

Análisis de imidacloprid en cultivos de girasol por UHPLC/MS-MS

Melina Michlig

Programa de Investigación y Análisis de Residuos y Contaminantes Químicos (PRINARC) – Facultad de Ingeniería Química (FIQ) - Universidad Nacional del Litoral (UNL). Santa Fe, Argentina.

Ciencias exactas, química.

melinapmichlig@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Los neonicotinoides se han convertido en los insecticidas botánicos más empleados en todo el mundo, debido a que muestran una buena actividad contra insectos resistentes a otras clases de insecticidas, actualmente el imidacloprid se ha posicionado en el primer lugar para el tratamiento contra insectos.

Estudios sugieren que los residuos de neonicotinoides pueden translocar en polen y néctar de plantas de semillas inoculadas y esto representa un riesgo para insectos polinizadores.

La Unión Europea ha resuelto en abril de 2013 la prohibición temporal de los plaguicidas imidacloprid, tiametoxan y clotianidina, basados en un informe emitido por la EFSA (European Food Safety Authority).

A pesar de ser Argentina un país agroproductor y agroexportador, los conocimientos referidos a las consecuencias ambientales del empleo de insecticidas en semillas para la siembra de cultivos, son muy escasos.

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue determinar la translocación del imidacloprid en polen y nectarios florales de girasol. De esta manera, fueron llevadas a cabo pruebas a campo durante dos años, para ello, se plantaron tres parcelas: un control sin imidacloprid; y semillas tratadas con dos diferentes cantidades de imidacloprid (Imida Nova 60): la dosis indicada en la etiqueta del insecticida, 600 cc/100 kg de semilla (Tratamiento I); y el doble de esta dosis, 1200 cc/100kg de semilla (Tratamiento II).

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras

Se ha desarrollado un método para la determinación de residuos de imidacloprid en muestras en polen de girasol, en niveles traza (sub-ppb). Las distintas alternativas fueron evaluadas mediante ensayos de recuperación, adicionando a una muestra blanco cantidades conocidas de estándar de imidacloprid. Una vez optimizado el método se procedió a validarlo y luego se midieron las muestras de campo. La misma metodología fue también aplicada a nectarios florales de girasol.

La extracción y limpieza fueron realizados basados en el método QuEChERS. Fueron pesados 500 mg de muestra homogenizada por morteo. Debido al bajo contenido de agua de las muestras fueron adicionados 2 ml de agua conteniendo 2 % v/v ácido fórmico.

Se dejó en remojo por 1 hora y el siguiente paso fue la adición al tubo de 2 ml de MeCN (solvente orgánico extractante), seguido de la agitación durante 1 min. Luego fueron adicionados 800 mg de MgSO₄ y 200 mg de NaCl y se procedió a una agitación vigorosa manual de 5 minutos seguido de 5 minutos de centrifugado a 2500 rpm.

Se tomaron 1,5 ml de la capa orgánica y se procedió a la limpieza por extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE), adicionando 225 mg de MgSO₄, ensayando distintas proporciones de nanotubos de carbono (CNTs) o carbón activado (C*), 225 mg de PSA y 75 mg de C18. Se agitó manualmente por un minuto y se centrifugó nuevamente por 5 min a 2500 rpm.

Se extrajeron 800 µl de sobrenadante, se evaporó el solvente con la precaución de no llevar a sequedad absoluta (hasta un volumen aproximado de 50 µl) y se reconstituyó con 300 µl de fase móvil (agua/MeCN 98:2 conteniendo 0,1% de ácido fórmico). El volumen final fue calculado por diferencia de pesada.

Análisis instrumental

Para la determinación instrumental se utilizó el cromatógrafo líquido de ultra alta resolución (ACQUITY UPLC™, Waters, Milford, MA, EE.UU.) acoplado a un espectrómetro de masa triple cuadrupolo (TQD, Waters Micromass, UK) equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI).

Para el análisis se empleó una columna de fase reversa (ACQUITY UPLC® BEH Shield RP18 1,7µm, 100 x 2,1mm i.d.). La temperatura del horno de la columna fue programada a 40°C y el flujo de fase móvil seleccionado fue de 0,35 ml/min.

La fase móvil consistió en un gradiente conformado por mezclas de solventes de agua, acetonitrilo y pequeñas proporciones de ácido fórmico.

El espectrómetro de masa fue operado en modo monitoreo múltiple reacción (MRM) con modo positivo de ionización electrospray (ESI+) monitoreando dos transiciones iónicas. Una vez que se encontró el ión padre se lo sometió a tensiones de energía de colisión con el fin de evaluar la fragmentación. La transición de mayor intensidad fue seleccionada para cuantificar y la segunda transición de mayor intensidad fue seleccionada para confirmación (Tabla 1).

Tabla 1. Iones elegidos para la cuantificación y confirmación de imidacloprid.

	lón precursor [m/z]	lón producto [m/z]	Voltaje de cono (V)	Energía de colisión (V)
Transición de cuantificación	256.11	175.0	25.00	21.00
Transición de confirmación	256.11	209.1	25.00	13.00

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el objetivo de mejorar las recuperaciones y aumentar la sensibilidad del método, se ensayaron alternativas en la etapa de limpieza para eliminar interferencias (Tabla 2). Se propuso el empleo de nanotubos de carbono (CNTs) y carbón activado (C*) en distintas proporciones, ambos adsorbentes permiten realizar una mayor limpieza de los extractos pero al mismo tiempo presentan afinidad por ciertos analitos.

