

**ESTUDIO DE MÉTODOS
AVANZADOS PARA LA
DETERMINACIÓN DE INSECTICIDAS
NEONICOTINOIDES. APLICACIONES A
ESTUDIOS DE RESIDUALIDAD EN COLMENAS
DE *APIS MELLIFERA L.* Y CULTIVOS REGIONALES.**

Tesis de Doctorado en Química

Melina Paola Michlig

Dirección: María Rosa Repetti

Co-dirección: Romina Brasca

Programa de Investigación y Análisis de Residuos
y Contaminantes Químicos (PRINARC)

Facultad de Ingeniería Química

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

2022

*Agradezco a Horacio R. Beldoménico por su cálido
acompañamiento durante los primeros años de estudio,
a María R. Repetti por su excelente capacidad de gestión
y su constante seguimiento y espíritu inquieto inspirador de
nuevas búsquedas, a Romina Brasca por su paciencia y dedicación
en la enseñanza y su minuciosa corrección.
A CONICET por contribuir para que logre alcanzar el máximo
nivel académico, a mis compañeros del PRINARC y personal del INTA,
amigos y familiares.
Melina*

PRÓLOGO

Los insecticidas neonicotinoides se aplican ampliamente porque brindan protección sistémica de los cultivos contra plagas y tienen una gran especificidad hacia los invertebrados. Sin embargo, varios estudios informaron la translocación de neonicotinoides al néctar y polen de las plantas con flores tratadas, lo que representa un riesgo potencial para los insectos polinizadores.

El presente trabajo se encuentra dividido en seis capítulos. El primero de ellos, presenta un marco teórico general que nos introducirá en la temática y asistirá a la comprensión de conceptos de los capítulos subsiguientes. En este capítulo se introduce al lector a la problemática actual acerca del uso de neonicotinoides y los posibles efectos que podría generar sobre la población de abejas. Asimismo, se describe el contexto en cuanto a la regulación de estos insecticidas y a las herramientas con las que contamos para realizar el análisis y control de residuos de plaguicidas en muestras alimenticias, ambientales y biológicas. En el capítulo 2 se aborda el desarrollo de las metodologías analíticas, empleando técnicas univariadas, y su validación para el análisis de neonicotinoides, especialmente imidacloprid, en polen, abeja, miel y cera. En el capítulo 3 se implementan estrategias multivariadas para determinar las condiciones óptimas de extracción de ocho neonicotinoides en miel. A partir del capítulo 4, se presentan los resultados obtenidos al aplicar las metodologías desarrolladas. De esta manera, se contemplan los residuos de neonicotinoides que se utilizan en el campo, haciendo hincapié en las fuentes de exposición más importantes para la abejas, como lo son el polen y el néctar de las plantas tratadas. El análisis de las consecuencias que genera esta exposición en las colonias de abejas se detalla en el capítulo 5, donde se abordan particularmente los efectos generados en un apiario alimentado artificialmente con jarabes adicionados con diferentes concentraciones de imidacloprid. Los efectos observados en el comportamiento poblacional de las colonias expondrán el grado de letalidad del insecticida y permitirá establecer cuantitativamente los cambios observados en la fortaleza de las colonias. Mediante el análisis de diversos componentes de las colmenas se podrán relacionar el accionar de las abejas con los cambios en su comportamiento. En el capítulo 6, se realiza la evaluación de residuos de neonicotinoides en mieles provenientes de la región central de la provincia de Santa Fe y se presentan estimaciones del riesgo por exposición crónica de las abejas, como así también de los consumidores de miel, por comparación con los límites máximos de residuos establecidos.

Los estudios de ocurrencia que se realizarán en muestras seleccionadas conjuntamente con los ensayos de comportamiento de los polinizadores, permitirán inferir sobre el impacto del modelo agroproductivo actual en las abejas melíferas en la región central de nuestro país. El conocimiento de los niveles de exposición y sus consecuencias, son esenciales para cubrir las incertidumbres actuales y orientar medidas estratégicas de regulación de plaguicidas que garanticen la conservación de estos importantes organismos.

CONTENIDOS

PRÓLOGO	2
PUBLICACIONES Y PARTICIPACIONES EN EVENTOS CIENTÍFICOS	8
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO.	10
1.1 PLAGUICIDAS	10
1.1.1 MARCO HISTÓRICO Y DEBATE	10
1.1.2 CLASIFICACIÓN	12
1.2 NEONICOTINOIDES	14
1.2.1 DE LA NICOTINA A LOS NEONICOTINOIDES	14
1.2.2 MODO DE ACCIÓN	15
1.2.3 ESTRUCTURA QUÍMICA	17
1.2.4 USOS AGRÍCOLAS	19
1.2.5 DISPONIBILIDAD Y DEGRADACIÓN EN EL AMBIENTE	21
1.2.6 NEONICOTINOIDES EN DEBATE	22
1.3 ABEJAS	24
1.3.1 SERVICIOS ECOSISTÉMICOS	24
1.3.2 INSECTOS SOCIALES	25
1.3.3 PRINCIPALES PLAGAS Y ENFERMEDADES DE LAS COLMENAS	26
1.3.4 PRODUCCIÓN APÍCOLA EN ARGENTINA	26
1.3.4.1 MIEL MONOFLORAL O POLIFLORAL	29
1.4 LEGISLACIÓN DE PLAGUICIDAS	29
1.4.1 LÍMITES MÁXIMOS DE RESIDUOS Y ANÁLISIS DE RIESGO	31
1.5 ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS	32
1.5.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	33
1.5.2 INSTRUMENTAL ANALÍTICO	35
1.5.2.1 SEPARACIÓN ANALÍTICA	35
1.5.2.2 TÉCNICAS DE DETECCIÓN, ESPECTROMETRÍA DE MASA	36
1.5.2.2.1 TRIPLE CUADRUPOLO (QQQ)	36

1.5.2.3 SISTEMAS ACOPLADOS CL-EM	37
1.5.2.3.1 IONIZACIÓN POR ELECTROESPRAY (ESI)	38
1.5.3 VALIDACIÓN	39
1.6 CONSIDERACIONES FINALES, CAPÍTULO 1	40
CAPÍTULO 2. PROCESAMIENTO DE MUESTRA. OPTIMIZACIÓN UNIVARIADA PARA ANÁLISIS DE IMD EN ABEJAS, POLEN Y PRODUCTOS DE COLMENA: CERA Y MIEL.	41
2.1 INTRODUCCIÓN	41
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	43
2.2.1 ESTÁNDARES Y REACTIVOS	43
2.2.2 EQUIPAMIENTO PARA PROCESAMIENTO DE MUESTRA	44
2.2.3 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS Y ESPECTROMÉTRICAS DE MASA	44
2.2.4 PROCESAMIENTO	45
2.2.4.1 ABEJAS, LARVAS Y MIEL	45
2.2.4.2 CERA	46
2.2.4.3 POLEN Y NECTARIOS FLORALES	47
2.2.5 VALIDACIÓN	48
2.2.5.1 LINEALIDAD Y EFECTO MATRIZ (EM)	48
2.2.5.2 PARÁMETROS DE DESEMPEÑO	49
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
2.3.1 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE PROCESAMIENTO	49
2.3.1.1 ABEJAS Y MIEL	49
2.3.1.2 CERA	52
2.3.2 VALIDACIÓN	54
2.3.2.1 LINEALIDAD Y EM	54
2.3.2.2 EXACTITUD Y PRECISIÓN	54
2.3.2.3 DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES	55
2.3.2.4 IMD EN POLEN Y NECTARIOS	57
2.4 CONSIDERACIONES FINALES, CAPÍTULO 2	57
CAPÍTULO 3. PROCESAMIENTO DE MUESTRA. OPTIMIZACIÓN POR DISEÑO DE EXPERIMENTOS PARA ANÁLISIS DE NEONICOTINOIDES EN MUESTRAS DE MIEL.	59

3.1 INTRODUCCIÓN	59
3.1.1 DDE, OPTIMIZACIÓN MULTIVARIADA	61
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	62
3.2.1 ESTÁNDARES Y REACTIVOS	62
3.2.2 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS Y ESPECTROMÉTRICAS	63
3.2.3 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	64
3.2.3.1 DDE	64
3.2.3.2 METODOLOGÍA ANALÍTICA DESARROLLADA	66
3.2.4 VALIDACIÓN	67
3.2.4.1 EM Y CURVAS DE CALIBRADO	67
3.2.4.1.1 EM EN MIELES DE DIFERENTES ORÍGENES FLORALES	67
3.2.4.2 PARÁMETROS DE DESEMPEÑO	68
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
3.3.1 CONDICIONES INSTRUMENTALES	69
3.3.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	70
3.3.3 DDE Y MÉTODO ANALÍTICO OPTIMIZADO	70
3.3.4 VALIDACIÓN	75
3.3.4.1 EM Y CURVAS DE CALIBRACIÓN	75
3.3.4.2 PARÁMETROS DE DESEMPEÑO	76
3.3.4.3 EM EN MIELES DE DIFERENTES ORÍGENES FLORALES	78
3.3.4.3.1 ESTUDIO DEL EM	78
3.3.4.3.2 ESTUDIO DE RECUPERACIÓN	79
3.4 CAPÍTULO 3, CONSIDERACIONES FINALES	80
CAPÍTULO 4. ANÁLISIS DE NEONICOTINOIDES EN MUESTRAS AMBIENTALES.	81
4.1 INTRODUCCIÓN	81
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	81
4.2.1 CAPACIDAD DE TRANSLOCACIÓN DEL IMD	81
4.2.1.1 SIEMBRA, RECOLECCIÓN DE MUESTRAS Y ANÁLISIS	81
4.2.1.2 INSPECCIONES Y REGISTRO DE POLINIZADORES	82
4.2.2 NEONICOTINOIDES EN COLMENAS UBICADAS EN LOTES DE SOJA	83

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	84
4.3.1 CAPACIDAD DE TRANSLOCACIÓN DEL IMD	84
4.3.1.1 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE POLEN Y DE NÉCTAR	84
4.3.1.2 INSPECCIONES Y REGISTRO DE POLINIZADORES	85
4.3.2 NEONICOTINOIDES EN COLMENAS UBICADAS EN LOTES DE SOJA	85
4.3.2.1 ANÁLISIS POLÍNICO DEL POLEN CORBICULAR	87
4.4 COMPARACIÓN DE LOS DOS ENSAYOS	87
CAPÍTULO 5. ALIMENTACIÓN ARTIFICIAL DE ABEJAS CON JARABE ADICIONADO CON IMD... 89	
5.1 INTRODUCCIÓN	89
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS	90
5.2.1 APIARIO	90
5.2.2 DOSIFICACIÓN DE IMD	90
5.2.3 MUESTREO Y ANÁLISIS DE IMD	91
5.2.4 EVALUACIÓN DE COLONIAS	93
5.2.4.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	93
5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	94
5.3.1 CONSIDERACIONES PREVIAS, SELECCIÓN DE DOSIS DE IMD	94
5.3.2 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS	95
5.3.2.1 JARABES SUPLEMENTADOS	95
5.3.2.2 ABEJAS Y LARVAS	95
5.3.2.3 MIEL Y CERA	97
5.3.3 EVALUACIÓN DE COLONIAS	98
5.3.3.1 POBLACIÓN DE ABEJAS Y RENDIMIENTO DE MIEL	98
5.3.3.2 FALLAS Y ESTADO DE SALUD DE LAS COLONIAS	100
5.4 CONSIDERACIONES FINALES, CAPÍTULO 5	101
CAPÍTULO 6. DETERMINACIÓN DE NEONICOTINOIDES EN MIEL SANTAFESINA.	102
6.1 INTRODUCCIÓN	102
6.2 MATERIALES Y MÉTODOS	102
6.2.1 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE MIEL	102
6.2.1.1 PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS Y ANÁLISIS POLÍNICO	104

6.2.2 ANÁLISIS DE MIELES COMERCIALES	104
6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	104
6.3.1 MIELES DE APIARIOS	104
6.3.1.1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y ANÁLISIS POLÍNICO	105
6.3.2 MIELES COMERCIALES	106
6.4 CONSIDERACIONES FINALES, CAPÍTULO 6	106
CONCLUSIONES FINALES.....	107
ABREVIATURAS	109
BIBLIOGRAFÍA.....	112
MATERIAL SUPLEMENTARIO - TABLAS	129
MATERIAL SUPLEMENTARIO - FIGURAS	134
MATERIAL SUPLEMENTARIO – ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	136
IMD EN ABEJAS.....	136
IMD EN MIEL	138
IMD EN CERA	140

PUBLICACIONES Y PARTICIPACIONES EN EVENTOS CIENTÍFICOS

Michlig, M.P.; Pacini, A.C.; Merke, J.; Orellano, E.M.; Brazca, R.; Repetti, M.R. (2022). Sublethal exposure to imidacloprid in commercial *Apis mellifera* colonies in early spring. Performance of honey bees and insecticide transference between in-hive products. *Apidologie, en evaluación*.

Michlig, M.P., Merke, J., Pacini, A.C., Orellano, E.M., Beldoménico, H.R., Repetti, M.R. Determination of imidacloprid in beehive samples by UHPLC-MS/MS. *Microchemical Journal*, 143 72-81.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2018.07.027>

Gutierrez, M.F.; Mayora, G.; Licursi, M.; Michlig, M.P.; Repetti, M.R.; Negro, L. (2022). Zooplankton shifts from headwater to lowland streams: insights into the role of water quality to assist the protection and restoration of agricultural waterways. *Ecohydrology*, e2432.

<https://doi.org/10.1002/eco.2432>

Fantón, N.; Cazenave, J.; Michlig, M.P.; Repetti, M.R.; Rossi, A. (2021). Biomarkers of exposure and effect in the armoured catfish *Hoplosternum littorale* during a rice production cycle. *Environmental Pollution*, 287 117356

<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117356>

Seehaus, M.; Sasal M.C.; Van Opstal N.; Gabioud E.A.; Wilson M.G.; Wingeyer A.; Michlig M. P.; Repetti M.R. (2020). Análisis del efecto de secuencias de cultivo sobre el escurrimiento superficial y pérdidas de suelo y herbicidas. *FAVE Sección Ciencias Agrarias*, 19 (2).

<https://doi.org/10.14409/fa.v19i2.9750>

Rossi, A.S.; Fantón, N.; Michlig, M.P.; Repetti, M.R.; Cazenave, J. (2020). Fish inhabiting rice fields: Bioaccumulation, oxidative stress and neurotoxic effects after pesticides application. *Ecological Indicators*, 113 106186

<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106186>

PRESENTACIONES ORALES (3 INTERNACIONALES, 5 NACIONALES).

Reciente: "Alimentación artificial de colonias *Apis mellifera* con jarabes adicionados con imidacloprid"

Congreso Argentino de Apicultura 2021 - modalidad virtual 5-8/7/2021.

PRESENTACIONES FORMATO POSTER (12 INTERNACIONALES, 13 NACIONALES)

Reciente: "Incidencia de insecticidas neonicotinoides en mieles de la provincia de Santa Fe"

VIII Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental – Mar del Plata, Argentina 7-11/3/2022.

OBJETIVO GENERAL

Generar aportes científicos que contribuyan en el diagnóstico, el análisis de riesgos, las acciones de prevención, control y corrección de residuos de plaguicidas considerados de interés en la zona central del país, y que a su vez ayuden en las actividades de gestión relacionadas con la salud pública, el ambiente y la economía regional.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar nuevos métodos analíticos que permitan determinar y cuantificar residuos de plaguicidas neonicotinoides en matrices complejas de apicultura (polen, néctar, miel, cera, abejas, larvas) mediante técnicas cromatográficas-espectrométricas de masa.
- Aplicar nuevos materiales y técnicas durante la etapa de preparación de las muestras, seleccionando nanomateriales, adsorbentes para extracción en fase sólida dispersiva, solventes para microextracciones líquido-líquido; en base a la simplificación de etapas y miniaturización de la escala.
- Optimizar los métodos analíticos en las etapas de preparación de las muestras, separación por cromatografía y detección de los analitos.
- Validar los métodos desarrollados siguiendo la normativa vigente para el análisis y cuantificación de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos (SANTE).
- Aplicar los métodos en estudios de ocurrencia en muestras ambientales y productos de colmena.
- Contribuir al estudio de los efectos de los plaguicidas neonicotinoides en agroecosistemas, principalmente en abejas melíferas (*Apis mellifera L.*).
- Evaluar la potencialidad de los métodos para su aplicación en el análisis de otros plaguicidas de uso frecuente en la región.
- A partir de los aportes científicos generar recomendaciones de interés práctica para los agroproductores en relación a estudios de translocación, niveles de exposición de las colonias de abejas, fuentes de contaminación y riesgos en colmenas expuestas a los neonicotinoides.

CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO.

En este capítulo se presenta una breve introducción respecto de la problemática actual en torno al uso de plaguicidas neonicotinoides en actividades agrícolas. La ocurrencia de estos compuestos en compartimentos ambientales y el riesgo que presentan para organismos no objetivo, especialmente abejas.

1.1 PLAGUICIDAS

1.1.1 MARCO HISTÓRICO Y DEBATE

Los daños que causan las plagas tienen gran importancia económica debido a que inciden en la disminución de los rendimientos, el aumento de los costos y como consecuencia menor calidad de la producción. Los plaguicidas se utilizan para proteger a los cultivos de insectos, malezas, hongos y otras plagas.

El uso de sustancias químicas en el control de plagas no es una actividad reciente. Así por ejemplo, la utilización de plaguicidas inorgánicos data desde AC, dónde se aplicaban arsénico, plomo, azufre, entre otros, para uso insecticida. El dinitrofenol, introducido en la década de 1930, fue el primer plaguicida químico organosintético usado para controlar malezas, insectos y enfermedades. No obstante, la “era química” para el control de plagas, como la conocemos actualmente, empezó alrededor del 1945, a finales de la Segunda Guerra Mundial, con el descubrimiento y uso masivo de plaguicidas químicos sintéticos altamente efectivos como el insecticida organoclorado DDT y los plaguicidas organofosforados [Stephenson y Solomon 2014].

En cada uno de los años de la década del 60 se introdujeron nuevos plaguicidas. Estos desarrollos permitieron el incremento de la cantidad y la mejora de la calidad de la comida para la creciente población mundial. Sin embargo, el desconocimiento hizo que la sociedad no se preguntara acerca del comportamiento de estos químicos en el ambiente, su destino y los potenciales efectos adversos en organismos no objetivos. Recién a partir de la publicación del libro *Silent Spring* (1962), en el cual Rachel Carson denuncia los efectos nocivos para la naturaleza del empleo masivo de plaguicidas, la sociedad empezó a debatir y a tomar conciencia.

«... por primera vez en la historia del mundo, todo ser humano está ahora en contacto con productos químicos peligrosos, desde el momento de su concepción hasta su muerte... Se han encontrado en peces en remotos lagos de montañas, en lombrices enterradas en el suelo, en los

huevos de pájaros y en el propio hombre, ya que estos productos químicos están ahora almacenados en los cuerpos de la vasta mayoría de los seres humanos. Aparecen en la leche materna y probablemente en los tejidos del niño que todavía no ha nacido.»

Rachel Carson. Silent spring. (1962). Extraído de Proyecto Chema Tierra <https://chematierra.mx>

El legado más directo de esta obra fue la campaña para prohibir el uso de DDT en los EEUU y los esfuerzos relacionados por limitar su uso en todo el mundo, ya que comenzó a tomarse conciencia de que era un compuesto altamente persistente con efectos carcinogénicos sobre los seres humanos (<https://www.iarc.fr/>). En 1967 la formación del Fondo de Defensa Ambiental (<https://www.edf.org/>) fue el primer hito importante en la campaña contra el DDT, demandando al gobierno “establecer el derecho de los ciudadanos a un ambiente limpio”.

Esta creciente preocupación pública, resultó en que en 1970 se creara la Agencia de Protección Ambiental (Environmental Protection Agency, EPA, <https://www.epa.gov/>) con el objetivo de responder a los problemas ambientales más allá de las capacidades previas de los programas gubernamentales de control de la contaminación. A partir de allí, entre otras actividades, se le asignó a la EPA la labor de regular los plaguicidas. Desde aquí, en ningún estado de EEUU se puede distribuir o vender plaguicidas que no se encuentren registrados por la EPA [Stepherson & Solomon 2014].

Otro organismo de protección a escala internacional es el Codex Alimentarius, el cual posee la finalidad de garantizar alimentos inocuos y de calidad para toda población. Desde su fundación en 1963, estableció un comité de expertos en residuos de plaguicidas en alimentos, a fin de estudiar y proponer tolerancias de residuos de plaguicidas en alimentos individuales [Codex Alimentarius Commission 1963]. Por su parte, la Unión Europea (UE) en 2002 creó la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority, EFSA) tras las crisis alimentarias que tuvieron lugar a finales de los años 90 en Europa [Reglamento (CE) N°178/2002], con el objetivo de proteger a los consumidores y restablecer y mantener su confianza en los productos alimenticios europeos. Su actuación comprende todas las áreas de la cadena alimentaria incluyendo la seguridad de alimentos y piensos, la nutrición, la salud y el bienestar animal y la protección de las plantas y sanidad vegetal. Las recomendaciones que proporciona la EFSA a los responsables de la gestión de riesgos sirven de base a muchas de las leyes y normativas establecidas para proteger a los consumidores de los riesgos alimentarios a lo largo de toda la cadena de producción del alimento.

En Argentina, la fiscalización de los productos de sanidad vegetal está regida por el Decreto-Ley 3489/58, donde se establece la obligatoriedad de registrar los plaguicidas fitoterapéuticos en el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación (MAGyP, <https://www.argentina.gob.ar/agricultura>), el Decreto N° 5769/59 y varias disposiciones reglamentarias.

El Decreto N° 5769/59 determina los informes exigidos para la inscripción de productos químicos o biológicos para el tratamiento de cultivos, las especificaciones requeridas que deberán tener en cuenta las normas vigentes del Instituto Argentino de Racionalización de Materiales y los datos a consignar en el rótulo o marbete del

envase del producto. Además, mediante dicho decreto se creó el Tribunal de Fiscalización de Productos de Terapéutica Vegetal.

Actualmente, los paquetes tecnológicos ofrecidos para la agricultura extensiva en Argentina incluyen una amplia variedad de productos con un vasto espectro de objetivos a alcanzar incluyendo insecticidas, nematocidas, funguicidas y herbicidas entre otros. En particular, los herbicidas derivados de la glicina, glifosato y glufosinato, al estar ligados a los cultivos transgénicos, son los plaguicidas de mayor volumen de aplicación en el país y los que generan la mayor controversia en la sociedad argentina [Lorenzatti y col. 2017].

Respecto del uso de neonicotinoides, el Poder Ejecutivo Nacional en 2019 estableció iniciar la evaluación de riesgo de los usos agrícolas del acetamiprid (ACT), imidacloprid (IMD), tiametoxam (TMX), clotianidina (CLT), dinotefuran (DNF) y tiacloprid (TCD), y del insecticida fipronil, considerando los lineamientos establecidos en la Guía de Evaluación de Riesgos de Plaguicidas para las Abejas de la Oficina de Programas de Plaguicidas de la EPA [Dirección Nacional de Protección Vegetal 2019]. En 2021, se resolvió prohibir la importación, formulación, el fraccionamiento, comercialización y uso del fipronil, sin embargo no se implementaron medidas restrictivas para los neonicotinoides [Resolución 425/2021].

1.1.2 CLASIFICACIÓN

A los plaguicidas se los puede clasificar en naturales y sintéticos. Como así también, según la plaga a la que deben combatir o atacar (Tabla 1.1).

Tabla 1.1 Clasificación según organismo blanco.

Plaguicida	Organismo que combate
Insecticida	Insectos
Funguicida	Hongos (mohos)
Molusquicida	Moluscos
Herbicida	Malezas
Acaricida	Ácaros
Rodenticida	Roedores
Nematicida	Nemátodos
Ovicida	Huevos
Larvicidas	Larvas
Defoliantes	Fronda vegetal

Fuente: Lorenzatti y col. 2017

De acuerdo a su modo de acción, el Comité de Acción de Resistencia a Insecticidas (Insecticide Resistance Action Committee, IRAC, <https://irac-online.org/>) define a los insecticidas como: “Un insecticida es un producto fitosanitario utilizado para controlar insectos, generalmente por la inhibición de enzimas. Es un tipo de biocida. Los biocidas pueden ser sustancias químicas sintéticas, naturales, de origen biológico o de origen físico que están destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo considerado nocivo

para el hombre. Los insecticidas tienen importancia para el control de plagas de insectos en la agricultura o para eliminar todos aquellos que afectan la salud humana y animal”.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica los plaguicidas principalmente en base a su toxicidad aguda en estudios realizados con animales (Tabla 1.2). Los plaguicidas se clasifican en las siguientes clases: extremadamente peligrosos (Ia), altamente peligrosos (Ib), moderadamente peligrosos (II), poco peligrosos (III), normalmente no ofrecen peligro bajo uso normal (IV, a veces no clasificados) [OMS 2009].

Tabla 1.2 Clasificación según riesgo toxicológico de acuerdo a la OMS.

Categoría de toxicidad	DL50* para rata (mg kg ⁻¹ de peso corporal)	
	Oral	Dermal
Ia: Extremadamente peligrosos	< 5	< 50
Ib: Altamente peligrosos	5–50	50–200
II: Moderadamente peligrosos	50–2000	200–2000
III: Ligeramente peligrosos	> 2000	
IV: Probablemente sin riesgos tóxicos agudos	≥ 5000	

(*) DL50: dosis letal media

Entre los neonicotinoides, la toxicidad para los vertebrados es baja en comparación con los insectos. Las DL50 en ratas varían desde 5000 mg kg⁻¹ para CLT hasta 140 mg kg⁻¹ para el ACT [Goulson 2013]. Por lo tanto la OMS los clasifica como moderada a ligeramente peligrosos (Clases II y III).

Según su formulación y presentación comercial los plaguicidas se clasifican como polvos, líquidos, gases y comprimidos. Esta clasificación es útil en prácticas de aplicación y prevención de riesgos.

De acuerdo a su persistencia basada en los tiempos de vida media ($t_{1/2}$), que puede variar según el medio en que se estudia el compuesto (agua, suelo, medio biológico), se pueden clasificar en no persistentes, persistentes y permanentes con $t_{1/2}$ de 0-12 semanas, mayores a 6 meses y mayores a 20 años, respectivamente [Lorenzatti y col. 2017]. Sin embargo, esta clasificación puede variar según los países y sus organismos regulatorios.

A su vez, según su comportamiento en la planta pueden ser clasificados en: sistémicos, es decir, que son absorbidos por el vegetal, especialmente por las hojas y/o raíces, y transportados a otras partes de la planta (translocación); o de contacto (efectivo contra la plaga cuando entra en contacto directo con ella). Y considerando la

especificidad contra la plaga, pueden ser selectivos y no selectivos [Stephenson y Solomon 2014].

1.2 NEONICOTINOIDES

1.2.1 DE LA NICOTINA A LOS NEONICOTINOIDES

Las plantas para oponerse al ataque de los insectos poseen mecanismos de protección como la repelencia y la acción insecticida. Es así como muchas especies de plantas producen insecticidas naturales, y fueron implementados por el hombre desde el siglo XVII [Stephenson y Solomon 2014].

A pesar del considerado número de insecticidas botánicos reportados en la literatura, sólo algunos fueron empleados para la protección de los cultivos: la nicotina proveniente de las hojas del tabaco, la rotenona extraída de las raíces de especies leguminosas, las piretrinas obtenidas de las flores del crisantemo y la azadiractina presente en las semillas del árbol Neem.

La azadiractina es considerada un insecticida ecológico que actúa de modo selectivo sobre más de 200 especies de insectos y es de baja toxicidad para el resto de los organismos. Sin embargo, presenta alta susceptibilidad a la fotodegradación, por lo tanto se están planteando alternativas como el microencapsulamiento para modular su liberación y evitar su fotodegradación [Córdoba Estévez y col. 2017]. Al igual que para la azadiractina, una de las principales desventajas de las piretrinas naturales es su rápida degradabilidad, lo que prácticamente impide su uso en cultivos. Debido a sus propiedades insecticidas, a partir de los 70s se comenzaron a sintetizar piretroides con estructuras químicas basadas en las piretrinas, pero con mayor estabilidad a la hidrólisis, oxidación y fotólisis [Elliot y col. 1978].

La rotenona, por su parte, es un inhibidor respiratorio que se utilizó inicialmente como veneno para peces (piscicida). También presenta gran eficacia contra áfidos, lavas de lepidópteros y ácaros [Stephenson y Solomon 2014]. Sin embargo, sus características piscicidas hacen que su uso como insecticida deba ser muy controlado [EPA 2007].

Durante un prolongado período de tiempo la nicotina fue utilizada en aplicaciones foliares. El polvo o los extractos de las hojas se han utilizado como insecticidas desde el 1600 [Stephenson & Solomon 2014]. Sin embargo este alcaloide botánico, no era muy efectivo y presentaba una alta toxicidad para mamíferos y otros organismos no objetivo. De hecho, la nicotina y sus alcaloides son rápidamente absorbidos a través de diferentes rutas de exposición incluyendo vías gastrointestinal, dérmica, intranasal, inhalatoria y además a través de la barrera hematoencefálica [Thany 2010].

A principios de la década del 1970 la empresa Shell comenzó a desarrollar una nueva clase de compuestos, a los cuales los denominó neonicotinoides, capaces de enlazarse a los receptores nicotínicos de la acetilcolina (nAChR) con modos de acción análogos al de la nicotina. Sin embargo, con toxicidades menores para los mamíferos que el insecticida botánico. Mientras que la nicotina presenta en ratas una dosis letal

media (DL50) de 55 mg kg^{-1} , el neonicotinoide con mayor toxicidad es el ACT con una DL50 en ratas de 417 mg kg^{-1} [Yu 2008].

Para reducir la toxicidad para los mamíferos y aumentar la toxicidad para los insectos, se han seleccionado compuestos neonicotínicos que son altamente específicos para los subtipos de receptores nicotínicos que se encuentran en los insectos. Asimismo, los neonicotinoides no atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica, lo que reduce aún más el potencial de toxicidad en mamíferos [Ensley 2018].

1.2.2 MODO DE ACCIÓN

La actividad del sistema nervioso de mamíferos e insectos depende básicamente de la capacidad de las neuronas para mantener una distribución desigual de iones sodio y potasio a cada lado de la membrana celular. La distribución desigual de iones a ambos lados de la membrana celular da origen a un potencial eléctrico. La transmisión del impulso nervioso, por lo tanto, es un proceso eléctrico en el cual la corriente es transportada por los iones. Cuando el axón de una neurona se encuentra con el de otra neurona, hay un punto de unión llamado sinapsis (Fig. 1.1). Los impulsos nerviosos son transmitidos a la sinapsis por medio de un transmisor químico, generalmente la acetilcolina (ACh) [Stephenson y Solomon 2014].

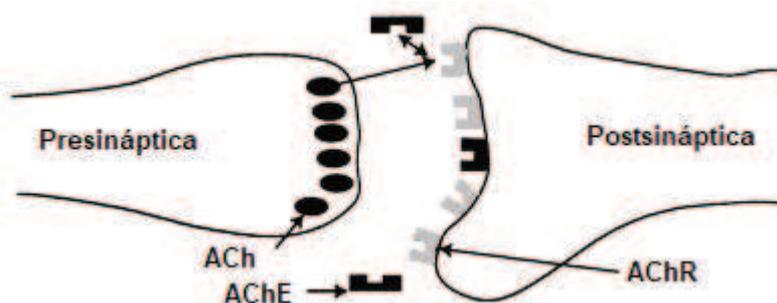


Fig. 1.1 Diagrama de una sinapsis con neurotransmisores de acetilcolina (ACh), receptores de acetilcolina (AChR) y la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (Imagen adaptada de Stephenson y Solomon 2014).

Los receptores de acetilcolina (AChR) se encuentran comúnmente en el sistema nervioso, en las terminales nerviosas, en células interneuronales, neuronas motoras y neuronas sensoriales. Se clasifican en dos tipos: nicotínicos y muscarínicos. Los nAChR son denominados de esta forma por presentar mayor afinidad por la nicotina. Los muscarínicos, en cambio, responden particularmente a la muscarina.

La nicotina y los neonicotinoides actúan como agonistas, activando los nAChR. Bajo condiciones fisiológicas normales, la sinapsis provocada por la ACh se frena hidrolizando el neurotransmisor a través de la enzima acetilcolinesterasa. Sin embargo, los insecticidas no son hidrolizados por esta enzima, por lo tanto persisten activos provocando la sobreestimulación de los receptores colinérgicos, resultando en hiperexcitación, convulsión, parálisis y finalmente la muerte del insecto [Yu 2008].

Al encontrarse la nicotina ionizada a pH fisiológico (pKa 7,9), se cree que de esta forma se enlaza a los receptores de acetilcolina (Fig. 1.2). El ión nicotínico se enlaza con mayor fuerza a los sitios aniónicos de los receptores, mediante su nitrógeno más básico, el pirrolidínico, y el nitrógeno piridínico asiste la unión. La distancia mínima entre los dos nitrógenos en la nicotina es similar a la encontrada en la ACh. Por lo tanto, para que haya actividad, es necesario que los neonicotinoides presenten dimensiones moleculares similares a la ACh y a la nicotina [Kagabu y Matsuno 1997].

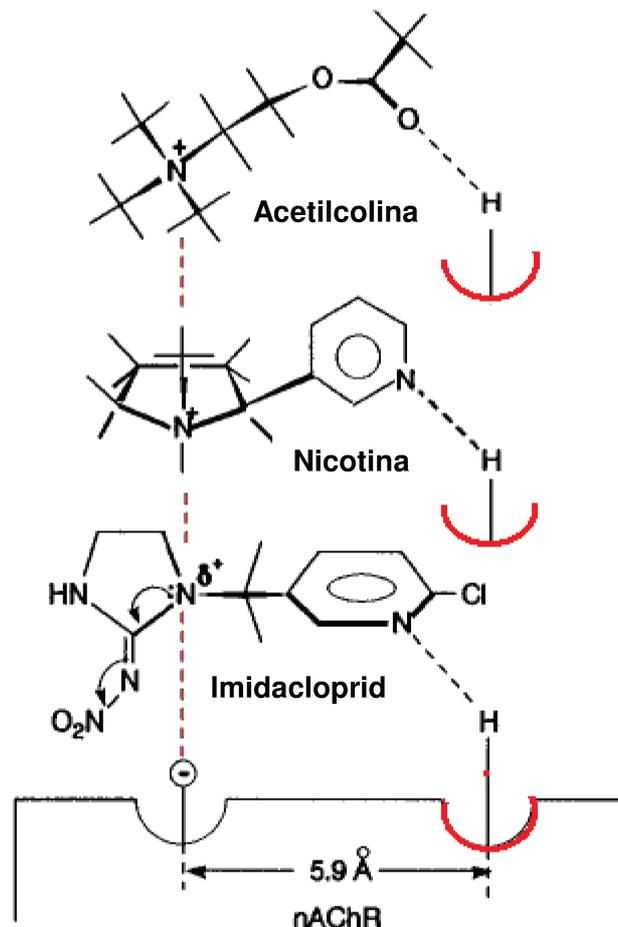


Fig. 1.2 Modelo de enlace de acetilcolina, nicotina e IMD a los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) (Imagen adaptada de Kagabu y Matsuno, J. Agric. Food Chem. 1997, 45, 276-281).

El IRAC es un organismo internacional formado por especialistas técnicos de las compañías miembros así como por asesores científicos independientes y se especializa en la industria de la protección de las plantas para prevenir o retrasar el desarrollo de resistencia en las plagas de insectos y ácaros. Este organismo brinda un listado de clasificación de modos de acción de algunos insecticidas, cuyo objetivo es proporcionar a los agricultores, productores, técnicos y profesionales de la protección de cultivos en general, una guía para seleccionar los insecticidas y/o acaricidas a usar en una estrategia de manejo de resistencia a insecticidas/acaricidas eficaz y sostenible. Los modos de acción de los insecticidas han sido clasificados en 31 categorías, pudiendo diferenciarse grandes grupos que afectan diversos órganos o funciones fisiológicas (por ejemplo, sistema muscular y nervioso, respiratorio,

digestivo). Dentro de cada grupo o categoría se incluyen ejemplos de subgrupos o sustancias activas representativas. A continuación se indica la clasificación correspondiente a los compuestos de interés del presente trabajo (Tabla 1.3).

Tabla 1.3 Clasificación de los principios activos de los insecticidas según sitio de acción: (*)

Grupo principal y punto de acción primario:	Subgrupo, clase o sustancia activa representativa:
4. Moduladores competitivos del receptor nicotínico de la acetilcolina. Sistema Nervioso.	4A. Neonicotinoides: acetamiprid, clotianidina, dinotefuran, imidacloprid, nitenpiram, tiacloprid y tiametoxam.
29. Moduladores de los órganos cordotonales - sin punto de acción definido. Sistema nervioso.	Flonicamid

(*) La lista está basada en las mejores evidencias del modo de acción de los insecticidas/acaricidas y contemplan las funciones fisiológicas afectadas.

Fuente: <https://irac-argentina.org/>

De acuerdo a esta clasificación, dentro del grupo de neonicotinoides hay siete compuestos representativos y por otro lado se encuentra el flonicamid (FCD). Si bien el FCD presenta un modo de acción diferente, es muy común que en publicaciones analíticas sea mencionado como un neonicotinoide [Chen y col. 2014, Tanner y Czerwenka 2011]. En el presente trabajo, se incluyó al FCD como analito de interés junto con los siete neonicotinoides.

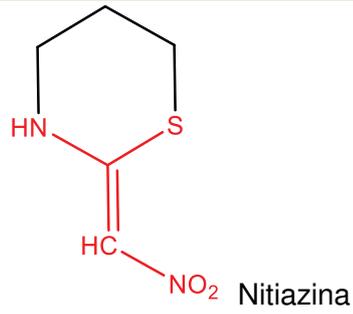
1.2.3 ESTRUCTURA QUÍMICA

La estructura química de los primeros neonicotinoides sintetizados se basó en el esqueleto de nitro enaminas. Entre ellos, la nitiazina se destacó por sus propiedades insecticidas pero nunca fue comercializada para usos agrícolas debido a su inestabilidad fotoquímica (Fig. 1.3).

El primer miembro comercializado de los neonicotinoides fue el IMD. A partir de la introducción del IMD al mercado, siguieron desarrollándose nuevos neonicotinoides convirtiéndose en la familia de insecticidas químicos de mayor crecimiento debido a sus propiedades químicas y biológicas [Jeschke y Nauen 2005].

Los neonicotinoides comparten características estructurales comunes: un anillo heteroaromático sustituido con cloro y a otro sustituyente cíclico o acíclico, unido a través de un metileno (Fig. 1.3). En el FCD, el anillo heteroaromático presenta trifluorometilo (en lugar de cloro) y el sustituyente acíclico no presenta el grupo metileno en su enlace. El DNF es un derivado del tetrahidrofurano.

Neonicotinoides – estructura química



Anillo de 6/5 miembros	Sustituyente	
	Cíclico	Acíclico
	<p>Imidacloprid (1985)</p>	<p>Nitenpiram (1987)</p>
	<p>Tiacloprid (1986)</p>	<p>Acetamiprid (1988)</p>
	<p>Tiametoxam (1992)</p>	<p>Clotianidina (1989)</p>

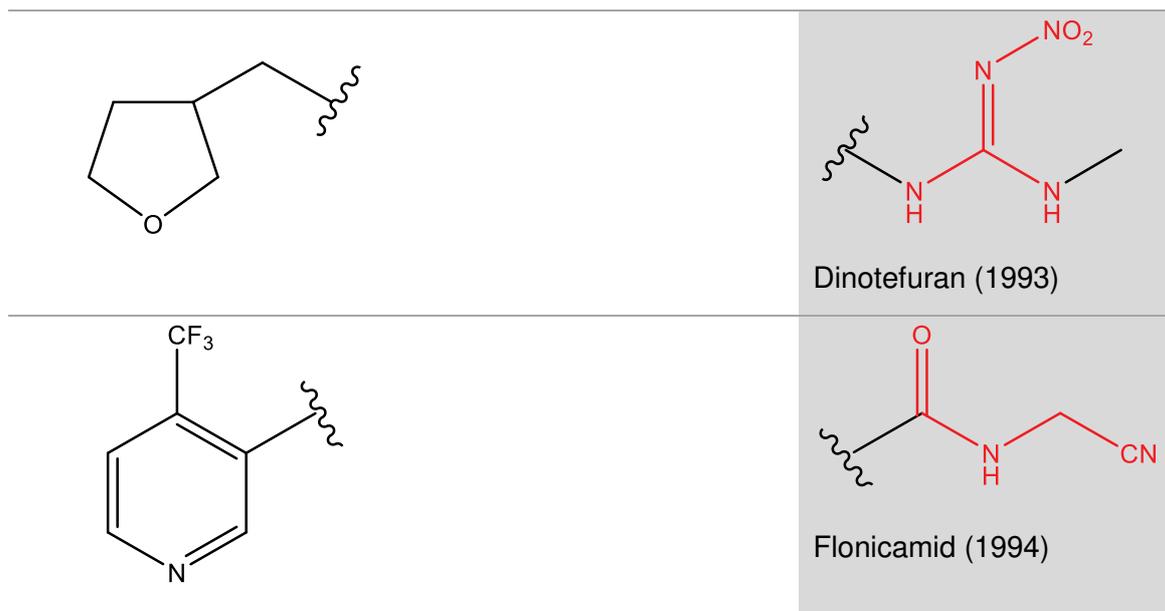


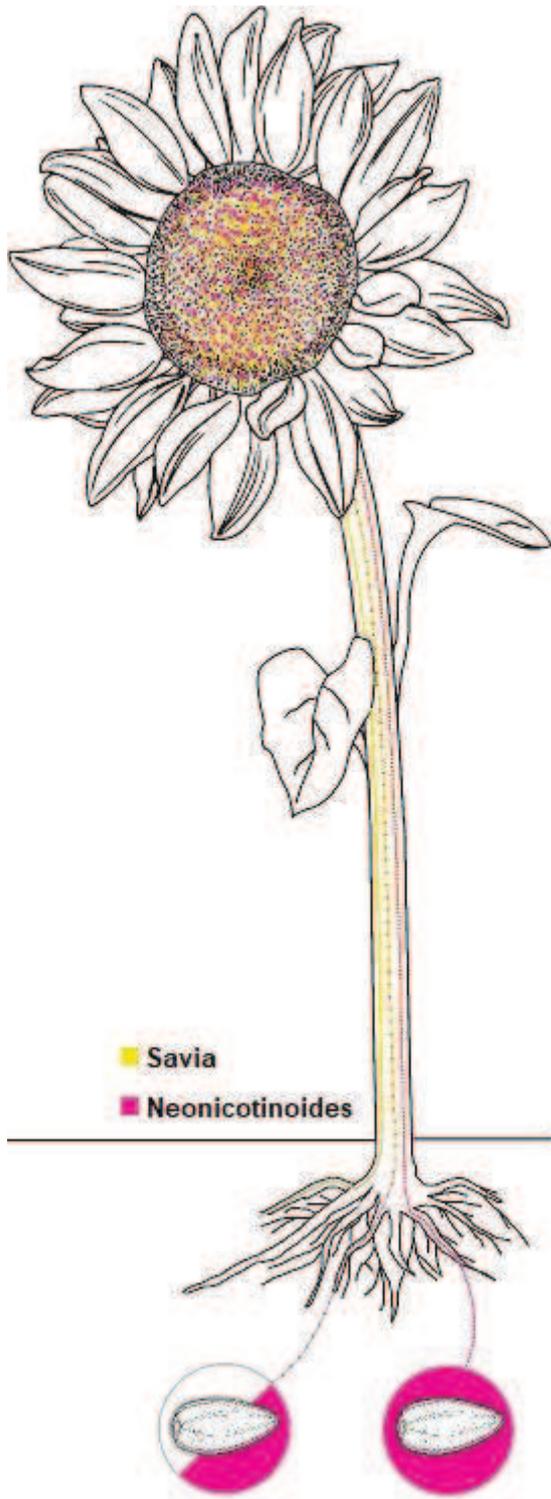
Fig. 1.3 Estructura química de la nitiazina, flonicamid y neonicotinoides comercializados exhibiendo el año de la primera patente de aplicación entre paréntesis y el farmacóforo en color rojo.

Además de su influencia en la actividad biológica, el farmacóforo (indicado en color rojo en la Fig. 1.3) es también responsable de algunas propiedades específicas como estabilidad a la fotólisis, degradación en suelo, metabolismo en las plantas y toxicidad para los diferentes animales. En los neonicotinoides los farmacóforos están conformados por derivados de iminas nitro o ciano sustituidas (IMD, ACT, TCD, TMX, CLT, DNF) de enaminas nitro sustituidas (NPI) o por ciano carboxamidas (FCD).

En comparación con los compuestos que poseen sustituyentes cíclicos, los neonicotinoides con estructuras acíclicas son generalmente menos lipofílicos y presentan una conformación casi cíclica cuando se enlazan a los receptores nAChR [Jeschke y Nauen 2005].

1.2.4 USOS AGRÍCOLAS

Debido a su amplio espectro de eficacia, los plaguicidas neonicotinoides son usados a nivel mundial para combatir principalmente áfidos, gorgojos, moscas y otros insectos succionadores [Jeschke y col. 2011]. En 2014, los neonicotinoides representaron más del 25% del mercado mundial de plaguicidas valorado en más de 3 billones de USD, y el TMX, el IMD y la CLT representaron casi el 85% de las ventas mundiales de neonicotinoides en protección de cultivos durante el 2012 [Craddock y col. 2019]. Son empleados en cereales y oleaginosas (arroz, maíz, soja, colza, girasol, algodón, etc.) [Blacquièrre y col. 2012] y en un gran número de vegetales (curbitáceas, brasicáceas, etc.) [Dively y Kamel 2012] y están registrados en más de 120 países [Craddock y col. 2019]. A pesar de ser principalmente usados en agricultura también presentan usos domésticos, siendo aplicados en jardines, en tratamientos para pulgas y garrapatas en perros y gatos y como cucarachicidas [Tomizawa y Casida 2005].



Los insecticidas sistémicos, como los neonicotinoides, abarcan una nueva forma de protección de los cultivos. Además de ser aplicados en aspersiones foliares, son frecuentemente empleados inoculando semillas o en tratamiento de suelo (Fig. 1.4). Un sesenta por ciento de la aplicación mundial de neonicotinoides se administra como tratamiento de semillas y suelo porque al disminuir la deriva se considera más seguro [Bonmatin y col. 2015]. Con solubilidades en agua bajo condiciones estándares (pH 7, 20 °C) que varían desde moderada a alta: 0,18 a 4,1 g L⁻¹, para la TCD y el TMX, respectivamente, los neonicotinoides son fácilmente transportados por el xilema de las plantas [Tomlin 2009]. Dado a su período de exposición prolongado, se diferencian de los insecticidas de rociado clásicos que están presentes en la planta por períodos más cortos (algunas horas o días luego de la adición). Mientras que la mayoría de los insecticidas son recibidos por el organismo objetivo por medio del contacto (uso tóxico), la mayor ruta de exposición a los insecticidas sistémicos es la ingestión. Estos insecticidas neonicotinoides son muy efectivos contra insectos que ya han desarrollado resistencia a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides [Stephenson y Solomon 2014]. Sus propiedades de translocación a través de toda la planta ponen en peligro a insectos polinizadores no-objetivo como las abejas, ya que existe evidencia de que están expuestos a dichos insecticidas mediante polen y néctar contaminado.

Fig. 1.4 Representación esquemática del proceso de translocación neonicotinoides aplicados a semillas de girasol con dosis de 6 mL kg⁻¹ de semilla y el doble de esta dosis. (Imagen adaptada de Michlig, M.P. y col. 2015, 5° Workshop Latinoamericano de Residuos de Plaguicidas).

