



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

Residuos de agrotóxicos en cera de abeja

Autor: Alberto Arribas García

Tutores: José Luis Bernal Yagüe

Silvia Valverde Bastardo

Julio 2016

La experimentación recogida en este trabajo ha sido llevada a cabo en los laboratorios del grupo TESEA en el Instituto CINQUIMA de la Universidad de Valladolid.

Para la realización de la investigación recogida se ha contado con la ayuda económica aportada por el Ministerio de Economía y Competitividad y el Instituto Nacional de Investigación Agraria y Alimentaria (INIA) a través del Proyecto RTA 2013-0042-C10-03.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento a mis tutores José Luis Bernal y Silvia Valverde, por todo el apoyo dado, por compartir conmigo sus conocimientos y por haberme formado un poco más como químico. Sin olvidar también al resto de integrantes del grupo de investigación por todos los consejos dados y la paciencia a la hora de manejar los equipos.

También me gustaría agradecer a todos mis amigos y compañeros de carrera por su cariño.

Por último a mi familia, en especial a mis padres y mi hermano por toda la paciencia y sobre todo por el apoyo prestado.

ÍNDICE

Abreviaturas	9
1.- Resumen/Abstract	11
2.- Introducción	13
3.- Antecedentes y situación actual	15
3.1.- Los neonicotinoides	15
3.1.1. Características y modo de acción de los neonicotinoides	17
3.2.- La cera de abeja	18
3.3.- Elección del método de análisis	18
4.-Objetivos	21
5.- Parte experimental	23
5.1.- Instrumentación y reactivos	23
5.1.1.- Equipos utilizados	23
5.1.2.- Equipo adicional y consumibles.....	23
5.1.3.- Reactivos	24
5.1.4.- Disoluciones.....	24
5.2.- Separación cromatográfica	24
5.2.1.- LC-DAD.....	25
Condiciones de detección.....	25
Composición de la fase móvil	26
Temperatura	28
Volumen de inyección.....	28
5.2.2.- LC-MS.....	28
Condiciones de detección.....	28
Composición de la fase móvil	30

Temperatura	32
Volumen de inyección.....	32
5.3.- Tratamiento de muestra.....	32
5.3.1.- Preparación de la cera	32
5.3.2.- Pruebas previas	33
5.3.3.- Extracción sólido-líquido.....	34
Selección de la naturaleza y composición del extractante	34
Selección del volumen de extractante.....	36
Optimización del tiempo de agitación.....	37
Segunda extracción	37
Concentración	38
Extracción en fase sólida (SPE).....	39
5.6.- Características del método desarrollado	42
5.6.1.- Selectividad.....	42
5.6.2.- Límite de detección y cuantificación	44
5.6.3.- Linealidad y efecto matriz.....	45
6.- Conclusiones.....	49
7.- Listado de tablas y figuras	51
7.1.- Tablas.....	51
7.2.- Figuras	51
8.- Bibliografía	53

ABREVIATURAS

ACET	Acetamiprida
ACN	Acetonitrilo
C₁₈	Octadecilsilano
CCD	Trastorno del colapso de las colmenas
CLO	Clotianidina
DAD	Detector de diodos en fila
DN	Dinotefuran
dSPE	Extracción en fase sólida dispersiva
EEUU	Estados Unidos
ESI	Ionización por electrospray
EtOH	Etanol
FIA	Análisis por inyección de flujo
GBC	Carbón negro grafitizado
GC	Cromatografía de gases
IMI	Imidacloprida
IPA	Isopropanol
LC	Cromatografía de líquidos
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
MeOH	Metanol
MS/MS	Espectrometría tándem masas-masas

MS	Detector de espectrometría de masas
m/z	Relación masa carga
NT	Nitempiran
ppb	Partes por billón ($\mu\text{g/L}$)
ppm	Partes por millón (mg/L)
PSA	Amina primaria y secundaria
q-TOF	Analizador híbrido cuadrúpolo-tiempo de vuelo
QuEChERS	Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe
RP	Reparto en fase inversa
SIM	Monitoreo de iones seleccionados
S/N	Relación señal/ruido
SPE	Extracción en fase sólida
TIA	Tiacloprida
TIC	Cromatograma total de iones
TMX	Tiametoxam
UE	Unión Europea
UHPLC	Cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia
UV-Vis	Ultravioleta-Visible

1.- RESUMEN

Actualmente, los plaguicidas sistémicos, en concreto aquellos pertenecientes a la familia de los neonicotinoides, han sido identificados por numerosos investigadores como uno de los factores potenciales relacionados con la muerte repentina y masiva de abejas, también conocido como síndrome del despoblamiento de las colmenas.

