la

miel. Ya sea debido a un efecto de dilución o a su baja solubilidad en ellos, su detección se ve dificultada. Los residuos de pesticidas en miel son menos frecuentes probablemente porque ésta es hidrofílica, mientras que la mayoría de los pesticidas son lipofílicos y por lo tanto, la difusión desde matrices más lipofílicas como el polen y la cera hacia la miel no se ve favorecida. Los pesticidas encontrados en las abejas son aquellos a los que ellas estuvieron directamente expuestas, y por lo tanto, pueden variar con el tiempo.

Análisis de residuos de pesticidas en el total de los muestreos del proyecto

Las tendencias generales descritas anteriormente

se mantuvieron en el total de los muestreos realizados entre 2014 y 2017. En la figura 6 se observan las altas frecuencias de detección de los fungicidas.

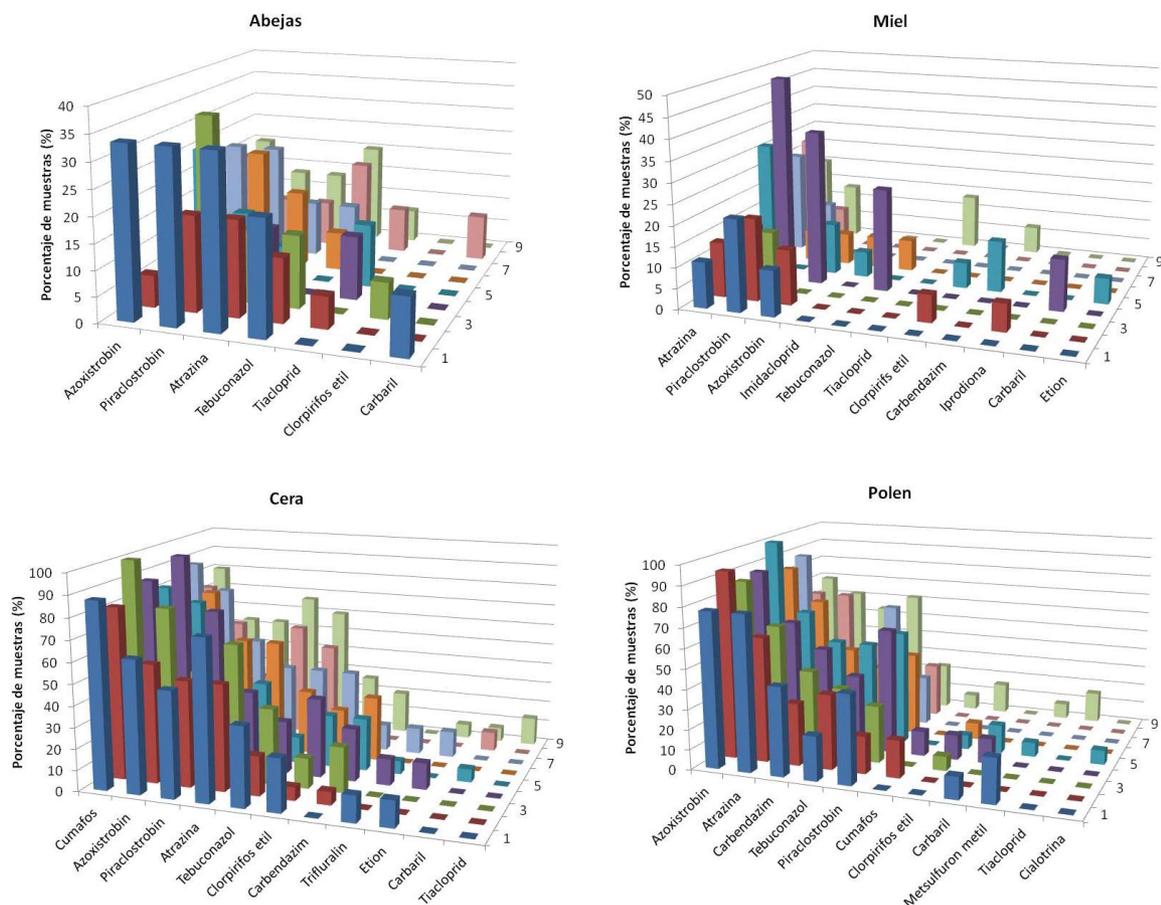


Figura 6. Porcentaje de muestras con detección de residuos más frecuentes para cada matriz por ambiente. 1- Cuenca lechera 2-Monte nativo, campo natural 3- Ganadero, agrícola arroz 4- Hortícola Norte 5- Citrícola 6- Soja 7- Urbano, monte ribereño 8- Forestación Eucaliptus 9- Hortifructicultura sur, soja.