1.2.5 DISPONIBILIDAD Y DEGRADACIÓN EN EL AMBIENTE

Se estima que sólo el 5% del principio activo neonicotinoide es tomado por la planta objetivo y el resto se dispersa en un entorno más amplio [Wood y Goulson 2017], incluso cuando se utiliza en el tratamiento de semillas [van der Sluijs y col. 2013]. Por lo tanto, existen otras fuentes de exposición para las abejas como el polvillo que vuela en el momento de la siembra de semillas tratadas, los cursos de agua, entre otros. Inclusive, debido a la solubilidad de los neonicotinoides en agua y a su persistencia en los compartimientos ambientales, existe la posibilidad de encontrarlos también en el polen y el néctar de plantas silvestres aledañas a los cultivos tratados [Wood y Goulson 2017, David y col. 2016].

Si bien, la adsorción y desorción de los plaguicidas en el suelo dependen de las características de este suelo, principalmente a su contenido de materia orgánica, la estructura química de los plaguicidas afectan su adsorción. En moléculas más largas, se podrían esperar uniones más fuertes que en las más pequeñas porque hay una mayor cantidad de puntos de contacto con la superficie enlazante. Asimismo las estructuras con puente hidrógeno y formación de dipolos forman enlaces más fuertes. La solubilidad en agua, es otro factor importante que influye en la persistencia del plaguicida en el suelo. Sería esperable que a mayor solubilidad, menor es la capacidad de adsorción por el suelo. Los plaguicidas con solubilidades acuosas moderadas a altas como los neonicotinoides son lixiviados con mayor facilidad que aquellos que presentan baja solubilidad en agua. Sin embargo, esta mayor disponibilidad en el agua puede presentar desventajas, de hecho se ha demostrado que los niveles más altos de residuos de neonicotinoides en cursos de agua que rodean regiones productoras de soja y maíz, se obtienen hacia fines de la primavera y principios del verano, en coincidencia con la siembra de cultivo y el período de aplicación de los plaguicidas [Hladik y col. 2014]. Desafortunadamente, también es la temporada en la que aumenta el consumo de agua por parte de las colonias de abejas para mantener la colmena refrigerada.

A partir de la aplicación y a lo largo del tiempo, los residuos de plaguicidas van disminuyendo progresivamente por la acción de diversas causas como el crecimiento del vegetal tratado, factores climáticos como la temperatura, la lluvia y el viento, eliminación en el ambiente por causas físicas como volatilización y solubilización, degradación química, etc. Cuando un plaguicida es liberado en el ambiente interacciona con los componentes bióticos y abióticos de este, sufriendo transformaciones en su estructura, capaces de modificar profundamente sus características físico-químicas y su acción biológica. La degradación del plaguicida dará lugar a nuevos compuestos que no necesariamente han de ser menos tóxicos que la sustancia original.

La degradación puede ser parcial o total, llegando en casos extremos a la obtención de compuestos inorgánicos como agua, dióxido de carbono, haluros, amonio, fosfatos, etc. Las reacciones que intervienen son muy variadas (oxidación, reducción, hidrólisis, sustitución, eliminación de grupos funcionales, etc.) pudiendo estar mediadas tanto por agentes orgánicos (principalmente bacterias del suelo), como inorgánicos. También son significativos otros procesos, como la fotólisis.

La tendencia general en los neonicotinoides es que los ciano-sustituidos (ACT y TCD) presenten tiempos de degradación mayores (uno o dos órdenes de magnitud) que los nitro-sustituidos como IMD, CLT y TMX, por lo tanto es esperable encontrarlos en el ambiente durante períodos más prolongados luego de su aplicación [Wood y Goulson 2017]. Para los neonicotinoides como el IMD, la fotólisis es el proceso de mayor contribución en su degradación en el ambiente [Acero y col. 2019]. La fotólisis es un proceso químico por el cual se rompen las moléculas a partir de la absorción de la luz solar [Burrows y col. 2002]. La fotólisis de los plaguicidas puede ocurrir en el suelo, en zonas cercanas a la superficie, ya que la penetración de la luz ultravioleta en el suelo es muy limitada. Además, es probable que la fotólisis se facilite en la superficie de las plantas, sobre todo en las hojas. En el agua los plaguicidas son muy vulnerables a la fotólisis dado a que la luz ultravioleta puede penetrar varias capas de agua clara.

La fotólisis del IMD fue estudiada en la cutícula y la fruta del tomate, de manera de comprender la fotoquímica general del IMD que se espera en las superficies de las frutas y las hojas [Schippers y Schwack, 2010], y en el agua [Lavine y col. 2010, Moza y col. 1998, Wamhoff y Schneider 1999]. Mientras que el $t_{1/2}$ (a 20°C y pH7) de hidrólisis del IMD varía de 33 a 44 días, el $t_{1/2}$ de la fotólisis acuosa es inferior a tres horas (a 24°C y pH 7) [Lavine y col. 2010]. Sobre cutículas y frutas, si bien el $t_{1/2}$ aumenta, la radiación elimina más de la mitad de la concentración inicial del IMD en menos de un día. En general, los pasos importantes de la fotólisis del IMD son la oxidación en el sustituyente cíclico (Fig. 1.3) y la reducción o pérdida del grupo nitro. A pesar de que otras partes de las moléculas también pueden ser degradadas, el grupo nitro debe ser enfocado particularmente debido a que ligeras alteraciones del mismo puede revertir completamente la toxicidad selectiva de los neonicotinoides para los insectos sobre los vertebrados. Por ejemplo, la relación de selectividad para los insectos sobre los vertebrados disminuye de 565 a 0,005 cuando el nitro se metaboliza en derivados de guanidina o desnitro [Pandey y col. 2009].

En algunas condiciones de suelo, debido al impedimento del paso de la luz ultravioleta, la persistencia del IMD podría prolongarse y la vida media podría superar los 1.000 días e ir acumulándose por aplicaciones cuando se usan repetidamente [Bonmatin y col. 2015]. Por consiguiente, determinar los riesgos asociados de los insecticidas neonicotinoides para los seres humanos y los ecosistemas, requiere una comprensión detallada de su destino, transporte y transformaciones en el ambiente, siendo procesos complejos que se ven influenciados según las características de los compartimentos ambientales en los que ocurren.

1.2.6 NEONICOTINOIDES EN DEBATE

El IMD fue el primer neonicotinoide introducido a mediados de la década de 1990, y desde entonces, su uso ha crecido rápidamente para controlar las plagas en una variedad de cultivos agrícolas siendo el neonicotinoide de mayor uso en Sudamérica [Mitchell y col. 2017]. Puesto que una vez dentro de la planta los neonicotinoides se vuelven sistémicos y se encuentran en los tejidos vasculares y el follaje, proporcionando protección contra los insectos herbívoros, su uso profiláctico se ha expandido extremadamente [Jeschke y col. 2011].

Cuando empezaron a ser usados los neonicotinoides los apicultores comenzaron a notar diferentes trastornos en las colonias como: abejas que no regresaban a la colmena, abejas desorientadas, comportamiento anormal de forrajeo, pérdidas masivas de abejas en primavera, pérdida de la reina, mayor susceptibilidad a enfermedades y desaparición de las colonias [van der Sluijs y col. 2013]. A principio de los 90, las evaluaciones de riesgo iniciales exhibían que las flores no estaban significativamente contaminadas [Maxim y van der Sluijs 2007]. Sin embargo, con la mejora de las técnicas analíticas, la detección de residuos en polen y néctar comenzaron a demostrar que los neonicotinoides presentan un riesgo para las abejas, que están expuestas mediante partes de las plantas y agua contaminada [Sanchez-Bayo y Goka 2014]. Consecuentemente, se entabló el debate acerca del efecto de los neonicotinoides en las abejas comenzando una serie de estudios científicos involucrando expertos de Bayer, apicultores e investigadores independientes.

La disminución de la población de abejas ha impulsado varios estudios sobre los factores que influyen en la vitalidad de las colonia [Potts y col. 2010, Vanbergen 2013], y el uso de plaguicidas neurotóxicos como los neonicotinoides, se posicionó como uno de los factores más importantes. La EFSA comenzó a reelaborar la evaluación de riesgos de los plaguicidas para las abejas a partir del 2010. Conociéndose además, que los neonicotinoides nitro-sustituidos como IMD, TMX y CLT son más tóxicos para las abejas melíferas ($DL50 = 80 - 3 \text{ ng abeja}^{-1}$) que los derivados ciano-sustituidos, [Decourtye y Devillers 2010], la UE resolvió en 2013 la prohibición temporal del uso de estos tres neonicotinoides en cultivos atractivos para abejas, basados en el informe emitido por la EFSA producido por ecotoxicólogos de abejas y evaluadores de riesgo [EFSA 2013]. Este documento considera el riesgo tanto de las abejas melíferas como el de especies silvestres y tiene en cuenta los efectos de exposición aguda y crónica. Además, estima las diferentes rutas de exposición, incluyendo depósitos de aspersión y partículas de polvo que se generan en el momento de la fumigación, polen, néctar y agua contaminados. En 2018, la EFSA formuló un nuevo documento concluyendo que los neonicotinoides presentan alto riesgo para las abejas debido a las múltiples rutas de exposición, como el polen y el néctar, no solo de plantas tratadas sino también de flores silvestres, conduciendo a la UE a permitir el uso de estos tres neonicotinoides sólo en cultivos de invernadero. Si bien algunos países, como Francia, adoptaron esta restricción y de hecho incluyeron también al ACT y TCD, prohibiendo de esta manera el uso de cinco neonicotinoides, otros países pertenecientes a la UE aún se resisten a hacerlo.

A partir de 2020 la EPA canceló el registro en los EEUU de 12 plaguicidas formulados con los neonicotinoides TMX y CLT como principios activos. Esta decisión fue parte de un acuerdo legal que involucró el Comité de Seguridad Alimentaria Mundial y la EPA para proteger a los polinizadores, los apicultores y las especies en peligro de extinción [US EPA 2019].

No obstante, el uso de neonicotinoides en cultivos atractivos para las abejas no se encuentra restringido en Latinoamérica. En nuestro país, estos insecticidas se encuentran autorizados para múltiples usos, incluyendo frutas, verduras, cereales, oleaginosas y leguminosas. Esta situación no sólo afecta a la producción apícola y la cadena agroalimentaria vinculada, sino también a las actividades beneficiosas de los insectos de polinización en los ecosistemas, provocando pérdidas de buena cantidad

de cultivos vegetales por alteraciones en el rendimiento de los ciclos productivos. Cabe mencionar que este efecto no es menor, dado que se estima que un tercio de la alimentación humana depende de la polinización realizada por insectos.

En estudios de ocurrencia de neonicotinoides a nivel mundial Mitchell y col. (2017) encontraron al menos uno de los cinco compuestos analizados (ACT, CLT, IMD, TCD y TMX) en el 75% de las 200 mieles evaluadas. Confirmando la exposición de las abejas a los neonicotinoides en su alimentación, en todo el mundo. La frecuencia de aparición de neonicotinoides individuales varió entre las regiones, por ejemplo, el IMD dominó las ocurrencias en mieles de África y América del Sur, TCD en Europa, ACT en Asia y TMX en América del Norte y Oceanía, lo que refleja las diferencias en el uso de neonicotinoides a lo largo del mundo.

La aparición de neonicotinoides en productos de colmena y la pérdida sustancial de colonias de abejas melíferas en las últimas décadas condujo al estudio del comportamiento de colonias de abejas expuestas artificialmente a insecticidas de esta familia, para intentar dilucidar los efectos potenciales en exposiciones crónicas [Faucon y col. 2005, Pettis y col. 2013, Cresswell y col. 2014, Sandroock y col. 2014, Dively y col. 2015, Meikle y col. 2016, Siede y col. 2017, Colin y col. 2019].

1.3 ABEJAS

Las abejas melíferas, como *Apis mellifera* L. (Hymenoptera Apidae) tienen un importante valor ecológico y económico en todo el mundo. Además de la contribución del suministro mundial de alimentos, los seres humanos también se benefician de una amplia gama de productos de la colmena, como la miel y el polen.

Desde comienzos del siglo XXI, se han reportado pérdidas significativas de colonias de abejas principalmente en el hemisferio norte [Ellis y col. 2010; Neumann y Carreck 2010; Potts y col. 2010; Kulhanek y col. 2017; Gray y col. 2020] y también en América del Sur [Vandame y Palacio 2010; Maggi y col. 2016; Antúnez y col. 2017; Requier y col. 2018]. En Argentina, también se han evidenciado pérdidas en la población de abejas. Así, durante un monitoreo realizado en 2015-2016, se indicó la pérdida del 15% de las colonias [Requier y col. 2018]. En este contexto, en 2016 se decide crear la Asociación Latinoamericana de Investigación de Abejas (SOLATINA, <https://solatina.org/>) que tiene por objetivo contribuir a la conservación de abejas en la región.

1.3.1 SERVICIOS ECOSISTÉMICOS

Las abejas forman parte de una comunidad de insectos que proveen el vital servicio de la polinización. Entre los polinizadores más importantes se destacan los insectos como las abejas, avispas, polillas, escarabajos y mariposas pero también otros animales como murciélagos y colibríes. Casi el 90% de las plantas silvestres dependen de la polinización por insectos u otros animales. Este tipo de polinización es importante además para la reproducción de muchos cultivos, 75% de los principales cultivos

alimentos del mundo dependen de este tipo de polinización. Asimismo, el consumo actual de frutas y vegetales no podría mantenerse sin la polinización realizada por estos agentes [Klein y col. 2007]. La contribución anual de la polinización de los insectos a la producción mundial de cultivos se ha estimado en 235.000 millones – 577.000 millones de dólares estadounidenses en todo el mundo [IPBES 2016]. La polinización genera mejoras en la cantidad y la calidad y, como resultado, la comerciabilidad de los cultivos.

Se cree que las abejas son los polinizadores más eficientes, ya que dependen del polen y el néctar para alimentar a sus crías. El néctar es la fuente principal de carbohidratos y energía, y el polen les provee las proteínas, lípidos, vitaminas y otros micronutrientes. Esto significa que pueden visitar más flores y pasar más tiempo buscando alimento que otros insectos polinizadores. También, muestran un comportamiento conocido como constancia floral, visitando repetidamente flores de la misma especie, y aumentando así la probabilidad de una transferencia exitosa de polen que conduzca a la polinización [Steele y Shardlow 2019].

Teniendo en cuenta el accionar de los insectos polinizadores, es inevitable preguntarse qué tan efectivos son los plaguicidas neonicotinoides en términos de protección de cultivos si perjudican a insectos esenciales para su producción.

1.3.2 INSECTOS SOCIALES

Las abejas melíferas viven en colonias cuyo número varía dependiendo del período estacional y la fortaleza de cada colonia. Ninguna abeja puede sobrevivir al margen del grupo durante más de dos o tres días.

En el interior de la colmena existen tres castas: la reina, las obreras y los zánganos. Sólo hay una reina por colonia que es indispensable porque es la encargada de poner los huevos. Las obreras son unas 15.000 en los meses de invierno, y aumenta hasta unas 40.000 o 50.000 en primavera hasta alcanzar entre 75.000 y 90.000 en verano [Ravazzi 2016]. Dentro de las abejas obreras (hembras) hay dos clasificaciones, las pecoreadoras y las nodrizas. En primavera y verano las obreras más viejas se encargan de pecorear, es decir recolectar los alimentos de las flores. Las restantes, nodrizas, trabajan dentro de la colmena, esencialmente alimentando a las crías. Los zánganos (machos) por su parte, solo presentan fines reproductivos [Mendizabal 2005].

Un apicultor en una nota del diario La Nación describió cómo funciona una sociedad de abejas, de una manera muy simple y clara:

«Durante el vuelo nupcial, la reina es fecundada por zánganos que mueren después de la cópula. El esperma que transfieren a la reina es suficiente para que ponga hasta mil huevos por día. Las obreras la van alimentando, renuevan los paneles y dejan comida para la nueva generación. Cuando cumplen 21 días salen a pecorear: la búsqueda de néctar y polen. Al detectar la fuente de alimento, avisan a la colonia y arman otra danza. Su forma e intensidad indica qué y dónde buscar. Cuando encuentran las flores, toman el néctar, al que le agregan enzimas en el estómago. De vuelta en la colmena, se van pasando el néctar de boca en boca

para agregar más enzimas. Las encargadas de depositarlo en las celdas baten las alas 12.000 veces por minuto. Es el proceso de secado y espesado que genera la miel. »
Tito Vieytes, apicultor. Diario La Nación 24/07/2018.

La producción de la miel por parte de las abejas melíferas involucra la recolección del néctar, y su almacenamiento en el buche melario mientras la abeja completa su carga en el campo y durante su regreso a la colmena. Luego, ocurre la maduración de la miel que incluye la adición de enzimas, para disgregar los azúcares originales en azúcares simples, y de otras sustancias propias de la abeja, como ácidos del estómago de las abejas que generan la disminución del pH de la miel, y el proceso de secado [Apimondia 2020]. Por acción de la ventilación y temperatura de la colmena se produce la evaporación de la humedad del néctar hasta obtener la miel madura con humedades inferiores al 20%, momento en el que las abejas tapan la celda [FECOAPI 2017].

1.3.3 PRINCIPALES PLAGAS Y ENFERMEDADES DE LAS COLMENAS

Las enfermedades y parásitos pueden afectar la dinámica de la colonia generando pérdidas en la producción e incluso hasta el colapso de dicha colonia. El uso de plaguicidas sintéticos como el fluvalinato, flumetrina, cumafós y amitráz para el control de plagas y enfermedades en la colonia es una práctica habitual, sin embargo se están estudiando otras alternativas como el empleo de aceites esenciales [Bulacio Cagnolo y col. 2010]. Entre los problemas sanitarios más frecuentes en Argentina se encuentran la varroasis, loque americana y nosemosis [Saeta y col. 2008]. Debido a su alto grado de patogenicidad y virulencia loque americana es una de las enfermedades más contagiosas y afecta a la abeja durante el estado larval, siendo las adultas portadoras asintomáticas. La nosemosis es una enfermedad producida por el hongo *Nosema* que afecta el tracto digestivo de las abejas melíferas adultas. Cuando la colmena se encuentra afectada por este patógeno, la producción de miel disminuye un 25% y la de jalea real es nula, provocando alteraciones en el normal desarrollo del ciclo de vida de la colonia. El ácaro *Varroa* perturba el desarrollo normal de la colonia, dando origen a abejas pequeñas y malformaciones tales como: patas atrofiadas, abdomen acortado y deformaciones en las alas, disminuyendo en forma significativa la vida de las abejas y por ende la producción.

1.3.4 PRODUCCIÓN APÍCOLA EN ARGENTINA

Hasta la llegada de las abejas europeas *Apis mellifera* hacia mediados del siglo XIX, la práctica apícola se desarrollaba como actividad complementaria o doméstica. Las primeras provincias en el desarrollo de la apicultura fueron Buenos Aires y Mendoza, permitiendo la propagación de la actividad a provincias vecinas como Santa Fe y Córdoba [Salizzi 2014].

El crecimiento desarrollado por esta actividad así como los avances técnicos incorporados, propiciaron una transformación en el rol asumido por la Argentina en el mercado mundial hacia mediados del siglo XX, en paralelo con la creciente demanda

extranjera de miel y cera. Tal es así que hacia mediado de los 90s, la apicultura argentina experimentó una importante expansión, ubicándose entre los principales productores mundiales de miel por detrás de China y los EEUU [FAOSTAT 2010]. A lo largo de la temporada 2005/2006 se produjeron 104 mil toneladas de miel a granel y fraccionada, lo que representó el máximo volumen de producción alcanzado hasta la actualidad. Sin embargo, a partir del 2007 se manifestó una visible disminución en la producción (Fig. 1.5), que notablemente es coincidente con el fenómeno de colapso de las colonias observado a partir de ese año en los EEUU [Frazier y col. 2011]. Diez años después, se alcanzó la mínima producción con una merma del 50% respecto de la temporada 2005/2006.

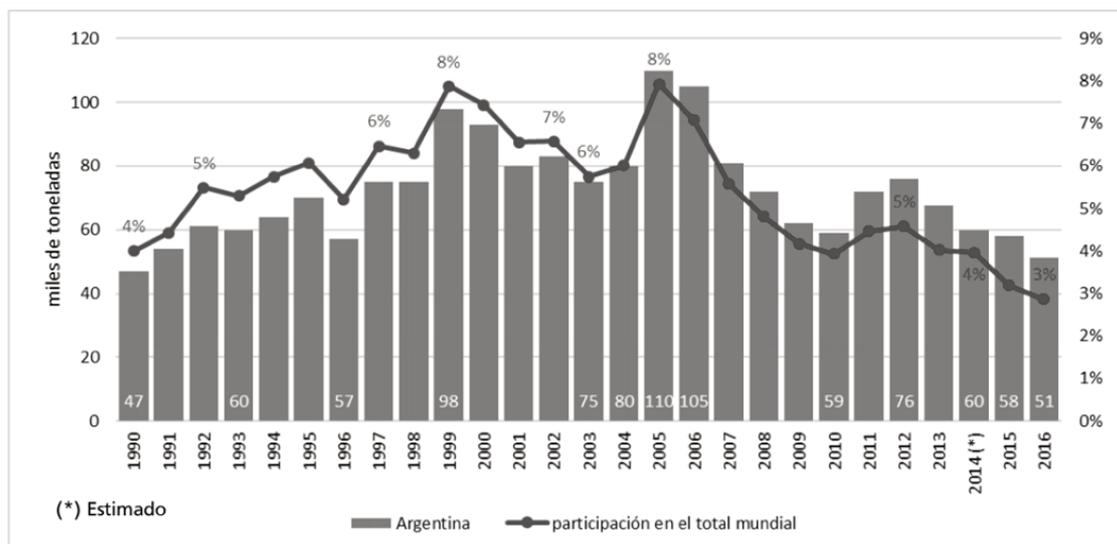


Fig. 1.5 Producción primaria de miel en miles de toneladas y participación a nivel mundial, período 1990-2016.

Fuente: gráfico elaborado por el Ministerio de Agroindustria sobre la base de datos de FAO STAT (18/6/2018).

La disminución en la población de abejas, entre otras causas, puede explicarse como producto del avance de los procesos de agriculturización y sojización y la consecuente intensificación del uso de agroquímicos. En las últimas cuatro décadas, Argentina experimentó un proceso de expansión agrícola promovido por la adopción de cultivos transgénicos, la siembra directa y el incremento en el uso de fertilizantes y agroquímicos [Viglizzo y Jobbágy 2010]. Entre 1980 y 2005, el área cubierta por soja aumentó de 2 a 17 millones de hectáreas [Salizzi 2014]. En este contexto, tanto la reducción de la diversidad de la flora melífera, que afecta la nutrición de las abejas y los rendimientos de miel, como el incremento de las aplicaciones de plaguicidas plantearon riesgos potenciales para las colonias de abejas melíferas y la cadena de producción asociada [Frazier y col. 2011].

Actualmente, Argentina sigue ocupando un lugar central en el mercado internacional de la miel. Dada la creciente demanda internacional, y al no existir un mercado de consumo interno desarrollado, se exporta alrededor del 95% de la producción total, principalmente a granel, a destinos como Alemania y EEUU [MAGyP 2019]. De aquí deviene la vital importancia de mantener la inocuidad y la calidad de las mieles dentro

de los estándares internacionales. Por lo tanto, se estableció un marco legal para garantizar la trazabilidad y el control de la calidad a lo largo de la cadena de producción de miel. Para ello el Registro Nacional de Productores Apícolas (RENAPA, <https://renapa.magyp.gob.ar>) creado en 2001, registra a los productores del país mientras que el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA, <https://www.argentina.gob.ar/senasa>) es el responsable de la fiscalización y auditoría de las salas de extracción, siendo una de sus principales tareas el hacer cumplir las Buenas Prácticas Apícolas y de Manufactura [Salizzi 2014]. Otras de las instituciones gubernamentales involucradas en la inspección de las muestras de miel es la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), que aplica el Código Nacional Alimentario Argentino (CAA, <https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>) y la Agencia Santafesina de Seguridad Alimentaria (ASSAI, https://www.assal.gov.ar/assal_principal/), el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, <https://www.argentina.gob.ar/inta>) y el MAGyP.

Además, Argentina exporta otros productos apícolas como cera de abejas, utilizada principalmente para confeccionar planchas para los cuadros de las colmenas, material vivo (paquetes de abejas, reinas vírgenes y fecundadas) y otros productos como polen, propóleos y jalea real. El material vivo apícola argentino es reconocido por adaptarse a diferentes ambientes y por la calidad de las abejas reinas [Ministerio de Hacienda de la Nación 2018].

Respecto de la distribución de la actividad en el país, Buenos Aires es la provincia con mayor concentración de la producción, con alrededor de 915 mil colmenas, seguida por Entre Ríos con unas 572 mil colmenas y Santa Fe, que cuenta con unas 295 mil [MAGyP 2019]. Por tanto, la región central del país es la que concentra el mayor número de productores y de colmenas, representando el 70% del total de la producción. El rendimiento promedio de miel, a nivel nacional, es de alrededor de 25 kilogramos por colmena, por año.

La provincia de Santa Fe aporta el 15% de la producción de miel que se exporta desde Argentina, destacándose por la calidad de sus productos. La apicultura representa una actividad de gran importancia social, económica y ambiental, fundamentalmente en las localidades más pequeñas, dónde constituye una herramienta de desarrollo local [Gobierno de Santa Fe 2007].

Uno de los principales aspectos de la producción de mieles en Argentina es su inocuidad respecto a su contenido de contaminantes químicos (plaguicidas, antibióticos, metales pesados, entre otros) y adulteraciones, siendo este aspecto una ventaja competitiva importante respecto a otros grandes proveedores mundiales. Sin embargo, en las últimas décadas la presencia de residuos contaminantes ha generado problemas para la exportación de este producto [Pórfido y col. 2014]. Por lo tanto, la cantidad y calidad de la producción de miel se ve amenazada tanto por problemas sanitarios como por el avance de la frontera agrícola que reduce la diversidad de la flora melífera.

El control y la evaluación de la exposición de abejas a los plaguicidas representa un desafío para los apicultores debido a los factores múltiples que se encuentran

involucrados [Kessler y col. 2015]. Las abejas vuelan en promedio 4 kilómetros (pudiendo extenderse hasta 9 km) desde la colmena para recolectar el néctar y el polen [Beekman y Ratnieks 2000], por lo tanto, incluso los apiarios manejados bajo prácticas orgánicas, ubicados en territorio libre de plaguicidas pueden sufrir problemas de contaminación porque los apicultores no pueden controlar estrictamente el forrajeo de las abejas [Chiesa y col. 2016]. En este sentido, el monitoreo del nivel de residuos de plaguicidas en muestras de la colmena proporciona información importante respecto de la aplicación de plaguicidas en terrenos circundantes a las colonias de abejas.

1.3.4.1 MIEL MONOFLORAL O POLIFLORAL

El conocimiento de la flora es de gran utilidad para determinar cuáles son los recursos alimenticios utilizados por las abejas, especialmente el conocimiento del origen botánico (las fuentes nectaríferas y poliníferas). La identificación y conteo de los granos de polen en una muestra de miel permitirá poder clasificarla como miel monofloral o polifloral, dependiendo del porcentaje de granos de polen de cada uno de los tipos polínicos presentes en la misma.

El clasificar una miel como monofloral aumenta su precio en el mercado respecto de la miel polifloral [Machado y col. 2021]. Una miel monofloral, de acuerdo con la normatividad argentina, es aquella cuyo contenido de granos de polen de una planta en particular es la dominante en el conjunto palinológico con más del 45% de polen de la misma familia, género o especie floral, y posea características organolépticas, físicoquímicas y microscópicas propias [MAGyP 2019].

Una miel es polifloral cuando el análisis palinológico demuestra que las frecuencias polínicas no revelan dominancia de ningún tipo de planta en particular. En términos comerciales, la caracterización de las mieles les confiere un valor agregado, ya que permite garantizar la calidad y homogeneidad del producto en diferentes cosechas, por lo que su cotización se ve favorecida.

1.4 LEGISLACIÓN DE PLAGUICIDAS

Inicialmente, la regulación de plaguicidas se enfocó en asegurar que los productos se etiquetaran de manera correcta y no se adulteraran. Con el interés creciente en los posibles efectos de los plaguicidas en el ambiente, se crearon agencias encargadas de la legislación de los plaguicidas. Así, por ejemplo, en 1970 se estableció en los EEUU la EPA. Este organismo, además de regular el uso de plaguicidas, es el encargado de fijar los Límites Máximos de Residuos (LMRs) para dichas sustancias en alimentos y de realizar estudios de evaluación de riesgo, tanto para los nuevos compuestos como para los plaguicidas ya autorizados, los cuales deben reevaluarse periódicamente para asegurar que siguen cumpliendo con las normas de seguridad e inocuidad [EPA 2022].

A nivel Europeo, la autorización y uso de plaguicidas, como así también la gestión de sus residuos en los alimentos, está regulada principalmente en dos reglamentos: i) El Reglamento (CE) N° 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de la UE del 21 de Octubre de 2009, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios [Comisión Europea 2009]; ii) El Reglamento (CE) N° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo del 23 de febrero de 2005 relativo a los LMRs de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal [Comisión Europea 2005]. Esta última reglamentación armonizó en todos los países de la UE los LMRs para los productos agrícolas destinados a la alimentación humana y a piensos para animales. El Reglamento N° 396/2005 se refiere a los compuestos actual o previamente utilizados en la agricultura dentro o fuera de la UE (alrededor de 1.100 plaguicidas). Si un plaguicida no se menciona específicamente, se aplica un LMR general por defecto de $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$.

En Argentina, el SENASA es la autoridad que regula la clasificación y etiquetado de los productos fitosanitarios. Este clasifica los productos formulados e ingredientes activos de los productos fitosanitarios de acuerdo a los resultados de diversos estudios toxicológicos, siguiendo los criterios internacionales de la OMS. Las normativas más recientes sobre especificaciones de LMR son las Resoluciones SENASA N° 934, 559 y 608 emitidas en 2010, 2011 y 2012, respectivamente [SENASA 2010, SENASA 2011, SENASA 2012].

Al menos siete compuestos activos de la familia de los neonicotinoides (ACT, CLT, DNF, FCD, IMD, TCD y TMX), se encuentran registrados en nuestro país para un variado conjunto de cultivos [SENASA 2010]. Los mismos están autorizados para ser aplicados en diversos productos frutihortícolas, oleaginosas y cereales con LMRs en el rango de $0,01$ a 6 mg kg^{-1} . El TMX y el IMD combinados con piretroides, son de los insecticidas más utilizados para la protección de cultivos extensivos contra insectos como la chinche, y en los últimos años también está aumentando el uso de DNF [Kahl 2015].

La evolución del mercado argentino de agroquímicos permite apreciar el crecimiento del volumen de consumo de agroquímicos año a año, observándose que los insecticidas y los curasemillas, que incluyen a los neonicotinoides, también siguen esta tendencia (Fig. 1.6).

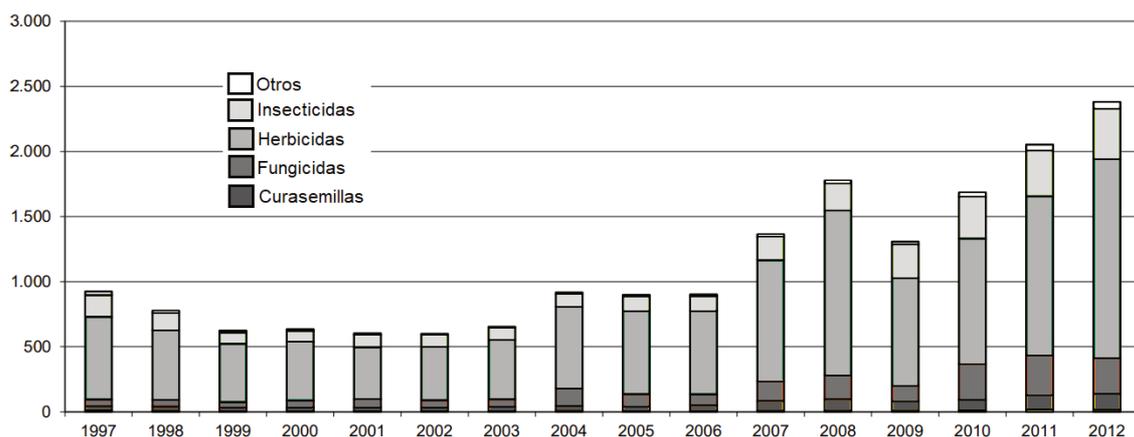


Fig. 1.6 Evolución del mercado argentino de agroquímicos. Valores expresados en millones de dólares norteamericanos por año.

Fuente: Mercado Argentino de Productos Fitosanitarios 2012 – CASAFE 2012.

En el marco de la Resolución de Ministerio de Salud y Ambiente N° 1221/04, en el año 2005 se realizó un diagnóstico con el objetivo de obtener un cuadro de situación relativo al manejo de agroquímicos y la identificación de los de mayor consumo en las distintas zonas del país. En la provincia de Santa Fe se adoptaron dos áreas de estudio. La primera caracterizada por presentar cultivos intensivos (hortícola) y la segunda, cultivos extensivos (agrícola). La metodología comprendió la realización de encuestas a los productores de las dos zonas.

En la zona hortícola, dado a la variedad de hortalizas que se cultivan (calabaza, zapallito, pepino, brócoli, coliflor, remolacha, tomate, chaucha, cebolla, pimiento, lechuga, repollo, etc.), se presentó una amplia gama de plaguicidas aplicados. En la zona de cultivo extensivo, con una predominancia de los cultivos soja, trigo y maíz, se utilizó una menor variedad de plaguicidas con un incremento en el uso de herbicidas (Tabla 1.4) [Lorenzatti y col. 2017]. Para ambas actividades la proporción de insecticida, ya sea solo o combinado con otra clase, supera el 50% con respecto del total de plaguicida utilizado.

Tabla 1.4 Plaguicidas más empleados para cultivos intensivos y extensivos en la provincia de Santa Fe.

Plaguicida	Zona hortícola (%)	Zona agrícola (%)
Insecticida	25	11
Herbicida	7	41
Insecticida / Acaricida	18	48
Insecticida / Nematicida	5	-
Insecticida / Acaricida / Nematicida	5	-
Fungicida	40	-

1.4.1 LÍMITES MÁXIMOS DE RESIDUOS Y ANÁLISIS DE RIESGO

Con el objetivo de proteger la salud humana y establecer parámetros de comercialización, en muchos países, se han establecido normas sobre los LMRs en

alimentos. El LMR es la concentración máxima en partes por millón (ppm) de un residuo legalmente permitida o reconocida como aceptable en alimentos para humanos, productos agrícolas o alimentos para animales, establecida por el Codex Alimentarius o por una autoridad reguladora competente.

Los LMRs se fijan más que por criterio toxicológico, por criterio agronómico. Es decir, los LMRs se fijan teniendo en cuenta los residuos que perduran en la cosecha cuando se utilizan los plaguicidas en concordancia con las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) y siempre que no supere a la ingesta diaria admisible. Al emplear el plaguicida correctamente en el campo, los niveles de residuos son más bajos que el nivel permisible toxicológicamente, por lo tanto, no es necesario llegar a éste ya que de lo que se trata es de utilizar correctamente el plaguicida y que quede la menor cantidad de residuos posibles. Esto añade un margen de seguridad suplementario. Como los criterios sobre las BPA pueden ser muy variables de un país al otro, debido a diferencias en los tipos y gravedad de las plagas, formas de cultivo, variedades empleadas, condiciones climáticas, etc., los LMRs son muy diferentes entre distintos países. En efecto, determinados países importadores son especialmente severos o estrictos con los niveles de residuos de determinados plaguicidas permitidos en alimentos.

Los LMRs para neonicotinoides en la miel no están establecidos en Argentina, o incluso a nivel mundial en los países donde estos insecticidas están actualmente autorizados para uso agrícola [SENASA 2010, EPA 2014]. En general, existen pocas regulaciones con respecto a los residuos de plaguicidas en la miel en comparación con otros productos alimenticios [Kamel 2010]. En concreto, se han establecido LMRs europeos para la miel y otros productos de apicultura en base a los límites de cuantificación de las determinaciones analíticas. Así, los LMRs para ACT, CLT, FCD, IMD y TMX son de $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ [EU 2017/671, EU 2018/687, EU 491/2014, EU 2019/50, EU 396/2005]. El TCD es el único neonicotinoide que tiene su LMR basado en estudios de seguridad alimentaria, considerando el consumo dietario de miel y su valor es de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ [EU 2019/50]. Finalmente, para el DNF y el nitenpiram (NPI), el LMR de $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$, se estableció por defecto para plaguicidas no autorizados en la UE [EU 396/2005]. Ante la creciente preocupación de los efectos toxicológicos del IMD en el cerebro de los mamíferos durante la exposición crónica y la mayor afinidad de sus metabolitos [Mitchell y col. 2017], sumado a las recientes conclusiones de la EFSA que confirman el daño que produce en las abejas [EFSA 2018], es esperable que se planteen en el futuro modificaciones en el estado actual de las autorizaciones y niveles de tolerancia.

1.5 ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS

La determinación de plaguicidas en muestras ambientales o en alimentos requiere de etapas de preparación, separación y detección de los analitos. Además, es necesario evaluar el desempeño del método para demostrar su idoneidad en la aplicación. En los últimos años, los esfuerzos en el campo de la química analítica se focalizaron en la miniaturización del método, ya sea en la preparación de las muestras y en la técnica de separación-detección acortando tiempos de análisis, costos y riesgos, y los

componentes, incluidos los insumos químicos y los solventes necesarios para realizar los ensayos, de manera de lograr alta selectividad y sensibilidad [Pena-Pereira 2014]. Es así que las técnicas preparativas se complementan con técnicas separativas como lo son las cromatográficas, acopladas con instrumentos selectivos, como la espectrometría de masa.

1.5.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Debido a la baja concentración de plaguicidas en los alimentos y en la mayoría de las muestras ambientales, las diferentes propiedades fisicoquímicas de los mismos y la complejidad de la composición de las matrices, es necesario la optimización de la extracción de los analitos y en algunos casos la preconcentración de los mismos, como así también la limpieza de los extractos [Zhang y col. 2012].

El principal objetivo de la preparación de la muestra es lograr la extracción de los analitos eliminando las interferencias. Un método de preparación de muestra para el análisis de residuos de plaguicidas debe presentar las siguientes características: proveer altos valores de recuperación de los analitos y remover compuestos de la muestra potencialmente interferentes, ser preciso, como así también rápido, de fácil aplicación, robusto, seguro y de bajo costo [Hercegová y col. 2007].

El método de extracción y el tipo de solvente a utilizar para la extracción de plaguicidas dependen de las propiedades físicas y químicas de los analitos, de las características de la muestra y del instrumental analítico.

En la actualidad la extracción en fase sólida (SPE) y la extracción con solvente son las técnicas de preparación más empleadas. De hecho, muchas metodologías analíticas oficiales y estandarizadas implican su aplicación para la extracción, preconcentración y limpieza de los extractos [Pena-Pereira 2014].

En la SPE se utilizan cartuchos que están rellenos con un material sólido (florisil, alúmina, PSA, gel de sílice funcionalizada con octadecilsilano -C18-, entre otros). Como esta técnica requiere poco volumen de solvente, equipamiento poco sofisticado, y proporciona un procedimiento experimental simple y rápido, que permite concentrar nuestros analitos de interés, ha sido ampliamente utilizada en la preparación de las muestras. Sin embargo, presenta algunas limitaciones; por un lado es difícil elegir rápidamente los adsorbentes y solventes de elución apropiados para el análisis multiresiduo de plaguicidas y por el otro, los cartuchos comerciales de SPE no pueden ser reutilizados, incrementando el costo del análisis [Zhang y col. 2012].

En 2003 se desarrolló el método QuEChERS, por sus siglas en inglés (rápido, fácil, económico, eficaz, robusto y seguro), que rápidamente se convirtió en uno de los más aplicados en la preparación de muestras para el análisis de plaguicidas debido a su amplio alcance y sus ventajas de simplicidad y bajo consumo de solventes y reactivos, entre otros. Se basa en la extracción de los analitos de la muestra acuosa con acetonitrilo (MeCN) como solvente a microescala, la utilización de sales de sulfato de magnesio anhidro (MgSO₄) y cloruro de sodio (NaCl) y la limpieza de los extractos mediante extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE) empleando una amina primaria

secundaria (PSA) como adsorbente para retener ácidos orgánicos, ciertos pigmentos polares y azúcares (Fig. 1.7) [Anastassiades y col. 2003]. Para eliminar coextractos lipofílicos es posible adicionar otro adsorbente, octadecilsilano (C18), en la etapa d-SPE. Asimismo, se están proponiendo adsorbentes alternativos para mejorar y ampliar el rango de aplicabilidad del QuEChERS.

Como a pH básicos se puede ver afectada la estabilidad de ciertos compuestos, se desarrollaron dos métodos basadas en el uso de soluciones tamponadas; uno adicionando ácido acético-acetato de sodio y otro denominado QuEChERS citrato [AOAC Official Method 2007, CEN Standard Method EN 15662 2008]. Ambos fueron comparados con el QuEChERS original y presentaron mejores recuperaciones para ciertos plaguicidas [Lehotay y col. 2010]. En estos métodos se introdujo la fijación del pH de la solución extractante a través de buffer (pH 4,8 y levemente mayor pH 5-5,5 para la versiones acetato y citrato, respectivamente) con el objetivo de evitar la hidrólisis de compuestos sensibles a pH básicos en métodos multiresiduo.

QuEChERS, métodos oficiales

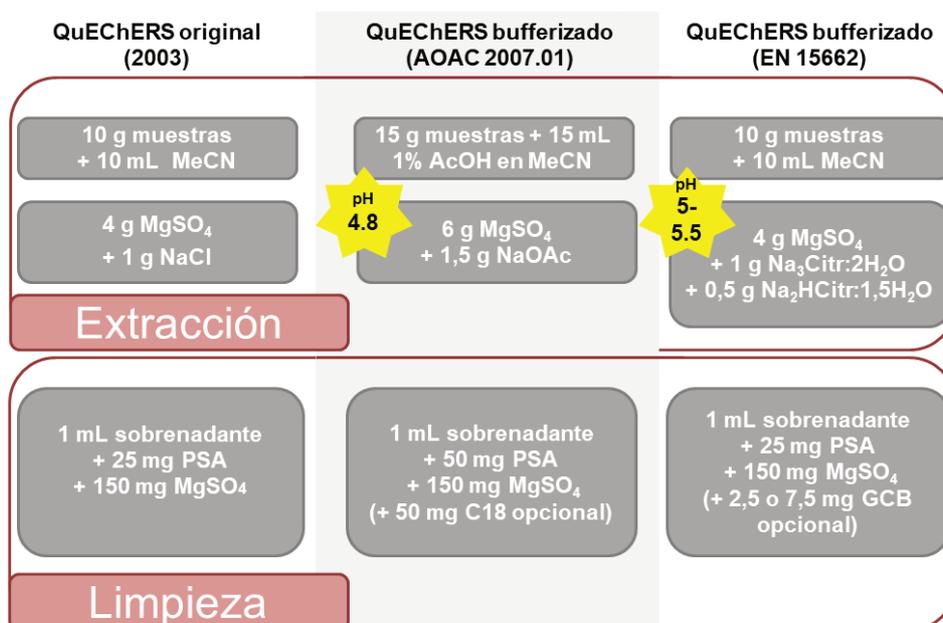


Fig. 1.7 Esquema comparativo de solventes, sales y adsorbentes agregados en cada una de las etapas del método QuEChERS original y sus variantes empleando soluciones tamponadas.

Siendo: AcOH (ácido acético), NaOAc (acetato de sodio), Na₃Citr:2H₂O (citrato trisódico dihidrato), Na₂HCitr:1,5H₂O (citrato disódico sesquihidrato) y GCB (carbono grafitizado).

Dado que el método QuEChERS demostró proporcionar resultados cuantitativos confiables en una amplia variedad de matrices alimentarias, es el más empleado en la actualidad, presentando un gran potencial para el análisis de numerosos residuos de plaguicidas en alimentos de diferente composición, habiéndose extendido su aplicación a muestras ambientales y de origen biológico.

Otras metodologías modernas de extracción con solvente para el análisis de residuos de plaguicidas incluyen el SweEt (Sweden Ethyl Acetate), que emplea acetato de etilo como solvente extractor [Pihlström y col. 2007], y el método mini-Luke en el cual se extraen los analitos con acetona y se realiza una limpieza de los extractos por partición con éter de petróleo y diclorometano [EURL-FV].

1.5.2 INSTRUMENTAL ANALÍTICO

En los últimos 50 años, los métodos para analizar residuos de plaguicidas en diversas matrices han mejorado notoriamente en cuanto a selectividad y límites de detección y cuantificación, gracias al desarrollo de nuevos instrumentos y técnicas.

Al igual que en el preparado de la muestra, hay una tendencia general en la miniaturización de las técnicas analíticas de separación y detección aumentando la velocidad, la eficiencia de la separación y la sensibilidad y selectividad de la detección, mejorando la portabilidad de los instrumentos, reduciendo el consumo de energía, la cantidad de muestra, solventes y reactivos y los desechos generados [Pena-Pereira 2014].

1.5.2.1 SEPARACIÓN ANALÍTICA

Las técnicas analíticas de separación son empleadas en química analítica para la separación de los analitos previamente a la detección. Las técnicas de separación más empleadas son la cromatografía líquida (CL), cromatografía gaseosa (CG) y electroforesis capilar [Leong y col. 2020].

Desde su introducción hacia fines de los 60s, CG se convirtió en la técnica más empleada en el monitoreo de plaguicidas. Sin embargo, la clara tendencia del cambio de uso de compuestos persistentes como los compuestos organoclorados hacia compuestos más polares, más degradables y termolábiles hizo que el empleo de la CL adquiriera mayor difusión en la química analítica de plaguicidas.

Por las propiedades fisicoquímicas de los neonicotinoides, la técnica separativa más empleada para su análisis es la CL [Souza Tette y col. 2016]. Sin embargo, se pueden analizar por CG realizando un paso adicional en el procesamiento de las muestras que involucra una reacción de derivatización de los analitos [Ko y col. 2014].

La CL es una técnica de separación esencial para una amplia variedad de áreas científicas, entre ellas la química analítica de neonicotinoides. A pesar de que la cromatografía de fase reversa es ampliamente la más empleada, otras fases estacionarias, como en la cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC), están siendo utilizadas para la determinación de compuestos más polares. En el análisis de residuos de plaguicidas, el empleo principal de esta técnica es la determinación de glifosato, aunque también está siendo aplicada en metabolómica para metabolitos polares. Así, Yoshida y col. (2013) determinaron el neonicotinoide NPI y dos de sus

metabolitos en vegetales, frutas y arroz. El uso de HILIC permitió la determinación de los metabolitos que son más polares que el compuesto original.

Es importante la correcta elección de la columna y la fase móvil para lograr una separación eficiente no solo entre los analitos sino también entre los analitos y las interferencias. La naturaleza de la fase móvil es el factor clave para la separación en CL. Además, el caudal y como consecuencia la presión de la misma son también factores de gran relevancia en el proceso separativo [Valcárcel Cases y Gómez Hens 2003].

1.5.2.2 TÉCNICAS DE DETECCIÓN, ESPECTROMETRÍA DE MASA

La espectrometría de masa es una técnica analítica muy poderosa que produce resultados confiables tanto en análisis cualitativos como cuantitativos de compuestos ionizables a través de la obtención de fragmentos de los analitos (relación m/z). Un espectrómetro de masa está compuesto por tres partes esenciales: la fuente de ionización, el seleccionador de masa y el detector de los iones.

Las primeras aplicaciones en el análisis de residuos de plaguicidas fueron realizadas con espectrómetros simple cuadrupolo (Q). Sin embargo, actualmente, al no cumplir el Q con el criterio de identificación establecido por la UE dado a que no puede realizar la fragmentación y la obtención de dos o más iones producto [SANTE 2019], los espectrómetros Q fueron ampliamente reemplazados por los triple cuadrupolo (QqQ) para el monitoreo de la seguridad de los alimentos y detectar contaminantes en el ambiente [Masiá y col. 2014]. Por ejemplo, para el análisis de neonicotinoides en miel (Capítulo 3), los sistemas de cromatografía líquida acoplados a espectrometría de masa CL-EM del tipo QqQ convencional y cuadrupolo-trampa de iones lineal (QTRAP) son los más empleados.