Para evaluar la incidencia de los neonicotinoides sobre las colmenas, se deben analizar todos los productos que se generan dentro de ella, miel, polen, jalea real, cera...; en particular, la cera de abeja tiene una gran importancia, ya que puede ser considerada como una reserva de contaminantes, y los plaguicidas presentes en ella pueden afectar directamente a las abejas o ser transmitidos desde la cera a otros productos de la colmena.

En este estudio, se va a investigar la posible presencia de siete neonicotinoides (acetamiprida, imidacloprida, tiametoxam, clotianidina, dinotefuran, nitempiran y tiacloprida) en cera de abeja. Para ello, ha sido necesario desarrollar un método de análisis que incluye la selección de las condiciones de separación, detección y de tratamiento de muestra. En primer lugar, se ha puesto a punto el tratamiento de muestra que consiste en una extracción sólido-líquido y posteriormente en una extracción en fase sólida con tierra de diatomeas, que permite obtener recuperaciones superiores al 80% en todos los casos. Debido al carácter polar de los analitos y a la sensibilidad y selectividad requeridas se ha empleado la cromatografía de líquidos en fase inversa acoplada a la espectrometría de masas. Se ha utilizado una columna C₁₈ y la fase móvil está formada por ácido fórmico al 0,1% (v/v) en agua y acetonitrilo, en régimen de gradiente. El método propuesto alcanza límites de detección comprendidos entre 0,8-6,0 µg/kg para todos los neonicotinoides estudiados.

ABSTRACT

Nowadays, systemic insecticides, specifically those belonging to the neonicotinoid family, have been identified by several researchers as one of the potential factors involved in the sudden and massive death of bees, commonly known as colony collapse disorder.

To evaluate the real incidence of neonicotinoids in the beehive, all bee products must be analyzed, such as honey, pollen, royal jelly, beeswax,...; in particular, beeswax possesses a great relevance in this issue, as it could be considered as a contaminant reservoir, and the pesticides present in wax could directly affect the bee colony or be transmitted to other bee products.

In the present study, it would be investigated the possible presence of seven neonicotinoids (acetamiprid, clothianidin, dinotefuran, imidacloprid, nitenpyram, thiacloprid and thiamethoxam) in beeswax. It has therefore been necessary to develop a completely new method of analysis that included the selection of separation, detection and sample treatment conditions. Firstly, it has been optimized a sample treatment that consisted of a solid-liquid extraction followed by a solid-phase extraction with diatomaceous material based cartridges, which allowed the obtention of recovery percentages higher than 80% in all cases. Due to the polar nature of the analytes and the required selectivity and sensibility, it has been employed the reverse phase liquid chromatography coupled to mass spectrometry. A C₁₈ based analytical column was used, and the mobile phase consisted of 0.1% (v/v) formic acid in water and acetonitrile applied in gradient elution mode. The proposed method achieves detection limits comprised between 0.8 and 6.0 µg/kg for all the studied neonicotinoids.

2.- INTRODUCCIÓN

Desde comienzos de siglo se ha percibido a nivel mundial una notable y creciente disminución del número de abejas y colmenas. Este fenómeno, se conoció inicialmente como “Trastorno del Colapso de las Colmenas”, (CCD por sus siglas en inglés), conlleva una gran preocupación socioeconómica y medioambiental. Se han propuesto numerosos estudios y diversas opiniones para explicarlo y tratar de revertir la situación.

Estas situaciones generan diferentes teorías con bandos muy enfrentados que no siempre se fundamentan científicamente. Actualmente se admite que es un fenómeno multifactorial entre los que cabe destacar la exposición de las abejas a plaguicidas, así como a las distintas infecciones que les afectan, siendo el más importante el microsporidio *Nosema ceranae*. En este caso, la suma de ambos factores conduce a la muerte masiva de abejas.