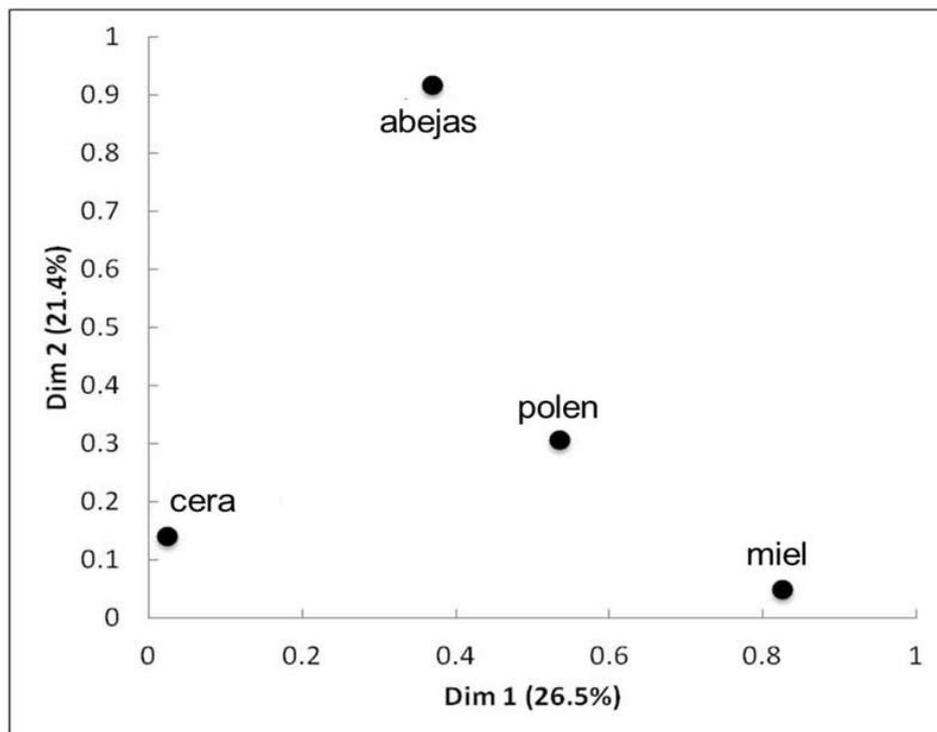
Como resultado de los 3 años de proyecto podemos concluir que: el 97 % de los residuos encontrados en todas las matrices estudiadas presentaron una concentración entre 0,0001 - 0,05 mg kg⁻¹. En las muestras de miel cada pesticida encontrado presentó una concentración por debajo del LMR (Límite Máximo de Residuo) permitido en Europa para miel como alimento. Luego de este estudio planificado, donde además se siguió la evaluación biológica de los apiarios, para luego correlacionarla con los hallazgos de residuos se pudo comprobar que la información obtenida a través del perfil de dichos residuos contribuye a tener una fotografía más amplia de la situación ambiental de los sistemas monitoreados. Las metodologías analíticas desarrolladas y validadas permitieron

reunir una enorme cantidad de información de manera rápida y efectiva lo que hace factible la idea de monitorear agroecosistemas a través del análisis de residuos de los productos de la colmena.

La colmena como monitor ambiental de la aplicación de pesticidas en agroecosistemas

Como se propuso en el proyecto, las abejas en su viaje a recoger alimento recorren territorios en un radio de 2000 m, tomando lo que encuentran allí, entre ellos los residuos de pesticidas. Debe tenerse en cuenta que para que los pesticidas que colectan las abejas lleguen a la colmena, deben encontrarse en concentraciones subletales para ellas.

Figura 7. Análisis Factorial Múltiple de los hallazgos de residuos de pesticidas en abejas, miel, polen y cera de abejas.



Se planteó la hipótesis que las propiedades fisicoquímicas de los pesticidas condicionan la matriz (abejas, miel y polen) donde estos se acumulan, independientemente del agroecosistema. Se espera como consecuencia, encontrar diferentes perfiles de residuos de pesticidas en las distintas matrices. Para confirmar esta hipótesis, se realizó un Análisis Factorial Múltiple de los hallazgos de residuos de pesticidas de todas las muestras analizadas en abejas, miel, polen y ceras. Ninguna de las cuatro matrices aparece como muy cercana entre sí como se puede observar en la Figura 7.