1.5.2.2.1 TRIPLE CUADRUPOLO (QqQ)

El cuadrupolo consiste en dos pares de barras metálicas de la misma longitud y diámetro, alineadas entre sí y equidistantes de un eje central imaginario. Las barras opuestas se conectan eléctricamente; un par se encuentra a potencial eléctrico positivo y el otro a potencial negativo. A cada par se le aplica una combinación de voltajes de corriente continua (CC) y de radiofrecuencia (RF) (de tipo oscilatorio), actuando un par como filtro de masas altas y el otro como filtro de masas bajas. Para una dada amplitud de voltajes de CC y de RF (que pueden ser variados por el operador), solo los iones con una relación masa/carga (m/z) resuenan adquiriendo una trayectoria estable que les permite atravesar el cuadrupolo y alcanzar el detector. Los otros iones se desestabilizan, cambian su trayectoria e impactan en las barras. De esta forma, el cuadrupolo se comporta como un filtro, generalmente configurado para transmitir iones con una relación m/z seleccionada. Este modo de operación se denomina monitoreo de ion selectivo (SIM).

En el caso de realizar un barrido de masas abarcando un amplio rango de m/z , CC y RF se varían mientras su relación se mantiene constante. La masa que logra pasar por

el Q está relacionada en forma lineal con la amplitud de voltaje aplicado. A este modo de operación se lo denomina modo de barrido o SCAN.

Para la identificación y cuantificación se suele operar en modo SIM debido a que el modo SCAN no resulta lo suficientemente sensible. Cuando se opera en el modo SIM, es necesario conocer y seleccionar previamente en el software las relaciones m/z de los iones a detectar, aquellas m/z no configuradas en el sistema no serán detectadas. Es decir, que es ideal para trabajar en la identificación y cuantificación de compuestos conocidos. Cuando se requiere monitorear compuestos desconocidos, dado que el modo de barrido es poco sensible, se corre el riesgo de no detectar adecuadamente los compuestos presentes. Para estos casos hay que emplear otros analizadores más adecuados.

El QqQ consiste en dos cuadrupolos simples (Q1 y Q3) separados por una celda de colisión (q) que fragmenta los iones enfocados en Q1, al colisionar con gas argón. En un sistema QqQ se definen diferentes modos de operación, de acuerdo a si se trabaja en modo SCAN o SIM en cada uno de los cuadrupolos. El monitoreo de reacciones múltiples (MRM) es el que se emplea para la cuantificación de compuestos conocidos. En este modo Q1 selecciona el ión de interés y lo envía a la celda de colisión donde es fragmentado, mientras que en Q3 se monitorea uno, dos o tres iones productos específicos seleccionados. Este modo permite una gran especificidad que conduce a una mayor selectividad y disminuye el ruido notablemente, alcanzándose mayores sensibilidades y menores límites de cuantificación [Wong y col. 2018].

El sistema QTRAP se basa en el mismo funcionamiento que un sistema QqQ convencional. Sin embargo, difieren en que el Q3 de un QTRAP también puede funcionar como una trampa de iones lineal (LIT). Esta funcionalidad dual de Q3 proporciona al sistema QTRAP un complemento de su utilidad como un espectrómetro de masas de QqQ con funciones adicionales de escaneo cualitativo. Estas funciones adicionales de escaneo de LIT mejoran la flexibilidad del sistema QTRAP para aplicaciones tales como la identificación, detección y confirmación [Sage 2019].

1.5.2.3 SISTEMAS ACOPLADOS CL-EM

El amplio espectro de aplicaciones que presentan los CL-EM se explica debido a que los analizadores de masa tienen características ideales para ser acoplados a CL, como velocidades altas de escaneo, tiempos de lectura (dwell) de 1 ms (permitiendo la obtención de suficientes puntos para formar el pico) y cambios de polaridades en 30 ms o menos [López-Ruiz y col. 2019]. Cuando el CL es un cromatógrafo líquido de ultra alta eficiencia (UHPLC), aumenta el poder de resolución y la supresión de la señal se minimiza debido a que disminuye la coelución de interferencias de la matriz.

La cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a espectrometría de masa en tándem (UHPLC-MS/MS) es ampliamente empleada en varios campos de investigación, como el análisis multiresiduo de plaguicidas en alimentos o muestras ambientales y biológicas, incluyendo bioanálisis, metabolismo de drogas y metabolómica [Masiá y col. 2014].

El principal problema para acoplar la CL con espectrometría de masa radica en la incompatibilidad que existe entre los volúmenes de solvente que eluyen de la columna cromatográfica y los requerimientos de vacío del espectrómetro de masa. Para solucionar este problema han sido diseñadas diferentes interfaces. Hay dos interfaces con sus correspondientes modos de ionización que son los más aplicados en la actualidad en CL-EM para el análisis de plaguicidas: la ionización química a presión atmosférica (APCI) y la ionización por electroespray (ESI). Ambos sistemas ofrecen mayores sensibilidades a menores flujos. De hecho, ESI puede ser fácilmente aplicada en sistemas de microfluídos [Pena-Pereira 2014].

El espectrómetro de masa con el que se llevó a cabo el presente trabajo de investigación cuenta con una fuente de ionización del tipo ESI. Por ello, se detalla su modo de funcionamiento en la siguiente sección.

1.5.2.3.1 IONIZACIÓN POR ELECTROESPRAY (ESI)

La ESI es uno de los métodos de ionización más recientemente desarrollados en espectrometría de masa. El diseño y operación de fuentes ESI usadas comúnmente en los espectrómetros de masa están basados en diseños de Whitehouse y col. (1985).

Este tipo de fuente de ionización puede operar en modo positivo o negativo. Para el análisis de neonicotinoides se la emplea en modo positivo (ESI+), y en este modo, opera de la siguiente manera (Fig. 1.8). En primer lugar, el eluyente de la CL es introducido a través de una aguja nebulizadora que se encuentra a potencial alto. Este potencial genera la ionización de todas las moléculas, es decir, las que provienen de los analitos, la matriz, los clusters del solvente, etc. Además, como lo que eluye de la columna cromatográfica tiene alta presión y en la aguja se estrecha el paso del líquido, al salir este líquido de la aguja y disminuir la presión abruptamente, se forma la nebulización (gotas líquidas dispersas en fase gaseosa). La aguja, se halla enfrentada a un electrodo de bajo potencial, generándose así un campo eléctrico. Las gotas son conducidas mediante el campo eléctrico y por medio de un gas a alta temperatura (nitrógeno) se evapora el solvente no cargado. Conforme el solvente se evapora, las moléculas ionizadas se aproximan, se repelen y finalmente, cuando la repulsión de las cargas positivas vence la tensión superficial, estallan las gotas (Explosión de Coulomb). Este proceso continúa repitiéndose hasta que los iones están libres de solvente, de modo que quedan iones dispersos en fase gaseosa.

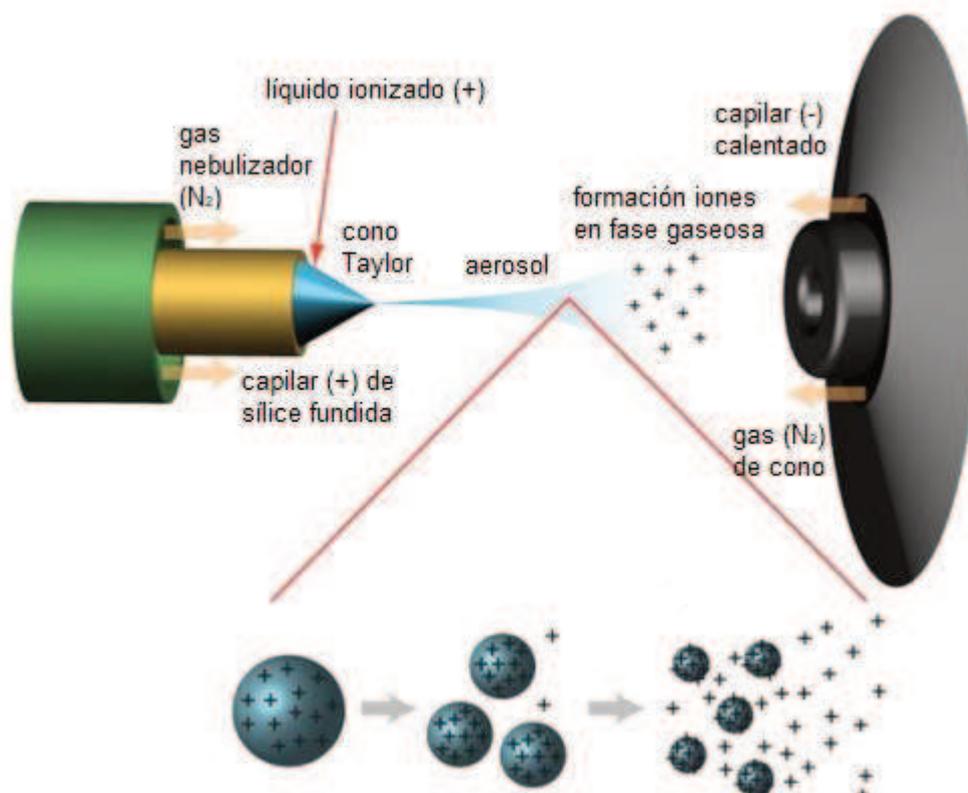


Fig. 1.8 Esquema de funcionamiento de una fuente de ionización ESI en modo positivo. El gas de cono (N_2) previene la formación de aductos como el $[M+Na]^+$ y mantiene limpio el cono de muestra. (Imagen adaptada de www.lamondlab.com).

1.5.3 VALIDACIÓN

Se requiere de la validación de los métodos para garantizar la calidad y comparabilidad de los resultados analíticos. En el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos uno de los documentos guía para el control analítico de la calidad y procedimientos de validación de métodos, es el establecido por la DG SANTE - DG for Health and Food Safety. Este organismo es el responsable de las políticas de la UE sobre seguridad y salud alimentaria. Dicho documento guía describe desde las condiciones óptimas de muestreo, transporte y almacenamiento de la muestra, hasta la manera en la que deben ser expresados los resultados. Este documento es complementario e integral a los requisitos de la ISO/IEC 17025 (2017), por lo tanto debe ser consultado durante las auditorías y acreditaciones de laboratorios oficiales de residuos de plaguicidas.

1.6 CONSIDERACIONES FINALES, CAPÍTULO 1

El uso intensivo de plaguicidas como los insecticidas neonicotinoides representa un riesgo para el ambiente debido a que los seres vivos quedan expuestos a sustancias químicas residuales que permanecen tras su aplicación. Las vías de exposición predominantes de los polinizadores a neonicotinoides son la dieta (es decir, el consumo de néctar y polen), el contacto (rociado directo) y los cursos de agua contaminados.

La complejidad que lleva experimentar con sistemas biológicos, como las colonias de abejas y su interacción con los agroecosistemas en los que se desarrollan, es uno de los aspectos más destacados de este trabajo. Los estudios a campos reales constituyen desafíos científicos de elevado interés para la ciencia actual, surgiendo la necesidad de armonizar e integrar los estudios de respuestas individuales de las abejas en condiciones de laboratorio con las respuestas poblacionales en condiciones reales de colonias de apiarios productivos [Carreck y Ratnieks 2014].

La generación de conocimiento acerca del impacto de la exposición de colonias de abejas a dosis controladas de neonicotinoides, combinado con la evaluación de la magnitud de la residualidad de los neonicotinoides en diferentes componentes de la colmena, contribuyen al análisis y propuesta de soluciones para la prevención de los riesgos que afecten la salud de las abejas y la inocuidad de las mieles.

Además de la pérdida de las colonias de abejas, la falta de uniformidad de los LMRs en los países es otra de las problemáticas a la que se enfrentan los productores apícolas, quienes deben responder a requisitos impuestos por los países destino para poder comercializar sus productos. Por la tanto, el desarrollo de metodologías analíticas que permitan conocer la concentración de neonicotinoides en mieles es de fundamental interés para los productores en vista de la necesidad de responder a estos requerimientos impuestos.

Es fundamental el perfeccionamiento de las técnicas de extracción de los neonicotinoides y sus metabolitos en muestras de esta naturaleza, utilizando materiales alternativos, diseñando los experimentos de manera tal de obtener altas recuperaciones para todos los analitos, considerando la miniaturización y la simplificación de las etapas de limpieza, así como también la compatibilidad con el sistema instrumental.

CAPÍTULO 2. PROCESAMIENTO DE MUESTRA. OPTIMIZACIÓN UNIVARIADA PARA ANÁLISIS DE IMD EN ABEJAS, POLEN Y PRODUCTOS DE COLMENA: CERA Y MIEL.

2.1 INTRODUCCIÓN

En este capítulo se presenta el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de IMD en muestras ambientales y productos de colmena, con el objetivo de ser aplicados en estudios de translocación y ocurrencia en cultivos regionales, y en ensayos de colonias de abejas expuestas artificialmente a este insecticida. Entre los neonicotinoides se seleccionó el IMD, por ser el neonicotinoide de uso más tradicional en la región y por su mayor toxicidad aguda para las abejas melíferas respecto a otros insecticidas de la familia.

Las matrices bajo estudio son polen, abejas y larvas, así como la miel y la cera obtenidas directamente de las colmenas, consideradas matrices complejas con composiciones químicas muy diferentes. Mientras que los componentes mayoritarios del polen son las proteínas y aminoácidos, lípidos y azúcares [FAO 1996], el cuerpo de los insectos es rico en lípidos, quitina y proteínas [Kiljanek y col. 2016]. La cera es una mezcla compleja de (> 300 compuestos) de hidrocarburos, ácidos grasos, esteroides y otras sustancias [Fratini y col. 2016] y la miel es una solución altamente concentrada en azúcares invertidos (fructosa y galactosa) que se obtiene a partir del néctar de las flores [Baroni y col. 2009]. En general, el análisis de estos productos es aún un desafío, y es necesario obtener metodologías simplificadas y confiables.

La cromatografía acoplada a espectrometría de masa, en diferentes configuraciones, es de las técnicas más empleadas para abordar el análisis de residuos de neonicotinoides en alimentos y muestras ambientales, incluyendo los productos de colmena. La cromatografía líquida con ionización por electroespray y detector de masa en tándem (LC-ESI-MS/MS), es empleada frecuentemente por su elevada sensibilidad en métodos multiresiduo que incluyen a la familia de los neonicotinoides para el análisis de tejido de abejas [Kaczynski y col. 2017], miel [Gbylik-Sikorska y col. 2015],

polen [Kasiotis y col. 2014] y cera [Niell y col. 2015, Herrera López 2016]. Asimismo, la cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa en tándem (GC-MS/MS) también ha sido empleada con un buen desempeño en el análisis de productos de colmena [Gil García y col. 2017, Chauzat y Faucon 2007], y otros estudios que combinan análisis por CG y CL [Kiljanek y col. 2016, Wiest y col. 2011, Ravoet y col. 2015].

En general, en estudios previos de productos de colmena, los procedimientos de extracción se basaron en estrategias QuEChERS con diferentes modificaciones. Por ejemplo, en abejas, Wiest y col. 2011 adicionaron una fracción de hexano al solvente extractante de manera de remover lípidos, otros autores adicionaron trietilamina a la fase extractante para generar un medio alcalino [Kasiotis y col. 2014, Kamel 2010]. Niell y col., por su parte, combinaron la d-SPE con freeze-out para la limpieza de los extractos [Niell y col. 2015]. Además, se adicionaron adsorbentes innovadores para la remoción de lípidos durante la etapa de d-SPE: extracción mejorada de matriz en lípidos (EMR-lipid), quitina y soporte de sílice recubierto con dióxido de circonio y C18 (Z-Sep+) [Kaczynski y col. 2017]. Otros autores optaron por el uso de cartuchos convencionales de SPE luego de la extracción con MeCN:acetato de etilo [Gbylik-Sikorska y col. 2015] (Tabla S2.1).

Para el análisis de plaguicidas en miel, nuevamente el QuEChERS es la elección más popular en el preparado de las muestras [Souza Tette y col. 2016]; sin embargo, la disolución de la muestra en agua y limpieza por SPE también se ha utilizado con frecuencia [Sánchez-Hernández y col. 2016, Jones y Turnbull 2016]. Un estudio que compara ambos procesamientos, QuEChERS y SPE, para el análisis de residuos de plaguicidas en miel expone resultados similares aplicando ambas metodologías [Calatayud-Vernich y col. 2016]. Considerando ambas matrices, abejas y miel, en algunos casos son propuestas condiciones similares en la preparación de las muestras, diferenciándose solo en el uso de determinados cartuchos de SPE para cada matriz [Gbylik-Sikorska y col. 2015] o la inclusión de un precalentamiento para procesar las muestras de miel con QuEChERS [Kasiotis y col. 2014]. Adicionalmente, algunas modificaciones mayores en los procesamientos de cada una de las muestras fueron introducidas por otros autores [Niell y col. 2015, Wiest y col. 2011] (Tablas S2.1 y S2.2).

En polen también se observa una predominancia en el empleo de QuEChERS para el tratamiento de las muestras. En general, comparándolo con otras matrices de colmena, se parte de menor cantidad de muestra inicial [Wiest y col. 2011] o se realiza una limpieza de los extractos más exhaustiva agregando más adsorbentes que en otras matrices como la miel [Niell y col. 2015], por contener altas cantidades de ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos. Sin embargo, otros trabajos no incluyeron modificaciones parciales para el procesamiento de esta matriz, comparándolo por ejemplo con abejas [Calatayud-Vernich y col. 2018], incluso con ambas, abejas y miel [Kamel 2010, Kasiotis y col. 2014] (Tabla S2.3).

La cera de abejas es una mezcla compleja que se presenta como una materia compacta sólida a temperatura ambiente (punto de fusión 61-66 °C) y es altamente insoluble en agua. Es secretada por las abejas obreras, constituye la estructura de la pared de las celdas de los panales de abejas y tiene diferentes funciones en la

actividad de la colonia. Las metodologías para ceras involucraron una previa fusión de la muestra incluyendo, en algunos casos, una dilución en solvente orgánico seguido de una extracción líquido-líquido y una etapa de limpieza SPE [Yáñez y col. 2013] o diferentes versiones de QuEChERS modificado [Niell y col. 2014, Calatayud-Vernich y col. 2018] (Tabla S2.4).

Considerando todos estos antecedentes analíticos, las metodologías analíticas para la determinación de IMD en los productos de colmena y muestras ambientales, fueron optimizadas en la etapa de preparación de las muestras, la separación y la detección del analito. Los métodos fueron validados siguiendo la normativa SANTE previamente a ser aplicados en el análisis de polen, néctar, abejas, larvas, miel y ceras provenientes de diversos ensayos a fin de evaluar el efecto de los neonicotinoides en abejas melíferas.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 ESTÁNDARES Y REACTIVOS

El estándar de IMD (98,9%) fue obtenido de Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania). Fueron preparadas soluciones estándares de trabajo a 1,0; 0,1 y 0,01 mg L⁻¹ en MeCN para la adición en los ensayos de recuperación y la confección de las curvas de calibrado. Asimismo, se prepararon soluciones de IMD en concentraciones de 0,1 y 0,01 mg L⁻¹ en alcohol isopropílico para adicionar la cera blanco. Todas las soluciones de trabajo fueron almacenadas a -10 °C. Los solventes, como alcohol isopropílico obtenido de AppliChem (Darmstadt, Alemania), MeCN y agua adquiridos de Sintorgan (Buenos Aires, Argentina), fueron de grado HPLC. El agua fue acidificada mediante el agregado de ácido fórmico de Fisher Chemical (98%) (Geel, Bélgica). El MgSO₄ fue comprado a AppliChem (Darmstadt, Alemania) y el NaCl a Carlo Erba Reagents (Val-de-Reuil, Francia). Para la limpieza de los extractos por d-SPE se utilizaron PSA Enviro-Clean® (Bristol, PA, EEUU), C18 Selectra® (Bristol, PA, EEUU) y carbón nanotubo multicapa (diam. 110-170 nm, long. 5-9 μm) Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania). Los filtros de jeringa (Econofilter, PTFE, 25mm × 0,2 μm) fueron obtenidos de Agilent Technologies (Santa Clara, EEUU).

Para el análisis instrumental el MeCN grado Optima® fue comprado a Fisher Chemical (Geel, Bélgica). El agua de grado CL (conductividad 18 MΩ cm⁻¹) se obtuvo mediante un sistema de purificación de agua MilliQ Millipore Ltd (Massachusetts, EEUU). La fases móviles fueron acondicionadas con ácido fórmico 98% Fisher Chemical (Geel, Belgium) de grado analítico.

Las soluciones de calibrado en solvente (0,1% ácido fórmico en agua:MeCN 98:2) se prepararon usando una dilución adecuada de los estándares de IMD de 1,0 y 0,1 mg L⁻¹. La calibración en matriz se realizó fortificando extractos de muestra blanco con alícuotas adecuadas de las soluciones de trabajo de 1,0 y 0,1 mg L⁻¹ para trabajar en el rango de concentración de 0,25 a 200 μg kg⁻¹.

Para los ensayos de recuperación, los blancos fueron fortificados con una alícuota apropiada de 0,1 y 0,01 mg L⁻¹ de solución estándar de trabajo para obtener dos

niveles de concentración de IMD. Previo a la adición de los estándares, se emplearon diversas metodologías para lograr un sistema más homogéneo, dependiendo de las características de la matriz. Así por ejemplo, las abejas fueron molidas en procesadora. En la miel, para reducir la viscosidad de la muestra se calentó la miel blanco en un baño de agua a 50 °C durante 10 min. Las ceras fueron fortificadas en estado líquido, una vez fundidas a 80 °C. El polen fue molido con mortero de manera de lograr una mayor área superficial. Luego, se adicionaron los blancos con el estándar para lograr las concentraciones deseadas y se agitó con vortex durante 30 s. Se almacenaron durante toda la noche a -20 °C y fueron procesadas el día siguiente.

La miel, la cera y las abejas blanco se obtuvieron de un apiario del INTA, Estación Experimental Agropecuaria (EEA Rafaela), localizado en la provincia de Santa Fe (31°12'S 61°30'O). Las muestras de polen blanco fueron recolectadas mediante trampas de polen, en colmenas de la estancia "La Palmira" ubicada en Las Avispas, departamento San Cristóbal, Provincia de Santa Fe. La ausencia de IMD en las muestras blanco fue corroborada por análisis en el sistema UHPLC-MS/MS.

2.2.2 EQUIPAMIENTO PARA PROCESAMIENTO DE MUESTRA

Las muestras fueron homogenizadas por molienda con procesadora Skymssen (Brusque, Brasil) y templadas mediante baño de agua termostatzado Arcano modelo SHZ-88 (CABA, Argentina). Para el pesado de las sales, adsorbentes y muestras se utilizó una balanza analítica Mettler Toledo, modelo AB204 (Columbus, EEUU). El centrifugado a temperatura ambiente se realizó en una centrífuga CAVOUR-VT 3216 (CABA, Argentina) de 3500 rpm y a 5 °C con centrífuga refrigerada Mixtasel BLT, J.P. SELECTA (Barcelona, España). La evaporación de los extractos se llevó a cabo en un concentrador de muestra de 30 puertos marca Thorbell (Santa Fe, Argentina) y la centrifugación de los extractos resuspendidos (paso previo a la inyección) se efectuó con micro centrífuga de ultra alta velocidad DLAB modelo D3024 (Beijing, China) de 15000 rpm.

2.2.3 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS Y ESPECTROMÉTRICAS DE MASA

El sistema UHPLC-MS/MS consistió en un UPLC Waters Acquity (Miliford, MA, EEUU) acoplado a un espectrómetro de masa QqQ Waters Misromass TQD (Manchester, Inglaterra) operando en el modo positivo de ESI. El UPLC fue equipado con una columna de 100 x 2,1 mm (d.i.) Waters Acquity BEH Shield RP18 (Dublin, Irlanda) protegida por un guarda columna 5 x 2,1 (d.i.) Waters VanGuard (Dublin, Irlanda). Para la adquisición y el procesamiento de los datos se utilizó el programa Waters MassLynx versión 4.1 (Manchester, Inglaterra).

La elución se realizó en modo gradiente con una fase móvil binaria compuesta de 0,1% de ácido fórmico en agua:MeCN (98:2) (fase móvil A) y 0,1% de ácido fórmico en MeCN (fase móvil B) con un flujo de 0,35 mL min⁻¹ manteniendo la temperatura de la columna a 40 °C. Para el análisis de plaguicidas en CL generalmente se emplea la cromatografía de fase reversa con fases móviles que consisten en metanol o MeCN y

soluciones acuosas. El agregado de ácidos como el fórmico a las fases móviles, promueve la formación de los aductos $[M+H]^+$ en la fuente de ionización bajo el modo ESI+.

El programa de gradiente de fase móvil comenzó a 5% de B hasta los 0,25 min cuando empezó a incrementarse hasta 100% a los 7 minutos. Luego, se realizó un acondicionamiento para equilibrar la columna previamente a la próxima inyección. Para ello, se fue reduciendo la proporción de B hasta 75% en el minuto 8, y finalmente, se llevó a la composición inicial en el minuto 9 donde se mantuvo esta proporción por 1 minuto. La ventana de adquisición fue programada de 0 a 5 min y el tiempo remanente de corrida se implementó para reequilibrar el sistema. El volumen de inyección fue de 10 μL y la temperatura del automuestreador de 7 $^{\circ}\text{C}$.

La temperatura de la fuente fue programada a 120 $^{\circ}\text{C}$ con un flujo de nitrógeno de 10 y 400 L h^{-1} para el cono y el gas de desolvatación, respectivamente. La temperatura de desolvatación fue de 350 $^{\circ}\text{C}$. Se utilizó gas argón para la colisión con un flujo de 0,15 mL min^{-1} . La optimización del voltaje del cono y de la energía de colisión fue realizada por infusión de estándar de IMD a 0,1 mg L^{-1} . La interfaz ESI fue operada en modo positivo (ESI+) y el espectrómetro de masa en SIM, monitoreando dos transiciones precursor/producto. La transición de mayor intensidad fue utilizada para cuantificar (m/z 256,1 > 175,0), mientras que la segunda transición más abundante fue usada con propósitos de confirmación (m/z 256,1 > 209,1) (Fig. 2.1).

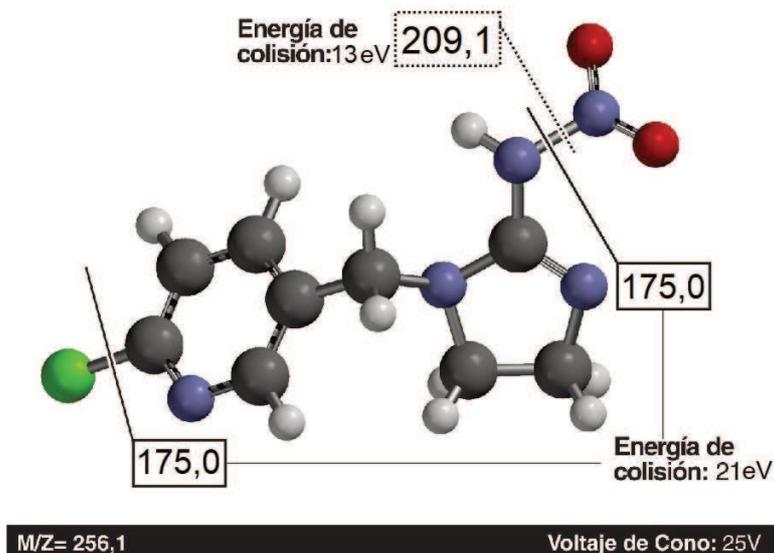


Fig. 2.1 Parámetros operacionales para el análisis de IMD en muestras ambientales y productos de colmena por UHPLC-MS/MS.

2.2.4 PROCESAMIENTO

2.2.4.1 ABEJAS, LARVAS Y MIEL

El desarrollo del método comprendió ensayos preliminares con diferentes alternativas de preparación de muestra adecuada para las tres matrices. El procedimiento

QuEChERS adoptado finalmente fue el siguiente: en un tubo falcon de 50 mL se pesaron 5 g de abeja, previamente homogeneizada mediante procesadora. Se procedió a la adición de 10 mL de una solución 2% de ácido fórmico en agua. Se agitó 10 s por vortex y se mantuvo la muestra en remojo por 1 h. Luego, se agregaron 10 mL de MeCN y se agitó por vortex durante 30 s. El siguiente paso fue la adición de 4 g de MgSO₄ y 2 g de NaCl seguido de una inmediata agitación manual por 2 min para prevenir la formación de aglomerados durante la hidratación del MgSO₄, y luego, se realizó un centrifugado de 5 min a 2500 rpm. Posteriormente, se tomaron 2 mL de la capa orgánica del extracto de la muestra y se transfirieron a un tubo falcon de 15 mL que contenía 300 mg de MgSO₄, 300 mg de PSA y 200 mg de C18. Luego, se agitaron los tubos manualmente de manera vigorosa por 1 min y se centrifugaron durante 5 min a 2500 rpm. Se tomó 1 mL del extracto y se concentró hasta sequedad bajo condiciones controladas de temperatura (50 °C) con corriente de nitrógeno y se resuspendió con 1 mL de 0,1% de ácido fórmico en agua:MeCN (98:2). Finalmente, los extractos fueron filtrados a través de filtros de 0,2 µm para el posterior análisis por UHPLC-MS/MS.

El mismo procesamiento de muestra con las siguientes modificaciones menores se aplicó para analizar IMD en las larvas de abeja y la miel. Las muestras de larva, fueron homogeneizadas en mortero de vidrio en lugar de ser molidas por procesadora. En las muestras de miel, para la etapa de hidratación se utilizó un baño de agua a 50 °C en vez de realizarse a temperatura ambiente como en las abejas.

2.2.4.2 CERA

La cera presenta una composición muy compleja. Se caracteriza por ser un producto con alto contenido de lípidos e hidrocarburos, constituyendo un material sólido con alto punto de fusión y baja solubilidad en agua. Por lo tanto, fue necesario ensayar diferentes condiciones de extracción para favorecer el contacto de los componentes de la matriz con los solventes extractantes. De esta manera, se realizaron tres propuestas de ensayo que se describen a continuación:

i) Al caracterizarse la cera por estar compuesta por una alta proporción de lípidos, se practicó un primer paso de disolución utilizando un solvente no polar: hexano o una mezcla de hexano:isopropanol (4:1); ayudando con una temperatura moderada para favorecer la posterior extracción [Yáñez y col. 2013]. El siguiente paso, la extracción cuantitativa del analito de esta mezcla líquida, es crítico. Por esta razón, se probó la capacidad extractora de distintos solventes: agua, agua ácida y MeCN saturado en n-hexano. El MeCN saturado en n-hexano se utiliza para la extracción de plaguicidas en muestras con alto contenido de lípidos de manera de minimizar el contenido de coextractantes [Castillo y col. 2011, Shin y col. 2020]. Teniendo en cuenta que la dilución con n-hexano no favoreció la posterior partición, se estudiaron volúmenes menores de este solvente. De esta manera, al reducir el volumen de n-hexano de 15 a 2 mL se introdujo la necesidad de aumentar la temperatura para fundir y disolver la cera de 50 a 70 °C (Tabla 2.2). Sin embargo, no contribuyó significativamente a una mayor eficiencia de la recuperación y aumentó considerablemente el efecto matriz (EM) en las mediciones espectrométricas de masa.

ii) Al ser el IMD un compuesto altamente soluble en dimetilsulfóxido (DMSO) ($> 200 \text{ g L}^{-1}$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}$), y a su vez el DMSO insoluble en cera [Banasiak 2000, Gaylord Chemical Company 2007], se incluyó a este solvente en la solución extractante MeCN:DMSO (8:2) pero no se observaron mejoras significativas en las recuperaciones. Además, se empleó ultrasonido durante la etapa de extracción pero tampoco contribuyó significativamente en la mejora de los resultados.

iii) Finalmente, se alcanzaron mejores resultados cuando se realizó una agitación secuencial y vigorosa durante la etapa de extracción [Niell y col. 2014]. De esta manera, lo que se realizó es una extracción repetitiva por etapas. Habitualmente, en este tipo de extracción fraccionada se realiza de forma secuencial un número determinado de extracciones simples retirando después de cada equilibración la fase extractante y poniendo en contacto la matriz nuevamente con solvente fresco. Sin embargo, consecuentemente, obtendríamos un analito más diluido en el extracto. Por lo tanto, se optó por repetir el proceso de agitación y reposo, en un baño termostatzado a 80°C , de manera de aumentar el contacto del solvente con la matriz y obtener mayor eficiencia en la extracción sin el agregado de solvente fresco en cada etapa de la secuencia.

En el método final se pesaron 2 g de cera templada en un tubo falcon de 50 mL y se incubaron a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ en un baño termostatzado hasta fundirse. Luego se agregaron 10 mL de MeCN y se agitó mediante vortex por 15 s. Después, se colocó nuevamente en el baño para fluidificar la cera, se agitó por vortex durante 15 s y se devolvió al baño de agua. Este procedimiento fue repetido 3 veces. Para precipitar la cera, se dejó el tubo toda la noche a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Se transfirió una alícuota de 2 mL del líquido sobrenadante a un tubo falcon de 15 mL que contenía 300 mg de PSA y 200 mg de C18. Se agitó el tubo manualmente durante 1 min y se centrifugó durante 5 min a 4000 rpm y $5 \text{ }^\circ\text{C}$. Los extractos fueron llevados a sequedad en condiciones de temperatura controlada y resuspendidos en 0,1% de ácido fórmico en agua:MeCN (98:2). Luego, fueron centrifugados a 15000 rpm durante 10 min y finalmente, fueron filtrados a través de filtros de $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ previo al análisis por UHPLC-MS/MS.

2.2.4.3 POLEN Y NECTARIOS FLORALES

El método utilizado fue desarrollado y discutido en la tesina de grado de la autora del presente trabajo [Michlig y col. 2015]. Para la realización de estos análisis se trabajó sobre la miniaturización del método QuEChERS debido a la dificultad que conlleva la toma de muestra del polen y los nectarios florales. Brevemente, en un tubo falcon de 15 mL se pesaron 500 mg de muestra previamente homogenizada en mortero. Se adicionaron 2 mL de una solución 2% de ácido fórmico en agua y se dejó en remojo durante 1 h. Se adicionaron 2 mL de MeCN y se agitó durante 1 min con vortex. Luego, se adicionaron 800 mg de MgSO_4 y 200 mg de NaCl, se agitó manualmente durante 5 min y se procedió al centrifugado a 2500 rpm durante 5 min. Posteriormente, se tomaron 1,5 mL de extracto y se transfirieron a un tubo falcon de 15 mL que contenía 225 mg de MgSO_4 :nanotubos de carbón (99:1), 225 mg de PSA y 75 mg de C18. Se agitó manualmente durante 1 min y se centrifugó nuevamente a 2500 rpm durante 5 min. Se tomaron 800 μL del extracto, se llevaron a sequedad con

temperatura controlada, se resuspendieron con 0,1% de ácido fórmico en agua:MeCN (98:2) y se filtraron previo al análisis cromatográfico.

2.2.5 VALIDACIÓN

Las validaciones fueron llevadas a cabo siguiendo el documento guía vigente redactado por la UE para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos. De esta manera, la validación para el análisis de IMD en polen y nectarios florales se realizó siguiendo la SANTE 11945 [SANTE 2015], y para la cuantificación de IMD en abejas, larvas, miel y cera se realizó la validación de acuerdo con la SANTE 11813 [SANTE 2017]. En todos los casos se determinó selectividad, límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC), linealidad, repetibilidad y precisión intermedia. Para asegurar la selectividad del método, matrices blanco con y sin adición de estándar fueron inyectadas en el sistema LC-ESI-MS/MS. Dado que los sistemas de cromatografía líquida-espectrometría de masa presentan en general una supresión de la señal por efecto de la matriz, se evaluó este efecto en el rango de concentraciones presumibles a ser encontradas en las muestras comparando curvas de calibrado en solvente y en matriz. Finalmente, las cuantificaciones se realizaron utilizando las curvas de calibrado en matriz. Para evaluar la repetibilidad y precisión intermedia, se realizaron recuperaciones por quintuplicado a dos niveles de concentración, en todos los casos uno de estos niveles fue el LC.

2.2.5.1 LINEALIDAD Y EFECTO MATRIZ (EM)

Para evaluar el efecto matriz, se realizó la adición del estándar a un extracto de muestra blanco a diferentes niveles de concentración para obtener la curva de calibrado en matriz. La pendiente de esta curva (b_1) se comparó con la de la curva de calibrado en solvente (b_2). Cuando el efecto matriz resulta significativo, en caso de más del 20% de supresión o intensificación de la señal, para la cuantificación de residuos de plaguicidas se emplean curvas de calibrado en matriz. La cuantificación por curva de calibrado en el rango de concentración del analito de interés, es apropiada para la obtención de resultados más precisos [SANTE 2019]. Comprensiblemente, la muestra y el blanco deben poseer similar naturaleza química para mitigar el efecto supresor o intensificador de la señal, que producen los coextractos.

Se evaluó la linealidad y el EM mediante la inyección de siete niveles de concentración preparados en fase móvil A (0,1% de ácido fórmico en agua:MeCN (98:2)), y en el extracto del blanco de cada matriz (calibración del tipo estándar en matriz), en rangos de concentración entre 0,25 y 200,00 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Se compararon las pendientes de ambas curvas de regresión lineal mediante la siguiente fórmula [SANTE 2017]:

$$EM (\%) = [(b_1 - b_2) / b_2] * 100 \quad (\text{Ec. 2.1})$$

siendo EM (%) el efecto matriz porcentual, b_1 =pendiente de la línea de regresión en matriz, b_2 =pendiente de la línea de regresión de la curva de calibrado en solvente.

Adicionalmente, se respaldó la presencia de EM aplicando la prueba estadística de la t de Student [Massart y col. 1998] utilizando el software estadístico Statgraphic Centurion XVI.I (Virginia, EEUU).

2.2.5.2 PARÁMETROS DE DESEMPEÑO

El LD y el LC se determinaron midiendo la magnitud del ruido y de la respuesta analítica. Se estimó el LD como la señal que resultó 3 veces la desviación estándar de la media de las determinaciones en el blanco y el LC como 10 veces esta desviación. Para los niveles del LC, además se verificó que las recuperaciones cumplan con los criterios de aceptabilidad de 70-120% con desviaciones estándar relativas (DER) $\leq 20\%$ [SANTE 2019].

Para evaluar la repetibilidad y la precisión intermedia, se realizaron recuperaciones a dos niveles de concentración (nivel del LC y nivel de 20 veces el LC -20xLC-). Los porcentajes de recuperación se calcularon de la siguiente manera:

$$\text{Recuperación (\%)} = \text{concentración medida} / \text{concentración nominal} \times 100 \quad (\text{Ec. 2.2})$$

Donde, la concentración nominal es la concentración teórica de la muestra fortificada, y la concentración medida, la obtenida mediante el sistema UHPLC-MS/MS a partir de la curva de calibración en matriz.

Además, para la cuantificación se verificó la relación (Q/q) entre los iones de cuantificación (Q) y de confirmación (q) de manera que cumpla con el criterio $\pm 30\%$ (relativo), comparando los extractos de la muestra con el promedio de los estándares de calibración de la misma secuencia.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE PROCESAMIENTO

2.3.1.1 ABEJAS Y MIEL

El analito de interés, IMD, es un compuesto relativamente no volátil, soluble en agua y polar. Sus principales características fisicoquímicas están detalladas en la Tabla S2.5 (material suplementario). El método QuEChERS fue aplicado exitosamente en una amplia variedad de matrices para una gran cantidad de compuestos incluido el IMD, sin embargo ha sido escasamente empleado en muestras de insectos [Haroune y col. 2015]. Además de la versión original del QuEChERS se han desarrollado otros usando soluciones tamponadas (Fig. 1.7). Asimismo, para el análisis multiresiduo en matrices secas (menos de 40% de humedad) Lacina y col. observaron recuperaciones más altas cuando disminuyeron el pH de remojo [Lacina y col. 2012]. Por esta razón, se optó por seguir la versión original, más simple teniendo en cuenta un solo compuesto de polaridad intermedia como el IMD, que no presenta inestabilidad dependiente del pH del medio. Se introdujeron modificaciones para incrementar la eficiencia del

método en una matriz básica como el tejido de abeja molido (pH=8), aumentando los porcentajes de recuperación y disminuyendo los efectos de la matriz.

En base a todas estas consideraciones y teniendo en cuenta las dificultades adicionales de maceración y homogenizado de las muestras compuestas por tejido de abeja con bajas humedades, se eligió un nivel medio de peso de muestra inicial (5 g) (Tabla S2.1) compatible con los LC requeridos y menor efecto matriz.

Se optimizó el procedimiento de extracción en abejas blanco adicionadas con la solución de trabajo de IMD en MeCN. Se introdujo una etapa de hidratación o remojo con agua acidificada con ácido fórmico. El tiempo de remojo de 1 h fue adecuado para completar la disolución del analito y mejorar las condiciones para la extracción con MeCN.

Para la partición se ajustó la relación de sales de salting-out con el agua de hidratación. Se realizaron ensayos con las relaciones 0,8 g MgSO₄ por mL de agua y 0,4 g MgSO₄ por mL de agua manteniendo la relación 0,2 g NaCl por mL de agua. Como no se observaron diferencias significativas ni en los valores de recuperación ni en el EM se trabajó con la segunda opción, donde se utilizan menos cantidad de sales. Esta relación fue conveniente para economizar reactivos pero también para disminuir la carga de sales inorgánicas de magnesio y sodio que comprometen el rendimiento y mantenimiento del sistema de espectrometría de masa.

La limpieza del extracto obtenido es otra etapa importante en la preparación de las muestras y el uso de adsorbentes sólidos en modo dispersivo es una forma muy efectiva de eliminar coextractivos en matrices orgánicas complejas. Se ha demostrado que un aumento en la proporción de PSA en la mezcla de adsorbentes, incluida la adición de C18, es específicamente efectivo para mejorar la eliminación de compuestos grasos de la matriz [Lehotay y col. 2010]. Sin embargo, se sabe que el PSA puede retener analitos polares como el IMD. Por esta razón, se realizó una comparación del procesamiento de muestra con y sin la limpieza de los extractos mediante d-SPE. Al obtenerse una similar relación señal/ruido (S/R= 15) al nivel de 0,5 µg kg⁻¹ empleando d-SPE que al nivel de 1 µg kg⁻¹ sin la limpieza de los extractos (Fig. 2.2), se seleccionaron estas dos concentraciones para estudiar las recuperaciones con y sin empleo de d-SPE en el nivel bajo de concentración. Para el nivel alto, se optó por estudiar las recuperaciones al nivel de 20 veces el nivel bajo (20 x nivel bajo) de manera que se evaluaron a 10 µg kg⁻¹ cuando de empleó d-SPE y a 20 µg kg⁻¹ sin esta etapa de limpieza (Tabla 2.1).

Tabla 2.1 Valores de recuperación obtenidos con y sin empleo de d-SPE.

Nivel	R (%) ^a con d-SPE (n=5)	R (%) ^a sin d-SPE (n=5)
0,5 µg kg ⁻¹	70 (20)	n.e.
1,0 µg kg ⁻¹	n.e. ^b	91 (16)
10,0 µg kg ⁻¹	73 (8)	n.e.
20,0 µg kg ⁻¹	n.e.	75 (6)

^a Recuperación porcentual calculada usando la Ec. 2.2 y desviación estándar relativa (DER) de quintuplicados entre paréntesis.

^b n.e.: no evaluado

Se observó que se obtuvieron mayores recuperaciones sin el empleo de d-SPE. Sin embargo, el EM de supresión aumentó notablemente de 11%, cuando se realizó la d-SPE, a 45% en extractos sin etapa de limpieza afectando la selectividad, elevando el ruido y los límites de detección y cuantificación (Fig. 2.2).

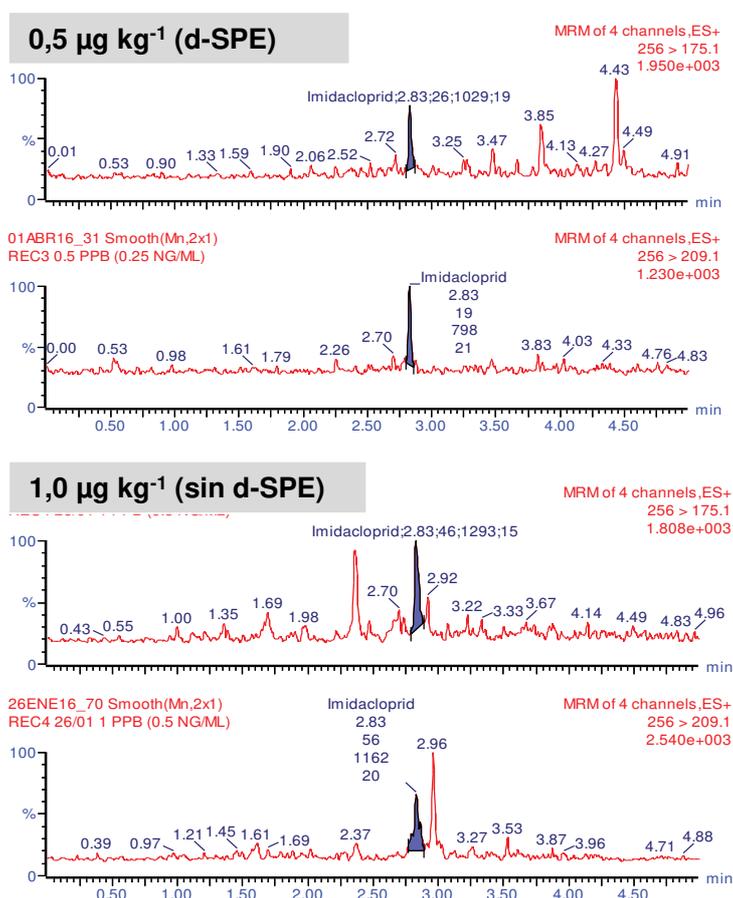


Fig. 2.2 Cromatogramas SIM, transiciones de cuantificación y confirmación (con sus respectivos tR, áreas, alturas y relación señal/ruido), de IMD en extractos de abeja: 0,5 µg kg⁻¹ con d-SPE (arriba) y 1 µg kg⁻¹ sin d-SPE (abajo).

Finalmente, el procedimiento de validación y el procesamiento de las muestras fueron realizados empleando la alternativa que incluye a la limpieza de los extractos mediante d-SPE para detectar concentraciones más bajas y preservar el instrumento.

El método desarrollado para determinar IMD en abejas también fue implementado para tratar muestras de miel incorporando una modificación durante la etapa de hidratación. A pesar de ser la miel una matriz ácida con valores de pH entre 3,4 y 6,1, fue compatible con el procedimiento de remojado en agua propuesto. Sin embargo, en este caso, la temperatura empleada se elevó hasta los 50 °C para favorecer la disminución de su viscosidad y su solubilización en el agua.

Otro paso que contribuyó a la disminución de los LC y LD, así como a la minimización de la asimetría de los picos y mejoras en la resolución logrando una mejor separación del analito de los coextractantes, fue llevar a sequedad los extractos obtenidos y resuspenderlos con un solvente acuoso, 0,1% de ácido fórmico en agua:MeCN (98:2), que es la fase móvil inicial en el sistema cromatográfico. Del mismo modo que cuando se utilizó d-SPE, la resuspensión en esta solución rica en agua ayudó a eliminar grasa remanente, especialmente en las muestras más lipídicas como abejas y cera. La mayor eficiencia lograda en términos de forma de pico con una base estrecha y un ruido más bajo permitió una cuantificación más precisa y preservar la vida útil de la columna justificando este paso adicional en el procedimiento. Otra manera de obtener estos resultados, es diluyendo los extractos con soluciones acuosas. Sin embargo se optó por la evaporación y la resuspensión en soluciones acuosas por lograrse niveles de LC más bajos.