Además se evaluó la relación señal/ruido (S/R). Mayores valores de S/R implican menores límites de detección (LD) y cuantificación (LC).

Si bien los mayores porcentajes de recuperación se obtuvieron sin el empleo de CNTs ni C*, se observó que el cono de muestra del equipo presentaba menor suciedad cuando se utilizaban estos adsorbentes. De esta manera se optó por un método final utilizando una proporción 99:1 MgSO₄/CNTs.

[Escriba aquí]

Tabla 2. Intercomparación de resultados entre diferentes proporciones de MgSO₄, CNTs y C*.

Sólo MgSO ₄				
% recuperación	113 ± 12%			
S/R	385			
Proporción MgSO ₄ /CNTs				
	99,04:0,06	99:1	98:2	95:5
% recuperación	90 ± 17%	92 ± 13%	96 ± 2%	85 ± 3%
S/R	382	381	384	336
Proporción MgSO ₄ /C*				
	99,04:0,06	99:1	98:2	95:5
% recuperación	103 ± 2%	91 ± 7%	93 ± 6%	73 ± 7%
S/R	445	367	346	334

Validación en polen

Previo al análisis de las muestras, el método fue validado, basándonos en el documento guía redactado por la Comisión Europea, DG SANCO 12571³.

Para comprobar la selectividad del método, extractos de polen blanco fueron comparados con ensayos de recuperación. No se observaron interferencias de la matriz en blancos de polen en el tiempo de retención del analito.

Los valores de LD y LC fueron estimados como tres veces y diez veces la relación S/R, respectivamente.

Mediante las curvas de calibración en solvente y matriz se ha evaluado la linealidad del método. Además para chequear la influencia de la matriz, se compararon ambas pendientes mediante el test de la t-Student, dando diferencias significativas para un 95% de confianza y 9 grados de libertad. Por lo tanto la cuantificación de imidacloprid en polen fue realizada mediante curva de calibrado en matriz (Imagen 1).

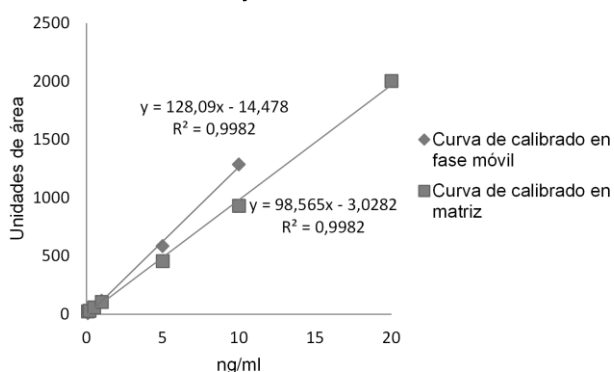


Imagen 1. Curva de calibrado en fase móvil y en matriz.

Además se evaluó la repetibilidad y la precisión intermedia del método a niveles de LC (1 ng/g) y 20 veces el valor de LC (20 ng/g), repitiendo ensayos de recuperación (n=5) a 1 y 20 ng/g, obteniendo resultados de recuperación promedio de 93% ± 13% y 101 ± 9%, respectivamente. El valor resultante de los recuperados confirma que el tratamiento propuesto es altamente efectivo para extraer imidacloprid de las muestras.

Aplicación del método validado

El método validado fue aplicado para determinar la posible presencia de residuos de imidacloprid en polen y nectarios recolectados de las plantas de girasol (Tabla 3)

La cuantificación de las muestras de polen fue realizada utilizando la curva de calibrado en matriz.

Las muestras de nectarios fueron cuantificadas con las curvas de calibrado en solvente. Para verificar el error que podría estar asociado a esta simplificación se realizó un

[Escriba aquí]

matrix-matched en el nivel de 15 ng/ml. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la respuesta del analito en matriz y en solvente.

Tabla 3. Resultados obtenidos en muestras de campo.

		Concentración ± DER [ng/g] (n=3)			
		Blanco	Testigo	Tratamiento 1	Tratamiento 2
Año	Polen	ND	ND	< LC (0,7)	2,5 ± 0,3
2010	Néctar	-	ND	6,9 ± 0,8	21,8 ± 2,5
Año	Polen	ND	<LC (0,7)	<LC (0,7)	<LC (0,7)
2011	Néctar	-	0,19 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,39 ± 0,04

Nota: En polen LD=0,2 ng/g y LC=0,7 ng/g; y en nectarios florales LD=0,04 ng/g y LC=0,15 ng/g.

CONCLUSIONES

El desempeño del método optimizado y validado fue demostrado mediante el análisis de muestras reales de polen y néctar con excelente sensibilidad y selectividad. Los resultados obtenidos evidenciaron la presencia de residuos de imidacloprid en polen y néctar, lo que permite inferir la exposición de las abejas a este contaminante incluso cuando se aplican las dosis recomendadas a las semillas.

Residuos de imidacloprid fueron encontrados en muestras control, éstos podrían provenir de suelos contaminados con el plaguicida.

Se encontraron diferencias marcadas entre los resultados obtenidos en los dos años de estudio. Esto podría estar relacionado a las altas precipitaciones correspondientes al segundo año de estudio.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Anastassiades, M.; Lehotay, S.J.; Stajnbaher, D.; Schenck, F.J., 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86(2), 412-431.

European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General, 2013. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANCO 12571 rev. 0.

European Food Safety Authority, 2013. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance imidacloprid. *EFSA Journal*, 11(1), 3068.