Esto indica que cada matriz acumula diferentes residuos según sus características fisicoquímicas y, de acuerdo a su rol en la colmena nos brindan diferente información. Por ello, y considerando la forma en que los residuos llegan a la colmena, se pudo probar que una información más valiosa puede conseguirse analizando cada matriz por separado. Mientras la cera es un reservorio histórico de los pesticidas que se colectaron, los residuos en el polen son mucho más diversos y representan lo que se aplicó directamente sobre los cultivos. Un alto número de insecticidas fueron detectados en él como, por ejemplo, imidacloprid, carbaril, dimetoato. Por otro lado, los residuos de pesticidas en las abejas corresponden a las últimas

aplicaciones a las cuales las abejas han estado expuestas. En las muestras de los apiarios en estudio, las abejas transportaban principalmente fungicidas y el único herbicida detectado, fue haloxifop metil. Por su parte, la miel es una matriz hidrofílica y es de esperar bajas concentraciones de pesticidas lipofílicos y los más hidrofílicos deberían de estar presentes. Sin embargo, solo estribulurinas fueron detectadas en esta matriz. Es de destacar que por las características analíticas de la molécula química de Glifosato y sus metabolitos éstos no fueron analizados en este estudio ya que requieren otras condiciones de trabajo.

Un monitor de agroecosistemas debe ser estable, pero a su vez, ser capaz de registrar las variaciones en la línea de base que ocurren en un ecosistema definido. Para ensayar la utilidad de la colmena como monitor se debe chequear el rango de variabilidad en la carga de residuos dentro de la colmena y si las diferencias observadas tienen algún significado. Para evaluar la estabilidad y la capacidad de respuesta de la colmena como indicador se empleó como herramienta estadística la distancia de Gower (distancia G), dada por la distancia original con la del sistema perturbada. La Tabla 8 muestra la evaluación de las distancias de Gower para cinco de los apiarios entre dos estaciones de muestreo.

Tabla 8. Comparación de apiarios ubicados en ambientes diferentes en dos estaciones de acuerdo a sus perfiles de residuos de pesticidas

Apiario	Estación comparada	Ambiente	G-distancia
A	Otoño& Primavera	Cuenca lechera	0,24
B	Otoño& Primavera	Forestación	0,24
C	Otoño &Invierno	Ganadería & arroz	0,35
D	Invierno& Primavera	Cuenca lechera, pradera natural	0,18
E	Otoño& Primavera	Forestación & monte nativo	0,15

Tabla 9. Distancias de Gower entre todos los pares de apiarios-estaciones muestreadas

	A-Otoño	F-Otoño	B-Otoño	E-Otoño	C-Otoño	C-Invierno	D-Invierno	G-Primavera	B-Primavera	E-Primavera	A-Primavera
F-Otoño	0,38										
B-Otoño	0,18	0,34									
E-Otoño	0,23	0,30	0,14								
C-Otoño	0,41	0,48	0,31	0,36							
C-Invierno	0,18	0,34	0,09	0,15	0,35						
D-Invierno	0,24	0,26	0,15	0,14	0,37	0,13					
G-Primavera	0,20	0,29	0,09	0,12	0,33	0,12	0,10				
B-Primavera	0,35	0,41	0,24	0,26	0,34	0,29	0,26	0,19			
E-Primavera	0,23	0,30	0,15	0,15	0,37	0,16	0,13	0,09	0,23		
A-Primavera	0,24	0,36	0,17	0,15	0,40	0,17	0,17	0,10	0,23	0,14	
D-Primavera	0,28	0,35	0,17	0,23	0,37	0,22	0,18	0,14	0,27	0,18	0,21