El uso de MeCN en el método QuEChERS, reduce la coextracción de lípidos si lo comparamos con otros solventes como acetona o acetato de etilo, esto cobra especial importancia cuando se trabaja con matrices complejas como el cuerpo de las abejas o las ceras. Además, el empleo de una mezcla de adsorbentes basada en una mayor proporción de PSA y C18 respecto del método original también permitió minimizar los coextractos de las matrices grasas, a niveles compatibles con EM aceptable, buena sensibilidad y prolongando la periodicidad en el mantenimiento del equipo. El procedimiento completo de preparación tal como se presenta aquí, no utiliza solventes no-polares adicionales (hexano), sales tamponantes o adsorbentes alternativos (materiales de diatomeas, alúmina, florisil, Z-sep+, etc.) (Tabla S2.1) implicando un versión simple de QuEChERS comparándolo con otros abordajes de la bibliografía para resolver la complejidad analítica en matrices de productos de colmena.

2.3.1.2 CERA

Al utilizarse la partición del analito entre la fase no polar (cera disuelta en hexano o hexano/isopropanol) y la fase polar o extractante (agua ya sea acidificada o no y/o MeCN saturado en n-hexano), no se alcanzaron los rendimientos aceptados por la SANTE, se obtuvieron recuperaciones debajo del 70% (Tabla 2.2).

El problema de disolver la cera en isopropanol, tal como lo proponen Yáñez y col. (2013), radica en que es particularmente difícil estimar el volumen final de los extractos dado a que la solubilidad del isopropanol en n-hexano y en la fase acuosa extractora es similar [Skrzecz y col. 1999]. Por lo tanto en los ensayos subsiguientes, se eliminó el uso de isopropanol.

De todas maneras, la alta solubilidad del IMD en isopropanol y a su vez la óptima impregnación de este solvente a la cera nos condujo a seleccionarlo, finalmente, como solvente de las soluciones estándares de fortificación para el cálculo de recuperaciones en la matriz cera.

Tabla 2.2 Ensayo de diferentes sistemas de disolución de cera (2 g) para el análisis de IMD 20 µg kg⁻¹.

Solvente	hexano / i-prop ^a (4:1)	hexano / i-prop (4:1)	hexano	hexano	hexano	hexano
Volumen (mL)	15	15	15	15	2	2
Temperatura (°C)	50	50	50	50	50	70
Solvente extractante	agua	2% AF ^b	agua / MeCN ^c (4:1)	MeCN ^c	2% AF / MeCN ^c (1:1)	2% AF / MeCN ^c (4:1)
Volumen (mL)	10	10	10	10	10	10
R (%)^d	55 (14)	61 (7)	60 (11)	57 (6)	56 (6)	64 (8)

^a iso-propanol (i-prop)

^b ácido fórmico (AF)

^c MeCN saturado con n-hexano.

^d Recuperación porcentual calculada usando la Ec. 2.2 y desviación estándar relativa (DER) de quintuplicados en paréntesis.

El procedimiento adoptado final incluyó un aumento en la temperatura inicial a 80°C para asegurar la fusión total de la cera y su homogenización, y la eliminación de la disolución con n-hexano debido a las dificultades de trabajar con este solvente a esta temperatura. Se seleccionó MeCN como solvente extractante por su mayor afinidad con un espectro de plaguicidas que el agua, y por lo tanto el método resulta más versátil al mejorar el alcance de los analitos en futuras aplicaciones. Asimismo, el mayor número de coextractos que puede generar trabajar con este solvente de menor polaridad que el agua, que solubiliza pequeñas porciones de compuestos no polares (lípidos), se complementó combinando freeze-out y d-SPE en la limpieza de los extractos. De esta manera, se logró una extracción eficiente mediante la mezcla de cera fundida y MeCN (relación 1:5) a 80 °C, favorecida por la repetición de la agitación en vortex durante 15 s cuatro veces. Previamente a la limpieza por d-SPE con PSA y C18, se realizó el proceso de freeze-out (-20 °C) para precipitar componentes grasos [Niell y col. 2014]. Un aspecto crítico en el proceso de freeze-out fue proceder rápidamente, manteniendo las temperaturas bajas al tomar la alícuota de extracto que luego será inyectada al sistema UHPLC-MS/MS. De esta forma, se logró un procedimiento con las mismas estrategias generales utilizadas para las otras matrices de colmena. El uso de MeCN y temperatura durante la extracción, la etapa de freeze-out y el empleo de PSA y C18 para la limpieza de los extractos, permitieron obtener un método eficiente para una matriz compleja rica en material graso.

2.3.2 VALIDACIÓN

En primer lugar, se estudió la presencia de interferencias de las matrices estudiadas y se corroboró la ausencia de picos cromatográficos en el tiempo de retención del IMD en las muestras blanco. Posteriormente, se evaluaron las curvas de calibración y la linealidad. En esta etapa se confirmó la homocedasticidad de los datos para el rango de concentración estudiado. A continuación, se evaluaron la exactitud y la precisión mediante el análisis de recuperaciones de muestras blanco (abejas, miel, cera) adicionadas.

2.3.2.1 LINEALIDAD Y EM

Los resultados obtenidos del análisis de regresión se consideraron satisfactorios; en todos los casos se verificó un coeficiente de correlación de regresión lineal (R^2) igual a 0,99 con desviaciones de la concentración calculada respecto de la nominal menor o igual al 20%. Estos resultados luego fueron reevaluados mediante análisis estadísticos con el test F (Material suplementario-Análisis estadísticos). Este test cuantifica si la varianza residual es mayor que el error cuadrado puro derivado del estudio de muestras replicadas [Olivieri 2015].

Se estudió el EM comparando las pendientes de las curvas de calibrado en solvente y matriz a través de la ecuación 2.1. En los tres casos, se observaron EM negativos consistentes con la supresión de iones frecuentemente observada en el proceso de ESI (LC-ESI-MS/MS). Los valores de EM fueron -11, -3 y -6% para las abejas, miel y cera, respectivamente, y pueden considerarse como casos en que no necesitan abordarse las curvas de calibrado en matriz de acuerdo con los criterios de la SANTE 11813 ($EM < \pm 20\%$) [SANTE 2017].

Sin embargo, siguiendo otros criterios más restrictivos para evaluar el EM, como la comparación de pendientes a través del test t [Massart y col. 1998], solo la miel satisface la condición de cumplimiento de la hipótesis nula (ambas pendientes son iguales) para un nivel de confianza del 90% (Material suplementario-Análisis estadístico). De todas maneras, se decidió realizar las cuantificaciones de las muestras a través de curvas de calibrado en matriz.

2.3.2.2 EXACTITUD Y PRECISIÓN

La exactitud como una combinación de la precisión y la veracidad fue evaluada a través de ensayos de recuperación, utilizando las metodologías previamente optimizadas y cinco réplicas de cada matriz enriquecida con estándares a dos niveles de concentración (LC y veinte veces este nivel $-20 \times LC$) (Tabla 2.3). Las recuperaciones promedio en los dos niveles se consideraron satisfactorias en la etapa de validación para la miel (85-88%), cera (97-101%) y abejas (70-73%) con una repetibilidad asociada en términos de DER debajo del 20%. En el caso de las abejas,

se verificó una menor eficiencia en las recuperaciones, reflejando la complejidad de la matriz como una mezcla heterogénea de compuestos orgánicos. Esta matriz mostró un rendimiento sistemáticamente diferenciado, con mayores variabilidades de las recuperaciones e interferencias de la matriz (Tabla 2.3). Las tres metodologías se desempeñaron adecuadamente con recuperaciones dentro de los criterios de aceptabilidad (R=70-120% y DER ≤20%) de acuerdo a las especificaciones de la SANTE [SANTE 2017].

Tabla 2.3 Límite de detección, límite de cuantificación, rango lineal, porcentaje de recuperación y efecto matriz calculados para IMD en productos de colmena.

Producto de colmena	LD µg kg ⁻¹	LC µg kg ⁻¹	Rango lineal µg kg ⁻¹	R (%) ^a nivel LC (n=5)	R (%) ^a 20 x LC (n=5)	EM ^b (%)
Abejas	0,20	0,50	0,50 - 200	70 (20)	73 (8)	-11
Miel	0,10	0,25	0,25 - 200	88 (12)	85 (4)	-3
Cera	0,40	1,00	1,00 - 200	97 (16)	101 (4)	-6

^a Recuperación porcentual, calculada usando la Ec. 2.2 y desviación estándar relativa (DER) de quintuplicados en paréntesis.

^b Efecto matriz porcentual, calculado usando la Ec. 2.1

2.3.2.3 DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES

En la tabla 2.3 se muestra que el nivel del LC para ceras resultó ser más alto que para las otras matrices debido, principalmente, a la mayor dilución inicial de las muestras de cera 1:5 (2 g de muestra en 10 mL de solvente de extracción) y a su complejidad, ya descrita (Sección 2.3.1.2), en la etapa de preparación de la muestra. Tanto para abejas como para miel la proporción muestra:solvente fue de 1:2 (5 g de muestra en 10 mL de solvente de extracción), sin embargo las menores interferencias y el mejor desempeño del método en mieles contribuyó a que presente menor LC comparándolo con las abejas. De todas maneras, todos los LC verificados en el rango de 0,25 - 1,00 µg kg⁻¹ fueron altamente satisfactorios para cumplir con el propósito del estudio y pueden considerarse consistentes con otros requisitos en análisis de IMD en muestras ambientales y alimentos.

La Fig. 2.3 muestra los cromatogramas de estándar en matriz a 1 µg kg⁻¹ y muestras reales en las cuáles se detectó IMD en las tres matrices a bajos niveles de concentración. En esta figura puede observarse el menor ruido de base que presenta la matriz miel respecto de las abejas y las ceras, lo que deriva en la obtención de un menor LC para esta matriz.

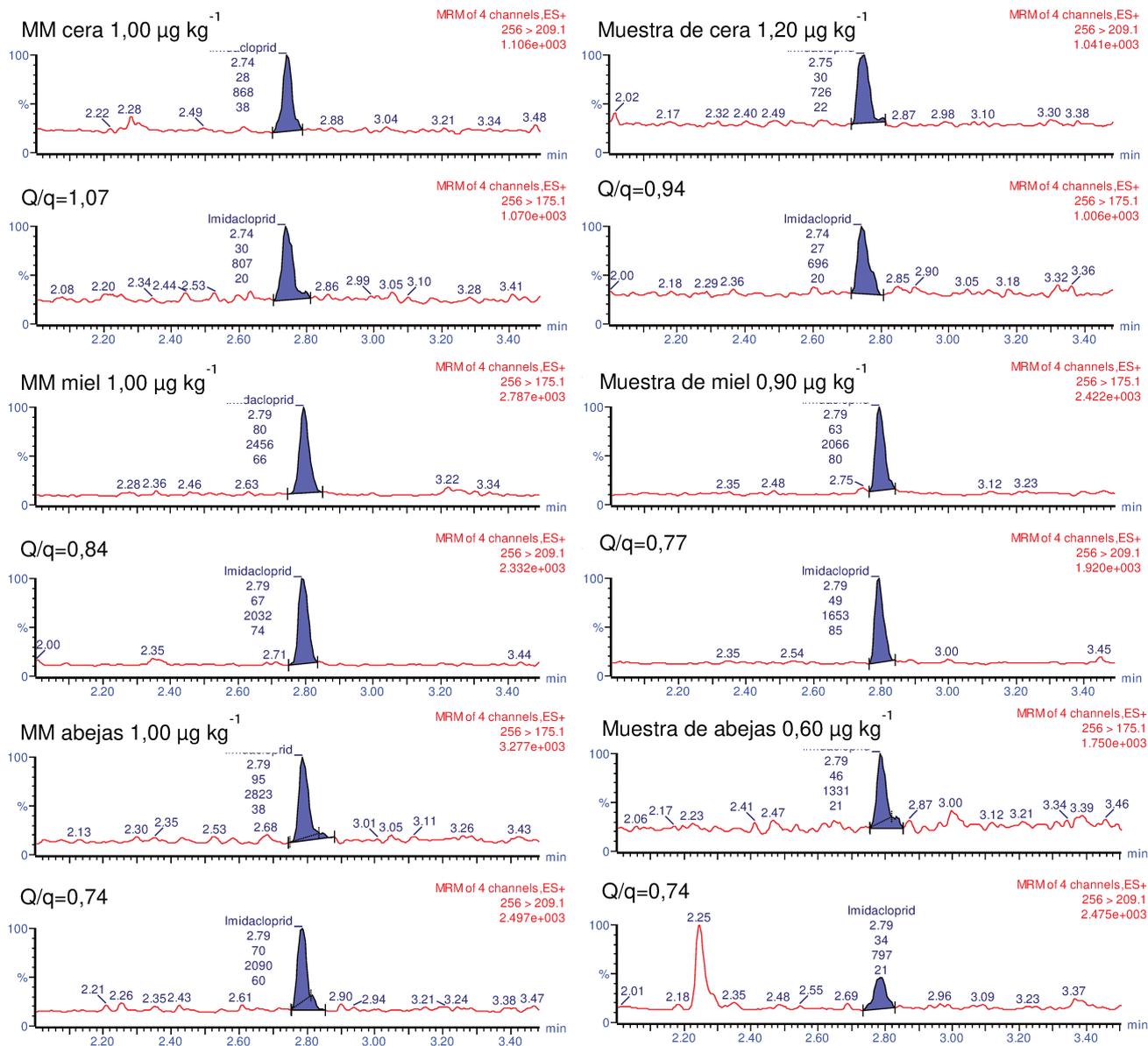


Fig. 2.3 Cromatogramas de iones seleccionados (transiciones de cuantificación -Q- y de confirmación -q-), con sus respectivos t_R , áreas, alturas y relación señal/ruido, de IMD en matriz y muestras reales de cera, miel y abejas; en concentraciones cercanas a los LCs.

2.3.2.4 IMD EN POLEN Y NECTARIOS

Al igual que en las matrices anteriores se comprobó la selectividad del método comparando extractos de polen blanco con ensayos de recuperación.

Se obtuvieron de esta manera un LD de $0,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ y un LC de $0,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ para el polen. La repetibilidad y precisión intermedia se evaluaron por repetición de cinco ensayos de recuperación en el nivel del LC y en un nivel 20 veces mayor. Como resultado se alcanzaron recuperaciones del $93 \pm 13\%$ para el nivel del LC y $101 \pm 9\%$ para el nivel restante. Para chequear el posible efecto de la matriz se comparó la curva de calibrado en solvente y en matriz en el rango lineal de $0,7\text{-}40 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Debido a la escasa cantidad de nectarios florales recolectados y a la faltante de muestra blanco, el mismo método optimizado y validado para el polen fue aplicado en el análisis de residuos de IMD en los nectarios. Esta es una práctica habitual en el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos donde, de manera de simplificar la labor del analista, se pueden utilizar matrices representativas para validar un método a ser aplicado en muestras de composición química similar [SANTE 2019].

Para el caso particular de los nectarios florales las cuantificaciones se realizaron con curvas de calibrado en solvente. Los LD y LC resultantes fueron de $0,04$ y $0,15 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, cumpliendo con el criterio de relación $S/R=3$ para el LD y $S/R=10$ para el LC.

2.4 CONSIDERACIONES FINALES, CAPÍTULO 2

Luego de estudiar el desempeño de parámetros importantes en las etapas de extracción y limpieza como el uso de PSA, concentración de extractos, uso de opciones de freeze-out y otras variables significativas, propusimos metodologías alternativas eficientes que podrán ser aplicadas satisfactoriamente en el análisis de IMD en muestras de colmena (abejas adultas, larvas, miel, polen y cera). El empleo de métodos basados en el QuEChERS para abejas, miel y polen, y en la partición líquido-líquido entre acetonitrilo y cera fundida ($80 \text{ }^\circ\text{C}$) resultaron ser eficientes, cumpliendo con los requerimientos de la validación para la obtención de resultados analíticos confiables. El agregado de adsorbentes no convencionales en d-SPE, como los nanotubos de carbono, aportó una alternativa para el empleo de métodos basados en el QuEChERS en matrices complejas como el polen, disminuyendo la demanda de mantenimiento del instrumento.

A continuación, se presentan de manera resumida las metodologías optimizadas para el análisis de IMD en los productos de colmena y muestras ambientales (Fig. 2.4).

Métodos optimizados

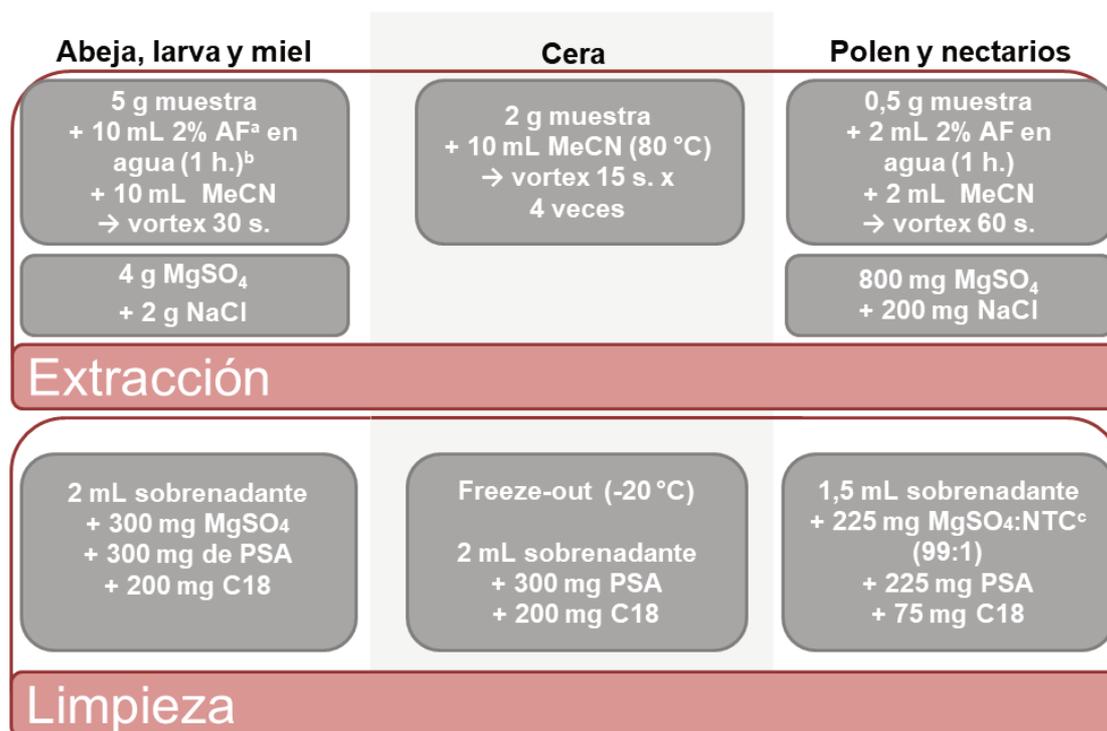


Fig. 2.4 Métodos optimizados para el análisis de IMD en abeja, larva, miel, cera, polen y nectarios florales. ^(a) AF: ácido fórmico, ^(b) remojo a temperatura ambiente para abejas y larvas, y a 50 °C en miel, ^(c) NTC: nanotubos de carbono.

Estas metodologías fueron las aplicadas para el análisis de las muestras del Capítulo 5 y parte de las del Capítulo 4, de manera de evaluar la translocación y la ocurrencia del IMD en cultivos regionales y el comportamiento de los polinizadores expuestos artificialmente a este insecticida.

Los métodos desarrollados y optimizados, quedan a disposición para responder a problemáticas de la región, especialmente relacionadas con el empleo de neonicotinoides como el IMD en agroecosistemas circundantes a poblaciones de abejas. Asimismo, pueden asistir a estudios de impacto ambiental teniendo en cuenta que las colonias de abejas y los productos de colmena son frecuentemente empleados como biomonitores.

CAPÍTULO 3. PROCESAMIENTO DE MUESTRA. OPTIMIZACIÓN POR DISEÑO DE EXPERIMENTOS PARA ANÁLISIS DE NEONICOTINOIDES EN MUESTRAS DE MIEL.

3.1 INTRODUCCIÓN

Con el objetivo de evaluar la ocurrencia de los neonicotinoides en miel y, por lo tanto, dar cuentas del grado de exposición de las abejas, tomando como referencia el método desarrollado para el análisis de IMD en miel mediante UHPLC-MS/MS, se optimizaron varios factores relevantes en el procesamiento de la muestra (método QuEChERS) y en la separación y la detección de los analitos, para obtener señales analíticas adecuadas para el análisis simultáneo de ocho neonicotinoides.

Como se mencionó anteriormente, la miel es una matriz dificultosa para el análisis de residuos de plaguicidas y se requieren eficientes procedimientos de limpieza de los extractos como paso previo a la detección y cuantificación de los analitos. Tal como se observa en la Tabla 3.1, SPE y el método QuEChERS fueron propuestos para remover compuestos interferentes de la matriz miel y desarrollar métodos analíticos multiresiduo basados en LC-ESI-MS/MS. Los métodos publicados exhibieron recuperaciones adecuadas para los neonicotinoides en estudio, fueron afectados por efecto matriz y se utilizaron para evaluar residuos de plaguicidas en mieles de diferentes procedencias. Por ejemplo, para las entradas 1 a 4, las muestras de miel fueron recolectadas directamente de colmenas en Polonia y Eslovenia; mientras que las entradas 5 y 6 incluyen mieles exhibidas en supermercados.

Es importante destacar que para abordar el tipo de estudios que se incluyen en la Tabla 3.1., que contemplan la ocurrencia de neonicotinoides en muestras de miel con diferentes objetivos (conocer el grado de exposición de las abejas en estudios de campo (entradas 1 a 4) o bien garantizar la inocuidad del alimento para proteger la salud del consumidor (entradas 5 y 6), es necesario contar con métodos que permitan obtener bajos niveles de cuantificación. Por lo tanto, y considerando que se pueden optimizar varios factores durante el procesamiento de la muestra para obtener las

señales analíticas adecuadas, se consideró la optimización de las condiciones experimentales de las extracciones y de los procedimientos de limpieza mediante el uso de herramientas de diseño de experimentos (DDE). La metodología analítica se validó siguiendo los requerimientos de la normativa SANTE para su posterior aplicación en muestras regionales de miel.

Tabla 3.1 Resumen de métodos analíticos publicados que utilizan cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tándem (LC-MS/MS) para la cuantificación múltiple y simultánea de neonicotinoides (y otros insecticidas) en miel.

Entrada	Analitos ^a	Extracción y limpieza	%R ^b	EM ^c	Capacidad de detección	Ref.
1	ACT	SPE	109	-7	Sistema QTRAP® LC: 0,1 µg kg ⁻¹	Gbylik-Sikorska y col. 2015
	CLT	Strata X-CW	101	-6		
	DNF		92	-5		
	IMD		99	-8		
	NPI		99	-7		
	TCD		106	-7		
	TMX		97	8		
2	ACT	QuEChERS	97	-14	Sistema QqQ LC: 1,0 µg kg ⁻¹	Hrynko y col. 2018
	CLT	citrato,	87	-13		
	DNF	d-SPE:	94	-33		
	FCD	quitosano,	107	-14		
	IMD	óxido de	90	-4		
	NPI	alúmina y	92	-28		
	TCD	octasilano (C8).	90	-5		
	TMX		91	-24		
		86	-7			
3	ACT ^d	SPE	114	38	Sistema QTRAP® LC: 0,15- 3,25 µg kg ⁻¹	Mrzlikar y col. 2019
	CLT	Oasis HLB.	71	37		
	IMD		96	36		
	TCD ^d		93	37		
	TMX		89	11		
		QuEChERS	90	62		
		citrato,	100	65		
		d-SPE: MgSO ₄ y PSA.	107	61		
			83	68		
			68	22		
4	ACT ^d	QuEChERS	118	-11	Sistema QqQ	Gaweł y col. 2019
	CLT	acetato,	108	5		

	FCD	d-SPE: MgSO ₄ ,	93	-15	LC: 1,0-	
	IMD	PSA y Z-Sep+.	104	-6	10,0 µg kg ⁻¹	
	NPI		84	-87		
	TCD ^d		94	11		
	TMX		72	3		
5	ACT ^d	SPE	103	Las señales de	Sistema	Hou y
	CLT	Oasis HLB.	95	IMD y CLT se	QqQ	col. 2019
	DNF		103	incrementaron	LC: 0,25–	
	FCD		83	mientras que	5,0 µg kg ⁻¹	
	IMD		103	las de TCD se		
	NPI		90	suprimieron.		
	TCD ^d		103			
	TMX		104			
6	ACT	Microextracción	92	Las señales de	Sistema	Jovanov
	CLT	líquido-líquido	86	IMD y TCD se	QqQ	y col.
	DNF	dispersiva	100	incrementaron	LC: 1,5–2,5	2013
	IMD		80	mientras que	µg kg ⁻¹	
	NPI		90	para el resto se		
	TCD		100	suprimieron.		
	TMX		90			

^a Se incluyeron en la tabla los métodos que analizan al menos seis neonicotinoides.

^b %R: los porcentajes de recuperación se evaluaron en el rango de 0,1 – 50,0 µg kg⁻¹; los resultados expuestos corresponden al nivel más bajo de concentración estudiado.

^c EM: efecto matriz

^d analitos detectados en las muestras de miel.

3.1.1 DDE, OPTIMIZACIÓN MULTIVARIADA

Cuando hay diversos factores para ser optimizados en un método analítico es aconsejable utilizar estrategias multivariadas en lugar de realizar la optimización cambiando una variable por ensayo (estrategia univariada) [Leardi 2009]. En general, en primer lugar se realiza un cribado donde las respuestas analíticas son registradas para un número reducido de ensayos experimentales. Posteriormente, una vez obtenidos los factores significativos, así como sus interacciones, la siguiente etapa a realizar es el proceso de optimización por ejemplo, mediante el uso de la metodología de superficie de respuesta (RSM) [Myers y col. 2009] que es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas que se emplean para modelar y analizar problemas, donde una respuesta de interés depende de varios factores [Vera Candiotti y col. 2014]. El objetivo de RSM es explorar la relación apropiada entre una respuesta y los factores involucrados en un experimento, e identificar las condiciones óptimas de operación que cumplen con un criterio o un requisito predefinido. En este sentido, la aplicación combinada de RSM y la función de deseabilidad de Derringer [Derringer y Suich 1980] permite combinar las respuestas individuales de los analitos en una función compuesta

y, posteriormente, encontrar las condiciones experimentales para alcanzar una solución global óptima [Vera Candiotti y col. 2014]. Alternativamente, los modelos de redes neuronales artificiales (ANN) son útiles cuando se requiere un modelado de datos multivariados no lineales [Desai y col. 2008].

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 ESTÁNDARES Y REACTIVOS

Los neonicotinoides ACT, TCD y TMX fueron obtenidos de Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemania) con una pureza analítica de 98,1%, 99,2% y 99,0%, respectivamente. CLT (99,9%), DNF (99,9%), FCD (99,9%) y NPI (99,5%), de Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania). Bendiocarb (BDC, 98,0%) se utilizó como estándar interno (ISTD) y se obtuvo de Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemania). El MeCN grado HPLC, usado como solvente extractante, de J.T.Baker (D.F., Mexico). Para el análisis instrumental se utilizó metanol grado UHPLC Optima® marca Fisher Chemical (Geel, Bélgica) y agua grado LC obtenida de un sistema Millipore Milli-Q (Massachusetts, EEUU). El sulfato de magnesio anhidro (MgSO₄, Enviro-Clean®, Pensilvania, EEUU), cloruro de sodio (NaCl, Carlo Erba Reagents, Val-de-Reuil, Francia), ácido fórmico 98% (Fisher Chemical, Geel, Bélgica) y el formiato de amonio 97% (Alfa Aesar, Massachusetts, EEUU) utilizados, fueron todos grado analítico. El PSA de Enviro-Clean® (Pensilvania, EEUU) y el C18 de Selectra® (Pensilvania, EEUU). Se prepararon las soluciones estándar madre (1000 mg L⁻¹) de los neonicotinoides individuales disolviendo una cantidad debidamente pesada en balanza analítica Mettler Toledo, modelo AB204 (Columbus, EEUU) y almacenadas en viales color caramelo a -20 °C. La solución estándar madre de BDC de 1000 mg L⁻¹ en MeCN fue preparada de la misma manera que las anteriores. Los mix de estándar de trabajo de los neonicotinoides (1,0; 0,1 y 0,01 mg L⁻¹) y la solución de trabajo del BDC (1,0 mg L⁻¹) fueron preparados en MeCN realizando la dilución adecuada de las soluciones madres con MeCN en material volumétrico.

Las soluciones de calibrado en solvente (0,1% ácido fórmico en agua:MeCN 98:2) se prepararon usando una dilución adecuada del mix de estándares de 0,1 mg L⁻¹. La calibración en matriz se realizó fortificando extractos de muestra blanco con alícuotas adecuadas de la solución de trabajo de 0,1 mg L⁻¹ para trabajar en el rango de concentración de 0,13 a 5,00 µg L⁻¹.

Los ensayos de recuperación se realizaron fortificando muestras de miel blanco con alícuotas apropiadas de solución estándar de trabajo de 0,1 y 0,01 mg L⁻¹ para obtener los dos niveles de concentración de cada analito. En esta instancia, se adoptó el siguiente procedimiento para fortificar la muestra y lograr una mezcla homogénea: se colocaron 5 g de miel blanco en un baño de agua a 50 °C durante 10 min; luego, se adicionaron los neonicotinoides a la miel para lograr las concentraciones deseadas; se realizó una homogeneización agitando con vortex durante 30 s; finalmente, las muestras fortificadas se almacenaron durante toda la noche a -20 °C y fueron procesadas el día siguiente.

A los extractos evaporados, se les adicionó en la etapa de resuspensión una alícuota fija de 25 µL de la solución de BDC 1,0 mg L⁻¹.

La miel blanco se obtuvo de un apiario del INTA, EEA Rafaela, localizado en la provincia de Santa Fe (31°12'S 61°30'O) y la ausencia de neonicotinoides en la muestra fue corroborada por análisis en el sistema LC-MS/MS.

Para el sistema cromatográfico, las fases móviles se prepararon a partir de una solución 500 mM de formiato de amonio, la cual se obtuvo solubilizando 3,25 g de formiato de amonio en 100 mL de metanol y se almacenó en una botella de vidrio color ámbar a 3 °C.

3.2.2 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS Y ESPECTROMÉTRICAS

El instrumento utilizado fue ya descrito en la Sección 2.2.3. Se estudiaron distintas combinaciones de fases móviles acuosas (A) y orgánicas (B). Se evaluaron como aditivos el ácido fórmico y el formiato de amonio. Los mismos son frecuentemente utilizados en sistemas CL-EM en el rango de concentración de 0,01 – 0,30% de ácido fórmico y 0,5-10,0 mM de formiato de amonio [Garrido French y col. 2014]. Estos aditivos son generalmente utilizados para mejorar la abundancia de los iones, suprimir los aductos de sodio y mejorar las formas de los picos cromatográficos. Para evaluar el desempeño de las fases móviles, se inyectó por triplicado una solución mix de neonicotinoides y BDC de 25.0 µg L⁻¹.

Las condiciones espectrométricas, como el voltaje de cono y la energía de colisión, se optimizaron por infusión directa de soluciones (individuales) de 0,1 mg L⁻¹ de cada analito. Todos los analitos se ionizaron con mayor abundancia en el modo positivo, formando los aductos [M+H]⁺. El espectrómetro de masa se operó en el modo MRM, que nos permitió monitorear dos transiciones precursor>producto por analito. Después de la colisión con gas argón, las transiciones MRM de mayor intensidad se utilizaron para cuantificar y las siguientes en intensidad se usaron con propósitos de confirmación (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Parámetros operacionales para análisis de neonicotinoides por UHPLC-MS/MS

Analito	Precursor (m/z)	Voltaje de cono (V)	Fragmento I (m/z) ^a	Energía de colisión (eV)	Fragmento II (m/z) ^b	Energía de colisión (eV)
ACT	223,0	28	126,0	20	56,0	15
CLT	250,0	18	169,0	12	132,0	18
DNF	203,0	20	157,0	8	129,0	12
FCD	230,0	30	203,0	18	148,0	25
IMD	256,1	25	209,1	15	175,1	17
NPI	271,1	25	224,9	12	125,9	25
TCD	253,0	35	126,0	20	90,0	40
TMX	292,0	22	132,0	22	181,0	12
BDC	224,1	20	167,0	8	109,0	18

^a Transición de cuantificación (precursor [M+H]⁺, fragmento I).

^b Transición de confirmación (precursor [M+H]⁺, fragmento II).

La temperatura de fuente del espectrómetro de masa se estableció en 120 °C con flujos de nitrógeno de 150 y 700 L h⁻¹ para los gases del cono y de desolvatación, respectivamente. La temperatura de desolvatación fue de 380 °C y al voltaje del capilar se configuró a 2,5 kV. Se usó argón como gas de colisión con un flujo de 0,15 mL min⁻¹, que produjo una presión de 6,7e⁻³ mbar en la celda de colisión.

Después de la optimización de los parámetros instrumentales, las condiciones adoptadas para la determinación de los compuestos en estudio fueron las siguientes: elución en modo gradiente con una fase móvil binaria compuesta de 5 Mm de formiato de amonio y 0,1% de ácido fórmico en agua:metanol (98:2) (fase móvil A) y 5 Mm de formiato de amonio y 0,1% de ácido fórmico en metanol (fase móvil B), caudal de 0,35 mL min⁻¹, manteniendo el horno de la columna a 40 °C. El programa del gradiente de la fase móvil comenzó con 5% de B hasta los 0,5 min y luego se incrementó hasta 51% a los 3,5 min. A los 5 min, B alcanzó el 100% y se mantuvo en esta proporción hasta los 8,5 min. Luego, para equilibrar la columna previo a la próxima inyección se disminuyó la proporción de B desde 100% a 5% hasta el final de la corrida cromatográfica, que duró 10 min. El volumen de inyección fue de 10 µL y la temperatura del automuestreador de 7 °C.

3.2.3 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

3.2.3.1 DDE

Se utilizaron estrategias multivariadas de manera de: (1) determinar los factores significativos que afectan la extracción de los neonicotinoides y los sucesivos pasos de limpieza de los extractos, y (2) encontrar las condiciones experimentales para alcanzar

las respuestas analíticas óptimas o adecuadas para detectar y cuantificar los neonicotinoides.

En primer lugar, se investigaron los factores cuya variación podría influir en la señal analítica mediante un diseño factorial fraccionado, que se utiliza ampliamente en el paso de selección de factores [Vera Candiotti y col. 2014, Narendran y col. 2019]. Se construyó un diseño factorial fraccionado que requirió 16 experimentos para evaluar siete variables independientes (o factores) en dos niveles. Se evaluaron la temperatura, el pH y el tiempo en la etapa de hidratación de la muestra; la cantidad de sulfato de magnesio y cloruro de sodio en la etapa de extracción; y la cantidad de C18 y de PSA en la etapa de limpieza de los extractos (Tabla 3.3). En esta instancia, se determinaron los factores que tuvieron una influencia significativa en las áreas de los picos cromatográficos examinando los diagramas de Pareto, considerándose como significativos aquellos factores (o interacción de factores) con un valor t entre el límite estadístico de Bonferroni y valor t crítico [Ravanipour y col. 2015].

Tabla 3.3 Diseño factorial de octava fracción para la evaluación de siete factores a dos niveles.

Factores	Niveles	
	bajo	alto
pH	2	4
temperatura (°C)	25	50
tiempo (min)	30	60
MgSO ₄ (g)	2	4
NaCl (g)	1	2
PSA (mg)	100	300
C18 (mg)	100	200

Posteriormente, se llevó a cabo un diseño de Box-Behnken (BBD) [Box y Behnken 1960] donde se examinaron los tres factores significativos indicados en la etapa anterior en tres niveles con tres réplicas del punto central (Fig. 3.1), resultando en 15 experimentos (Tabla S3.1). Para encontrar las condiciones experimentales que produjeron señales analíticas óptimas o adecuadas para la determinación simultánea de los ocho neonicotinoides en las muestras de miel se utilizó la función de deseabilidad de Derringer [Myers y col. 2009]. En esta instancia, no fue posible construir la superficie de respuesta (que se representa como una superficie en un espacio tridimensional) para algunos de los analitos debido a que no se encontraron modelos adecuados para los datos. Por lo tanto, se modeló posteriormente cada conjunto de datos generados utilizando el enfoque multivariado no lineal basado en RBF-ANN, que se empleó en combinación con la función de deseabilidad. El criterio implementado impuesto durante el procedimiento de optimización fue la maximización de las áreas de los neonicotinoides menos sensibles. Los modelos RBF-ANN para cada analito se evaluaron utilizando el coeficiente de determinación (R²), definido como la relación entre la variabilidad explicada y la variabilidad total [Haber y Runyon 1977, Vera Candiotti y col. 2014].

DDE y RSM se calcularon utilizando Stat-Ease Design-Expert 8.0.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, EEUU). Para el análisis de datos estadísticos generales se utilizó el software InfoStat (<http://www.infostat.com.ar>) [Di Rienzo y col. 2020]. El enfoque multivariado no lineal RBF-ANN en combinación con la función de deseabilidad se implementó utilizando una interfaz gráfica llamada SRO-ANN [Giordano y col. 2017] disponible en <https://www.iquir-conicet.gov.ar/>.

Ambos DDE (factorial y BBD) se realizaron fortificando muestras de miel blanco con los ocho neonicotinoides a $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ con alícuotas adecuadas de la solución estándar de trabajo de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. Se adicionó BDC a los extractos finales en el mismo nivel de concentración.

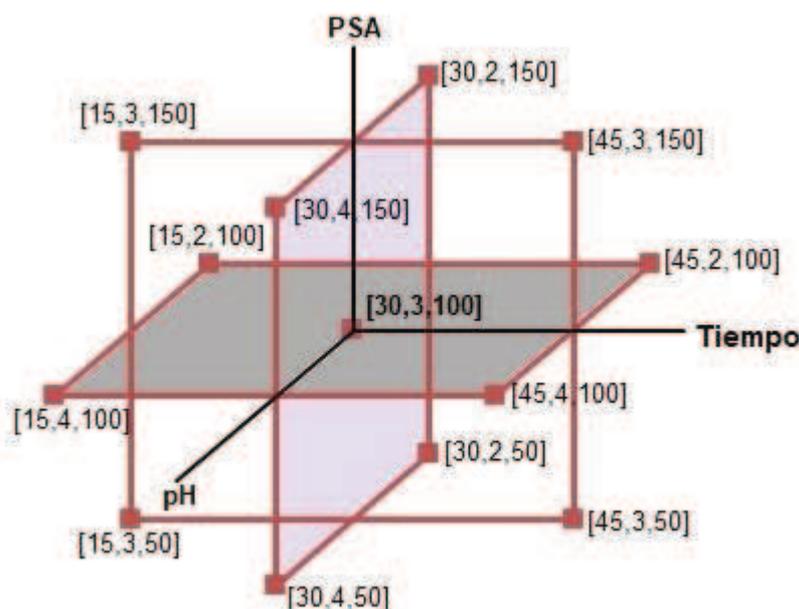


Fig. 3.1 Representación del plan experimental resultante de la matriz BBD para los tres factores significativos estudiados: tiempo (min), pH y cantidad de PSA (mg). Los puntos indicados corresponden a las condiciones experimentales (combinación de los diferentes niveles de los factores) donde se examinaron las respuestas de los ocho analitos.

3.2.3.2 METODOLOGÍA ANALÍTICA DESARROLLADA

El método QuEChERS modificado consistió en el siguiente procedimiento: se pesaron 5,0 g de miel en un tubo Falcon de 50 mL y se adicionaron 10 mL de agua milliQ. Luego se agitó el tubo con vortex durante 30 s y se mantuvieron las muestras de miel en remojo durante 45 min. Después de este período, se adicionaron 10 mL de MeCN y se agitó con un vortex durante 30 s. Se adicionaron 2 g de MgSO_4 y 1 g de NaCl y se agitó la solución manualmente e inmediatamente durante 2 min. Esta mezcla se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min y se tomaron 2,0 mL de la capa orgánica sobrenadante para realizar la d-SPE. Para ello dicho volumen se transfirió a un tubo Falcon de 15 mL que contenía 300 mg de MgSO_4 , 50 mg de PSA y 100 mg de C18.

Se agitó vigorosamente a mano durante 1 min y se centrifugó a 2500 rpm por 5 min. Se tomó un volumen de 1,0 mL del sobrenadante, se transfirió a un tubo Eppendorf y se evaporó con corriente de nitrógeno hasta sequedad usando un concentrador de muestra a 40 °C. En esta instancia, se agregaron 25,0 µL de solución de trabajo BDC para obtener una concentración final de ISTD de 25,0 µg L⁻¹. Los extractos se reconstituyeron posteriormente al volumen original de 1,0 mL con agua y se ultracentrifugaron a 15000 rpm por 5 min previo al análisis por UHPLC-MS/MS. Se tomó una alícuota de cada extracto, se transfirió a un vial de vidrio y se inyectaron 10 µL en el sistema cromatográfico. Los residuos de neonicotinoides se cuantificaron basándose en su respectivo factor de respuesta al ISTD.

3.2.4 VALIDACIÓN

El método analítico fue validado siguiendo la guía SANTE 12682 [SANTE 2019], analizando EM, linealidad, selectividad, LC, precisión, repetibilidad y precisión intermedia.

3.2.4.1 EM Y CURVAS DE CALIBRADO

Para evaluar el EM se realizaron curvas de calibrado en solvente y en matriz a cuatro niveles de concentración por triplicado. Las concentraciones finales de las muestras de calibración (preparadas por dilución de una solución estándar de trabajo de 0,1 mg L⁻¹) fueron: 0,13; 0,25; 0,50 y 1,00 µg L⁻¹ para ACT y TCD (que son los analitos más sensibles para el sistema de ionización por electroespray con detector de masa en tándem -ESI-MS/MS-) y 0,50; 1,00; 2,50 y 5,00 µg L⁻¹ para los neonicotinoides restantes.

En primer lugar, se evaluó la linealidad del método para cada uno de los analitos a partir de una prueba F, para lo cual se obtuvo el valor experimental de F (F_{exp}), correspondiente a la relación entre la varianza residual y el error puro al cuadrado, y se comparó con el valor crítico F (F_c) [Danzer y Currie 1998]. De esta manera, se confirmó la linealidad de los datos en todo el rango de calibración evaluado.

A continuación, se compararon las pendientes de las curvas de regresión correspondientes a la calibración en solvente (b1) y en matriz (b2) para evaluar el EM. Para ello, se aplicó la prueba estadística t mediante el cálculo del valor de t experimental (t_{exp}) y su comparación con el valor de t crítico (t_c) [Massart y col. 1998]. Adicionalmente, se calculó el EM utilizando la Ec. 2.1.

3.2.4.1.1 EM EN MIELES DE DIFERENTES ORÍGENES FLORALES

Se estudió el EM en muestras de miel de tres de las variedades florales más frecuentes en las regiones de estudio: miel de alfalfa, de meliloto y de trébol (Fig. 3.2). Estas mieles seleccionadas presentaron valores de pH de 3,34; 3,52 y 3,33, y colores de 20; 28,3 y 48 mm, respectivamente.



Fig. 3.2 De izquierda a derecha: mieles de alfalfa, meliloto y trébol

Para ello, se compararon las curvas de calibrado obtenidas al adicionar, en los mismos niveles que los empleados en la validación, extractos de muestras blanco de cada una de estas mieles con la de la miel de validación.

Además, se realizaron ensayos de recuperación adicionando las mieles de los diferentes orígenes florales. De esta manera, las mieles fueron adicionadas por triplicado al nivel de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ o $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para el ACT y el TCD y $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ o $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para el resto de los neonicotinoides, menos sensibles. Las concentraciones fueron calculadas utilizando la curva de calibrado realizada sobre la miel originalmente validada.

3.2.4.2 PARÁMETROS DE DESEMPEÑO

Para evaluar la selectividad del método se inyectaron en el sistema LC-MS/MS muestras blanco sin adición y adicionadas con el estándar mix de neonicotinoides.

Se calcularon la repetibilidad y la precisión intermedia mediante ensayos de recuperación. Para evaluar la exactitud y precisión de la metodología analítica el documento SANTE indica que deben probarse al menos dos niveles de concentración. El estudio de recuperación se llevó a cabo añadiendo a las muestras de miel volúmenes apropiados de soluciones estándares de trabajo de neonicotinoides para obtener los dos niveles de concentración para cada analito: $0,25 \mu\text{g kg}^{-1}$ y $1,00 \mu\text{g kg}^{-1}$ para ACT y TCD, y $1,00 \mu\text{g kg}^{-1}$ y $5,00 \mu\text{g L}^{-1}$ para los neonicotinoides restantes, que corresponden a las siguientes concentraciones en los extractos: $0,13 \mu\text{g L}^{-1}$ y $0,50 \mu\text{g L}^{-1}$ para ACT y TCD, y $0,50 \mu\text{g L}^{-1}$ y $2,50 \mu\text{g L}^{-1}$ para los neonicotinoides restantes. Los estudios de recuperación se realizaron con réplicas por quintuplicado, y para el cálculo de las recuperaciones se utilizó la Ec. 2.2.

El LC se estableció cómo el mínimo nivel de fortificación de los ensayos de recuperación y se seleccionó en base a la sensibilidad analítica (γ) de cada neonicotinoide, calculado usando la Ec. 3.1 [Olivieri y Escandar 2014]

$$\gamma [\text{kg } \mu\text{g}^{-1}] = b_1/S_y \quad (\text{Ec. 3.1})$$

siendo: b_1 la pendiente de la curva de calibración en matriz, y S_y el ruido de la señal analítica.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 CONDICIONES INSTRUMENTALES

En primer lugar en el sistema cromatográfico, se hizo una evaluación del desempeño de cuatro fases móviles en modo gradiente: 0,1% ácido fórmico en agua:MeCN (98:2) (A1), 0,1% ácido fórmico en MeCN (B1); 0,1% ácido fórmico en agua:metanol (98:2) (A2), 0,1% ácido fórmico en metanol (B2); 5 mM formiato de amonio en agua:metanol (98:2) (A3), 5 mM formiato de amonio en metanol (B3); y 5 mM formiato de amonio y 0,1% ácido fórmico en agua:metanol (98:2) (A4), 5 mM formiato de amonio y 0,1% ácido fórmico en metanol (B4). No se evaluaron fases móviles conteniendo formiato de amonio en MeCN, debido a las limitaciones en la solubilidad.

Los cromatogramas obtenidos con las diferentes fases móviles se muestran en la Fig. 3.3. Se observaron variaciones en el orden de elución de NPI y DNF, es decir, el NPI eluyó en tiempos de retención más bajos que el DNF en las fases móviles acidificadas con ácido fórmico (A1-B1 y A2-B2) y se obtuvo un orden de elución opuesto cuando se empleó el formiato de amonio (A3-B3 y A4-B4). Además, las fases móviles con metanol permitieron aumentos de los tiempos de retención en comparación con las fases móviles de MeCN, es decir, los tiempo de retención de los ocho analitos oscilaron entre 2,0 y 4,2 min y entre 1,8 y 3,4 min, respectivamente. (Fig. 3.3, superior). La fase móvil con MeCN presentó picos cromatográficos con tiempos de retención similares para el DNF, NPI, IMD y CLT, y se observó una coelución para cada par de compuestos. Para las fases móviles con metanol y formiato de amonio, se obtuvieron altos incrementos en el área de los picos cromatográficos para TCD y ACT y ligeros aumentos para DNF, TMX y CLT, mientras que el área de FCD aumentó ligeramente cuando se adicionó ácido fórmico (Fig 3.3, inferior). Por lo tanto, se seleccionó la fase móvil conteniendo ambos aditivos para estudios posteriores.