Del estudio de los resultados, la primera conclusión a extraer es que las comparaciones deben establecerse entre los mismos apiarios. A partir de esta constatación se puede afirmar que el menor valor de distancias G es el del apiario E, localizado en las cercanías de una zona de forestación y bosque nativo, lo que significa que el cambio entre estaciones en ese ambiente fue bajo. Esto puede interpretarse como que la contribución en la carga de residuos de pesticidas en la colmena en este ambiente es debida a las aplicaciones en la zona de forestación mientras que en principio no se registrarían aplicaciones de pesticidas en el monte nativo. Subiendo en los valores de distancias G, el siguiente menor valor corresponde al apiario D, cercano a una pradera natural, donde los pesticidas que se encuentran corresponden a actividades pecuarias ya que no se realizan aplicaciones en el campo natural. Por otro lado, en lo que respecta al apiario A localizado también en una cuenca lechera donde se encuentran plantadas praderas de lotus y trébol, dos especies muy visitadas por las abejas pecoreadoras, se obtuvo una distancia G muy grande, mostrando que el monitor es también capaz de distinguir entre diferentes prácticas agrícolas a pesar de

que la misma actividad productiva esté siendo desarrollada en los alrededores de la colmena. La distancia G encontrada entre los apiarios A y D alimentados en diferentes cuencas con ambientes distintos en primavera es de 0,21 (Tabla 9). Estos resultados prueban que la colmena es capaz de detectar diferentes manejos dentro de un ambiente agrícola. El apiario B que estaba localizado en el medio de una plantación de forestación de Eucaliptus presentó la misma distancia G que el apiario A, resultados que indican que ambos apiarios fueron capaces de registrar los mismos cambios en el perfil de sus pesticidas en otoño y primavera. Estos hallazgos confirman también las observaciones reportadas por los apicultores de que las abejas prefieren visitar áreas forestadas naturales debido a su diversidad frente a las áreas cultivadas, usualmente áreas de monocultivos como eucaliptus o pinos. La distancia de Gower más alta registrada se obtuvo en un ambiente complejo donde diferentes actividades productivas eran desarrolladas. La rotación entre los cultivos de arroz y la producción ganadera es característica en la producción de arroz en Uruguay. Particularmente el apiario C estaba establecido en un ambiente como el anteriormente

descrito y fue el que registró esa variación. Las diferencias en las cargas de pesticidas observadas entre las dos estaciones en los apiarios localizados en todos los ambientes estudiados sustentan la idea de que la colmena puede ser un monitor del estado del ambiente. Estas aseveraciones son las primeras observaciones objetivas de que la incorporación de los residuos de pesticidas, a pesar de serlo a bajas concentraciones, son características de cada ecosistema y de las distintas prácticas de cultivo desarrolladas en ellos. Los apiarios en los diferentes ambientes

evaluados mostraron variaciones estacionales significativas en la cantidad de residuos de pesticidas, los que además fueron característicos para cada ambiente. La Figura 8 muestra el cambio en el perfil de los residuos de pesticidas de un apiario localizado ceca de una plantación de soja antes y después de una estación de cultivo. La cantidad y el tipo de residuos encontrados fueron los más altos al final del periodo agrícola, mostrando nuevamente que la colmena es sensible a los cambios estacionales que ocurren en un mismo ambiente.

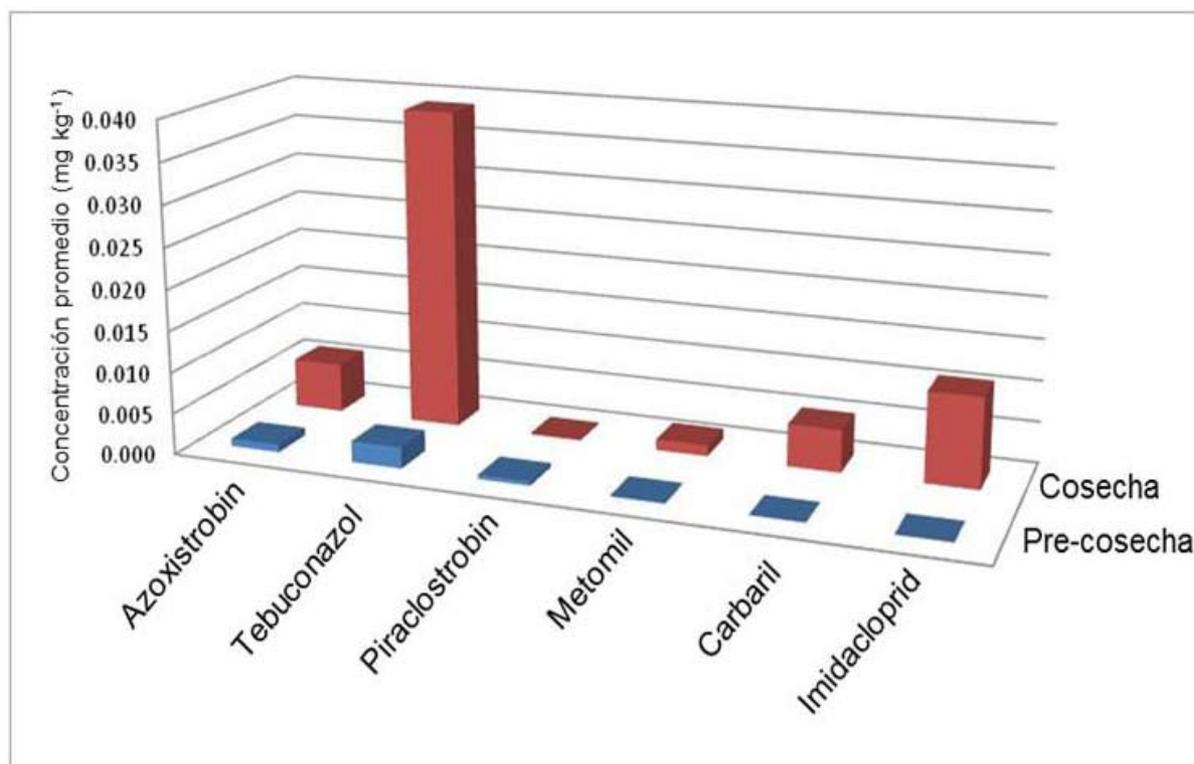


Figura 8. Promedio de las concentraciones de los residuos encontrados en un apiario localizado en una plantación de soja muestreado en pre y post cosecha.

Posteriormente en base a los resultados tanto biológicos como analíticos del proyecto se desarrolló un modelo de aprendizaje automático utilizando la herramienta informática SVM (*Support Vector Machines*) [26]. En primera instancia se construyeron indicadores químicos y biológicos. Luego se utilizaron como variables de entrada para

el modelo y se validó el mismo al constatar que es capaz de clasificar los agroecosistemas donde se encontraban los apiarios según la presencia de pesticidas utilizando los indicadores. Esta es otra herramienta objetiva para poder utilizar la colmena como biomonitor de residuos de pesticidas en agroecosistemas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] P. Genthon, "Blue and green honey makes French beekeepers see red," 2012. [Online]. Available: <https://www.reuters.com/article/us-france-bees/blue-and-green-honey-makes-french-beekeepers-see-red-idUSBRE8930MQ20121004>.
- [2] M.-P. Chauzat *et al.*, "An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France.," *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 30, no. 1, pp. 103–111, Jan. 2011.
- [3] O. Lambert *et al.*, "Widespread occurrence of chemical residues in beehive matrices from apiaries located in different landscapes of Western France," *PLoS One*, vol. 8, no. 6, pp. e67007–e67007, Jun. 2013.
- [4] M.-P. Chauzat *et al.*, "Influence of pesticide residues on honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony health in France.," *Environ. Entomol.*, vol. 38, no. 3, pp. 514–523, Jun. 2009.
- [5] C. A. Mullin, M. Frazier, J. L. Frazier, S. Ashcraft, and R. Simonds, "High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries : Implications for Honey Bee Health," vol. 5, no. 3, 2010.
- [6] L. Pareja *et al.*, "Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay.," *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 8, no. 10, pp. 3844–3858, Oct. 2011.
- [7] F. J. Orantes-Bermejo, A. G. Pajuelo, M. M. Megías, and C. T. Fernández-Piñar, "Pesticide residues in beeswax and beebread samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in Spain. Possible implications for bee losses," *J. Apic. Res.*, vol. 49, no. 3, pp. 243–250, Jan. 2010.
- [8] K. M. Kasiotis, C. Anagnostopoulos, P. Anastasiadou, and K. Machera, "Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC–MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees," *Sci. Total Environ.*, vol. 485–486, pp. 633–642, 2014.
- [9] E. Gattavecchia, S. Girotti, S. Ghini, G. Celli, C. Porrini, and A. G. Sabatini, "Use of honey bees as bioindicators of environmental pollution in Italy," 2002, pp. 186–247.
- [10] C. Porrini *et al.*, "Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination," *Apiacta*, vol. 38, pp. 63–70, 2003.
- [11] C. Porrini, E. Caprio, D. Tesoriero, and G. Prisco, "Using honey bee as bioindicator of chemicals in Campanian agroecosystems (South Italy)," *Bull. Insectology*, vol. 67, no. 1, pp. 137–146, 2014.
- [12] G. Balayiannis and P. Balayiannis, "Bee honey as an environmental bioindicator of pesticides' occurrence in six agricultural areas of Greece.," *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 55, no. 3, pp. 462–470, Oct. 2008.
- [13] D. Barišić, J. Bromenshenk, N. Kezić, and A. Vertačnik, "The role of honey bees in environmental monitoring in Croatia," 2002.
- [14] B. Raeymaekers, *A Prospective Biomonitoring Campaign with Honey Bees in a District of Upper-Bavaria (Germany)*, vol. 116. 2006.
- [15] S. Ghini *et al.*, "Occurrence and distribution of pesticides in the province of Bologna, Italy, using honeybees as bioindicators.," *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 47, no. 4, pp. 479–488, Nov. 2004.
- [16] G. Celli and B. Maccagnani, "Honey bees as bioindicators of environmental pollution," *Bull. Insectology*, vol. 56, no. 1, pp. 137–139, 2003.
- [17] C. Porrini, G. Celli, and P. Radeghieri, "Monitoring of pesticides through the use of honeybees as bioindicators of the Emilia-Romagna coastline," *Ann. Chim.*, vol. 88, no. 3–4, pp. 243–252, 1998.
- [18] M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Stajnbaher, and F. Schenck, "Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile," *J. AOAC Int.*, vol. 86, no. 2, pp. 412–431, 2003.
- [19] S. Niell *et al.*, "Análisis multiresiduo de 41 pesticidas en miel por LC-MS / MS : evaluación de dos métodos de clean-up," *Agrociencia Uruguay*, vol. 17, no. 1, pp. 101–107, 2013.
- [20] S. Niell *et al.*, "QuEChERS-based method for the multiresidue analysis of pesticides in beeswax by LC-MS/MS and GC×GC-TOF," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 62, no. 17, pp. 3675–3683, 2014.