Además, se comprobó el efecto del solvente del extracto en las corridas cromatográficas inyectando estándar en matriz directamente en el solvente extractante, MeCN, y otro evaporado y resuspendido en una fase acuosa. Tal como se esperó, los cromatogramas correspondientes a los neonicotinoides en solución acuosa dieron como resultado notables mejoras en las formas de los picos, obteniéndose picos más simétricos y mejor resueltos que en MeCN (Fig. S3.1). Por lo tanto, se implementó como parte de la metodología la evaporación del MeCN de los extractos y posterior resuspensión en un medio acuoso. Se utilizó BDC como ISTD para corregir las incertidumbres que pueden generarse en la etapa de evaporación. Se seleccionó este compuesto porque eluye en un tiempo de retención (4,7 min) próximo a los neonicotinoides (2,0 a 4,2 min); este analito también fue muy sensible al sistema ESI-MS/MS y las áreas de los picos cromatográficos fueron estables al realizar inyecciones sucesivas (Fig. 3.3).

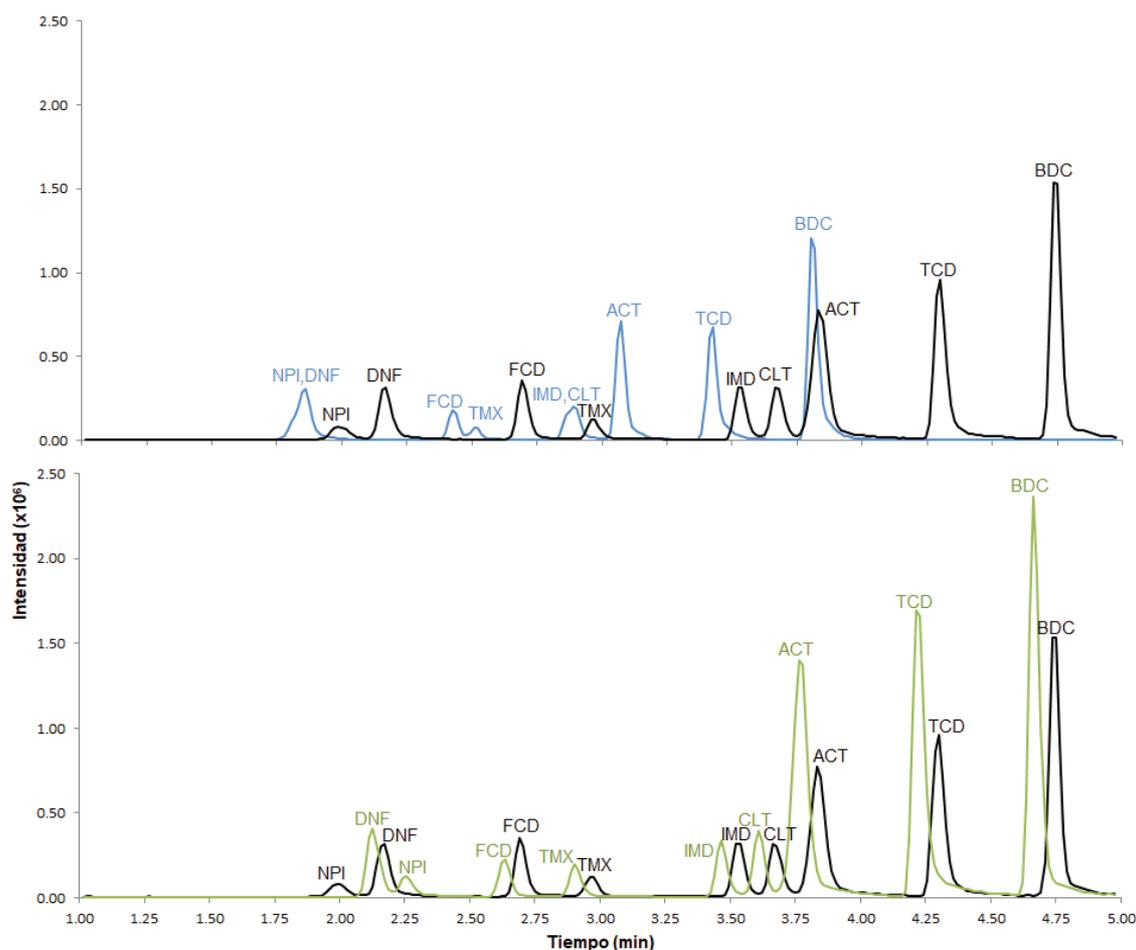


Fig. 3.3 Cromatogramas de iones totales (TIC) de estándar en matriz de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ usando fases móviles de diferentes composiciones; A1:B1 (celeste), A2:B2 (negro) y A3:B3 (verde).

3.3.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Dado que la miel es un alimento natural de composición compleja, la preparación de la muestra fue un paso esencial previo al análisis espectrométrico; de esta manera, se procesaron las muestras siguiendo el método QuEChERS sin el agregado de buffer [Anastassiades y col. 2003] para la detección simultánea de los analitos. En esta etapa, se realizó la optimización de las condiciones experimentales para la extracción eficiente de los analitos de las muestras de miel y la limpieza de los extractos mediante el uso de herramientas de DDE.

3.3.3 DDE Y MÉTODO ANALÍTICO OPTIMIZADO

De acuerdo con las gráficas de Pareto, la temperatura de remojo y las cantidades de MgSO_4 , NaCl y C18 no presentaron efectos significativos en las áreas cromatográficas

de los analitos investigados. Estos resultados sugirieron que estos cuatro factores no afectaron ni la extracción de los neonicotinoides de las muestras ni la sucesiva limpieza de los extractos en el dominio experimental evaluado. En consecuencia, para estudios posteriores, la temperatura de remojo se fijó en 25 °C y las cantidades de MgSO₄, NaCl y C18 se establecieron en los niveles más bajos estudiados (2 g, 1 g y 100 mg, respectivamente).

Por otro lado, el tiempo y el pH de remojo, y la cantidad de PSA, empleado en la limpieza de los extractos, se indicaron como factores significativos que afectaron las respuestas evaluadas.

Por lo tanto, posteriormente se utilizaron estos tres factores para construir el BBD. Los datos experimentales fueron modelados (basados en el método de mínimos cuadrados) y los resultados fueron analizados por ANOVA con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$). La significancia de los factores y sus interacciones fueron evaluadas en base a sus p -valores. En esta etapa, fue posible obtener modelos satisfactorios para cuatro analitos (ACT, IMD, TCD y TMX) (Tabla 3.4). El análisis de los modelos de interacción de dos factores (2FI) reveló que el tiempo y la cantidad de PSA, y la interacción entre ellos, fueron variables estadísticamente significativas. Para cada una de las cuatro respuestas modeladas, la cantidad más baja de PSA, el pH más alto y el tiempo de remojo más prolongado produjeron áreas máximas de los picos cromatográficos. No fue posible modelar las respuestas para CLT, DNF, FCD y NPI usando esta aproximación, incluso cuando se seleccionaron explícitamente parámetros no lineales en el modelo o se implementaron respuestas transformadas. En todos los casos analizados, los datos se distribuyeron de manera normal y no se reportaron outliers.

Tabla 3.4 Ecuaciones de regresión generales y parámetros estadísticos para los modelos de interacción de dos factores (2FI) obtenidos al modelar las relaciones entre cada respuesta y los tres factores: tiempo (X1), cantidad de PSA (X2) y pH (X3).

Analito	Modelo ^a	ANOVA p -valor ^b	R ²	Ecuación de regresión general ^c
ACT	2FI	0,0096	0,78	$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2$
IMD	2FI	0,0011	0,82	
TCD	2FI	0,0103	0,70	$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2$
TMX	2FI	0,0009	0,83	

^a La falta de ajuste de los modelos no fue significativa

^b p -valores menores a 0,05 implican que el modelo es significativo.

^c Factores e interacciones involucradas en el modelo lineal: X1, X2, X3 y X1X2, respectivamente. Coeficientes de regresión: b_0 , b_1 , b_2 , b_3 y b_{12} .

Como segunda aproximación, cada conjunto de datos experimentales comprendiendo la respuesta medida a partir de la matriz BBD fue modelado por RBF-ANN, que permitió explicar cómo fueron afectadas las ocho respuestas por los tres factores significativos y encontrar una solución óptima general de acuerdo con el criterio impuesto. Para todos los conjuntos de datos analizados se correlacionaron las áreas cromatográficas relativas predichas y reales (Fig 3.4). Por lo tanto, el desempeño de

los modelos fue adicionalmente evaluado usando los coeficientes de determinación, que fueron mayores a 0,97 (Tabla 3.5), demostrando la excelente concordancia entre los resultados experimentales y los predichos.

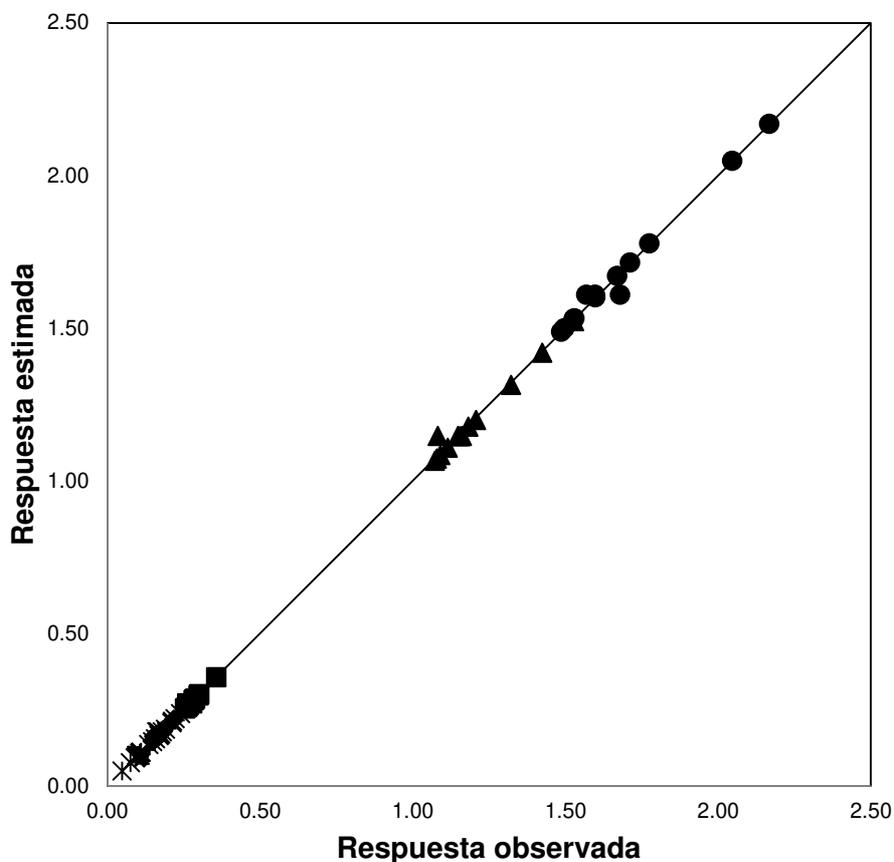


Fig. 3.4 Comparación entre las respuestas observadas y las predichas (estimadas) por RBF-ANN para el conjunto de datos generados para cada analito. Referencias: ▲ ACT, ◆ CLT, ■ DNF, - FCD, × IMD, * NPI, ● TCD y + TMX.

Tabla 3.5 Parámetros estadísticos para los modelos RBF-ANN construidos a partir de la matriz de respuesta BBD.

Analito	R ²
ACT	0,99
CLT	0,98
DNF	0,99
FCD	0,99
IMD	0,97
NPI	0,99
TCD	0,99
TMX	0,97

La Fig. 3.4 muestra claramente que para ACT y TCD se obtuvieron respuestas más altas que para los neonicotinoides restantes. Por lo tanto, las respuestas de los neonicotinoides menos sensibles se maximizaron durante el modelado por RBF-ANN. En la mayoría de los casos, el tiempo de remojo y el pH demostraron ser los dos factores más influyentes con efectos positivos en las respuestas, probablemente debido a la interrupción de las interacciones analito-matriz, lo que permitió una mejor homogenización. Este hecho se representa en la Fig. 3.5 para las respuestas individuales de dos analitos seleccionados. Asimismo, la función de deseabilidad global mostró un valor máximo de 0.92 para las condiciones experimentales de mayor tiempo y pH (Fig. 3.6).

Por otro lado, la cantidad de PSA se indicó también como un factor importante que mostró un efecto variable en la respuesta de los neonicotinoides (Fig. 3.7). Se conoce muy bien que este reactivo, que es generalmente utilizado para eliminar ácidos orgánicos, lípidos y ácidos grasos de las matrices alimenticias, retiene los plaguicidas ácidos, lo que puede provocar pérdidas importantes de los analitos durante la limpieza de los extractos [Mastovska y col. 2010]. Por lo tanto, este factor debe ser cuidadosamente evaluado de acuerdo con los analitos objetivos. En este trabajo, se obtuvieron los valores más altos para la función de deseabilidad global ($D = 0.7 - 0.9$) cuando las cantidades de PSA se encontraron en el rango de 50-130 mg, para un tiempo de remojo de 45 min (Fig. 3.8A) y para un pH de 4 (Fig. 3.8B). Las condiciones experimentales correspondientes a un máximo en la función de deseabilidad ($D = 0.92$) fueron para un tiempo de remojo de 45 min, pH 4 y PSA 92 mg. Teniendo en cuenta que se obtuvo un valor de 0.74 de deseabilidad global para la menor cantidad de PSA (tiempo de remojo 45 min, pH 4 y 50 mg de PSA), también se esperarían respuestas adecuadas de los analitos bajo esas condiciones experimentales. Por lo tanto, con el objetivo de reducir la cantidad de adsorbente PSA a utilizarse durante el procesamiento de las muestras fueron adoptadas estas condiciones experimentales.

Las condiciones experimentales finalmente seleccionadas para validar el método de acuerdo a la normativa SANTE [SANTE 2019] se resumen en la Tabla 3.6.

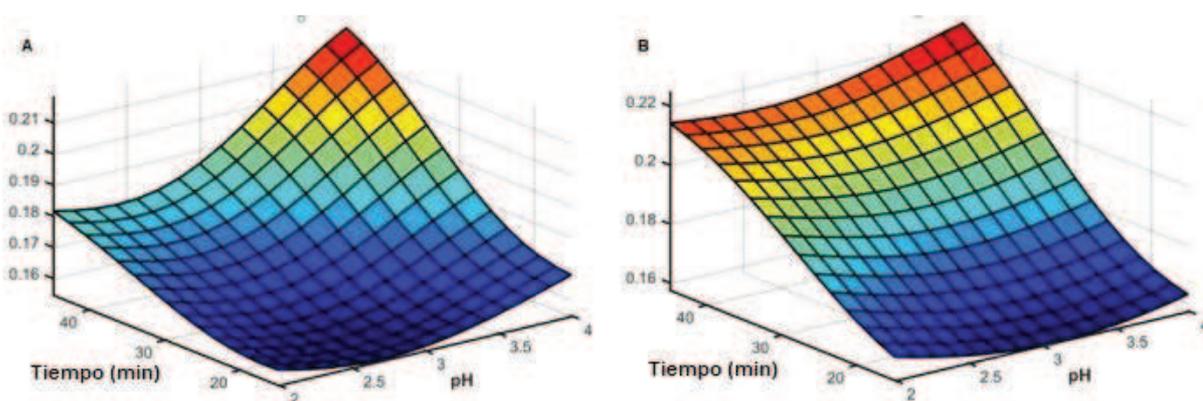


Fig. 3.5 Grafico de superficie para las respuestas (A) CLT y (B) FCD en función del tiempo de remojo (min) y el pH.

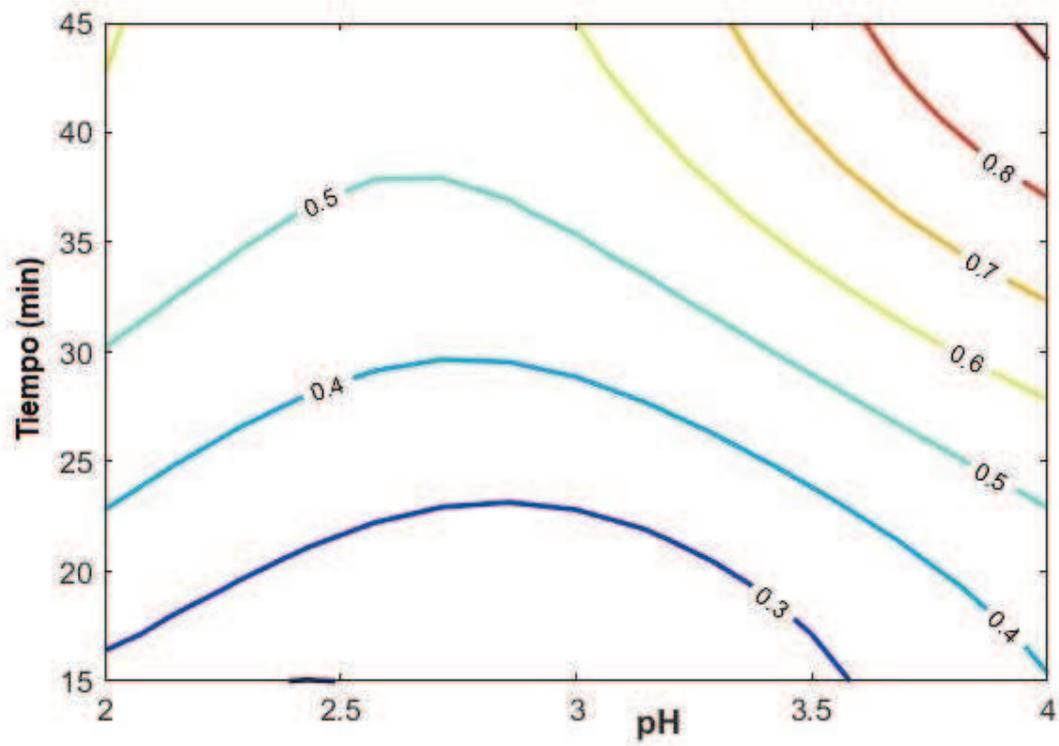


Fig. 3.6 Gráfico de contorno para la deseabilidad global como función del tiempo de remojo (min) y el pH.

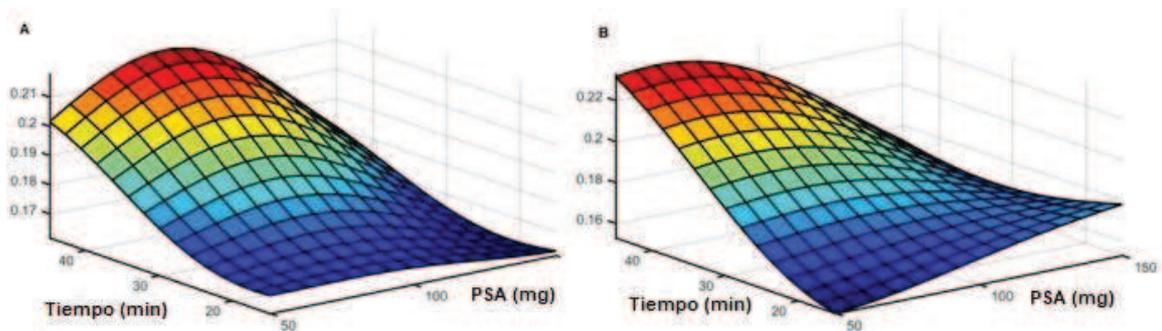


Fig. 3.7 Gráfico de superficie para las respuestas de dos analitos seleccionados (A) CLT y (B) FCD en función del tiempo de remojo (min) y la cantidad de PSA (mg).

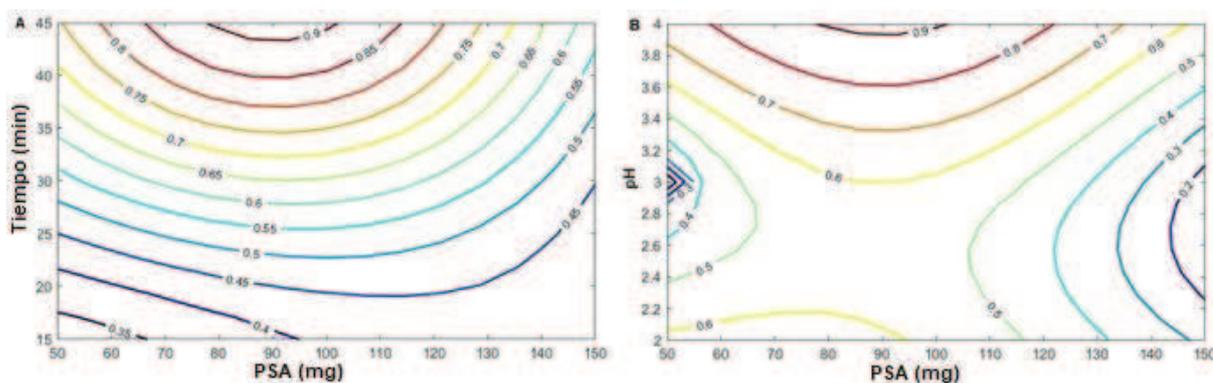


Fig. 3.8 Gráfico de contorno para la deseabilidad global en función de (A) tiempo de remojo (min) y cantidad de PSA (mg), y (B) pH y cantidad de PSA (mg).

Tabla 3.6 Condiciones experimentales para el método QuEChERS optimizado en muestras de miel empleando 5 g de muestra y 10 mL de MeCN.

Parámetro	Valor óptimo*
Remojo	
temperatura (°C)	25
pH	4
tiempo (min)	45
Extracción	
MgSO ₄ (g)	2
NaCl (g)	1
Limpieza	
PSA (mg)	50
C18 (mg)	100

(*) según los criterios impuestos: maximización de la respuesta de los analitos menos sensibles y minimización del consumo de PSA.

3.3.4 VALIDACIÓN

3.3.4.1 EM Y CURVAS DE CALIBRACIÓN

El EM y la linealidad fueron evaluados en el rango de 0,25-2,00 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para ACT y TCD, y 1,00-10,00 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para CLT, DNF, FCD, IMD, NPI y TMX. En los rangos de concentración evaluados, las respuestas de los analitos tanto en matriz como en solvente correspondieron a ecuaciones lineales. Dado que F_{exp} no superó la F_c para ninguno de los analitos, se aceptó la hipótesis nula (H_0 : los datos son lineales) con un nivel de confianza del 95% y 13 y 10 grados de libertad para el numerador y denominador, respectivamente (Tabla 3.7).

Tabla 3.7 Parámetros de la curva de calibración en matriz miel como indicadores de linealidad y efecto matriz a través de test estadísticos.

Neonicotinoide	R ² ^a	F _{exp} ^b	t _{exp} ^c	EM (%) ^d
ACT	0,99	0,92	- 2,88	-12
CLT	0,99	1,46	- 1,73	-11
DNF	0,99	0,85	2,44	13
FCD	1,00	0,73	-6,30	-25
IMD	1,00	0,77	9,25	25
NPI	0,99	0,29	4,29	19
TCD	0,99	2,25	4,49	24
TMX	0,99	0,86	1,03	8

^a Coeficiente de correlación de regresión lineal

^b F_c= 2,887

^c t_c=2,06

^d Efecto matriz porcentual, Ec. 2.1

El EM se evaluó comparando las áreas de las soluciones estándares preparadas en solvente con aquellas obtenidas de los estándares adicionados a los extractos de matriz dentro del rango de concentración estudiado. De acuerdo a los lineamientos de la normativa SANTE en caso de más del 20% de supresión o incremento de la señal, los efectos de la matriz deben abordarse en la calibración. Tal como se muestra en la Tabla 3.7, se observó EM significativo para tres analitos, TCD, IMD y FCD (Ec. 2.1).

Además, se empleó otro criterio para evaluar el EM, que consistió en comparar las pendientes de las curvas de calibración mediante el estadístico test t [Massart y col. 1998]. La hipótesis nula (H0:b1=b2) fue rechazada para un nivel de confianza del 95% y 26 grados de libertad, considerando que el t_{exp} excedió el t_c=2,06 (Tabla 3.7), permitiendo confirmar la presencia de EM para FCD, IMD, NPI, TCD, ACT y DNF, es decir, en seis de los ocho neonicotinoides evaluados. Por lo tanto, las cuantificaciones se realizaron usando curvas de calibración en matriz.

3.3.4.2 PARÁMETROS DE DESEMPEÑO

En la Tabla 3.8 se presentan los valores porcentuales de recuperación promedio, que oscilaron entre 79 y 120%, y la repetibilidad asociada, expresada en términos de DER. Estos resultados fueron satisfactorios de acuerdo a las pautas de la norma que establece que las recuperaciones medias aceptables de la validación inicial son aquellas dentro del rango 70-120% con una DER menor o igual al 20%.

Al trabajar con espectrometría de masa y obtener dos iones producto, el de mayor y el siguiente en abundancia para cuantificar y confirmar respectivamente, es posible que el LD coincida con el LC. Dado a que el protocolo analítico prescribe la calificación de los picos vía una relación relativa de cuantificación respecto de confirmación (Q/q) de ±30% [SANTE 2019], las señales pueden usarse como LD sólo cuando cumplen esta disposición. Por lo tanto, la identificación de los picos a través de la relación Q/q, sólo

es posible en niveles en que los iones utilizados para la cuantificación ya puedan medirse con alta precisión. En consecuencia, el LC podría ser igual al LD. Por lo tanto el LD fue progresivamente perdiendo preponderancia en el análisis de residuos de plaguicidas mediante espectrometría de masa, a tal punto que actualmente sólo se informa el valor de LC que incluye a ambos parámetros (LC y LD) (Tabla 3.8). Los LCs alcanzados para los neonicotinoides en estudio se encuentran en el rango de 0,25–1,00 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y estuvieron dentro de los mismos valores o por debajo de los niveles reportados en otros trabajos (Tabla 3.1, entradas 2-6). Las sensibilidades analíticas calculadas indicaron que tanto el ACT como el TCD fueron los analitos más sensibles para el sistema de detección empleado.

En el presente estudio al pretender evaluarse la exposición de abejas a los neonicotinoides, se busca disminuir los niveles de los LC tanto como sea posible. En cambio, en la evaluación de residuos de plaguicidas en mieles comerciales (Tabla 3.1, entradas 5 y 6), en general lo que se busca es una sensibilidad suficiente para evaluar el cumplimiento de los valores de LMR permitidos, por lo tanto se puede trabajar con LCs más altos, dependiendo por supuesto de los requerimientos que establecen las regulaciones. Dentro de los trabajos previamente publicados que recolectaron e investigaron mieles de las colmenas, para evaluar el grado de exposición de las abejas a los plaguicidas (Tabla 3.1, entradas 1 a 4), Gbylik-Sikorska y col. (entrada 1) alcanzaron los LC más bajos (0,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$) empleando un sistema QTRAP 6500, último modelo. Es sabido que, con este tipo de sistema tope de gama se requieren menores esfuerzos de limpieza de la muestra ya que tienen una mayor capacidad para eliminar interferencias que los modelos anteriores, por lo tanto aquí se lograron LCs del mismo orden tratando la muestra con métodos de preparación menos exhaustivos. Sin embargo, son sistemas más costosos y por lo tanto quizás menos accesibles para algunos laboratorios. De igual manera, Mrzlikar y col. (entrada 3) también reportaron LC por debajo de la parte por billón (ppb o 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$) pero para su determinación se basaron solamente en el criterio de la relación S/R, sin realizar ensayos de recuperación en este nivel. En este último estudio, las recuperaciones porcentuales fueron evaluadas a 10 y 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Respecto de los dos trabajos restantes, que persiguieron objetivos y presentaron capacidad de detección similares al presente (Tabla 3.1, entradas 2 y 4), en ninguno de los casos los LCs fueron menores a la ppb con límites de hasta 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, es decir 10 veces los límites alcanzados en el presente estudio.

Tabla 3.8 Rango lineal, porcentaje de recuperación, límite de cuantificación y sensibilidad calculados para cada analito con el método analítico optimizado.

Neonicotinoide	Rango lineal $\mu\text{g kg}^{-1}$	R (%) ^a a 2 niveles de adición			LC $\mu\text{g kg}^{-1}$	γ ^b $\text{kg } \mu\text{g}^{-1}$
		0.25 $\mu\text{g kg}^{-1}$	1.00 $\mu\text{g kg}^{-1}$	5.00 $\mu\text{g kg}^{-1}$		
ACT	0,25 – 2	120 (17)	120 (7)	-	0,25	25
CLT	1 – 10	-	111 (13)	113 (7)	1,00	7
DNF	1 – 10	-	97 (15)	98 (12)	1,00	4
FCD	1 – 10	-	116 (10)	118 (9)	1,00	8
IMD	1 – 10	-	111 (10)	98 (4)	1,00	8
NPI	1 – 10	-	79 (20)	118 (5)	1,00	2
TCD	0,25 – 2	117 (15)	114 (9)	-	0,25	48
TMX	1 – 10	-	113 (11)	95 (5)	1,00	5

^a Recuperación porcentual, y desviación estándar relativa (DER) de quintuplicados entre paréntesis. Criterio de aceptabilidad: 70 – 120% con DER menores a 20% [SANTE 2019].

^b Sensibilidad analítica.

3.3.4.3 EM EN MIELES DE DIFERENTES ORÍGENES FLORALES

3.3.4.3.1 ESTUDIO DEL EM

De los tres orígenes florales estudiados, las curvas de calibrado de alfalfa y meliloto se comportaron de manera similar a la muestra de miel empleada para la validación realizada anteriormente para los siguientes analitos: ACT, CLT, DNF, TCD y TMX (Fig. S3.2). Para la miel de trébol, en general, se obtuvieron incrementos en la señal de los neonicotinoides evaluados respecto de la muestra de validación.

En la mayoría de los trabajos reportados, donde se realizó la determinación de neonicotinoides en mieles regionales, no fueron evaluados los efectos de la matriz teniendo en cuenta el origen floral de las mieles, y para construir las curvas de calibración se emplearon muestras blanco proveniente de alguna de las regiones en estudio [Jovanov y col. 2013, Hou y col. 2019, Gawel y col. 2019, Mrzlikar y col. 2019, Hrynko y col. 2018, Gbylik-Sikorska y col. 2015]. Sin embargo, Sánchez-Hernández y col. 2016 al estudiar cuatro variedades de muestras blanco de diferentes orígenes florales (polifloral, romero, miel de bosque y lavanda) encontraron diferencias en los LC y en los efectos de la matriz dependiendo de su origen floral. En base a estos hallazgos, se puede observar que para realizar cuantificaciones más confiables se deberían realizar una curva de calibrado para cada miel de diferente origen floral (o región) lo que dificultaría el análisis en cuánto a tiempos y costos, y requeriría que el total de las mieles se encuentren caracterizadas en base a su composición floral. De todas maneras, fue demostrado que incluso las mieles del mismo origen floral pueden presentar diferencias en su composición química [Kaškonienė y Venskutonis 2010] lo que dificulta aún más ésta tarea. Respecto a la normativa SANTE (2019), seguida para la validación de los presentes métodos, permite realizar una curva de calibrado en

matriz sin exigir el estudio exhaustivo de la misma, incluso se pueden utilizar matrices representativas de una familia o grupo de productos de composición química similar.

3.3.4.3.2 ESTUDIO DE RECUPERACIÓN

Tres mieles de diferentes orígenes florales fueron adicionadas por triplicado al nivel de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ para el ACT y el TCD y $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para el resto de los neonicotinoides, menos sensibles. Las concentraciones obtenidas fueron calculadas utilizando la curva de calibrado realizada sobre la miel originalmente validada, para conocer su desviación respecto a la concentración nominal. Teniendo en cuenta los valores de las concentraciones calculadas y la desviación estándar de los ensayos realizados por triplicado, menos del 20% de los resultados incluyeron a la concentración nominal al calcular las concentraciones con la curva de calibrado validada en matriz (Fig. 3.9). Sin embargo, para el análisis de residuos de plaguicidas se acepta una incertidumbre de la medición del 50% (correspondiente a un nivel de confianza del 95% con un factor de cobertura $k=2$) [SANTE 2019]. Tomando en consideración este valor de incertidumbre, todas las concentraciones calculadas incluyeron a la concentración nominal (Fig. 3.10).

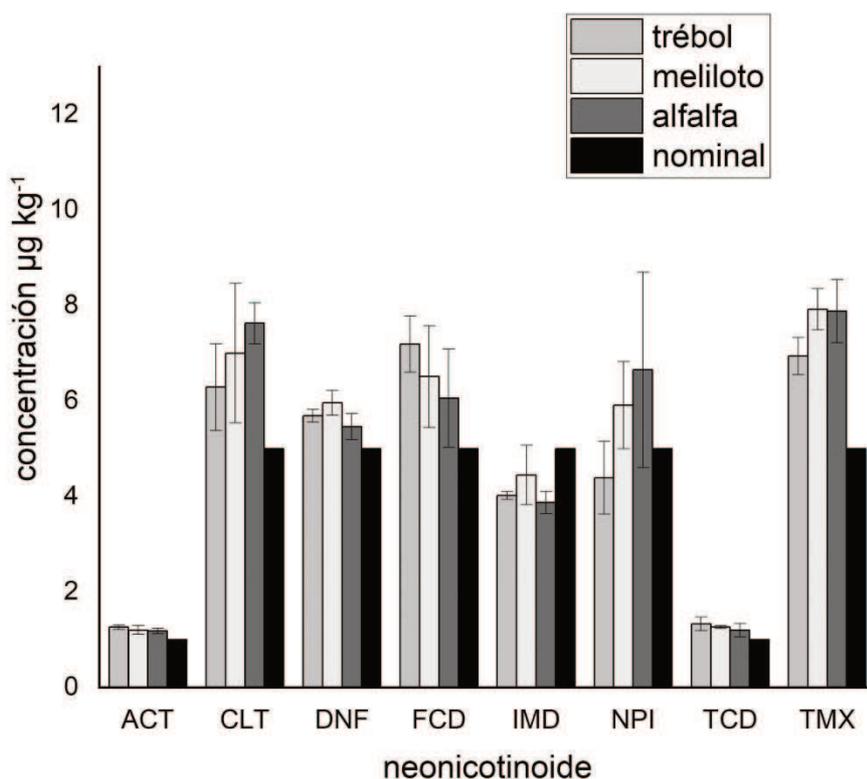


Fig. 3.9 Concentración nominal y calculada \pm DE ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de tres réplicas en miel de trébol, meliloto y alfalfa.

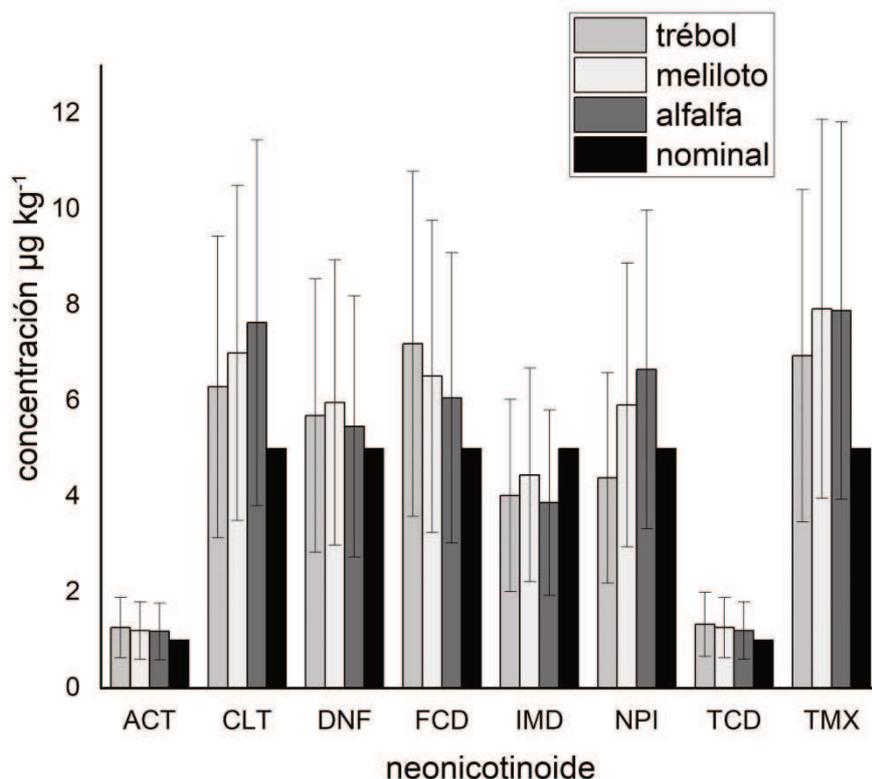


Tabla 3.10 Concentración nominal y calculada $\pm 50\%$ de incertidumbre ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en miel de trébol, meliloto y alfalfa.

3.4 CAPÍTULO 3, CONSIDERACIONES FINALES

El enfoque multivariado no lineal RBF-ANN en combinación con la función de deseabilidad permitieron seleccionar las condiciones experimentales para las etapas de extracción y limpieza que produjeron respuestas analíticas eficientes de los neonicotinoides y, posteriormente, obtener LCs del orden de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$. Para el método optimizado, se redujo el uso de sales y adsorbentes durante el procesamiento de muestras respecto al método QuEChERS oficial [Anastassiades y col. 2003]. Además, se puede prescindir del calentamiento y la acidificación de la solución de remojo previamente empleados (Capítulo 2), ya que no se indicaron como factores significativos, lo cual constituyó una simplificación del método.

La importancia de contar con un método multiresiduo para la región, radica en su potencial uso en estudios del grado de exposición de las abejas melíferas a insecticidas neonicotinoides y la seguridad alimentaria para los consumidores. De esta manera, se podrán establecer posibles fuentes de contaminación contribuyendo a la resolución de la problemática de la disminución de la población de abejas, ya que los valores de concentración en muestras de miel reflejan el grado de exposición de las abejas a estos contaminantes en la región central de nuestro país. Asimismo, permitirá garantizar la calidad de la miel regional dentro de los estándares internacionales para favorecer su exportación y comercialización satisfaciendo la demanda mundial de este endulzante natural.

CAPÍTULO 4. ANÁLISIS DE NEONICOTINOIDES EN MUESTRAS AMBIENTALES.

4.1 INTRODUCCIÓN

Determinar los riesgos asociados de los insecticidas neonicotinoides para los polinizadores, requiere una comprensión detallada de su destino, transporte y transformación en el ambiente, siendo una tarea compleja que incluye diversas vías y procesos según los compartimentos ambientales en los que ocurren. Por consiguiente, en el presente capítulo se propone abordar los resultados de dos ensayos en los cuales se analizaron neonicotinoides en muestras ambientales. En el primero de ellos se evaluó la capacidad translocación del IMD en polen y néctar de girasoles tratados con este plaguicida. En el segundo, se investigaron los residuos de neonicotinoides presentes en colmenas rodeadas de soja, para ello se extrajeron muestras de miel inmadura, polen y abejas, con la finalidad de determinar las rutas de ingreso de los neonicotinoides a las colmenas. Finalmente, se realizó una comparación con los hallazgos obtenidos en cada ensayo.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 CAPACIDAD DE TRANSLOCACIÓN DEL IMD

4.2.1.1 SIEMBRA, RECOLECCIÓN DE MUESTRAS Y ANÁLISIS

En primera instancia, se evaluó la capacidad de translocación del IMD en plantas de girasol. Para ello, durante dos años consecutivos se realizó la siembra de tres parcelas con semillas DOW MG-2 en la EEA Rafaela perteneciente al INTA. Cada una de las parcelas presentó las siguientes dimensiones: 10 m de largo por 16 surcos, separados entre sí por 70 cm. La densidad de siembra fue de 4 semillas cada metro lineal. Las semillas fueron inoculadas con IMIDA NOVA 60 (IMD 60% m/v) en las siguientes dosis: la indicada según el marbete (6 mL kg⁻¹ de semilla), y 12 mL kg⁻¹ de semilla, denominándose T1 y T2, respectivamente. La tercera de las parcelas fue utilizada como control (T0), sembrándose sin adición del insecticida. Tres meses después de la siembra, durante el mes de diciembre, se recolectaron nectarios florales y polen de las flores de girasol y se conservaron a -20 °C hasta el momento del análisis (Fig. 4.1).



Fig. 4.1 Recolección de polen y nectarios de flores de girasol

Para el procesamiento de las muestras se pesaron 500 mg, se le adicionaron 2 mL de 2% de ácido fórmico en agua y se dejó en reposo durante 1 h. Se adicionaron 2 mL de MeCN y se agitó con vortex. Luego se adicionaron 800 mg de $MgSO_4$ y 200 mg de NaCl, se agitó manualmente durante 5 min y se procedió al centrifugado a 2500 rpm durante 5 min. Posteriormente se realizó la d-SPE, para ello se tomaron 1,5 mL de extracto y se le agregaron 225 mg de $MgSO_4$:nanotubos de carbón (99:1), 225 mg de PSA y 75 mg de C18 (Fig. 2.4). Se agitó manualmente durante 1 min y se centrifugó nuevamente a 2500 rpm durante 5 min. Se tomaron 800 μ L de los extractos, se llevaron a sequedad, se reconstituyeron con 0,1% de ácido fórmico en agua:metanol (98:2) y se filtraron previamente al análisis cromatográfico. Debido a que sólo se realizó la determinación de IMD, los extractos se inyectaron en el sistema UHPLC-MS/MS, bajo las condiciones instrumentales desarrolladas en el Capítulo 2, con elución en modo gradiente y la fase móvil compuesta de 0,1% de ácido fórmico en agua:MeCN (98:2) y 0,1% de ácido fórmico en MeCN, caudal de 0,35 mL min^{-1} , manteniendo el horno de la columna a 40 °C.

4.2.1.2 INSPECCIONES Y REGISTRO DE POLINIZADORES

Estos estudios fueron complementados con observaciones de campo, en los cuales se registraron los insectos visitantes de las plantas de girasol. En los dos años de ensayo, durante una semana, se tomaron al azar diez inflorescencias de girasol de cada parcela y se inspeccionaron diariamente a las 8:00 y a las 12:00 h (Fig. 4.2). Se realizó un registro de las especies de insectos polinizadores que frecuentaron estas plantas con el objetivo de investigar si su comportamiento en cuánto a la alimentación es afectado por los tratamientos. Mediante un análisis estadístico de ANOVA, se evaluó la diferencia en el comportamiento de las diferentes especies polinizadoras.



Fig. 4.2 Visitantes polinizadores en las plantas de girasol estudiadas.

4.2.2 NEONICOTINOIDES EN COLMENAS UBICADAS EN LOTES DE SOJA

El estudio se desarrolló en un lote agrícola sembrado con soja bajo prácticas agronómicas habituales, localizado en Oro Verde (Entre Ríos). En uno de los límites del lote experimental se emplazó, previo a la floración del cultivo, en el mes de febrero, un grupo de tres colmenas de *Apis mellifera* (Fig. 4.3 izq.). Durante el período de floración de la soja, por 5 días consecutivos, se realizaron muestreos de miel inmadura, polen corbicular y abejas pecoreadoras. Estas muestras formaron parte de un estudio en donde en la mitad del período de muestreo, el tercer día, se realizó la fumigación del campo de soja con tres plaguicida, pero ninguno de ellos perteneciente a la familia de los neonicotinoides.

La miel inmadura fue colectada por medio de jeringas, sorbiendo el interior de las celdas no operculadas de los marcos melarios dispuestos sobre las tres colmenas. Las muestras de polen se colectaron a través de trampas caza polen de piquera colocadas en la entrada de las colmenas. Estas trampas consistieron en rejillas agujereadas y un cajón donde se recogió el polen desprendido de las patitas de las abejas al pasar por esta rejilla (Fig. 4.3 centro y der.). Además, mediante la utilización de redes entomológicas, se capturaron abejas que intentaron ingresar a las colmenas y se limpiaron sus corbículas de polen (Fig. 4.3 izq.).



Fig. 4.3 Ubicación de las colmenas y redes entomológicas (izq.). Trampas de polen (centro) y cajón (der.).

Tanto las mieles inmaduras como el polen corbicular fueron sometidos a análisis polínico para comprobar su origen botánico. Asimismo, en las muestras recolectadas se efectuó el análisis de ocho neonicotinoides. Para el polen se utilizó el procesamiento de la muestra descrito sección anterior, el análisis de miel inmadura se realizó siguiendo la metodología optimizada para mieles en el Capítulo 3 y en abejas la desarrollada en el Capítulo 2.

Brevemente, se pesaron 5,0 g de miel inmadura, se adicionaron 10 mL de agua milliQ. Luego se agitó el tubo con un vortex durante 30 s y se mantuvieron las muestras de miel en remojo durante 45 min. Después de este período, se adicionaron 10 mL de MeCN y se agitó con un vortex durante 30 s. Se adicionaron 2 g de $MgSO_4$ y 1 g de NaCl y se agitó manualmente durante 2 min. Esta mezcla se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min y se tomaron 2,0 mL de la capa orgánica sobrenadante para realizar la d-SPE con 300 mg de $MgSO_4$, 50 mg de PSA y 100 mg de C18. Se agitó vigorosamente a mano durante 1 min y se centrifugó a 2500 rpm por 5 min.

Para el procesamiento de las abejas, es importante aclarar que no fueron previamente molidas ya que el objetivo era determinar los neonicotinoides que trajeron incorporados en su cutícula, es decir los de contacto. Se pesaron 5,0 g de muestra y se procedió a la adición de 10 mL de agua con 2% de ácido fórmico. Se agitó 10 s por vortex y se mantuvo la muestra en remojo por 1 h. Luego, se agregaron 10 mL de MeCN y se agitó por vortex durante 30 s. El siguiente paso fue la adición de 4 g de MgSO₄ y 2 g de NaCl se agitó durante 2 min, y luego se realizó un centrifugado de 5 min a 2500 rpm. La d-SPE se realizó tomando 2,0 mL de la capa orgánica del extracto, transfiriéndolos a un tubo con 300 mg de MgSO₄, 300 mg de PSA y 200 mg de C18 (Fig. 2.4). Luego, se agitaron los tubos manualmente de manera vigorosa por 1 min y se centrifugaron durante 5 min a 2500 rpm.

Se tomó un volumen de 1,0 mL de los extractos y se evaporaron hasta sequedad, seguidamente se reconstituyeron con agua:MeCN (98:2) acidificada con 0,1% de ácido fórmico. Todos los extractos se inyectaron en el sistema UHPLC-MS/MS, bajo las condiciones instrumentales desarrolladas en el Capítulo 3, con elución en modo gradiente y la fase móvil compuesta de 5 Mm de formiato de amonio y 0,1% de ácido fórmico en agua:metanol (98:2) y 5 Mm de formiato de amonio y 0,1% de ácido fórmico en metanol, caudal de 0,35 mL min⁻¹, manteniendo el horno de la columna a 40 °C.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 CAPACIDAD DE TRANSLOCACIÓN DEL IMD

4.3.1.1 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE POLEN Y DE NÉCTAR

El análisis de IMD en polen y nectarios de los girasoles tratados con IMD NOVA 60 se realizó por triplicado siguiendo la metodología detallada en la sección anterior. Las concentraciones halladas y sus correspondientes desviaciones estándar (DE) se exponen en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1 Concentración^a de IMD (µg kg⁻¹) en polen y nectarios de girasol.

	Muestra (n=3)	T0	T1 ^d	T2 ^e
AÑO 1	polen de girasol	ND ^b	<LC	2,50 (0,30)
	nectario floral	ND	7,00 (1,00)	22,00 (3,00)
AÑO 2	polen de girasol	<LC ^c	<LC	<LC
	nectario floral	0,20 (0,02)	0,20 (0,02)	0,40 (0,04)

^a Concentración en µg kg⁻¹ y DE de triplicados entre paréntesis.

^b no detectado.

^c Límite de cuantificación de 0,70 µg kg⁻¹ para el polen y 0,15 µg kg⁻¹ en nectarios.