- [21] S. Niell *et al.*, "QuEChERS adaptability for the analysis of pesticide residues in beehive products seeking the development of an agroecosystem sustainability monitor," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 63, no. 18, 2015.
- [22] S. Niell, N. Gerez, F. Jesús, V. Cesio, and H. Heinzen, "Case Study: Beehive Devastation by Microencapsulated Parathion-Methyl," *Chromatographia*, vol. 79, no. 17–18, 2016.
- [23] S. Walorczyk and B. Gnusowski, "Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in honeybees using acetonitrile-based extraction and gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, no. 37, pp. 6522–6531, 2009.
- [24] M. Anastassiades, B. Tasdelen, E. Scherbaum, and D. Stajnbaher, "Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis," in *Pesticide Chemistry: Crop Protection, Public Health, Environmental Safety*, H. Ohkawa, H. Miyagawa, and P. Lee, Eds. Weinheim: Wiley-VCH, 2007, pp. 439–458.
- [25] The European Commission, "Sante/11813/2017 Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis," pp. 1–46, 2018.
- [26] S. Niell *et al.*, "Beehives biomonitor pesticides in agroecosystems: Simple chemical and biological indicators evaluation using *Support Vector Machines* (SVM)," *Ecol. Ind.*, vol. 91, pp. 149–154, 2018.

INIA Dirección Nacional
Avda. Italia 6201
Ed. Los Guayabos
Parque Tecnológico LATU
Montevideo
Tel: 2605 6021
inia@inia.org.uy

INIA La Estanzuela
Ruta 50 Km. 11
Colonia
Tel.: ++598 4574 8000
Fax: ++598 4574 8012
iniale@le.inia.org.uy

INIA Las Brujas
Ruta 48 Km. 10
Canelones
Tel.: ++598 2367 7641
Fax: ++598 2367 7609
inia_lb@lb.inia.org.uy

INIA Salto Grande
Camino al Terrible
Salto
Tel.: ++598 4733 5156
Fax: ++598 4732 9624
inia_sg@sg.inia.org.uy

INIA Tacuarembó
Ruta 5 Km. 386
Tacuarembó
Tel.: ++598 4632 2407
Fax: ++598 4632 3969
iniatbo@tb.inia.org.uy

INIA Treinta y Tres
Ruta 8 Km. 281
Treinta y Tres
Tel.: ++598 4452 2023
Fax: ++598 4452 5701
iniatt@tyt.inia.org.uy