^d Dosis IMD 60%: 6 mL kg⁻¹ de semilla

^e Dosis IMD 60%: 12 mL kg⁻¹ de semilla

En ambos períodos analizados, se puede observar que las concentraciones de IMD en los nectarios florales resultaron mayores que en el polen, evidenciándose los mayores

niveles de IMD en los nectarios del primer año. Con los datos aportados por la estación meteorológica ubicada en las inmediaciones de los cultivos de girasol en el INTA Rafaela, se advirtió una diferencia marcada entre los registros de precipitaciones. Mientras que en el primer año las precipitaciones fueron inferiores a la media histórica, en el segundo año se registraron lluvias superiores a la normal. Si bien los insecticidas sistémicos al penetrar en el tejido vegetal presentan una mayor resistencia a la lluvia que los plaguicidas de contacto, las altas precipitaciones pueden haber generado un lavado superficial de los componentes de la planta como los nectarios y el polen de las inflorescencias de los girasoles.

En este segundo año se encontraron además residuos de IMD en las muestras de la parcela control, esto puede deberse a la persistencia de los neonicotinoides en suelo. Aunque los neonicotinoides aplicados a través de un tratamiento de semillas están diseñados para ser absorbidos por la planta de cultivo objetivo, solo se absorbe del 1,6 al 20% del ingrediente activo, y la mayoría permanece en el suelo [Wood y Goulson 2017]. En investigaciones previas donde se midió la concentración de IMD en suelos se sugirió la posibilidad de acumulación ya que las concentraciones de IMD fueron más altas en los suelos que habían sido tratados en dos años consecutivos que en los suelos que solo habían recibido un tratamiento [Bonmatin y col. 2005, Stewart y col. 2014]. Dado que los neonicotinoides son solubles en agua y pueden persistir en suelos y cuerpos de agua, pueden ser absorbidos por cualquier planta silvestre presente en las cercanías, de hecho fueron encontrados residuos de neonicotinoides en polen y el néctar de plantas silvestres aledañas [Wood y Goulson 2017]. Todos estos aspectos, justifican la eventual contaminación de polen y néctar de los cultivos no tratados.

4.3.1.2 INSPECCIONES Y REGISTRO DE POLINIZADORES

Durante los dos años de ensayo se observó el mismo patrón, las especies de insectos polinizadores que visitaron con mayor frecuencia las plantas de girasol fueron *Bombus sp.* (abejorro), *Apis mellifera* L. y *Xylocopa sp.* (abejorro carpintero europeo). Se observó que las visitas de *Xylocopa sp.* difirieron entre los distintos tratamientos ($p < 0,05$) con más frecuencia de visitas en el control, luego en la de menor dosis y por último en la de mayor dosis. Sin embargo, en *Bombus sp.* y *Apis mellifera*, no se manifestaron diferencias significativas ($p > 0,05$). De hecho y de manera alarmante, en un estudio donde se alimentaron artificialmente abejas melíferas con soluciones de sacarosa adicionadas y no adicionadas con neonicotinoides IMD, CLT y TMX, se encontró que las abejas prefirieron alimentarse con las soluciones adicionadas con neonicotinoides probablemente debido a que, al igual que la nicotina, generan adicción [Kessler y col. 2015].

4.3.2 NEONICOTINOIDES EN COLMENAS UBICADAS EN LOTES DE SOJA

Para el análisis de neonicotinoides en miel inmadura (néctar) se utilizó el método optimizado y validado para el análisis de neonicotinoides en miel. Si bien el método empleado para el análisis de polen y abejas fue sólo validado para el análisis de IMD, se realizaron tres réplicas de ensayos de recuperación de neonicotinoides en el nivel

de 10 y 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para polen y abejas, respectivamente (Tabla S4.1). En abejas, el análisis se realizó de manera superficial en la abeja entera, es decir se evaluaron los neonicotinoides a las que pudieron estar expuestas por contacto directo durante el vuelo, por lo tanto se encontraron menores interferencias en el sistema cromatográfico-espectrométrico de masa que cuando se evaluaron las abejas procesadas. De todas maneras, de los ocho neonicotinoides analizados el único que fue detectado y cuantificado es el IMD (Tabla 4.2). Cada una de las muestras fue tomada de una colmena diferente ($n=3$), realizándose el muestreo por 5 días consecutivos durante la etapa de floración de la soja.

Tabla 4.2 Concentraciones \pm DE $\mu\text{g kg}^{-1}$ de IMD en muestras de colmena ubicadas en lote de soja

muestra (n=3)	día 1	día 2	día 3	día 4	día 5
miel inmadura	<LC ^a	<LC	n.e. ^b	n.e.	<LC
polen corbicular	12,0 \pm 3,0	7,0 \pm 3,0	n.e.	3,0 \pm 2,0	3,0 \pm 4,0
abeja pecoreadora	ND ^c	<LC	1,6 \pm 1,5	ND	1,3 \pm 1,1

^a Límite de cuantificación de 1,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para miel inmadura, 0,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en polen corbicular y 0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en abeja pecoreadora.

^b n.e.: no evaluado, no se tomó la muestra.

^c no detectado.

Al efectuarse el análisis de ocho neonicotinoides, siete de los cuáles se encuentran registrados en Argentina [SENASA 2010], solo se encontró IMD en niveles de concentración de 3,0-12,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en el polen y <0,5-1,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en abejas. Esto no es llamativo dado que con el TMX son de los neonicotinoide más empleados en el país para la protección de cultivos extensivos [Kahl 2015].

En estudios previos donde se evaluó la exposición potencial de los polinizadores a los insecticidas neonicotinoides utilizados como tratamientos de semillas de maíz, algodón y soja, encontraron menores incidencias de neonicotinoides, los detectaron solo en el 5% de las abejas melíferas pecoreadoras, y solo hubo una detección de trazas (< 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$) en el polen transportado por esas abejas. Las flores de soja estuvieron muy por debajo de los niveles de preocupación definidos que se cree que causan una mortalidad aguda en las abejas melíferas [Stewart y col. 2014]. Teniendo en cuenta que las abejas obreras son las que consumen mayores cantidades de néctar y polen (6,5 mg de polen por día con colectas de 80,2 mg de néctar por día [Sanchez-Bayo y Goka 2014]), y al presentar toxicidades agudas (DL50) para el IMD de entre 119 y 3,7 ng bee⁻¹ [Sanchez-Bayo y Goka 2014, EFSA 2013, Laurino y col. 2013, Decourtye y Devillers 2010], las abejas del presente estudio también estarían expuestas a niveles por debajo de los de preocupación por intoxicación aguda, consumiendo mediante el polen recolectado como máximo a 0,078 ng día⁻¹.

4.3.2.1 ANÁLISIS POLÍNICO DEL POLEN CORBICULAR

Del polen corbicular analizado, sólo el 5,7% correspondió a soja y menos del 0,2% a alfalfa (no se ha registrado otro cultivo en polen). El resto (94%) correspondió a especies ruderales presentes en orillas de tajamares y arroyos, laterales de alambrado y banquinas de caminos vecinales. Por lo tanto, es posible que parte de la contaminación haya provenido de las especies ruderales que absorben plaguicidas que escurren desde los campos hacia las zonas más bajas.

4.4 COMPARACIÓN DE LOS DOS ENSAYOS

Se observó que en contraposición a las concentraciones halladas en girasol, el polen corbicular de las colmenas situadas en el lote de soja resultó contaminado por el insecticida en mayor proporción que la miel inmadura (néctar). Las diferencias podrían deberse a propiedades intrínsecas y características de cada uno de los cultivos, sin embargo existen otras variables que pueden presentar efecto en los resultados como: el modo de aplicación del insecticida, la topografía y las características del suelo, las condiciones del clima y la temporada de recolección. Asimismo, en la miel inmadura pudo haberse presentado una interacción entre sus enzimas y el IMD, disminuyendo su concentración [Kaškonienė y Venskutonis 2010].

En el primero de los ensayos, evaluamos la capacidad de translocación del IMD al ser aplicado como curasemilla en semillas de girasol, previo a su siembra. Esta es una práctica habitual que se realiza en cultivos de girasol para prevenir el ataque por tenebriónido del girasol (*Blapstinus sp.*). En la soja, en cambio, si bien en el país está permitido el uso del IMD como curasemilla para controlar el picudo de la soja (*Promecops carinicollis*), su uso más habitual es como insecticida de rociado, se lo suele emplear inclusive combinado con otros insecticidas como los piretroides gammacialotrina, lambdacialotrina, beta-ciflutrina y bifentrín u organofosforados como el clorpirifós [CASAFE 2013]. Este modo de aplicación genera una deriva, es decir una pérdida del producto y una mayor contaminación del ambiente circundante. Sumado a las diferencias en el modo de aplicación, en los ensayos practicados se observan diferentes topografías. Mientras que Rafaela se encuentra ubicada en una zona llana, la topografía de Oro Verde posee lomadas de suave pendiente y por lo tanto, mayores probabilidades de presentar escorrentía superficial, es decir el transporte del plaguicida a través del agua de lluvia, incrementando por esta vía la contaminación del entorno. Por consiguiente, es muy probable que el modo de aplicación y las características del terreno hayan contribuido a la detección de IMD en el polen corbicular, incluso sabiéndose que sólo el 6% del polen correspondió al cultivo.

Entonces, podemos concluir que en el polen y en los nectarios de girasol, las concentraciones de IMD están más estrechamente relacionadas a las capacidades de translocación del IMD en la planta de girasol. Pero que en el campo de soja, dado a las características de este ensayo, en dónde se analizaron pólenes y néctar recolectado por las abejas, la concentración del IMD pueden no ser representativa de su distribución dentro de la planta de soja.

De todas maneras, en ambos ensayos se comprobó la exposición de las abejas al IMD. Haciendo el mismo desarrollo que para las abejas melíferas expuestas al polen contaminado del campo de soja, se puede inferir que la mayor exposición la tendrían las abejas que colectasen el néctar de las plantas de girasol del año 1 con un valor de 1,8 ng abeja⁻¹ por día. Por lo tanto, las concentraciones halladas se encontraron en los niveles de subletalidad para abejas melíferas. Sin embargo, esto no significa que su carga de IMD no pueda generar efectos a largo plazo o crónicos en abejas melíferas u otros polinizadores.

CAPÍTULO 5. ALIMENTACIÓN ARTIFICIAL DE ABEJAS CON JARABE ADICIONADO CON IMD.

5.1 INTRODUCCIÓN

El modo de acción del IMD consiste en actuar como un agonista colinérgico-nicotínico y afectar los procesos neuronales en el cerebro, como el aprendizaje olfativo de las abejas [Simon-Delso y col. 2015]. Se ha sugerido que el aprendizaje olfativo de las abejas se vio significativamente afectado después de la exposición oral crónica a IMD ($0,02 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) durante 11 días [Li y col. 2019]. Además, después de la exposición subletal de abejas melíferas a este insecticida se redujeron fuertemente los genes que codifican las principales proteínas de la jalea real, que desempeñan papeles críticos y multifuncionales en la fisiología, el desarrollo y la extensión de las colonias de abejas [Wu y col. 2017]. Por tanto, los estudios de laboratorio concluyeron que el IMD causa trastornos en abejas melíferas individuales; sin embargo, el efecto de este plaguicida a nivel de toda la colonia en el campo no ha sido suficientemente estudiado [Pisa y col. 2015]. En especies sociales como las abejas melíferas, la división eficiente del trabajo y la coordinación de tareas proporcionan un efecto amortiguador de los estresores ambientales, pero esta capacidad amortiguadora tiene límites que se pueden agotar, sobre todo cuando los estresores son frecuentes [Klein y col. 2017]. Reforzando estas sugerencias, Di Noi y col. (2021), realizaron una revisión de la literatura existente sobre el tipo de efectos evaluados en *A. mellifera*, recopilando información sobre las regiones, los enfoques metodológicos, el tipo de contaminantes y las etapas de vida de las abejas melíferas, y concluyeron que pocos artículos han investigado los efectos subletales sobre las abejas melíferas en sus condiciones y hábitats naturales.

Por lo tanto, con el objetivo de evaluar los efectos subletales sobre colonias de abejas melíferas, se llevó a cabo un estudio en uno de los apiarios perteneciente al INTA EEA Rafaela. Para ello, se alimentaron colonias de *A. mellifera* L. con jarabes adicionados con diferentes dosis del neonicotinoide durante siete semanas, desde septiembre a octubre de 2014. A lo largo del ensayo, se evaluaron varios parámetros como el desempeño de la colmena, la población de abejas, el número de larvas, el almacenamiento de polen y miel. Asimismo, se realizaron muestreos de abeja, larva, miel y cera de estas colmenas, combinando la evaluación de la transferencia del insecticida entre matrices de la colmena y las posibles anomalías funcionales de la colonia.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 APIARIO

Se instaló un apiario conformado por 30 colmenas de *Apis mellifera* L. en la EEA Rafaela perteneciente al INTA (31°12'S 61°30'O) durante septiembre-octubre de 2014 al comienzo de la temporada de producción de miel. Las colonias se distribuyeron aleatoriamente en cinco tratamientos (n=6). Al inicio del ensayo, cada cámara de cría estuvo compuesta por diez cuadros, un promedio de 15.000 abejas obreras y una reina de un año y el mismo origen genético. Las colmenas fueron ubicadas en dos líneas paralelas con dos colmenas por caballete y una separación entre caballetes de 1 m.

5.2.2 DOSIFICACIÓN DE IMD

Las dosis fueron elegidas de acuerdo a ensayos de toxicidad previos en laboratorio [Sanchez-Bayo y Goka 2014, EFSA 2013, Laurino y col. 2013, Decourtye y Devillers 2010], a datos recolectados de exposición por residuos de IMD [Sanchez-Bayo y Goka 2014, Bonmatin y col. 2015, Lu y col. 2016] y a los niveles encontrados en el polen y el néctar analizados en el presente trabajo (Capítulo 4). Todas las colonias fueron suministradas semanalmente, durante siete semanas, con soluciones de sacarosa con diferentes concentraciones de IMD: 0, 15, 30, 120 y 240 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (control o T0, T1, T2, T3 y T4, respectivamente) (Tabla 5.1).

Tabla 5.1 Concentración de los jarabes y dosis suministrada por abeja por día en cada tratamiento.

Tratamiento	Concentración ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Dosis ng abeja ⁻¹ / día
T0	0	0
T1	15	0,09
T2	30	0,18
T3	120	0,70
T4	240	1,40

El IMD utilizado fue obtenido en polvo (98,9% de pureza) de Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania). Inicialmente, se prepararon dos soluciones primarias en agua destilada: una de 200 mg L^{-1} y la otra de 20 mg L^{-1} , que fueron conservadas en freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de la alimentación de las abejas. La solución más concentrada se utilizó para el preparado de los jarabes de los T3 y T4 (120 y 240 $\mu\text{g kg}^{-1}$), y la más diluida para los T1 y T2 (15 y 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$). De esta manera, las soluciones finales se encontraron constituidas por la proporción 2:1 azúcar:agua destilada (densidad= 1,326 g mL^{-1} a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) y la dosis correspondiente de IMD. Se prepararon jarabes frescos cada semana y se corrigió el volumen suministrado a cada colonia dependiendo del número de abejas adultas. Por consiguiente, la primera semana se suministraron 500 mL (665 g) de jarabe por colmena (0,03 mL por abeja), y desde la segunda semana hasta finalizado el período de alimentación (semana 7) el volumen de jarabe se ajustó de acuerdo con el número de abejas para garantizar la dosis de 0,03 mL por individuo. El máximo nivel de concentración elegido proporcionó

1,4 ng de IMD por abeja por día, lo que es consistente con exposiciones ambientales. Asimismo, todas las dosis se encontraron por debajo de la DL50, asegurando el nivel de subletalidad del ensayo. Se verificó la concentración de IMD en los jarabes de alimentación mediante el análisis con LC-ESI-MS/MS.

Cada una de las semanas de alimentación se comprobó que las colonias hayan consumido todo el jarabe. Una vez completado este período de alimentación artificial se colocaron las alzas melarias, conformadas por 9 cuadros, en la parte superior de la colmena separada de la cámara de cría por un excluidor de reina para limitar el alcance de la actividad de puesta de huevos. Debido a que la reina posee un tamaño mayor que el del resto de las abejas de la colmena, este excluidor consiste simplemente en una rejilla que impide a la reina salir de la zona delimitada de la cámara de cría de la colmena.

5.2.3 MUESTREO Y ANÁLISIS DE IMD

Para evaluar la distribución del insecticida dentro de la colmena, se diseñó un plan de muestreo no invasivo ni perturbador para las abejas. De esta manera, se tomaron muestras de larvas y abejas pecoreadoras de 2 colmenas por tratamiento durante el período de alimentación. Cada semana, previo al suministro de los jarabes, se extrajeron 100 abejas adultas para el posterior análisis. Adicionalmente, en las semanas 1, 3 y 7 (comienzo, mitad y final del periodo de alimentación) los muestreos fueron repetidos 24 y 48 hs después de la suplementación de las soluciones de sacarosa para evaluar la capacidad de las abejas para metabolizar el insecticida. En las mismas semanas (1, 3 y 7) se muestrearon 100 celdas de cría con larva. Además, dos meses después de finalizado el período de alimentación (diciembre de 2014), se tomaron muestras de miel y cera de la cámara de cría y la media alza de todas las colmenas (Fig. 5.1). Todas las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta el momento del análisis. La metodología empleada para el análisis de residuos de IMD en las muestras detalladas fue descripta en el Capítulo 2 (Fig. 2.4).

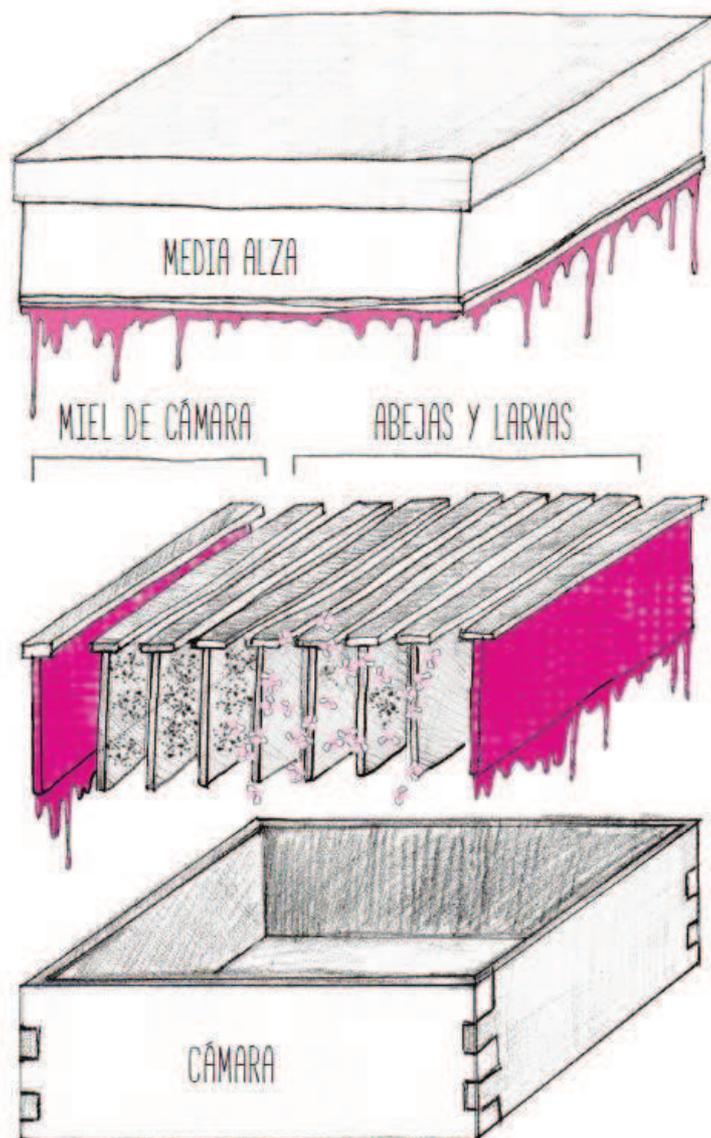


Fig. 5.1 Esquema simplificado de compartimentos de la colmena. La cámara de cría contiene los panales centrales con cría y los laterales con miel y polen.

Conociendo las concentraciones de IMD en la miel de la cámara y la media alza, se realizó un balance de masa para calcular el porcentaje de IMD finalmente almacenado en la miel de cada una de las colonias. Para ello se realizó un balance de masa de manera de medir la cantidad (mg) de IMD que ingresó y la que finalmente se encontró en la miel. Se calculó la masa de IMD que ingresó a la colonia como la concentración del jarabe multiplicada por el total de kg de jarabe suministrados durante las siete semanas (Ec. 5.1). La masa almacenada en la miel se calculó como el peso de miel (kg) acumulado en la cámara multiplicado por la su concentración de IMD más el peso (kg) de miel de la media alza multiplicado la concentración de la misma (Ec. 5.2). Estos dos valores, expresados en mg de IMD, nos permitieron evaluar el porcentaje finalmente depositado en la miel (Ec. 5.3).

$$m_1 = \sum_{i=1}^7 m_i * C_i \quad (\text{Ec. 5.1})$$

$$m_2 = m_{mr} * C_{mr} + m_{ms} * C_{ms} \quad (\text{Ec. 5.2})$$

$$\text{IMD en miel (\%)} = \frac{m_2}{m_1} * 100 \quad (\text{Ec. 5.3})$$

Donde: m_1 (mg) es la masa inicial de IMD, y m_i (kg) y C_i (mg kg⁻¹) son la masa de jarabe adicionado por semana y la concentración de este jarabe, respectivamente.

m_2 (mg) es la masa final de IMD en la miel, m_{mr} y m_{ms} (kg) es el peso de miel de reserva (cámara) y de miel de media alza, y C_{mr} y C_{ms} (mg kg⁻¹) son las concentraciones halladas de IMD en la miel de estos compartimentos.

5.2.4 EVALUACIÓN DE COLONIAS

El posible impacto del IMD en la dinámica de las colonias se estimó a través del número de abejas obreras (CCA), el número de celdas con cría operculada (CCC), el número de celdas con polen (CCP) y de miel de reserva (CCM) siguiendo el método Liebefeld (Dainat y col. 2020). Las alzas melarias se agregaron luego de terminado el período de alimentación, en octubre de 2014. Cada alza se pesó antes de ser introducida en la colmena y previo a la cosecha de miel (febrero de 2015), y a partir de la diferencia de peso se obtuvo el rendimiento de miel por colonia.

Además, se realizaron inspecciones complementarias durante el manejo de las colmenas para observar remplazos de reina e infecciones por patógenos. Se realizaron recuentos de esporas de *Nosema spp.* en abejas adultas de dos colmenas por tratamiento, al inicio, durante y luego de finalizado el período del estudio. Para ello, se recolectaron manualmente no menos de 60 abejas obreras en la entrada de la colonia y se colocaron en matraces de plástico etiquetados conteniendo 60 mL de alcohol 96°. Se tomaron los abdómenes de las abejas muestreadas al azar y se trituraron. Se agregaron 60 mL de agua destilada y se observó la suspensión de esporas de *Nosema spp.* usando un microscópico óptico 40x (Nikon, China) y un hemocitómetro. Este es el método de muestreo más utilizado, proporciona información sobre el número de esporas por abeja y puede detectar un 5% de las abejas infectadas con un 95% de confianza [Fries 1988].

5.2.4.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para evaluar los efectos de los tratamientos se comparó el resultado de cada parámetro (CCA, CCC, CCM, CCP y la abundancia de *Nosema spp.*) con los del control, mediante ANOVA. Para comparar la mortalidad y los problemas en las reinas de los diferentes tratamientos se utilizó el estadístico Chi-cuadrado. Todos los análisis se realizaron utilizando el software InfoStat (<http://www.infostat.com.ar>).

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1 CONSIDERACIONES PREVIAS, SELECCIÓN DE DOSIS DE IMD

El enfoque escalonado de la presente investigación, incorporó una amplia gama de tratamientos (cuatro niveles), en los que se eligieron dosis para imitar una situación de campo realista, siguiendo los protocolos proporcionados por la EPA para una mejor evaluación del riesgo para las abejas [EPA 2014]. Así, se seleccionaron dos niveles más conservadores en los niveles inferiores ($15, 30 \mu\text{g kg}^{-1}$) y dos más realistas en los niveles superiores (120 y $240 \mu\text{g kg}^{-1}$). El estudio simuló una exposición a largo plazo con concentraciones subletales de IMD.

En la alimentación artificial de abejas, una de las mayores dificultades es la selección de dosis consistentes con la exposición real de las abejas a los neonicotinoides. Dada a la gran cantidad de cultivos en los que se usan los neonicotinoides y la gran escala de uso, existe una gran variabilidad en el espacio y el tiempo para cada posible vía de exposición. Entre los factores que intervienen se encuentra la variabilidad de concentraciones encontradas en polen y néctar de plantas tratadas, que a su vez depende del modo de aplicación, el cultivo estudiado, la estación del año, las condiciones meteorológicas, la localidad, el suelo, entre otros. Asimismo, la existencia de otras fuentes de alimento además del cultivo estudiado, como así también la exposición por otras vías, complementan el entramado de variables que intervienen en la exposición de las abejas. Esto se complica aún más por el hecho de que el área de alimentación de una colonia de abejas puede extenderse en un radio de hasta 9 km alrededor de la colmena, que nunca es un paisaje homogéneo [van der Sluijs y col. 2013].

En una tentativa de evaluar esta exposición, Bonmatin y col. (2015) integraron los resultados de alimentos almacenados en colonias de abejas de todo el mundo, fijando un rango general de exposición a neonicotinoides y metabolitos de 1 a $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. Lu y col., por su parte, analizaron ocho neonicotinoides en polen y miel de 62 colmenas en Massachusetts y encontraron que el IMD fue el más abundante con concentraciones <1 hasta $43 \mu\text{g kg}^{-1}$ en polen y hasta $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ en miel [Lu y col. 2016].

Además de las variaciones en el espacio y tiempo, dentro de una colonia existen diferentes categorías de abejas que están expuestas de diferentes maneras y grados. Por ejemplo, las pecoreadoras o recolectoras de polen (que difieren de las recolectoras de néctar) no consumen el polen, simplemente lo llevan a la colmena. El polen es consumido por las abejas nodrizas (encargadas de alimentar a las larvas, la reina y los zánganos) y en menor medida por las crías. Las recolectoras en cambio consumen más néctar y miel, de los cuáles obtienen la energía para volar. Por lo tanto, entre las diferentes castas que integran la colonia, las obreras son las que se encuentran más expuestas a los neonicotinoides por ser las que consumen mayores cantidades de polen y néctar. Mientras las nodrizas se alimentan en promedio con 6,5 mg de polen por día, las pecoreadoras colectan 80,2 mg de néctar por día. Según Sanchez-Bayo y Goka (2014), teniendo en cuenta estos consumos diarios y las concentraciones de neonicotinoides halladas, las abejas podrían estar expuestas a dosis promedio menores a $0,5 \text{ ng abeja}^{-1}$ por día, con dosis máximas cercanas a los 6

ng abeja⁻¹. Observando los resultados de nuestros análisis en las flores de girasol, se puede inferir que la mayor exposición sería de 1,8 ng abeja⁻¹ por día en abejas que colectasen néctar de las plantas de girasol del año 1 (Tabla 4.1). Por lo tanto, la máxima concentración de 240 µg kg⁻¹ a la que fueron expuestas las abejas mediante la alimentación artificial con jarabes de IMD, equivalentes a una dosis de 1,4 ng abeja⁻¹ por día, es consistente con las concentraciones encontradas en estudios previos.

5.3.2 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

5.3.2.1 JARABES SUPLEMENTADOS

Se verificaron las concentraciones de IMD en los jarabes de todos los tratamientos durante cada una de las siete semanas de alimentación. Las concentraciones de IMD se mantuvieron estables a lo largo de las siete semanas, obteniéndose los siguientes valores promedio (n=7): 16 ± 3, 32 ± 7, 123 ± 4 y 244 ± 35 µg kg⁻¹ para T1, T2, T3 y T4, respectivamente.

5.3.2.2 ABEJAS Y LARVAS

La concentración hallada del principio activo en los tejidos de las abejas obreras fue mayor en las colmenas T3 y T4. Estudios de laboratorio previos encontraron que las abejas adultas metabolizan y excretan rápidamente IMD, con una vida media de cinco horas [Suchail y col. 2004]. Se observó que en el instante previo a la alimentación (t0), en cada una de las semanas, las concentraciones de IMD fueron similares a las encontradas 24 y 48 h después de la suplementación de los jarabes de sacarosa (Fig. 5.2). Por lo tanto, podría interpretarse que esas concentraciones probablemente representan en su mayoría jarabe no digerido en el intestino o que, a pesar de que la suplementación se realiza solo una vez por semana, las abejas estuvieron en contacto con el insecticida todos los días del período de exposición ya sea por consumo directo del jarabe de sacarosa o por el que almacenaron en las celdas. De todos modos, las tendencias en la persistencia del compuesto después de 24 y 48 h de exposición parecerían mostrar algunas diferencias entre T3 y T4, sobre todo en la última semana de suplementación (S7). Mientras que en T3 las concentraciones a las 24 h fueron el doble de las encontradas a las 48 h, en T4 las diferencias entre estos días fueron menores. Estos resultados sugieren una disminución de la capacidad de desintoxicación en las abejas expuestas a las dosis más altas. La falta de recuperación de las abejas melíferas ya fue observada por Cresswell y col. (2014). Al exponer abejas melíferas y abejorros a jarabes de IMD, encontraron niveles más altos del insecticida en los abejorros y vincularon estos resultados con el hecho de que los abejorros consumían más jarabe que las abejas melíferas. Sin embargo, los abejorros fueron capaces de eliminar aproximadamente 3 veces más IMD por día que las abejas melíferas.

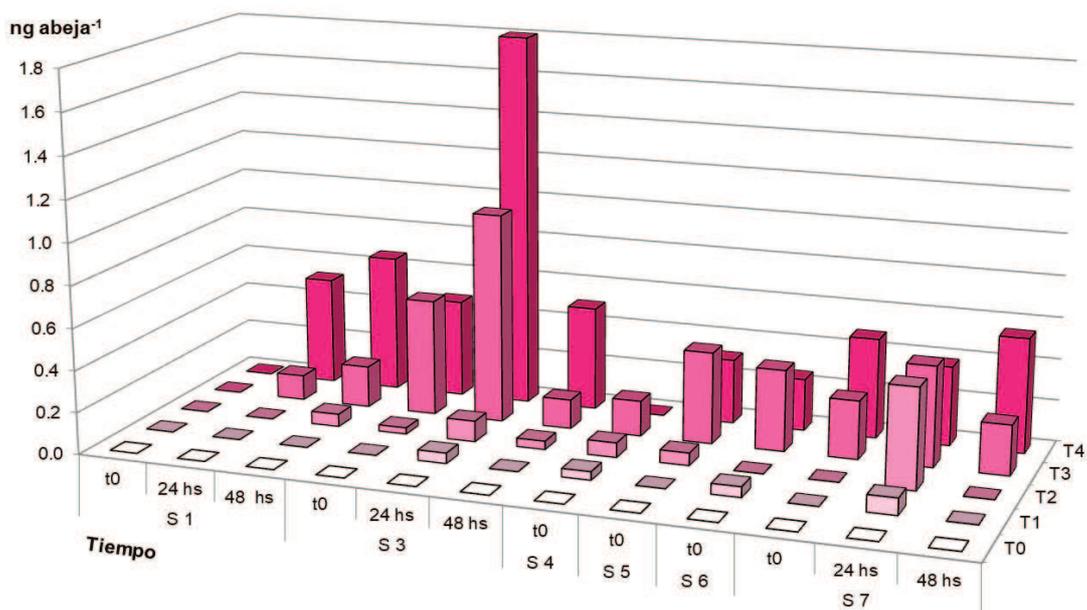


Fig. 5.2 Promedio (n=2) de IMD por abeja adulta (ng abeja⁻¹) a lo largo de las siete semanas (S1 a S7) de alimentación. Los muestreos fueron realizados en el instante previo a la suplementación de los jarabes (t0), 24 y 48 hs pos-suplementación.

La concentración máxima de IMD en abejas adultas, 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$, se registró en la semana tres de comenzado el ensayo en una de las colmenas del T4. Teniendo en cuenta que en promedio cada abeja adulta pesa 100 mg, el valor máximo detectado fue prácticamente de 3 ng de IMD por abeja. En ensayos de laboratorio, el IMD presenta una alta toxicidad oral para abejas (*Apis mellifera*), con valores de DL50 que varían entre 3,7 y 119 ng de IMD por abeja [Sanchez-Bayo y Goka 2014, EFSA 2013, Laurino y col. 2013, Decourtye y Devillers 2010]. Esta variabilidad en las DL50 reportadas puede deberse a diferentes métodos de exposición y la variabilidad entre las abejas, entre ellos la edad de las abejas testeadas. De todas maneras, los valores de IMD en abejas registrados en este ensayo se encuentran debajo de las DL50 reportadas, evidenciando la exposición subletal.

En cuanto al efecto del IMD sobre la cría, la exposición de las larvas a IMD puede causar mayores problemas a las colonias porque afecta su correcto crecimiento; las larvas podrían verse afectadas por una contaminación con IMD de tan solo 0,04 ng larva⁻¹ [Yang y col. 2012]. Sin embargo, en el presente estudio se encontraron residuos sólo en el 10% de las larvas muestreadas al inicio, a mediados y al final de las siete semanas de alimentación (n=30) y sólo en una de las muestras (T1, S7) superó 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Estos resultados sugieren que ni la reina ni el alimento larval estuvieron expuestos al insecticida; por lo tanto, las larvas y la reina se comportarían como si fueran una población preservada libre de IMD. En este sentido, dado que el néctar (o suplementos de azúcar) es la principal fuente de alimento para las abejas melíferas forrajeras, su contaminación puede representar la mayor parte del riesgo potencial para las abejas adultas. Sin embargo, como el polen procesado es la fuente de proteína para la reina y la cría, podría representar la mayor parte del riesgo potencial para ellos. Por tanto, para complementar este trabajo una investigación adicional

debería abordar la alimentación artificial con tortas de polen adicionadas con IMD de manera de estudiar ambas fuentes de alimentación y sus efectos subletales crónicos en las abejas melíferas.

5.3.2.3 MIEL Y CERA

Al ser el IMD una molécula relativamente pequeña, polar y altamente soluble en agua (Tabla S2.5), es esperable que la miel estuviese más contaminada que la cera. De hecho, la miel presentó las mayores concentraciones de IMD, con un 87% de muestras positivas, detectándose residuos de IMD en un rango entre el LC ($0,25 \mu\text{g kg}^{-1}$) y $91 \mu\text{g kg}^{-1}$ en la miel de reserva de la cámara de cría, y del LC a $53 \mu\text{g kg}^{-1}$ en la miel de las medias alzas (Fig. 5.3 A). Se observa que si bien las concentraciones detectadas fueron variables, mostraron una asociación con la dosis suministrada en cada tratamiento.

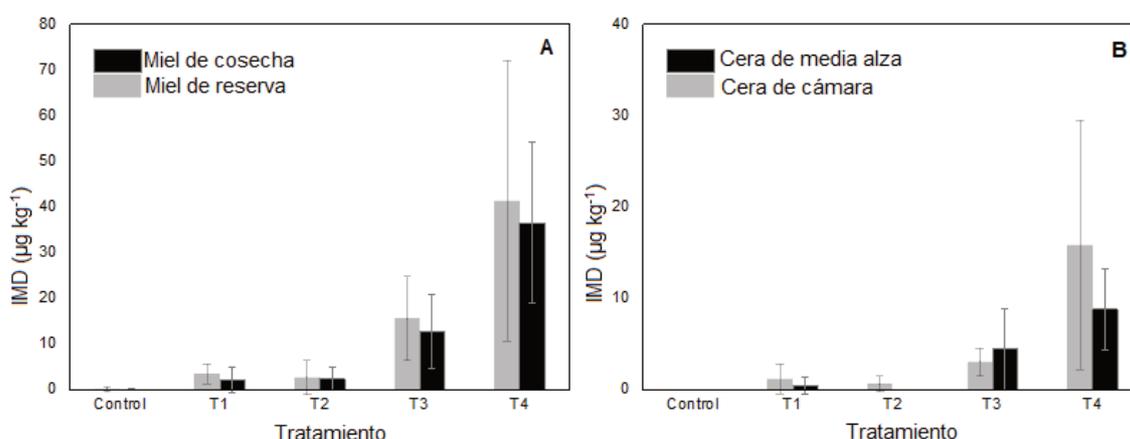


Fig. 5.3 Concentración media ($\mu\text{g kg}^{-1}$) y desviación estándar ($n=6$) de IMD en miel (A) y cera (B) de las colmenas en estudio.

El balance de masa realizado entre los miligramos de IMD introducidos en las colonias a través de los jarabes de azúcar y los finalmente obtenidos en la miel (Ec. 5.1, 5.2 y 5.3) expuso que hasta el 60% del total de IMD suministrado durante las 7 semanas se almacenó en la miel. Como muestran los niveles de residuos, se encontró una alta proporción de IMD en las reservas de miel y en las alzas de miel. Dado que las medias alzas se agregaron a las colmenas cuando finalizó el período de alimentación, es evidente que las abejas estuvieron expuestas y en contacto con el contaminante incluso después del final del período de alimentación. Siede y col. (2017) también utilizaron jarabes enriquecidos para estudiar el rendimiento de las colonias de abejas melíferas expuestas al neonicotinoide TCD. Ellos detectaron, incluso casi un año después del final del período de alimentación artificial, una gran proporción del ingrediente activo como compuesto no transformado (padre) en las reservas de miel [Siede y col. 2017]. Por lo tanto, las colonias estudiadas pueden haber estado menos expuestas a los metabolitos en comparación con las abejas que se alimentan naturalmente con néctar de plantas contaminadas. Algunos metabolitos de IMD, como

el IMD-olefina, se caracterizan por tener un potencial tóxico mayor que el compuesto original [Suchail y col. 2004, EFSA 2018].

Se detectó IMD en concentraciones cuantificables ($0,3$ y $1 \mu\text{g kg}^{-1}$) en dos de las muestras de miel control. Estos resultados podrían deberse al comportamiento de pillaje mediante el cual las abejas de las colmenas más pobladas, ingresan a las colmenas más débiles para robarles la miel almacenada.

Además, se detectó IMD en el 60% de las muestras de cera recolectadas, con niveles que van desde 1 (LC) hasta $35 \mu\text{g kg}^{-1}$ en la cámara de cría, y desde el LC hasta $12 \mu\text{g kg}^{-1}$ en la cera extraída de las medias alzas (Fig. 5.3 B).

Dado que la miel está en contacto con la cera del panal, si la miel o la cera se contaminan, se espera que la otra también se contamine. Sin embargo, la distribución de un contaminante entre matrices depende de diferentes variables, como las propiedades fisicoquímicas del contaminante y la matriz, el tiempo y la superficie de contacto entre las matrices y la temperatura. Debido a la composición de la cera de abejas: una mezcla compleja de hidrocarburos, ácidos grasos, ésteres y otras sustancias de baja polaridad, cabría esperar una baja incidencia de muestras de cera contaminadas por IMD. Sin embargo, al igual que en nuestro trabajo, la detección de IMD y otros neonicotinoides en cera de abejas ya ha sido reportada en la literatura [Yáñez y col. 2013].

5.3.3 EVALUACIÓN DE COLONIAS

5.3.3.1 POBLACIÓN DE ABEJAS Y RENDIMIENTO DE MIEL

Un aspecto clave en la biología de las abejas es que la colonia se comporta como un “superorganismo”; de hecho, la unidad funcional de la abeja melífera es la colonia misma, y el número de organismos involucrados en las diversas tareas para mantener dicha colonia es crítico. Variando entre el invierno y el verano, una colonia de abejas melíferas está típicamente formada por entre 10.000 y 60.000 individuos y funciona como una unidad cooperativa manteniendo el almacenamiento de los alimentos, la higiene de las celdas, la defensa de la colmena, el cuidado de las crías, etc [van der Sluijs y col. 2013]. Por lo tanto, un efecto subletal que afecta el número de individuos que realizan funciones específicas puede influir en el funcionamiento de toda la colonia.

En este estudio se evaluó la composición total de las colonias expuestas a cada tratamiento. Al inicio del presente ensayo cada colonia tenía un promedio de 15.000 obreras y una reina de la misma edad (1 año) y origen genético, y condiciones sanitarias controladas, al final de este estudio las colonias no mostraron diferencias, a pesar de que se suplementaron con diferentes dosis de IMD. Todos los parámetros estudiados (CCA, CCC, CCP, CCM) durante este experimento siguieron patrones estacionales normales.

Las colonias alimentadas repetidamente con el jarabe adicionado no mostraron ningún efecto inmediato o problemas serios, incluso hasta el final del período de observación,

es decir, el verano, durante la cosecha de miel (febrero de 2015). De hecho, ni el nivel población de abejas adultas (CCA) ni en el número de celdas con cría (CCC), mostraron diferencias significativas ($p=0,89$ y $p=0,86$, respectivamente) entre los tratamientos y el control al final de la suplementación (Tabla 5.1). Por el contrario, las reservas de miel (CCM) mostraron diferencias ($p=0,037$), con la mitad de los panales completos en T4 en comparación con otros tratamientos. Este patrón de comportamiento también se observó en T2 ($p=0,0002$); por lo que se descarta la posibilidad de atribuir este efecto a la mayor exposición a IMD. Durante la cosecha, no se registraron diferencias en el rendimiento de miel de alzas entre tratamientos ($p=0,96$).

Tabla 5.1 Media de cuadros de la cámara de cría cubiertos con abejas (CCA), cría operculada (CCC), polen (CCP) y miel (CCM).

Tratamiento ^a	CCA		CCC		CCP		CCM		Rendimiento de miel ^d (kg)
	inicial ^b	final ^c	Inicial	final	inicial	final	inicial	final	
control	5,8	10,3	3,6	6,2	0,3	0,5	0,9	1,8 ^e	23 ± 17
T1	5,8	9,8	3,2	5,7	0,8	0,5	1,0	1,9	21 ± 17
T2	5,8	9,8	3,3	6,0	0,3	0,3	0,9	1,1 ^e	22 ± 19
T3	5,8	10,2	3,2	5,2	0,3	0,5	0,8	1,8	17 ± 18
T4	5,6	9,0	3,5	5,6	0,3	0,5	0,8	0,9 ^e	20 ± 17

^a n=6 (seis colonias por tratamiento).

^b Comienzo del período de alimentación: 10 de septiembre de 2014.

^c Final del período de alimentación: 22 de octubre de 2014.

^d Rendimiento de miel (media y desviación estándar) al momento de la cosecha el 12 de febrero de 2015.

^e Diferencias estadísticamente significativas entre reservas de miel (CCM) de algunos tratamientos y control, verificadas por comparaciones múltiples.

Una de las posibles razones de esos resultados podría ser la alimentación en campo abierto, donde las abejas son libres de alimentarse de fuentes distintas a la dieta enriquecida, lo que diluye los efectos del contaminante estudiado [Di Noi y col. 2021].

Varios estudios similares informan efectos después de la exposición artificial a los neonicotinoides, como un incremento en el transporte de polen durante el período de alimentación y del número de celdas de cría en invierno [Faucon y col. 2005], una mortalidad a largo plazo, incluso ocho meses después de la exposición [Colin y col. 2019], aumento del número de esporas de Nosema [Pettis y col. 2013], fallas de la reina [Sandrock y col. 2014, Dively y col. 2015], reducidas poblaciones de abejas adultas, áreas de superficie de cría, pesos de marco promedio y capacidades de control de temperatura [Meikle y col. 2016]. Sin embargo, mencionan que, la determinación de los efectos a nivel de colonia de la exposición subletal es difícil, en gran parte debido a la variación natural entre las colonias y a factores no controlados como la exposición diferencial de las colonias experimentales a los agroquímicos exógenos [Meikle y col. 2016].

Al haberse realizado el ensayo durante la primavera-verano, período en que las abejas se encuentran más activas y consumen y metabolizan más rápido cualquier alimento

que se les suministre, pueden haber sido amortiguados los efectos del IMD. En invierno las abejas presentan ciclos de vida más largo y considerando al tiempo como un factor de exposición, menores concentraciones de IMD podrían ser letales para las abejas mayores. La extrapolación de la escala de toxicidad de las abejas melíferas a la vida media de las abejas de invierno, sugiere que el IMD en la miel a $0,25 \mu\text{g kg}^{-1}$ sería letal para una gran proporción de abejas que se acercan al final de su vida [Rondeau y col. 2014]. En particular y como ya se mencionó, dado que el consumo de jarabe lo realizan principalmente las abejas pecoreadoras y son ellas las que también encuentran diversas fuentes en el campo, las concentraciones de IMD y por tanto sus efectos pueden haberse diluido por otras fuentes de alimento.

5.3.3.2 FALLAS Y ESTADO DE SALUD DE LAS COLONIAS

A lo largo del estudio, se observaron pocos eventos de mortalidad en todos los grupos, sin diferencias ($p=0,58$) entre las colonias alimentadas con IMD y las de control, pero todos los grupos tuvieron algún problema con la reina. Por ejemplo, durante el período de alimentación, se produjeron cuatro muertes de colonias, una de cada colonia alimentada con IMD (T1, T2, T3 y T4). La falta de reina es una de las formas más comunes de perder una colonia. En este caso, hubo dos colonias con obreras ponedoras y solo celdas de cría de zánganos, una del T0 y otra del T3. Además, dos colonias de T1 reemplazaron a la reina en el transcurso del período de alimentación.

La presencia de signos de loque europea en el T0 y una colonia T2 provocó el descenso de la producción de miel, entre otros efectos. La abundancia de esporas de *Nosema spp.* no mostraron diferencias significativas entre tratamientos ni al inicio ni al final del período de alimentación ($p=0,40$ y $p=0,27$, respectivamente). Las observaciones del estado de salud no mostraron relación entre las fallas en las colonias y ninguno de los tratamientos, ya sea control o alimentados con diferentes dosis de IMD ($p=0,31$).

5.4 CONSIDERACIONES FINALES, CAPÍTULO 5

Durante el período de estudio y bajo las condiciones aplicadas en este ensayo, no se observaron impactos directos en el comportamiento de las colonias en los tratamientos suministrados con jarabes de azúcar que contenían diferentes dosis de IMD puro (no formulado). La falta de IMD en las larvas sugiere que la comida suministrada por las nodrizas no estuvo en contacto con el insecticida.

Además, el mayor nivel de residuos de IMD encontrado (3 ng por abeja), que es inferior a los valores DL50 informados en la literatura, confirma las condiciones subletales de este ensayo. Se encontraron diversos niveles de residuos de IMD en abejas, miel y cera, que estuvieron estrechamente relacionados con la dosis suministrada en cada tratamiento. Un porcentaje significativo de la molécula original (no metabolizada) se almacenó en la miel.

Los niveles de residuos de IMD en los jarabes no causaron la muerte inmediata pero esto no implica que no podrían tener un efecto a largo plazo.

En general, nuestros resultados indican la necesidad de realizar estudios más prolongados que involucren entornos contrastantes en términos de disponibilidad de alimentos y dosificación con la formulación que generalmente se usa en aplicaciones de campo. La información obtenida permitirá comprender las cuestiones no resueltas del presente capítulo.

CAPÍTULO 6. DETERMINACIÓN DE NEONICOTINOIDES EN MIEL SANTAFESINA.

6.1 INTRODUCCIÓN

El análisis de muestras de miel con el propósito de monitorear el entorno de las colmenas es una vía adecuada y no invasiva para chequear la exposición de las colonias de abejas. Además proporciona información sobre la seguridad alimentaria para los consumidores de miel [Mrzlikar y col. 2019, Woodcock y col. 2018], y la presencia de residuos en cantidades elevadas puede tener repercusiones graves para el sector apícola. Debido a que cada país presenta una legislación diferente respecto de los LMRs, el comercio internacional presenta los mayores problemas de esta índole. Teniendo en cuenta tanto la problemática de la exposición de las abejas a los neonicotinoides como la carga que puede contener la miel poniendo en riesgo a los consumidores, en este capítulo propusimos evaluar y discutir los resultados obtenidos al analizar neonicotinoides en mieles originarias de la provincia de Santa Fe, utilizando la metodología analítica descrita en el capítulo 3. La zona donde se recolectaron las 151 muestras de miel se caracteriza por poseer una variada e intensiva actividad agrícola. Asimismo, y de manera de evaluar las mieles del mercado interno, se realizó el análisis de 28 mieles comerciales, tomadas directamente de la góndola del supermercado.

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE MIEL

El muestreo se realizó utilizando prácticas apícolas convencionales durante el verano de tres temporadas de cosecha: 2018-2019, 2019-2020 y 2020-2021. Cada muestra comprendió una mezcla de miel recolectada de uno o dos apiarios vecinos. Las muestras fueron proporcionadas por una cooperativa local de apicultores, quienes recolectaron mieles de diferentes regiones geográficas de Santa Fe, y se almacenaron a 20 °C hasta el momento de su análisis. En la zona de muestreo se reconocen tres ecosistemas distintivos: la zona llana, con predominio de pastos naturales e implantados, como alfalfa y trébol, y actividades agrícolas, incluyendo cultivos (soja, trigo, maíz, girasol y sorgo) y producción lechera; la zona norte, con especies arbóreas

y herbáceas, como caña de azúcar y algodón, y fuerte producción pecuaria; y la zona costera al este, bordeando el río Paraná, con variada vegetación, cultivos (arroz) y producción hortícola [Ministerio de Gobierno y Reforma del Estado 2016].

Como ya se mencionó, la mayor cantidad de productores y colmenas se encuentran en la región central del país, lo que representa aproximadamente el 70% de la producción total de miel. Las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos, Santa Fe y Córdoba son las principales productoras, exhibiendo el mayor número de salas de extracción y plantas de procesamiento [MAGyP 2019, RENAPA 2021]. Dentro de la provincia de Santa Fe la zona de mayor producción se encuentra concentrada en la región centro-norte (Fig. 6.1). Por lo tanto, se seleccionaron para el muestreo diferentes apiarios localizados en esta zona.

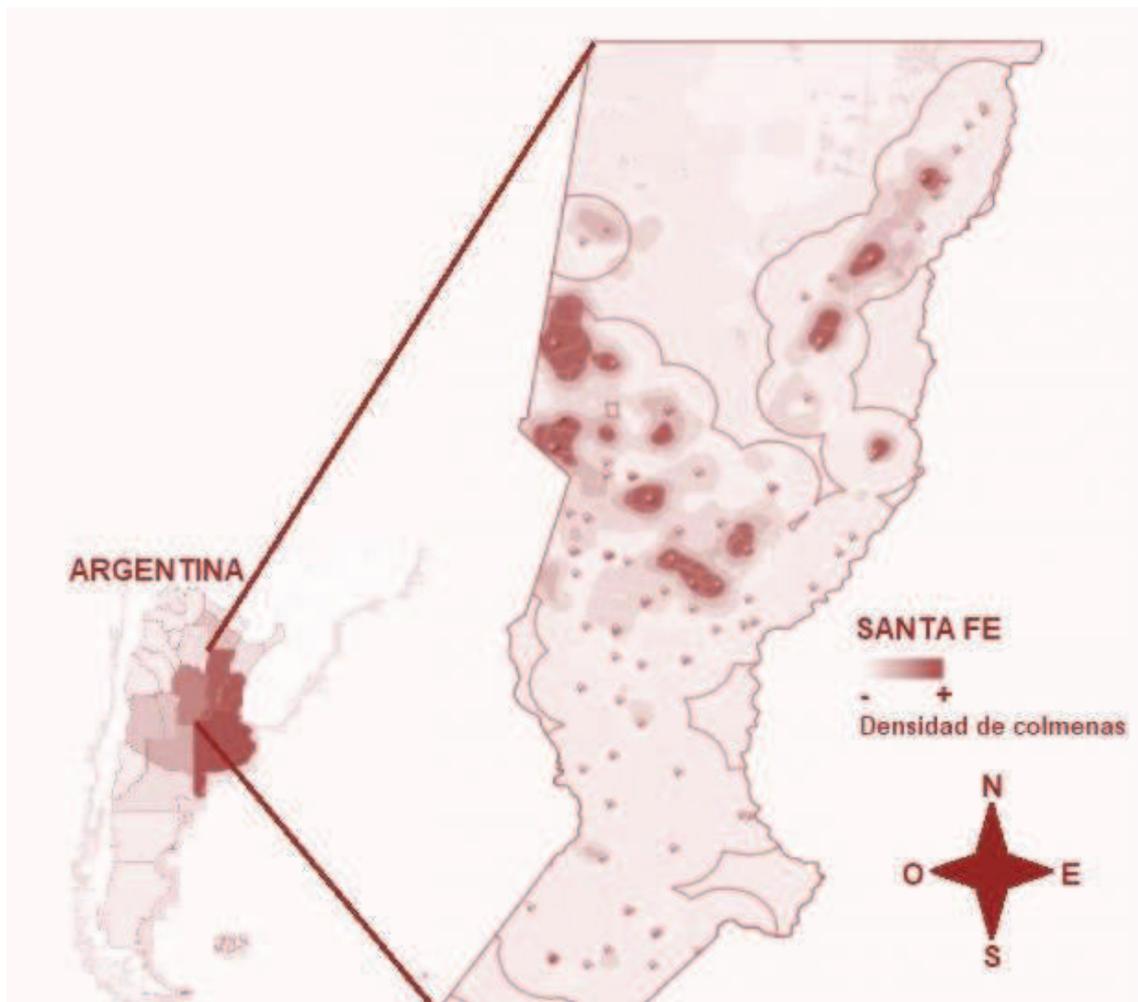


Fig. 6.1 Densidad de colmenas en la provincia de Santa Fe.

Fuente: Ministerio de Producción, Ciencia y Tecnología de la provincia de Santa Fe.

Las muestras de miel fueron procesadas para el análisis de neonicotinoides, siguiendo la metodología analítica optimizada en el Capítulo 3.

6.2.1.1 PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS Y ANÁLISIS POLÍNICO

Además, el Laboratorio de Producción Animal de la EEA Rafaela del INTA, nos proporcionó el resultado de los ensayos de caracterización fisicoquímica y del análisis polínico de 26 de las muestras de miel. Entre los análisis fisicoquímicos determinaron el porcentaje de humedad, el color (mm), el hidroximetilfurfural (mg kg^{-1}), la relación fructosa/glucosa, el pH, la conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$) y la acidez libre (meq kg^{-1}). El hidroximetilfurfural es un parámetro indicador de la calidad de la miel, su concentración va aumentando con el tiempo y con otros factores, como tratamientos térmicos o temperaturas de almacenamiento inadecuados. Mediante microscopía, se determinó el contenido de granos de polen, esto nos proporciona una descripción indirecta del origen geográfico/botánico del producto.

6.2.2 ANÁLISIS DE MIELES COMERCIALES

Asimismo, se analizaron 28 mieles comerciales fraccionadas en diferentes puntos del país entre ellos Santa Fe, Buenos Aires, Córdoba, Chaco, Entre Ríos, Río Negro y Corrientes (Fig. 6.2). A diferencia de las mieles crudas recolectadas de los apiarios (sección anterior), estas mieles mínimamente fueron sometidas a un tratamiento térmico de pasteurización previamente al envasado.



Fig. 6.1 Mieles comerciales.

6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3.1 MIELES DE APIARIOS

El método validado (Capítulo 3), se implementó para la determinación de ACT, CLT, DNF, FCD, IMD, NPI, TCD y TMX en 151 muestras de miel producidas por abejas *Apis mellifera* en apiarios ubicados en la región central de la provincia de Santa Fe (Fig. 6.3).

Se detectaron residuos de neonicotinoides en el 13% de las muestras y solo se detectó un analito por muestra, a excepción de una miel que contenía residuos de IMD y TMX. Como se muestra en la Fig. 6.3, Cayastá, ubicada en el sector hortícola, y Colonia Belgrano, en la zona de producción agrícola y láctea, fueron las localidades con mayor incidencia de neonicotinoides en la miel. En Castellanos, también ubicada en la zona de producción agrícola y láctea, un tercio de las muestras presentaron residuos de neonicotinoides. Tal como se esperó, la miel producida en la zona norte, donde el cultivo de productos básicos está más limitado debido a las características del suelo [Heredia y col. 2006], se observó una menor frecuencia de neonicotinoides. El analito detectado con mayor frecuencia fue IMD, seguido de TMX y ACT. El IMD fue el único plaguicida detectado en el sector frutihortícola, mientras que los residuos de IMD y TMX se detectaron en el centro y norte de la provincia con similar incidencia.

Estos hallazgos son consistentes con el hecho de que las aplicaciones de IMD están autorizadas en Argentina en una amplia variedad de productos frutihortícolas, mientras que la aplicación de TMX está más restringida [SENASA 2010]. Fue posible cuantificar TMX en una muestra con una concentración de $1,5 \mu\text{g kg}^{-1}$.

En la provincia de Santa Fe hubo una tendencia a la baja en los registros de precipitaciones en las tres temporadas melíferas evaluadas en este trabajo [Cooperativa Guillermo Lehmann 2021]; los mayores niveles de lluvia y ocurrencia de neonicotinoides se registraron en la primera temporada.

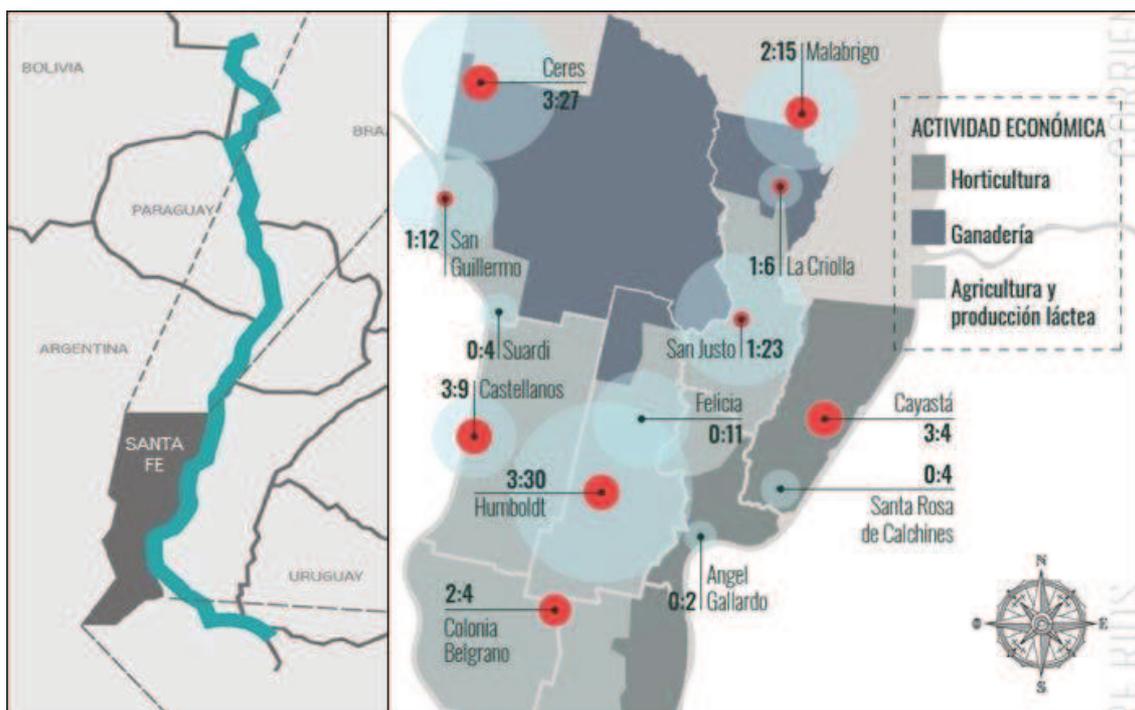


Fig. 6.3 Neonicotinoides en miel de apiarios ubicados en la región central de la provincia de Santa Fe. Muestras positivas (círculos rojos) del total de muestras analizadas (círculos celestes) en cada localidad.

6.3.1.1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y ANÁLISIS POLÍNICO

Cada una de las 26 muestras que fueron sometidas a análisis fisicoquímicos satisficieron los parámetros normados por el Código Alimentario Argentino, con valores de humedad debajo del 18%, acidez libre por debajo de los 40 meq kg^{-1} y valores de hidroximetilfurfural muy por debajo del máximo permitido (valor máximo encontrado $9,79 \text{ mg kg}^{-1}$ de un máximo permitido de 40 mg kg^{-1}) [Código Alimentario Argentino 1985].

El color de la miel está relacionado con los pigmentos vegetales del néctar, por lo tanto es característico de la fuente floral visitada por la abeja, y puede variar desde los tonos blancos hasta el ámbar oscuro. Las presentes mieles se caracterizaron por ser mieles

claras con valores de 18 a 48 mm, categorizadas según la escala Pfund en mieles blancas o en ambar extra claro [MAGyP 2019].

Dentro de las mieles caracterizadas se identificaron 28 familias botánicas, no obstante el 77% de las mieles se consideraron como monoflorales de trébol ya que presentaron en su conjunto el valor mínimo de 45% de pólenes melilotus, alfalfa (*Medicago sativa*) y lotus, exigido por la legislación argentina para ser consideradas dentro de esta categoría [MAGyP 2019]. Llamativamente, una de las mieles se encontró compuesta por más del 50% de polen de soja (*Glycine max* L.). Al ser la soja una especie autógama, con gametos de ambos sexos en la misma planta, se creía que su producción de semillas no se veía influenciada por la polinización asistida, sin embargo algunos estudios señalaron que las abejas melíferas podrían incrementar el rendimiento de esta planta [Santos y col. 2013].

Evaluando los residuos de neonicotinoides en estas mieles en particular, se encontraron dos mieles monoflorales de trébol contaminadas con neonicotinoides; una con ACT y la otra con IMD, pero ambas por debajo del LC. En la miel que contenía 50% de polen de soja no se encontraron residuos de neonicotinoides.

6.3.2 MIELES COMERCIALES

Del total de las 28 muestras analizadas, sólo se detectó residuos de neonicotinoides, puntualmente CLT, en una de las muestras en un nivel por debajo del LC. Al ser CLT un metabolito de degradación del TMX en suelos, plantas e insectos [Nauen y col. 2003], este resultado puede deberse a la aplicación de cualquiera de los dos neonicotinoides.

6.4 CONSIDERACIONES FINALES, CAPÍTULO 6

Se detectaron cuatro neonicotinoides en concentraciones por debajo de $1,5 \mu\text{g kg}^{-1}$, lo que indica que no hay riesgo para la salud humana por el consumo, pero sí riesgos potenciales para las abejas melíferas por la exposición crónica. Los datos obtenidos mostraron que los neonicotinoides sustituidos con nitro, como IMD y TMX, dominaron la distribución general en la región central de Santa Fe, lo que indica que las abejas melíferas estuvieron expuestas a los neonicotinoides más tóxicos. Según nuestro conocimiento, el tipo de monitoreo realizado en este trabajo es el primero para Argentina y debería contribuir para complementar los datos mundiales sobre la exposición de las abejas a los neonicotinoides. Además, estos resultados respaldan la necesidad de analizar muestras de miel para evitar la comercialización de lotes que contengan residuos por encima de los niveles permitidos.

CONCLUSIONES FINALES

El presente trabajo nos permitió desarrollar metodologías analíticas simplificadas y validadas, que arrojan resultados confiables para su aplicabilidad en estudios de campo, para el análisis de neonicotinoides en muestras de colmena (abejas adultas, larvas, polen, miel y cera). Además la implementación de herramientas de DDE permitió reducir el consumo de ácidos, sales y adsorbentes para realizar un monitoreo mediante el análisis de neonicotinoides en miel, el principal alimento que se obtiene de la producción apícola.

Estos estudios evidencian la presencia de IMD en el polen y néctar, los cuales constituyen el principal alimento de las abejas. Permitiendo inferir la exposición de las abejas melíferas, teniendo en cuenta el consumo diario de estas fuentes de alimento, y aportan datos en nuestro territorio respecto de esta problemática. A partir de estos resultados, se evaluó el comportamiento de colonias *Apis mellifera* alimentadas artificialmente con este insecticida. Así encontramos que las dosis suministradas no generaron la muerte inmediata de las colonias, sin embargo es necesaria la realización de estudios complementarios que involucren entornos contrastantes, cómo otra época del año y en consecuencia diferente disponibilidad de recursos alimenticios, ya que como fuimos destacando a lo largo del presente escrito los estudios a campo si bien son más realistas, presentan condiciones menos controladas que estudios en laboratorio. Además, al realizar el análisis de IMD en los productos de estas colmenas expuestas artificialmente, encontramos que hasta un 60% del total suministrado había sido almacenado en la miel, de allí nos propusimos analizar residuos de neonicotinoides en mieles regionales. Afortunadamente encontramos que las mieles santafesinas satisficieron los estándares internacionales, todas estuvieron por debajo de los LMRs permitidos europeos, lo que indicaría que no habría riesgos para la salud humana y los mercados, un aspecto fundamental teniendo en cuenta que Argentina exporta el 95% de su producción de miel. Sin embargo, detectamos cuatro neonicotinoides en distintas mieles, demostrándonos una vez más que las abejas se encuentran expuestas a estos plaguicidas, presentándose riesgos potenciales para las abejas melíferas por exposición crónica.

Según nuestro conocimiento este tipo de investigación, donde se combinan la evaluación de la magnitud de la residualidad de los neonicotinoides en muestras ambientales y productos de colmena con el estudio de colonias de abejas expuestas a dosis controladas de neonicotinoides, es el primero realizado en Argentina y debería

contribuir a los datos mundiales sobre la exposición de las abejas a los neonicotinoides y sobre los efectos que generan en colonias de *Apis mellifera*.

Las acciones futuras involucran, además de estudios complementarios de la evaluación en campo del comportamiento de colonias de abejas expuestas artificialmente a neonicotinoides, el análisis del contenido de metabolitos de degradación en muestras ambientales y productos de colmena. Resultó llamativo que al suplementar las colonias con IMD, con dosis seleccionadas en base a concentraciones halladas en el ambiente, se encontró hasta el 60% del insecticida proporcionado, almacenado en la miel. Sin embargo, las concentraciones en las muestras de los apiarios comerciales fueron muy bajas. Un objetivo futuro, entonces, será extender el método al análisis de metabolitos de neonicotinoides relevantes, para obtener una visión más amplia de la contaminación de la miel por estos insecticidas y optimizar su uso como biomonitor.

Las muestras y la ubicación geográfica de los apiarios, fueron proporcionadas por el INTA-EEA Rafaela y la cooperativa apícola COSAR. Este trabajo fue apoyado por fondos del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (MINCyT, Argentina, Proyecto PICT 2019-2019-03257) y la Universidad Nacional del Litoral (UNL, Argentina, Proyecto CAI+D Res N° 378-UNL).

ABREVIATURAS

ACh	Acetylcholine (Acetilcolina)
ACT	Acetamiprid
ANMAT	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
ANN	Artificial neural networks (Redes neuronales artificiales)
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization (Ionización química a presión atmosférica)
ASSAI	Agencia Santafesina de Seguridad Alimentaria
BBD	Box-Behnken design (Diseño de Box-Behnken)
BDC	Bendiocarb
BPA	Buenas prácticas agrícolas
C18	Octadecilsilano
CAA	Código Nacional Alimentario Argentino
CC	Corriente continua
CCA	Número de abejas obreras
CCC	Celdas con cría operculada
CCM	Celdas con miel de reserva
CCP	Celdas con polen
CG	Cromatografía gaseosa
CL	Cromatografía líquida
CL-EM	Cromatografía líquida acoplados a espectrometría de masa
CLT	Clotianidina
DDE	Diseño de experimentos
DE	Desviación estándar
DER	Desviación estándar relativa
DL50	Dosis letal media
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNF	Dinotefuran
d-SPE	Dispersive solid phase extraction (Extracción en fase sólida dispersiva)
EEA Rafaela	Estación Experimental Agropecuaria Rafaela
EFSA	European Food Safety Authority (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)
EM	Efecto matriz
EMR-lipid	Enhanced Matrix Removal—Lipid (Extracción mejorada de matriz en lípidos)
EPA	Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental)
ESI	Electrospray ionization (Ionización por electroespray)
ESI-MS/MS	Electrospray ionization tandem mass spectrometry (Ionización por electroespray con detector de masa en tándem)
FCD	Fonicamid
GC-MS/MS	Gas chromatography tandem mass spectrometry (Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa en tándem)
HILIC	Hydrophilic interaction chromatography (Cromatografía de interacción hidrofílica)
IRAC	Insecticide Resistance Action Committee (Comité de Acción de

	Resistencia a Insecticidas)
IMD	Imidacloprid
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
ISTD	Internal standard (Estándar interno)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada)
LC	Límite de cuantificación
LC-ESI-MS/MS	Liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometric (Cromatografía líquida con ionización por electroespray y detector de masa en tándem)
LC-MS/MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometric (Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tándem)
LD	Límite de detección
LIT	Linear ion trap (Trampa de iones lineal)
LMR	Límite máximo de residuo
MAGyP	Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
MeCN	Acetonitrilo
MRM	Monitoreo de reacciones múltiples
m/z	Masa/carga
nAChR	Nicotinic acetylcholine receptor (Recetores nicotínicos de la acetilcolina)
ND	No detectado
NPI	Nitenpiram
OMS	Organización Mundial de la Salud
PSA	Primary secondary amine (Amina primaria secundaria)
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
Q	Single quadrupole (Simple cuadrupolo)
Q/q	Relación relativa de cuantificación respecto de confirmación
QqQ	Triple quadrupole (Triple cuadrupolo)
QTRAP	Quadrupole- Linear ion trap (Cuadrupolo–trampa de iones lineal)
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (rápido, fácil, económico, eficaz, robusto y seguro)
R ²	coeficiente de correlación de regresión lineal
RBF	Radial basis function (Redes de función de base radial)
RENAPA	Registro Nacional de Productores Apícolas
RF	Radiofrecuencia
RSM	Response surface methodology (Metodología de superficie de respuesta)
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
SIM	Single ion monitoring (Monitoreo de ion selectivo)
SOLATINA	Asociación Latinoamericana de Investigación de Abejas
S/R	Señal/ruido
SPE	Solid phase extraction (Extracción en fase sólida)
T0	Tratamiento control
T1	Tratamiento 1
T2	Tratamiento 2
T3	Tratamiento 3
T4	Tratamiento 4

t ₀	Instante previo a la alimentación
t _{1/2}	Tiempo de vida media
TCD	Tiacloprid
TIC	Total ion chromatogram (Cromatograma de iones totales)
TMX	Tiametoxam
UE	Unión Europea
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia)
UHPLC-MS/MS	Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometer (Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a espectrometría de masa en tándem)
Z-Sep	Soporte de sílice recubierto con dióxido de circonio y grupos octadecilsilano

BIBLIOGRAFÍA

- Acero, J.L.; Real, F.J.; Benitez, J.; Matamoros, E. Degradation of neonicotinoids by UV irradiation: Kinetics and effect of real water constituents. *Sep. Purif. Technol.* 211 (2019) 218-226.
- Anastassiades, M.; Lehotay, S.J.; Štajnbaher, D.; Schenck, F.J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *J. AOAC Int.* 86 (2) (2003) 412-431.
- Antúnez, K.; Invernizzi, C.; Mendoza, Y.; Vanengelsdorp, D.; Zunino, P. Honeybee colony losses in Uruguay during 2013–2014. *Apidologie*, 48(3) (2017) 364-370.
- AOAC Official Method 2007.01. Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate. *J. AOAC Int.* 90 (2) (2007) 485–520.
- Apimondia. Declaración de Apimondia sobre el fraude en la miel (2020) https://www.apiservices.biz/documents/articulos-es/declaracion_apimondia_fraude_miel_v_2.pdf. Fecha de acceso: 3 enero 2022
- Banasiak, U. Imidacloprid (206) (2000) p. 688 http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPRE/valuation02/IMIDA_EVjib.pdf. Fecha de acceso: 15 febrero 2018
- Baroni, M.V.; Arrua, C.; Nores, M.L.; Fayé, P.; Díaz, M.P.; Chiabrando G.A.; Wunderlin D.A. Composition of honey from Córdoba (Argentina): Assessment of North/South provenance by chemometrics, *Food Chem.* 114 (2009) 727–733.
- Beekman, M.; Ratnieks, F.L.W. Long-range foraging by the honey-bee, *Apis mellifera* L. *Funct. Ecol.* 14(4) (2000) 490-496.
- Blacquièrre, T.; Smagghe, G.; van Gestel, C.A.; Mommaerts V. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* 21(4) (2012) 973-92.
- Bonmatin, J. M.; Moineau, I.; Charvet, R.; Colin, M.E.; Fleche, C.; Bengsch, E.R. Behaviour of imidacloprid in fields. Toxicity for honey bees, in: E. Lichtfouse, J. Schwarzbauer, D. Robert (Eds.), *Environmental Chemistry: Green Chemistry and Pollutants in Ecosystems*, Berlin (2005) pp. 483-494.
- Bonmatin, J.M.; Giorio, C.; Girolami, V.; Goulson, D.; Kreutzweiser, D.P.; Krupke, C.; Liess, M.; Long E.; Marzaro, M.; Mitchell, E.A.D.; Noome, D.A.; Simon-Delso, N.; Tapparo, A. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (2015) 35–67.
- Box, G.E.; Behnken, D.W. Some new three level designs for the study of quantitative variables, *Technometrics* 2(4) (1960) 455-475.
- Bulacio Cagnolo, N.; Basualdo, M.; Eguaras, M. Actividad Varroocida del timol en colonias de *Apis mellifera* L. de la provincia de Santa Fe. *InVet* 12(1) (2010)

- Burrows, H.D.; Canle L, M.; Santaballa, J.A.; Steenken S. Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides. *J. Photoch. Photobio. B* 67 (2002) 71-108.
- Calatayud-Vernich, P.; Calatayud, F.; Simó, E.; Picó, Y. Efficiency of QuEChERS approach for determining 52 pesticide residues in honey and honey bees. *MethodsX* 3 (2016) 452–458.
- Calatayud-Vernich, P.; Calatayud, F.; Simó, E.; Picó, Y. Pesticide residues in honey bees, pollen and beeswax: Assessing beehive exposure (2018).
- Carreck, N.L. y Ratnieks, F.L. The dose makes the poison: Have “field realistic” rates of exposure of bees to neonicotinoid insecticides been overestimated in laboratory studies? *J Apicult Res.* 53 (2014) 607–614.
- CASAFE – Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. Guía de productos fitosanitarios 2013/2015. 16ta Edición, Buenos Aires (2013).
- Castillo, M.; González, C.; Miralles, A. An evaluation method for determination of non-polar pesticide residues in animal fat samples by using dispersive solid-phase extraction clean-up and GC-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011)1315–1328.
- CEN Standard Method EN 15662, Foods of plant origin — determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS method. *Brit. Stand.* (2008).
- Chauzat, M.P.; Faucon, J.P. Pesticide residues in beeswax samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera L.*) in France. *Pest Manag. Sci.* 63 (2007) 1100-1106.
- Chen, M.; Tao, L.; McLean, J.; Lu, C. Quantitative Analysis of Neonicotinoid Insecticide Residues in Foods: Implication for Dietary Exposures. *J. Agric. Food Chem.* 62(26) (2014) 6082–6090.
- Chiesa, L.M.; Labella, G.F.; Giorgi, A.; Panseri, S.; Pavlovic, R.; Bonacci, S.; Arioli, F. The occurrence of pesticides and persistent organic pollutants in Italian organic honeys from different productive areas in relation to potential environmental pollution. *Chemosphere* 154 (2016) 482-490.
- Codex Alimentarius Commission. Report of the first session (1963). https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-701-01%252Fal63_12e.pdf. Fecha de acceso 12 agosto 2022.
- Código Alimentario Argentino. Capítulo X, Alimentos azucarados (1985). http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/marco/CAA/Capitulo_10.htm. Fecha de acceso 7 abril 2022.
- Colin, T.; Meikle, W.G.; Paten, A.M.; Barron, A.B. Long-term dynamics of honey bee colonies following exposure to chemical stress. *Sci. Total Environ.* 677 (2019) 660-670.

- COMMISSION REGULATION (EU) 1107/2009 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC, (2009). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1107&from=ES>. Fecha de acceso 25 abril 2022.

- COMMISSION REGULATION (EU) 2017/626 of 31 March 2017 amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for acetamiprid, cyantraniliprole, cypermethrin, cyprodinil, difenoconazole, ethephon, fluopyram, flutriafol, fluxapyroxad, imazapic, imazapyr, lambda-cyhalothrin, mesotrione, profenofos, propiconazole, pyrimethanil, spirotetramat, tebuconazole, triazophos and trifloxystrobin in or on certain products, (2017). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/ALL/?uri=CELEX:32017R0626>. Fecha de acceso 30 septiembre 2021.

- Commission Regulation (EU) 2017/671 of 7 April 2017 amending Annex II to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for clothianidin and thiamethoxam in or on certain products, (2017). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/ALL/?uri=CELEX:32017R0671>. Fecha de acceso 30 septiembre 2021.

- Commission Regulation (EU) 2018/687 of 4 May 2018 amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for acibenzolar-S-methyl, benzovindiflupyr, bifenthrin, bixafen, chlorantraniliprole, deltamethrin, flonicamid, fluazifop-P, isofetamid, metrafenone, pendimethalin and teflubenzuron in or on certain products, (2018) <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=uriserv%3AOJ.L.2018.121.01.0063.01.ENG>. Fecha de acceso 30 septiembre 2021.

- Commission Regulation (EU) No 491/2014 of 5 May 2014 amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for ametoctradin, azoxystrobin, cycloxydim, cyfluthrin, dinotefuran, fenbuconazole, fenvalerate, fludioxonil, fluopyram, flutriafol, fluxapyroxad, glufosinate-ammonium, imidacloprid, indoxacarb, MCPA, methoxyfenozide, penthiopyrad, spinetoram and trifloxystrobin in or on certain products, (2014). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32014R0491>. Fecha de acceso 30 septiembre 2021.

- Commission Regulation (EU) 2019/50 of 11 January 2019 amending Annexes II, III, IV and V to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for chlorantraniliprole, clomazone, cyclaniliprole, fenazaquin, fenpicoxamid, fluoxastrobin, lambda-cyhalothrin, mepiquat, onion oil, thiacloprid and valifenalate in or on certain products, (2019). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32019R0050>. Fecha de acceso 30 September 2021.

- Commission Regulation (EU) 2019/50 of 11 January 2019 amending Annexes II, III, IV and V to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the

Council as regards maximum residue levels for chlorantraniliprole, clomazone, cyclaniliprole, fenazaquin, fencicoxamid, fluoxastrobin, lambda-cyhalothrin, mepiquat, onion oil, thiacloprid and valifenalate in or on certain products, (2019). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32019R0050>. Fecha de acceso 30 septiembre 2021.

- Commission Regulation, B Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC, (2005).

https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Legislation/Food_Legislation_Links/Pesticides_Residues_in_food/Regulation_EC_No_396_2005%20.pdf. Fecha de acceso 30 septiembre 2021.

- Cooperativa Guillermo Lehmann, <https://www.cooperativalehmann.coop/registro-lluvias>, (2021). Fecha de acceso: 30 septiembre 2021.

- Córdoba Estévez, M.; Arata, J.; Pereyro, A.; Hermida, L. Ensayos de liberación controlada del biopesticida azaridactina microencapsulado.

<file:///C:/Users/melina/Downloads/TecnoINTI2017-317.pdf>, (2017). Fecha de acceso: 2 mayo 2022.

- Craddock, H.A.; Huang, D.; Turner, P.C., Quirós-Alcalá, L.; & Payne-Sturges, D.C. Trends in neonicotinoid pesticide residues in food and water in the United States, 1999–2015. *Environ. Health-Glob.* 18(7) (2019).

- Cresswell, J.; François-Xavier, R.; Florance, H.; Smirnoff, N. Clearance of ingested neonicotinoid pesticide (imidacloprid) in honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus terrestris*). *Pest Manag Sci.* 70(2) (2014) 332-337.

- Dainat, B.; Dietemann, V.; Imdorf, A.; Charrière, J.D. A scientific note on the 'Liebfeld Method' to estimate honey bee colony strength: its history, use, and translation. *Apidologie* 51 (2020) 422-427.

- Danzer, K.; Currie, L. A. Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part 1. Fundamentals and single component calibration. *Pure Appl. Chem.* 70 (1998) 993-1014.

- David, A.; Botías, C.; Abdul-Sada, A.; Nicholls, E.; Rotheray, E.L.; Hill, E.M.; Goulson, D. Widespread contamination of wildflower and bee-collected pollen with complex mixtures of neonicotinoids and fungicides commonly applied to crops. *Environ. Int.* 88 (2016) 169–178.

- Decourtye, A.; Devillers, J. Ecotoxicity of Neonicotinoid Insecticides to Bees. In: Thany S.H. (Eds) Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 683 (2010) 85-95.

- Decreto Ley Nacional-3489-1958-SENASA - Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (1958) <http://www.senasa.gob.ar/normativas/decreto-ley-nacional-3489-1958-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria>. Fecha de acceso: 28 abril 2022.

- Decreto Ley Nacional-5769-1959-SENASA - Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (1959)
http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/INFORMACION/NORMA_TIVA/DECRETO/dn-5769-1959.pdf. Fecha de acceso: 28 abril 2022.
- Derringer, G.; Suich, R. Simultaneous optimization of several response variables, *J. Quality Technol.* 12 (1980) 214-219.
- Desai, K.M.; Survase, S.A.; Saudagar, P.S.; Lele, S.S.; Singhal, R.S. Comparison of artificial neural network (ANN) and response surface methodology (RSM) in fermentation media optimization: case study of fermentative production of scleroglucan, *Biochem. Eng. J.* 41 (2008) 266–273.
- Di Noi, A.; Casini, S.; Campani, T.; Cai, G.; Caliani, I. Review on sublethal effects of environmental contaminants in honey bees (*Apis mellifera*), knowledge gaps and future perspectives. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18 (2021) 1863.
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C.W. InfoStat version 2020, Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, <http://www.infostat.com.ar>
- Dirección Nacional de Protección Vegetal. Circular-Evaluación de riesgos de los usos agrícolas insecticidas de la familia Neonicotinoides y Fipronil, para los insectos polinizadores (2019).
https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/analisis_de_riesgo_de_los_neonicotinoi_des_0.pdf. Fecha de acceso: 28 abril 2022.
- Dively, G.P.; Kamel, A. Insecticide residues in pollen and nectar of a cucurbit crop and their potential exposure to pollinators (Conference Paper). *J. Agric. Food Chem.* 60(18) (2012) 4449-4456.
- Dively, G.P.; Embrey, M.S.; Kamel, A.; Hawthorne, D.J.; Pettis, J.S. Assessment of Chronic Sublethal Effects of Imidacloprid on Honey Bee Colony Health. *PLOS ONE* 10(3) (2015) e0118748.
- Elliot, M.; Farnham, A.W.; Janes, N.F.; Soderlund, D.M. Insecticidal activity of the pyrethrins and related compounds. XI. Relative potencies of isomeric cyano-substituted 3-phenoxybenzyl esters. *Pesticide Science* 9 (1978) 112-116.
- Ellis, J.D.; Evans, J.D.; Pettis, J.S. Colony losses, managed colony population decline and Colony Collapse Disorder in the United States. *J. Apicult. Res.* 49(1) (2010) 134-136.
- Ensley, S.M. Neonicotinoids - Chapter 40 de *Veterinary Toxicology*, 3era Edición (2018) 521-524.
- Environmental Protection Agency (EPA), Washington, DC, United States of America (USA) (2022) <https://www.epa.gov/>. Fecha de acceso: 25 abril 2022.
- EPA. Code of Federal Regulations. PART 180—TOLERANCES AND EXEMPTIONS FOR PESTICIDE CHEMICAL RESIDUES IN FOOD (2014).

<https://www.govinfo.gov/content/pkg/CFR-2014-title40-vol24/xml/CFR-2014-title40-vol24-part180.xml>. Fecha de acceso: 23 de mayo 2022.

- EPA. REREGISTRATION ELIGIBILITY DECISION for Rotenone (2007). https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/rotenone_red.pdf. Fecha de acceso: 29 abril 2022.
- EU Pesticide Database (2020) <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=download.MRL>. Fecha de acceso: 22 abril 2020.
- EURL-FV. Dutch mini-Luke ("NL-") extraction method followed by LC and GC-MS/MS for multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables. <https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/NL-miniLuke-extraction-method.pdf>. Fecha de acceso: 10 agosto 2022.
- European Food Safety Authority. Conclusion on the Peer Review of the Pesticide Risk Assessment for Bees for the Active Substance Imidacloprid, EFSA J. 11(1) (2013) 3068.
- European Food Safety Authority. Peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance imidacloprid considering the uses as seed treatments and granules. *EFSA Journal* 16:2 (2018) 5178.
- FAO. Value added products from beekeeping. Chapter 3. *Agricultural Services Bulletin* 124 (1996) <http://www.fao.org/docrep/w0076e/w0076e10.htm>. Fecha de acceso: 22 mayo 2020.
- FAOSTAT. ProdSTAT, Food and Agriculture Data of the Food and Agriculture Organization of the United Nations, Livestock primary, natural honey. (2010) <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QL>. Fecha de acceso 21 agosto 2021.
- Faucon, J.P.; Aurières, C.; Drajnudel, P.; Mathieu, L.; Ribière, M.; Martel, A.C.; Zeggane, S.; Chauzat M.P.; Aubert, M.F.A. Experimental study on the toxicity of imidacloprid given in syrup to honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Pest. Manag. Sci.* 61 (2005) 111–125.
- FECOAPI, Federación de Cooperativas Apícolas Ltda. (2017) ¿Qué es la miel? <http://fecoapi.com.ar/que-es-la-miel/> Fecha de acceso: 26 marzo 2020.
- Fratini, F.; Cilia, G.; Turchi, B.; Felicioli, A. Beeswax: a minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine, *Asian Pac J Trop Med* 9(9) (2016) 839–843.
- Frazier, J.; Mullin, C.; Frazier, M.; Ashcraft S. (2011). Pesticides and Their Involvement in Colony Collapse Disorder <https://bee-health.extension.org/pesticides-and-their-involvement-in-colony-collapse-disorder/> Fecha de acceso: 25 marzo 2020.
- Fries, I. Infectivity and multiplication of *Nosema apis* Z. in the ventriculus of the honey bee. *Apidologie* 19 (1988) 319–328.
- Garrido Frenich, A.; Romero-González, R.; Aguilera-Luiz, M.M. Comprehensive analysis of toxics (pesticides, veterinary drugs and mycotoxins) in food by UHPLC-MS, *Trend Anal. Chem.*, 63 (2014) 158-169.

- Gaweł, M.; Kiljanek, T.; Niewiadowska, A.; Semeniuk, S.; Goliszek, M.; Burek, O.; Posyniak, A. Determination of neonicotinoids and 199 other pesticide residues in honey by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 282 (2019) 36-47.
- Gaylord Chemical Company, Dimethyl Sulfoxide, Solubility Data, 2 (2007) <https://es.scribd.com/document/159511575/Dmso-Dimetil-Sulfuxido> Fecha de acceso: 23 febrero 2018.
- 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. *J. Chromatogr. B* 990 (2015) 132–140.
- Gil García, M.D.; Uclés Duque, S.; Lozano Fernández, A.B.; Sosa, A.; Fernández-Alba, A.R. Multiresidue method for trace pesticide analysis in honeybee wax comb by GC-QqQ-MS. *Talanta* 163 (2017) 54–64.
- Giordano, P.C.; Goicoechea, H.C.; Olivieri, A.C. SRO_ANN: An integrated MatLab toolbox for multiple surface response optimization using radial basis functions, *Chemometr. Intell. Lab.* 171 (2017) 198–206.
- Gobierno de Santa Fe (2007) Cadena apícola santafesina. Ministerio de Producción. <https://www.santafe.gov.ar/index.php/web/content/download/66066/320676/file/descargar.pdf> Fecha de acceso: 15 mayo 2020.
- Goulson, D. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *J. Appl. Ecol.* 50(4) (2013) 977-987.
- Gray, A.; Adjlane, N.; Arab, A.; Ballis, A.; Brusbardis, V., et al. Honey bee colony winter loss rates for 35 countries participating in the COLOSS survey for winter 2018–2019, and the effects of a new queen on the risk of colony winter loss. *J. Apicult. Res.* 59(5) (2020) 744-751.
- Haber, A.; Runyon, R.P. General statistics, third ed., Addison-Wesley, Indianapolis, (1977).
- Haroune, L.; Cassoulet, R.; Lafontaine, M.P.; Bélisle, M.; Garant, D.; Pelletier, F.; Cabana, H.; Bellenger, J.P. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination for multiclass pesticides from insect samples by microwave-assisted solvent extraction followed by a salt-out effect and micro-dispersion purification. *Anal. Chim. Acta* 891 (2015) 160–170.
- Hercegová, A.; Dömötörvá, M.; Matisová, E. Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. *J. Chromatogr. A*, 1153 (2007) 54–73.
- Heredia, O.S., Giuffré, L., Gorleri, F.J., Conti, M.E. Soil quality in the north of Santa Fe. Effect of geomorphology and land use. *Ci. Suelo (Argentina)* 24 (2) (2006) 109-114.

- 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* 163 (2016) 44–53.
- Hladik, M.L.; Kolpin, D.W.; Kuivila, K.M. Widespread occurrence of neonicotinoid insecticides in streams in a high corn and soybean producing region, USA. *Environ. Pollut.* 193 (2014) 189-196.
- Hou, J.; Xie, W.; Hong, D.; Zhang, W.; Li, F.; Qian, Y.; Han, C. Simultaneous determination of ten neonicotinoid insecticides and two metabolites in honey and royal-jelly by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 270 (2019) 204–213.
- Hrynko, I.; Łozowicka, B.; Kaczyński, P. Liquid Chromatographic MS/MS Analysis of a Large Group of Insecticides in Honey by Modified QuEChERS. *Food Anal. Method.* 11 (2018) 2307-2319.
- IPBES. The assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production. Potts, S.G.; Imperatriz-Fonseca, V.L.; Ngo, H.T. (eds). Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, Bonn, Germany (2016).
- ISO/IEC 17025: 2017. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.
- Jeschke, P. and Nauen, R., 5.3 Neonicotinoid Insecticides. *Elsevier BV.* (2005) 53-105.
- Jeschke, P.; Nauen, R.; Schindler, M.; Elbert, A. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 2897-2908.
- Jones, A.; Turnbull, G. Neonicotinoid concentrations in UK honey from 2013. *Pest Manag. Sci.* 72 (2016) 1897–1900.
- Jovanov, P.; Guzsvány, V.; Franko, M.; Lazić, S.; d, Sakač, M. Šarić, B.; Banjac, V. Multi-residue method for determination of selected neonicotinoid insecticides in honey using optimized dispersive liquid-liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 111(2013) 125–133.
- Kaczynski, P.; Hrynko, I.; Łozowicka, B. Evolution of novel sorbents for effective clean-up of honeybee matrix in highly toxic insecticide LC/MS/MS analysis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 139 (2017) 124–131.
- Kagabu, S. and Matsuno, H. Chloronicotinyl Insecticides. 8. Crystal and Molecular Structures of Imidacloprid and Analogous Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 276-281.
- Kahl M.B. Principales características de los insecticidas utilizados en el cultivo de soja. *INTA EEA Paraná* (2015). https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-insecticidas_utilizados_en_soja- caractersticas.pdf Fecha de acceso: 04 junio 2020.

- 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). *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 5926-5931.
- Kasiotis, K.M.; Anagnostopoulos, C.; Anastasiadou, P.; Machera, K. Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC-MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees. *Sci. Total Environ.* 485–486 (2014) 633–642.
- Kaškonienė, V.; Venskutonis, P.R. Floral Markers in Honey of Various Botanical and Geographic Origins: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. F.* 9(6) (2010) 620-634.
- Kessler, S.C.; Tiedeken, E.J.; Simcock, K.L.; Derveau, S.; Mitchell, J.; Softley, S.; Stout, J.C.; Wright, G.A. Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides. *Nature* 521 (2015) 74–76.
- Kiljanek, T.; Niewiadowska, A.; Semeniuk, S.; Gawel, M.; 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. *J. Chromatogr. A* 1435 (2016) 100-114.
- Klein, A. M.; Vaissière B. E.; Cane, J. H.; Steffan-Dewenter, I.; Cunningham, S. A.; Kremen, C.; Tscharntke, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. B* 274 (2007) 303-313.
- Klein, S.; Cabirol, A.; Devaud, J.M.; Barron, A.B.; Lihoreau, M. Why Bees Are So Vulnerable to Environmental Stressors. *Trends Ecol. Evol.* 32(4) (2017) 268-278.
- Ko, A.Y., Rahman, M., Aty, A., Jang, J., Park, J.H., Cho, S.K., Shim, J.H. Development of a simple extraction and oxidation procedure for the residue analysis of imidacloprid and its metabolites in lettuce using gas chromatography. *Food Chem.* 148 (2014) 402-409.
- Kulhanek, K.; Steinhauer, N.; Rennich, K.; Caron, D.M.; Sagili, R.R. et al. A national survey of managed honey bee 2015–2016 annual colony losses in the USA. *J. Apicult. Res.* 56(4) (2017) 328-340.
- Lacina, O.; Zachariasova, M.; Urbanova, J.; Vaclavikova, M.; Cajka, T.; Hajslova, J. Critical assessment of extraction methods for the simultaneous determination of pesticide residues and mycotoxins in fruits, cereals, spices and oil seeds employing ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1262 (2012) 8-18.
- Laurino, D.; Manino, A.; Patetta, A.; Porporato, M. Toxicity of neonicotinoid insecticides on different honey bee genotypes. *B. Insectol.* 66 (2013) 119-126.
- Lavine, B.L.; Ding, T.; Jacobs, D. LC_PDA_MS studies of the photochemical degradation of imidacloprid. *Anal. Lett.* 43 (2010) 1812-1821.
- Leardi, R. Experimental design in chemistry: A tutorial. *Anal. Chim. Acta.* 652 (2009) 161-172.

- Lehotay, S.J.; Ae Son, K.; Kwon, H.; Koesukkiwat, U.; Fu, W.; Mastovska, K.; Hoh, E.; Natchanun, L. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2548–2560.
- Leong, W.L.; Teh, S.Y.; Moshaddeque Hossain, M.; Nadarajaw, T.; Hussin, Z.; Chin, S.Y.; Lai, K.S.; Erin Lim S.H. Application, monitoring and adverse effects in pesticide use: The importance of reinforcement of Good Agricultural Practices (GAPs). *J. Environ. Manage.* 260 (2020) 109987.
- Li, Z.; Yu, T.; Chen, Y.; Heerman, M.; He, J.; Huang, J.; Nie, H.; Su, S. Brain transcriptome of honey bees (*Apis mellifera*) exhibiting impaired olfactory learning induced by a sublethal dose of imidacloprid. *Pestic. Biochem. Phys.* 156 (2019) 36-43.
- López-Ruiz, R.; Romero-González, R.; Garrido Frenich, A. Ultrahigh-pressure liquid chromatography-mass spectrometry: An overview of the last decade. *Trend. Anal. Chem.* 118 (2019) 170-181.
- Lorenzatti, E.; Maitre, M.I.; Marino, F.; Masin, C.; Rodríguez, A. R.; Lenardón, A. Contaminación ambiental por plaguicidas: análisis de residuos y experimentos de laboratorio. 1era Edición, Ediciones UNL, Santa Fe (2017).
- Lu, C.; Chang, C.H.; Tao, L.; Chen, M. Distributions of neonicotinoid insecticides in the Commonwealth of Massachusetts: a temporal and spatial variation analysis for pollen and honey samples. *Environ. Chem.* 13(1) (2016) 4-11.
- Machado, A.M.; Antunes, M.; Miguel, M.G.; Vilas-Boas, M.; Figueiredo, A.C. Volatile Profile of Portuguese Monofloral Honeys: Significance in Botanical Origin Determination. *Molecules* 26(16) (2021) 4970.
- Maggi, M.; Antúnez, K.; Invernizzi, C.; Aldea, P.; Vargas, M., et al. Honeybee health in South America. *Apidologie* 47 (2016) 835–854.
- MAGyP, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Argentina. Apicultura. *Boletín Cambio Rural* 7 (2019).
https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/cambio_rural/boletin/07_apicultura.php. Fecha de acceso: 4 enero 2022
- MAGyP, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Argentina. Guía para la caracterización de mieles argentinas (2019).
http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Apicultura/documentos/Guia_para_la_Caracterizacion_de_Mieles_Argentinas_F40919.pdf. Fecha de acceso 7 abril 2022.
- Masiá, A.; Blasco, C.; Pico, Y. Last trends in pesticide residue determination by liquid chromatography–mass spectrometry. *Trend. Anal. Chem.* 2 (2014) 11-24.
- Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Buydens, L.M.C.; De Jong, S.; Lewi, P.J.; Smeyers-Verbeke, J. Handbook of chemometrics and qualimetrics: part A. Chapter 8- straight line regression and calibration. *Data Handl. Sci. Techn.* 20 (1998) 208–210.

- Mastovska, K.; Dorweiler, K.J.; Lehotay, S.J.; Wegscheid, J.S.; Szpylka, K.A. Pesticide multiresidue analysis in cereal grains using modified QuEChERS method combined with automated direct sample introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS techniques, *J. Agric. Food Chem.* 58 (10) (2010) 5959–5972.
- Maxim, L.; van der Sluijs, J. P. Uncertainty: Cause or effect of stakeholders' debates? Analysis of a case study: The risk for honeybees of the insecticide Gaucho. *Sci. Total Env.* 376 1-3 (2007) 1-17.
- Meikle, W.G.; Adamczyk, J.J.; Weiss M.; Gregorc A.; Johnson D.R., et al. Sublethal Effects of Imidacloprid on Honey Bee Colony Growth and Activity at Three Sites in the U.S. *PLoS ONE* 11(12) (2016) e0168603.
- Mendizabal, F. M. Abejas: manuales esenciales. Primera edición. *Editorial Albatros*. Buenos Aires, Argentina (2005).
- Michlig, M.P.; García S.R.; Repetti, M.R. Determinación de residuos de imidacloprid en pólenes y nectarios florales de plantas de girasol por LC-MS/MS: Consecuencias del consumo de este neonicotinoide en abejas. *Trabajo final de la carrera de grado de Licenciatura en Química, PRINARC, FIQ, UNL* (2015).
- Ministerio de Gobierno y Reforma del Estado de la Provincia de Santa Fe. Strategies and Capacities for a Competitive Global Insertion, <https://www.santafe.gov.ar/index.php/web/content/download/243244/1281334/file/Santa%20Fe%20-%20Strategies%20and%20Capacities%20for%20a%20Competitive%20Global%20Insertion.pdf>, (2016). Fecha de acceso: 30 septiembre 2021.
- Ministerio de Hacienda de la Nación. Informe de cadenas de valor https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/sspmicro_cadenas_de_valor_apicola_0.pdf (2018). Fecha de acceso: 10 septiembre 2021.
- Mitchell, E.A.D.; Mulhauser, B.; Mulot, M.; Mutabazi, A.; Glauser, G.; Aebi, A. A worldwide survey of neonicotinoids in honey. *Science* 358 (2017) 109–111.
- Moza, P.N.; Hustert, K.; Feicht, E.; Kettrup, A. Photolysis of imidacloprid in aqueous solution. *Chemosphere*, 36 (1998) 497-502.
- Mrzlikar, M.; Heath, D.; Heath, E.; Markelj, J.; Kandolf Borovšak, A.; Prosen, H. Investigation of neonicotinoid pesticides in Slovenian honey by LC-MS/MS. *LWT – Food Sci. Tech.* 104 (2019) 45–52.
- Myers, R.H.; Montgomery, D.C.; Anderson-Cook, C.M. Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments, fourth ed., Wiley, Hoboken (2009).
- Narendran, S.T.; Meyyanathan, S.N.; Karri, V.V.S.R. Experimental design in pesticide extraction methods: A review, *Food Chem.* 289 (2019) 384-395.
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., Salgado, V.L., Kausmann, M. Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plant, *Pestic. Biochem. Phys.* 76 (2003) 55-69.

- Neumann, P., Carreck, N. Honey bee colony losses. *J. Apicult. Res.* 49(1) (2010) 1-6.
- Niell, S.; Cesio, V.; Hepperle, J.; Doerk, D.; Kirsch, L.; Kolberg, D.; Scherbaum, E.; Anastassiades, M.; Heinzen, H. QuEChERS-based method for the multiresidue analysis of pesticides in beeswax by LC-MS/MS and GC×GC-TOF, *J. Agric. Food Chem.* 62(17) (2014) 3675–3683.
- Niell, S.; Jesús, F.; Pérez, C.; Mendoza, Y.; Díaz, R.; Franco, J.; Cesio, V.; Heinzen, H. QuEChERS adaptability for the analysis of pesticide residues in beehive products seeking the development of an agroecosystem sustainability monitor. *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 4484-4492.
- Olivieri, A.C.; Escandar, G.M. Practical three-way calibration, Elsevier, Amsterdam, (2014).
- Olivieri, A. C. Practical guiderlines for reporting results in single- and multi-component analytical calibration: A tutorial. *Anal. Chim. Acta.* 868 (2015) 10-22.
- OMS, 2009. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44271/9789241547963_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y (2009). Fecha de acceso: 14 mayo 2022.
- Pandey, G.; Dorrian, S.; Russell, R.J.; Oakeshott, J.G. Biotransformation of the neonicotinoid insecticides imidacloprid and thiamethoxam by *Pseudomonas* sp. 1G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380 (2009) 710-714.
- Pena-Pereira, F. From Conventional to Miniaturized Analytical Systems. *Miniaturization in Sample Preparation*, Capítulo 1 (2014).
- Pettis, J.S.; Lichtenberg, E.M.; Andree, M.; Stitzinger, J.; Rose, R.; vanEngelsdorp, D. Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*. *PLOS ONE* 8(7) (2013) e70182.
- Pihlström, T.; Blomkvist, G.; Friman, P.; Pagard, U.; Österdahl, B.G. Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 1773–1789.
- Pisa, L.W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Downs, C.A., et al. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ. Sci. Pollut. R.* 22 (2015) 68-102.
- Pórfido, O.D.; Butler, E.; de Titto, E.; Issaly, P.; Benítez, R. Los plaguicidas en la República Argentina. Temas de salud ambiental. *Departamento de Salud Ambiental, Ministerio de Salud de la Nación, Buenos Aires, República Argentina* (2014).
- Potts, S.G.; Biesmeijer, J.C.; Kremen, C.; Neumann, P.; Schweiger, O.; Kunin, W.E. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.* 25 (2010) 345–353.

- Ravanipour, M.; Kalantary, R.R.; Mohseni-Bandpi, A.; Esrafil, A.; Farzadkia, M.; Hashemi-Najafabadi, S. Experimental design approach to the optimization of PAHs bioremediation from artificially contaminated soil: Application of variables screening development, *J. Environ. Health Sci. Eng.* 13(22) (2015).
- Ravazzi, G. Las abejas: cría rentable. *Editorial De Vecchi, S. A. México* (2016).
- Ravoet, J.; Reybroeck, W.; de Graaf, D.C. Pesticides for apicultural and/or agricultural application found in Belgian honey bee wax combs. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 94 (2015) 543–548.
- Reglamento (CE) N°178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo. <https://boe.es/doue/2002/031/L00001-00024.pdf>. Fecha de acceso: 16 agosto 2022.
- RENAPA, Registro Nacional de Productores Apícolas. <https://datos.agroindustria.gob.ar/dataset/registro-nacional-de-productores-apicolas>, (2021). Fecha de acceso: 21 julio 2021.
- Requier, F.; Andersson, G. K. S.; Oddi, F. J.; Garcia, N.; Garibaldi, L. A. Perspectives from the survey of honey bee colony losses during 2015–2016 in Argentina. *Bee World* 95:1 (2018) 9-12.
- Resolución 425/2021- SENASA- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (2021). <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/248095/20210813>. Fecha de acceso: 28 abril 2022.
- Rondeau, G.; Sánchez-Bayo, F.; Tennekes, H.A.; Decourtye, A.; Ramírez-Romero, R.; Desneux, N. Delayed and time-cumulative toxicity of imidacloprid in bees, ants and termites. *Sci. Rep.* 4 (2014) 5566.
- Saeta, J.M.; Bulacio, L.; Giuliani, S.; Panelo, M. Incidencia del manejo sanitario de la colmena en la contaminación de la miel. *Revista agromensajes de la Facultad de Ciencias Agrarias UNR* 24(4) (2008).
- Salizzi, E. Economic restructuring and transformation in the pampa agro: the expansion of soybean crop and its effects on Buenos Aires apiculture at the beginnings of the 21st century, *Journal of geography* 16(1) (2014) 13-46.
- Sanchez-Bayo, F.; Goka, K. Pesticide residues and bees – A risk assessment. *PLOS ONE* 9(4) (2014).
- Sánchez-Hernández, L.; Hernández-Domínguez, D.; Martín, M.T.; Nozal, M.J.; Higes, M.; Bernal Yagüe, J.L. Residues of neonicotinoids and their metabolites in honey and pollen from sunflower and maize seed dressing crops. *J. Chromatogr. A* 1428 (2016) 220–227
- Sandrock, C.; Tanadini, M.; Tanadini, L.G.; Fauser-Misslin, A.; Potts, S.G.; Neumann, P. Impact of Chronic Neonicotinoid Exposure on Honeybee Colony Performance and Queen Supersedure. *PLOS ONE* 9(8) (2014).

- SANTE 11945. European Commission Health, Directorate-General for Health and Food Safety, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed (2015).
- SANTE 11813. European Commission, Directorate General for Health and Food Safety, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, (2017).
- SANTE 12682. European Commission, Directorate General for Health and Food Safety Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, (2019).
- Santos, E.; Mendoza Y.; Vera M.; Carrasco-Letelier L.; Díaz S.; Invernizzi C. Aumento en la producción de semillas de soja (*Glycine max*) empleando abejas melíferas (*Apis mellifera*). *Agrociencia Uruguay* 17(1) (2013).
- SENASA, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, Resolución N° 934, Límite Máximo de Residuos para Productos Agrícolas, <http://www.senasa.gob.ar/resolucion-9342010-productos-agropecuarios> (2010). Fecha de acceso: 15 mayo 2020
- SENASA, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, Resolución N° 559, Productos veterinarios: límites de residuos en alimentos de origen animal, <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-559-2011-185988/texto> (2011). Fecha de acceso: 25 abril 2022
- SENASA, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, Resolución N° 608, Productos alimenticios: Límites Máximos de Residuos, <http://www.senasa.gob.ar/resolucion-6082012> (2012). Fecha de acceso: 25 abril 2022
- Sage, A. When is a triple quadrupole not a triple quadrupole? <https://community.sciex.com/2019/11/12/when-is-a-triple-quadrupole-not-a-triple-quadrupole/> (2019). Fecha de acceso: 13 mayo 2022.
- Schippers, N.; Schwack., W. Phototransformation of imidacloprid on isolated tomato fruit cuticles and on tomato fruits. *J. Photochem. Photobiol B: Biol.* 98 (2010) 57-60.
- Shin, Y.; Kim, C.J.; Baek, J.; Kim, L.; Son, K.A.; Lee, H.D.; Kim, D.; Kim, J.H.; Noh, H.H. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for the Simultaneous Analysis of 353 Pesticides in the Edible Insect *Tenebrio molitor* Larvae (Mealworms). *Molecules* 25(24) (2020) 5866.
- Siede, R.; Faust, L.; Meixner, M.D.; Maus, C.; Grünewald, B.; Büchler, R. Performance of honey bee colonies under a long-lasting dietary exposure to sublethal concentrations of the neonicotinoid insecticide thiacloprid. *Pest Manag. Sci.* 73(7) (2017) 1334-1344.
- Simon-Delso, N.; Amaral-Rogers, V.; Belzunces, L.P.; Bonmatin, J.M.; Chagnon, M., y col. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ. Sci. Pollut. R.* 22, (2015) 5-34.

- Skrzecz, A.; Shaw, D.; Maczynski, A. IUPAC-NIST solubility data series 69. Ternary alcohol-hydrocarbon-water systems, *J. Phys. Chem.* 28(4) (1999) 1146, <https://doi.org/10.1063/1.556052>. Fecha de acceso: 12 febrero 2018
- van der Sluijs, J.P.; Simon-Delso, N.; Goulson, D.; Maxim, L.; Bonmatin, J.M.; Belzunces L.P. Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Curr. Opin. Env. Sust.* 5 (2013) 293–305.
- Souza Tette, P.A.; Rocha Guidi, L.; de Abreu Glória, M.B.; Fernandes, C. Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods. *Talanta* 149 (2016) 124-141.
- Steele, T.; Shardlow, M. (2019) Bees under siege from habitat loss, climate change and pesticides. Informe producido por Buglife y financiado por WWF, London.
- Stephenson, G. R.; Solomon, K. R. Plaguicidas y ambiente. Versión editada por Rojas, E. C. *Editorial Universidad de Costa Rica*. Costa Rica (2014).
- Stewart, S.D.; Lorenz, G.M.; Catchot, A.L.; Gore, J.; Cook, D.; Skinner, J.; Mueller, T.C.; Johnson, D.R.; Zawislak, J.; Barber, J. Potential Exposure of Pollinators to Neonicotinoid Insecticides from the Use of Insecticide Seed Treatments in the Mid-Southern United States. *Environ. Sci. Technol.* 48(16) (2014) 9762–9769.
- Suchail, S.; Debrauwer, L.; Belzunces, L.P. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest. Manag. Sci.* 60(3) (2004) 291-296.
- Tanner, G.; Czerwenka, C. LC-MS/MS Analysis of Neonicotinoid Insecticides in Honey: Methodology and Residue Findings in Austrian Honeys. *J. Agr. Food Chem.* 59 (2011) 12271–12277.
- Thany, S. H. Neonicotinoid insecticides historical evolution and resistance mechanism. *Adv. Exp. Med. Biol.* 683 (2010) 75-83.
- Tomizawa, M.; Casida, J.E. NEONICOTINOID INSECTICIDE TOXICOLOGY: Mechanisms of Selective Action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45 (2005) 247–68.
- Tomlin, C.D.S. (Ed.) The pesticide manual. Fifteenth edition. *British Crop Production Council* (2009).
- US EPA, Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos <https://www.federalregister.gov/documents/2019/05/20/2019-10447/product-cancellation-order-for-certain-pesticide-registrations> (2019). Fecha de acceso: 30 marzo 2020
- Valcárcel Cases M.; Gómez Hens A. Técnicas analíticas de separación. *Editorial Reverté S.A.* Barcelona, España (2003).
- Vanbergen, A.J. The Insect Pollinators Initiative. Threats to an ecosystem service: pressures on pollinators. *Front. Ecol. Environ.* 11 (2013) 251–259.

- Vandame, V.; Palacio, M.A. Preserved honey bee health in Latin America: a fragile equilibrium due to low-intensity agriculture and beekeeping? *Apidologie* 41 (2010) 243–255.
- Vera Candiotti, L.; De Zan, M.M.; Cámara, M.S.; Goicoechea, H.C. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*, 124 (2014) 123-138.
- Viglizzo, E.F.; Jobbágy, E. Expansión de la frontera agropecuaria en Argentina y su impacto ecológico-ambiental. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Buenos Aires (2010).
- Wamhoff, H., Schneider, V. Photodegradation of imidacloprid. *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 1730-1734
- Whitehouse, C.M.; Dreyer, R.N.; Yamashita, M.; Fenn, J.B. Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers. *Anal. Chem.* 57(3) (1985) 675–679.
- Wiest, L.; Buleté, A.; Giroud, B.; Fratta, C.; Amic, S.; Lambert, O.; 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. *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5743–5756.
- Wong, J.W.; Wang, J.; Chow, W.; Carlson, R.; Jia, Z.; Zhang, K.; Hayward, D.G.; Chang, J.S. Perspectives on Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry for Pesticide Screening in Foods. *J. Agric. Food Chem.* 66 (2018) 9573-9581.
- Wood, T.J.; Goulson, D. The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (2017) 17285–17325.
- Woodcock, B.A.; Ridding, L.; Freeman, S.N.; Pereira, M.G.; Sleep, D.; Redhead, J.; Aston, D.; Carreck, N.L.; Shore, R.F.; Bullock, J.M.; Heard, M.S.; Pywell, R.F. Neonicotinoid residues in UK honey despite European Union moratorium. *PLoS ONE* 13(1) (2018) e0189681.
- Wu, M.C.; Chang, Y.W.; Lu, K.H.; Yang, E.C. Gene expression changes in honey bees induced by sublethal imidacloprid exposure during the larval stage. *Insect Biochem. Molec.* 88 (2017) 12-20.
- Yang, E.C.; Chang, H.C.; Wu, W.Y.; Chen, Y.W. Impaired Olfactory Associative Behavior of Honeybee Workers Due to Contamination of Imidacloprid in the Larval Stage. *PLOS ONE* 7(11) (2012).
- Yáñez, K.; Bernal, J.L.; Nozal, M.; Martín, M.; Bernal, J. Determination of seven neonicotinoid insecticides in beeswax by liquid chromatography coupled to electrospray-mass spectrometry using a fused-core column. *J. Chromatogr. A* 1285 (2013) 110–117.

- Yoshida, T.; Murakawa, H.; Toda K. Determination of nitenpyram and its metabolites in agricultural products by using hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pestic. Sci.* 38(1) (2013) 27–32.
- Yu, S. J. The toxicology and biochemistry of insecticides. *CRC Press, Taylor & Francis Group*. Estados Unidos (2008).
- Zhang, L.; Liu, S.; Cui, X.; Pan, C.; Zhang, A.; Chen, F. A review of sample preparation methods for the pesticide residue analysis in foods. *Cent. Eur. J. Chem.* 10(3) (2012) 900-925.

MATERIAL SUPLEMENTARIO - TABLAS

Tabla S2.1 Resumen de métodos analíticos disponibles aplicados a abejas.

Peso de muestra (g)	Extracción	Limpieza	Capacidad de detección	Ref.
2, 5 o 10	Agua + MeCN ^a acidificado con 1% de ácido fórmico o acético + sales citrato	Freeze-out (-60°C) + quitina, EMR-lípido ^b o Z-Sep+ ^c	Sistema QTRAP®	Kaczynski y col. 2017
2	Agua QuEChERS acetato	Freeze-out (-12 °C) + PSA, Z-Sep+ y MgSO ₄	Sistema QTRAP® LC: 1 µg kg ⁻¹	Kiljanek y col. 2016
15	Agua + 2% trietilamina en MeCN + sales acetato	Cartucho MgSO ₄ + C18	Sistema QqQ LC: 0,8 µg kg ⁻¹	Kamel 2010
2	MeCN:acetato de etilo (8:2)	Cartucho de alúmina	Sistema QTRAP® LC: 0,1 µg kg ⁻¹	Gbylik-Sikorska y col. 2015
5	Agua QuEChERS convencional	MgSO ₄ , PSA y C18	Sistema QqQ	Calatayud-Vernich y col. 2016
5	Agua y hexano QuEChERS citrato	MgSO ₄ , PSA y C18	Sistema QqQ LC: 9,6 µg kg ⁻¹	Wiest y col. 2011
1	Agua y hexano + 2% trietilamina en MeCN + sales acetato y PSA	PSA y MgSO ₄ + cartucho C18	Sistema QqQ LC: 1,5 µg kg ⁻¹	Kasiotis y col. 2014
2	Agua QuEChERS citrato	Freeze-out (-18 °C) + PSA, C18 y MgSO ₄ :GCB ^d (59:1)	Sistema QTRAP® LC: 10 µg kg ⁻¹	Niell y col. 2015

^a acetonitrilo

^b EMR-lípido: eliminador de lípidos altamente selectivo

^c Z-Sep+: soporte de sílice recubierto con dióxido de circonio y grupos octadecilsilano,

^d carbono grafitizado

Tabla S2.2 Resumen de métodos analíticos disponibles aplicados a miel.

Peso de muestra (g)	Extracción	Limpieza	Capacidad de detección	Ref.
5	Agua	Cartucho polimérico	Sistema QTOF LC: entre 6 y 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, dependiendo del origen floral.	Sánchez-Hernández y col. 2016
0,125	Metanol:agua	Cartucho HLB	Sistema QqQ LC: 0,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Jones y Turnbull 2016
2	MeCN ^a :acetato de etilo (8:2)	Cartucho X-CW	Sistema QTRAP® LC: 0,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Gbylik-Sikorska y col. 2015
5	Agua QuEChERS convencional	MgSO ₄ , PSA y C18	Sistema QqQ	Calatayud-Vernich y col. 2016
5	Agua QuEChERS citrato	MgSO ₄ , PSA y C18	Sistema QqQ LC: 3,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Wiest y col. 2011
1	Agua (30 °C) + 2% trietilamina en MeCN + sales acetato y PSA	PSA y MgSO ₄ + cartucho C18	Sistema QqQ LC: 1,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Kasiotis y col. 2014
5	Agua QuEChERS citrato	PSA y MgSO ₄	Sistema QTRAP®	Niell y col. 2015

^a acetonitrilo

Tabla S2.3 Resumen de métodos analíticos disponibles aplicados a polen.

Peso de muestra (g)	Extracción	Limpieza	Capacidad de detección	Ref.
15	Agua + 2% trietilamina en MeCN ^a + sales acetato	Cartucho MgSO ₄ + C18	Sistema QqQ LC: 0,8 µg kg ⁻¹	Kamel 2010
5	Agua QuEChERS convencional	MgSO ₄ , PSA y C18	Sistema QqQ	Calatayud-Vernich y col. 2016
2	Agua y hexano QuEChERS citrato	MgSO ₄ , PSA y C18	Sistema QqQ LC: 12 µg kg ⁻¹	Wiest y col. 2011
1	Agua y hexano + 2% trietilamina en MeCN + sales acetato y PSA	PSA y MgSO ₄ + cartucho C18	Sistema QqQ LC: 1,5 µg kg ⁻¹	Kasiotis y col. 2014
5	Agua QuEChERS acetato	PSA, C18 y MgSO ₄	Sistema QTRAP® LC: 1 µg kg ⁻¹	Niell y col. 2015

^a acetoniitrilo**Tabla S2.4** Resumen de métodos analíticos disponibles aplicados a cera.

Peso de muestra (g)	Extracción	Limpieza	Capacidad de detección	Ref.
2	Hexano:iso-propanol (8:2) (50 °C) + agua	Cartucho basado en material diatomeo	Sistema QqQ LC: 6 µg kg ⁻¹	Yáñez y col. 2013
2	MeCN ^a (80 °C)	Freeze-out (-18 °C) + PSA y C18	Sistema QTRAP® LC: 10 µg kg ⁻¹	Niell y col. 2014
10	QuEChERS citrato	MgSO ₄ y PSA	Sistema QTRAP®	Herrera López y col. 2016

^a acetoniitrilo

Tabla S2.5 Propiedades fisicoquímicas del IMD.

IMIDACLOPRID	
punto de fusión	144°C
presión de vapor a 20 °C	3 mmHg
constante de Henry	$1,7 \times 10^{-10} \text{ Pa} \cdot \text{m}^3 \text{ mol}^{-1}$
solubilidad en agua a 20 °C	0,61 g L ⁻¹
coeficiente de partición octanol-agua (Kow) a 21 °C	0,57
constante de disociación (pKa ₁ ; pKa ₂)	1,56 ; 11,12

PubChem, Open Chemistry Database.

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/E-imidacloprid>, fecha de acceso 16 febrero 2018.

Tabla S3.1 BBD para la evaluación de tres factores en tres niveles, codificados como bajo (-1), medio (0) y alto (+1), cantidad de experimentos 15.

Experi- mento n°	Factores no codificados			Factores codificados		
	Tiempo (min)	PSA (mg)	pH	X1	X2	X3
1	30	150	2	0	+1	-1
2	45	50	3	+1	-1	0
3	30	50	2	0	-1	-1
4	15	100	4	-1	0	+1
5	15	150	3	-1	+1	0
6	30	100	3	0	0	0
7	45	100	4	+1	0	+1
8	45	100	2	+1	0	-1
9	30	100	3	0	0	0
10	45	150	3	+1	+1	0
11	30	150	4	0	+1	+1
12	15	50	3	-1	-1	0
13	15	100	2	-1	0	-1
14	30	50	4	0	-1	+1
15	30	100	3	0	0	0

Tabla S4.1 Recuperación porcentual y desviación estándar relativa (DER) (n=3) al nivel de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para polen y 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en abejas.

Neonicotinoide	Polen		Abeja	
	R (%)	DER	R (%)	DER
ACT	85	5	91	7
CLT	60	5	97	18
DNF	80	13	67	18
FCD	88	16	94	9
NPI	72	8	81	18
TCD	63	15	91	4
TMX	107	20	79	19

MATERIAL SUPLEMENTARIO - FIGURAS

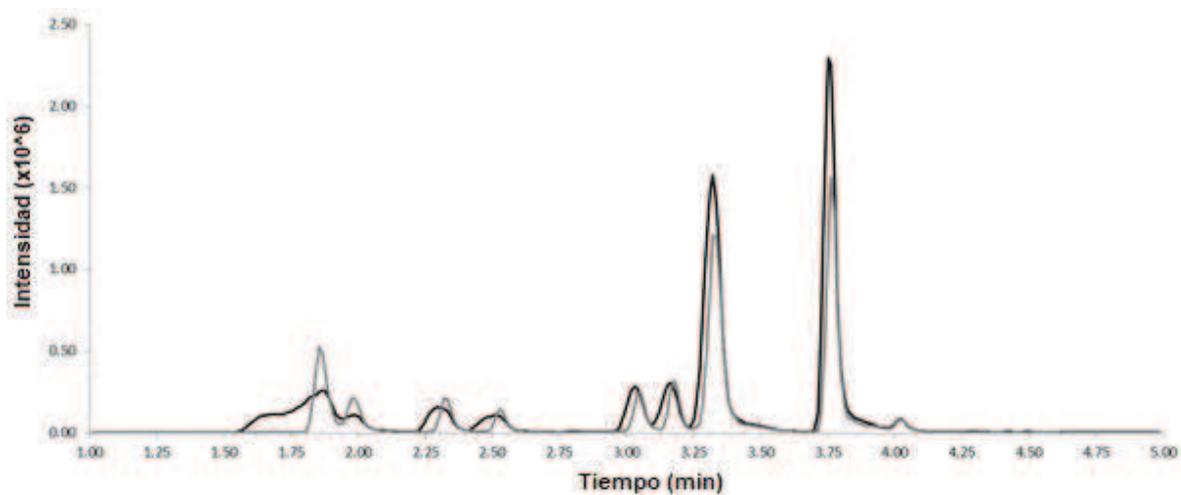


Fig. S3.1 Cromatograma de iones totales (TIC) para extractos de neonicotinoides de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ en diferentes solventes, MeCN (negro) y solución acuosa (gris).

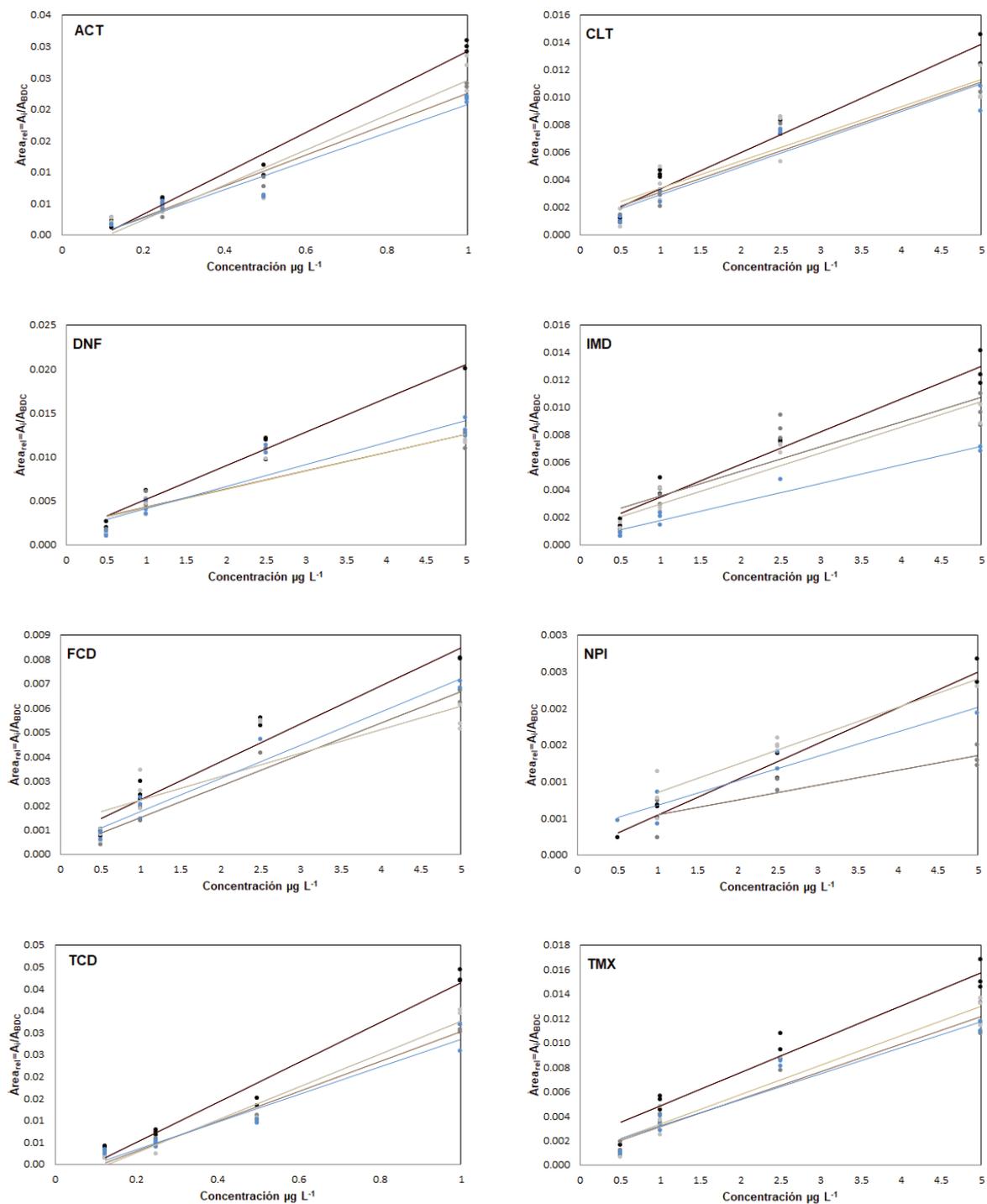


Fig. S3.2 Curvas de calibrado en extractos de miel de diferentes orígenes florales: ● trébol, ● meliloto, ● alfalfa y ● miel de validación.

MATERIAL SUPLEMENTARIO – ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

IMD EN ABEJAS

Comparación de Líneas de Regresión - AREA versus PPB por STE_MATRIZ

Variable dependiente: AREA

Variable independiente: PPB

Códigos de Nivel: STE_MATRIZ; 1=solvente; 2= matriz abeja

Número de casos completos: 24

Número de líneas de regresión: 2

Análisis de Regresión Múltiple

		Error	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Estándar	T	Valor-P
CONSTANTE	-15,1965	33,7444	-0,450341	0,6573
PPB	55,6186	0,367802	151,219	0,0000
STE_MATRIZ=2	77,0239	47,7218	1,61402	0,1222
PPB*STE_MATRIZ=2	-12,9673	0,52015	-24,93	0,0000

Coefficients

STE_MATRIZ	Intercepto	Pendiente
1	-15,1965	55,6186
2	61,8274	42,6512

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	3,17642E8	3	1,05881E8	12199,70	0,0000
Residuo	173579,	20	8678,95		
Total (Corr.)	3,17815E8	23			

R-Cuadrada = 99,9454 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 99,9372 por ciento

Error estándar del est. = 93,1609

Error medio absoluto = 58,8242

Estadístico Durbin-Watson = 2,63803 (P=0,8456)

Autocorrelación residual de retardo 1 = -0,34925

Análisis de Residuos

	Estimación	Validación
n	24	
CME	8678,95	
MAE	58,8242	
MAPE	29,1785	
ME	-7,5436E-13	
MPE	-17,5488	

El StatAdvisor

La salida muestra el resultado de ajustar un modelo de regresión lineal para describir la relación entre AREA, PPB y STE_MATRIZ. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{AREA} = -15,1965 + 55,6186 \cdot \text{PPB} + 77,0239 \cdot (\text{STE_MATRIZ}=2) - 12,9673 \cdot \text{PPB} \cdot (\text{STE_MATRIZ}=2)$$

en donde los términos similares a STE_MATRIZ=2 son variables indicadoras las cuales toman el valor de 1 si son verdaderas ó 0 si son falsas. Esto corresponde a 2 líneas separadas, una para cada valor de STE_MATRIZ. Por ejemplo, cuando STE_MATRIZ=1, el modelo se reduce a

$$\text{AREA} = -15,1965 + 55,6186 \cdot \text{PPB}$$

Cuando STE_MATRIZ=2, el modelo se reduce a

$$\text{AREA} = 61,8274 + 42,6512 \cdot \text{PPB}$$

Como el valor-P de la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95,0%.

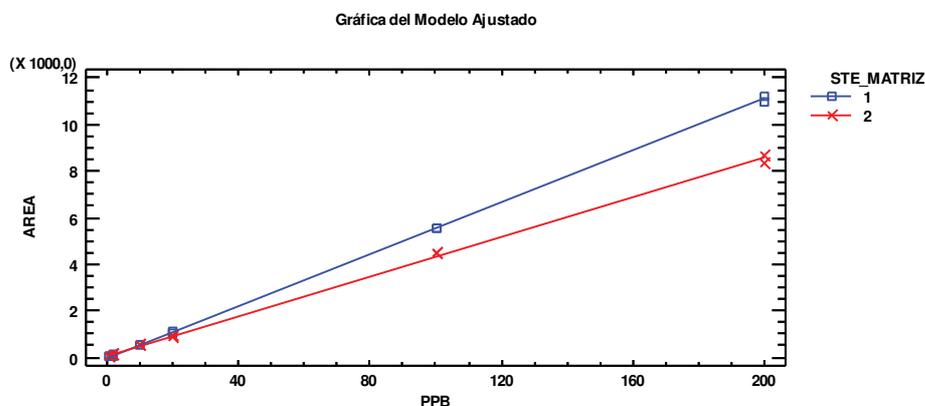
El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 99,9454% de la variabilidad en AREA. El estadístico R-Cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes es 99,9372%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 93,1609. Este valor puede utilizarse para construir límites de predicción para nuevas observaciones seleccionando la opción de Pronósticos del menú de texto. El error absoluto medio (MAE) de 58,8242 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada e el orden en que se presentaron en su archivo de datos. Dado que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no hay indicación de una posible correlación serial con un nivel de confianza del 95,0%. Para probar si hay diferencias estadísticamente significativas entre los interceptos y/o pendientes, seleccione Suma de Cuadrados Condicional de la lista de Opciones Tabulares.

ANOVA Adicional para Variables Según el Orden de Introducción

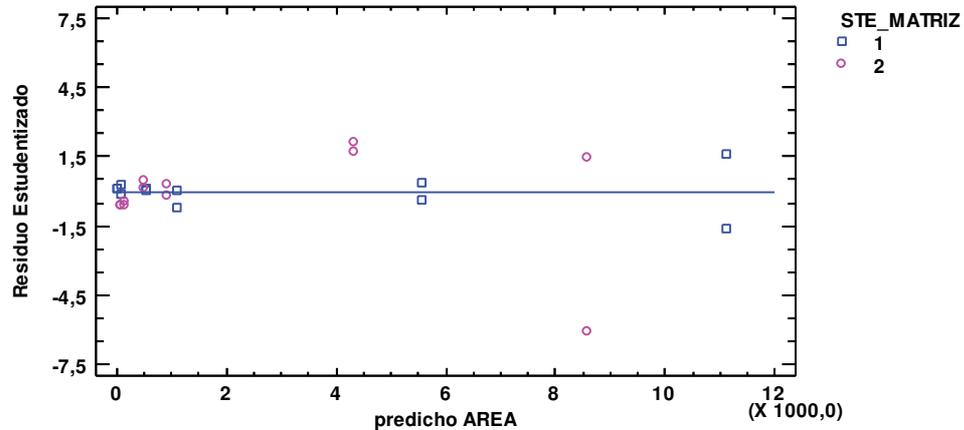
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
PPB	3,09778E8	1	3,09778E8	35693,02	0,0000
Interceptos	2,46978E6	1	2,46978E6	284,57	0,0000
Pendientes	5,39402E6	1	5,39402E6	621,51	0,0000
Modelo	3,17642E8	3			

El StatAdvisor

Esta tabla le permite evaluar la significancia estadística de los términos en el modelo. **Debido a que el valor-P para las pendientes es menor que 0,01, existen diferencias estadísticas entre las pendientes para los distintos valores de STE_MATRIZ con un nivel de confianza del 99%.** Dado el valor-P para los interceptos es menor que 0,01, existen diferencias estadísticamente significativas entre los interceptos para los diferentes valores de STE_MATRIZ con un nivel de confianza del 99%.



Gráfica de Residuos



IMD EN MIEL

Comparación de Líneas de Regresión - AREA versus PPB por STE_MATRIZ

Variable dependiente: AREA

Variable independiente: PPB

Códigos de Nivel: STE_MATRIZ; 1= solvente; 2= matriz miel

Número de casos completos: 34

Número de líneas de regresión: 2

Análisis de Regresión Múltiple

Parámetro	Estimado	Error		Estadístico	
		Estándar	T	Valor-P	
CONSTANTE	-121,541	104,204	-1,16638	0,2527	
PPB	65,0778	1,42125	45,7893	0,0000	
STE_MATRIZ=2	67,2697	146,81	0,458209	0,6501	
PPB*STE_MATRIZ=2	0,828228	1,95853	0,422883	0,6754	

Coefficients

STE_MATRIZ	Intercepto	Pendiente
1	-121,541	65,0778
2	-54,2716	65,906

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	6,00086E8	3	2,00029E8	1503,09	0,0000
Residuo	3,99234E6	30	133078,		
Total (Corr.)	6,04078E8	33			

R-Cuadrada = 99,3391 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 99,273 por ciento

Error estándar del est. = 364,799

Error medio absoluto = 214,583

Estadístico Durbin-Watson = 1,70047 (P=0,0825)

Autocorrelación residual de retardo 1 = 0,146576

Análisis de Residuos

	Estimación	Validación
n	34	
CME	133078,	
MAE	214,583	

MAPE	125,503	
ME	6,1859E-13	
MPE	119,05	

El StatAdvisor

La salida muestra el resultado de ajustar un modelo de regresión lineal para describir la relación entre AREA, PPB y STE_MATRIZ. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{AREA} = -121,541 + 65,0778 \cdot \text{PPB} + 67,2697 \cdot (\text{STE_MATRIZ}=2) + 0,828228 \cdot \text{PPB} \cdot (\text{STE_MATRIZ}=2)$$

en donde los términos similares a STE_MATRIZ=2 son variables indicadoras las cuales toman el valor de 1 si son verdaderas ó 0 si son falsas. Esto corresponde a 2 líneas separadas, una para cada valor de STE_MATRIZ. Por ejemplo, cuando STE_MATRIZ=1, el modelo se reduce a

$$\text{AREA} = -121,541 + 65,0778 \cdot \text{PPB}$$

Cuando STE_MATRIZ=2, el modelo se reduce a

$$\text{AREA} = -54,2716 + 65,906 \cdot \text{PPB}$$

Como el valor-P de la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95,0%.

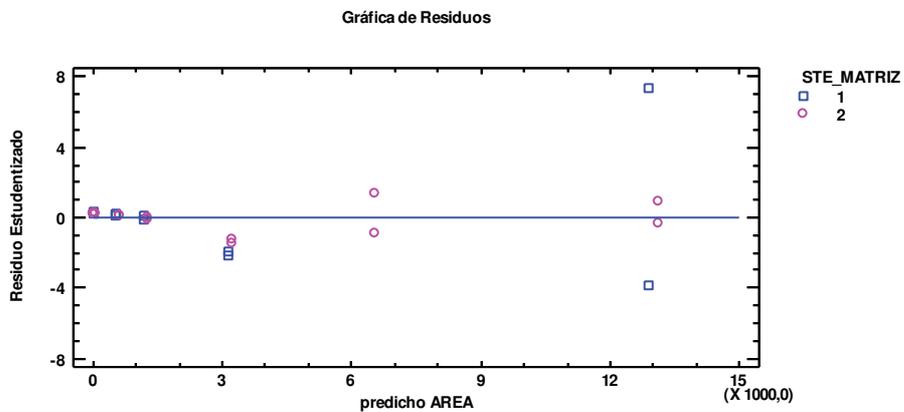
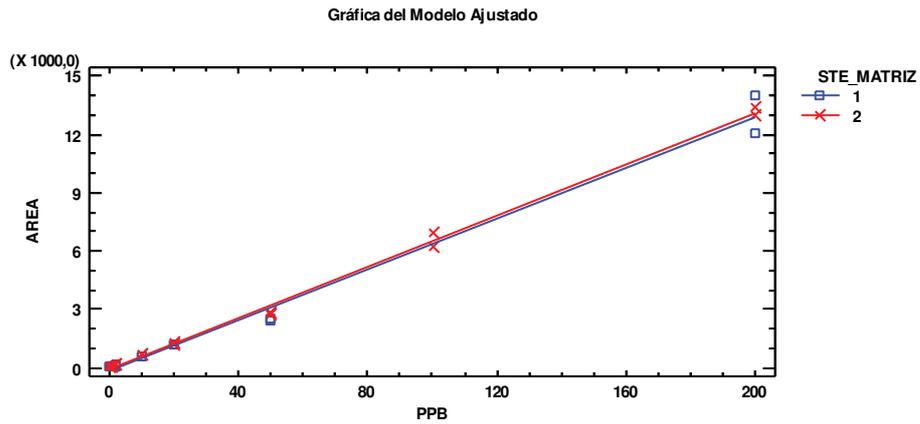
El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 99,3391% de la variabilidad en AREA. El estadístico R-Cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes es 99,273%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 364,799. Este valor puede utilizarse para construir límites de predicción para nuevas observaciones seleccionando la opción de Pronósticos del menú de texto. El error absoluto medio (MAE) de 214,583 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada e el orden en que se presentaron en su archivo de datos. Dado que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no hay indicación de una posible correlación serial con un nivel de confianza del 95,0%. Para probar si hay diferencias estadísticamente significativas entre los interceptos y/o pendientes, seleccione Suma de Cuadrados Condicional de la lista de Opciones Tabulares.

ANOVA Adicional para Variables Según el Orden de Introducción

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
PPB	5,99978E8	1	5,99978E8	4508,47	0,0000
Interceptos	83527,4	1	83527,4	0,63	0,4344
Pendientes	23798,3	1	23798,3	0,18	0,6754
Modelo	6,00086E8	3			

El StatAdvisor

Esta tabla le permite evaluar la significancia estadística de los términos en el modelo. **Dado que el valor-P para las pendientes es mayor que 0,1, no existen diferencias estadísticas entre las pendientes para los distintos valores de STE_MATRIZ con un nivel de confianza del 90% o mayor.** Puede forzar que se consideren pendientes iguales marcando la casilla correspondiente en el cuadro de diálogo de Opciones de Análisis. Dado el valor-P para los interceptos es mayor que 0,1, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los interceptos para los diferentes valores de STE_MATRIZ con un nivel de confianza del 90% o mayor. Puede forzar a que se consideren interceptos iguales marcando la casilla correspondiente en el cuadro de diálogo de Opciones de Análisis.



IMD EN CERA

Comparación de Líneas de Regresión - AREA versus PPB por STE_MATRIZ

Variable dependiente: AREA

Variable independiente: PPB

Códigos de Nivel: STE_MATRIZ; 1= solvente; 2= matriz cera

Número de casos completos: 28

Número de líneas de regresión: 2

Análisis de Regresión Múltiple

Parámetro	Estimado	Error Estándar	Estadístico T	Valor-P
CONSTANTE	18,6378	27,5483	0,676548	0,5052
PPB	21,2301	0,31924	66,5022	0,0000
STE_MATRIZ=2	18,214	38,9592	0,467514	0,6443
PPB*STE_MATRIZ=2	-1,25531	0,451473	-2,78048	0,0104

Coefficients

STE_MATRIZ	Intercepto	Pendiente
1	18,6378	21,2301
2	36,8517	19,9748

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
--------	-------------------	----	----------------	---------	---------

Modelo	5,42787E7	3	1,80929E7	2780,05	0,0000
Residuo	156195,	24	6508,11		
Total (Corr.)	5,44349E7	27			

R-Cuadrada = 99,7131 por ciento
R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 99,6772 por ciento
Error estándar del est. = 80,6728
Error medio absoluto = 60,1242
Estadístico Durbin-Watson = 1,45743 (P=0,0180)
Autocorrelación residual de retardo 1 = 0,266263

Análisis de Residuos

	Estimación	Validación
n	28	
CME	6508,11	
MAE	60,1242	
MAPE	44,7448	
ME	1,76621E-13	
MPE	-40,5689	

El StatAdvisor

La salida muestra el resultado de ajustar un modelo de regresión lineal para describir la relación entre AREA, PPB y STE_MATRIZ. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{AREA} = 18,6378 + 21,2301 \cdot \text{PPB} + 18,214 \cdot (\text{STE_MATRIZ}=2) - 1,25531 \cdot \text{PPB} \cdot (\text{STE_MATRIZ}=2)$$

en donde los términos similares a STE_MATRIZ=2 son variables indicadoras las cuales toman el valor de 1 si son verdaderas ó 0 si son falsas. Esto corresponde a 2 líneas separadas, una para cada valor de STE_MATRIZ. Por ejemplo, cuando STE_MATRIZ=1, el modelo se reduce a

$$\text{AREA} = 18,6378 + 21,2301 \cdot \text{PPB}$$

Cuando STE_MATRIZ=2, el modelo se reduce a

$$\text{AREA} = 36,8517 + 19,9748 \cdot \text{PPB}$$

Como el valor-P de la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 99,7131% de la variabilidad en AREA. El estadístico R-Cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes es 99,6772%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 80,6728. Este valor puede utilizarse para construir límites de predicción para nuevas observaciones seleccionando la opción de Pronósticos del menú de texto. El error absoluto medio (MAE) de 60,1242 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada e el orden en que se presentaron en su archivo de datos. Dado que el valor-P es menor que 0,05, esto es indicativo de una posible correlación serial con un nivel de confianza del 95,0%. Grafique los residuos versus el orden de las filas para ver si hay algún patrón que pueda detectarse. Para probar si hay diferencias estadísticamente significativas entre los interceptos y/o pendientes, seleccione Suma de Cuadrados Condicional de la lista de Opciones Tabulares.

ANOVA Adicional para Variables Según el Orden de Introducción

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
PPB	5,42114E7	1	5,42114E7	8329,83	0,0000
Interceptos	16954,3	1	16954,3	2,61	0,1196
Pendientes	50314,7	1	50314,7	7,73	0,0104
Modelo	5,42787E7	3			

El StatAdvisor

Esta tabla le permite evaluar la significancia estadística de los términos en el modelo. **Dado que el valor-P para las pendientes es menor que 0,05, existen diferencias estadísticas entre las pendientes para los distintos valores de STE_MATRIZ con un nivel de confianza del 95%.** Dado el valor-P para los interceptos es mayor que 0,1, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los interceptos

para los diferentes valores de STE_MATRIZ con un nivel de confianza del 90% o mayor. Puede forzar a que se consideren interceptos iguales marcando la casilla correspondiente en el cuadro de diálogo de Opciones de Análisis.