Evidentemente existen otros factores como el tratamiento y manipulación inadecuada de las colmenas. También se generalizan datos obtenidos en lugares donde se realiza agricultura extensiva, donde se emplea la fumigación aérea, con más riesgos para el resto de especies vegetales y animales; esto no es habitual en España, donde tampoco se cultivan transgénicos de forma extensiva, lo que podría alterar el comportamiento de las abejas.

Como todo tema polémico tiene muchas causas probables, muchas explicaciones subjetivas, pero el hecho objetivo es que en España, en los últimos años, se han perdido más del 50% de las colmenas y las que sobreviven tienen una producción muy reducida.

Ante esta alarmante situación hay una explicación controvertida que cuenta con numerosos seguidores. Ésta achaca el efecto a los plaguicidas, en especial, a los insecticidas derivados de la nicotina, los neonicotinoides. El movimiento ha provocado que la Unión Europea, en julio de 2013, suspendiera durante dos años el uso de semillas tratadas con imidacloprida, tiametoxam y clotianidina, regulación que entró en vigor a finales de 2013. Una vez finalizada no se conocen, por el momento, las actuaciones posteriores.

Por otra parte cabe señalar que estos compuestos siguen empleándose en otros cultivos, en gran proporción en frutales donde lógicamente su aplicación debe respetar el período de floración.

Para comprobar la incidencia de este factor antes y después de la prohibición debe disponerse de metodología analítica que permita el conocimiento de la cantidad de estos residuos en los

productos apícolas. Este trabajo se centra en la cera que podría liberar gradualmente cantidades almacenadas de los neonicotinoides después de su aporte por diferentes vías.

Dadas las características físico-químicas de los compuestos involucrados y las cantidades mínimas a evaluar se ha pensado que la cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas podría ser una alternativa viable para su análisis.

3.- ANTECEDENTES Y SITUACIÓN ACTUAL

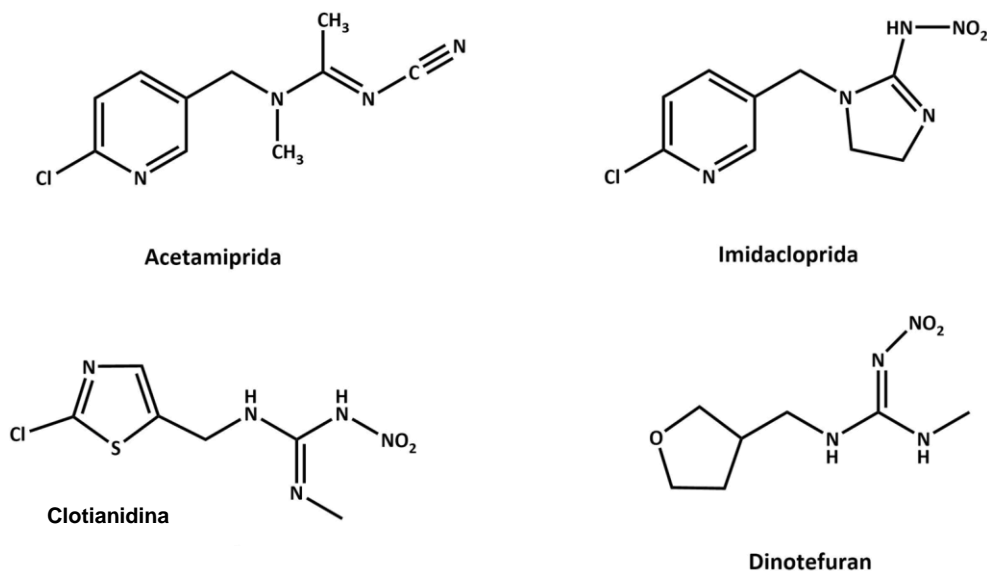
Las abejas (*Apis mellifera*) son consideradas uno de los insectos más importantes del mundo debido a su importante papel en la polinización de cultivos y plantas silvestres [1]. Además de mejorar la calidad de los cultivos, también genera actividad económica debido a que los productos apícolas cada vez son más demandados [2].

A partir de los años 2000 se ha detectado la disminución en la población de las abejas, así como de colmenas. La voz de alarma se dió en Estados Unidos, en 2006, donde se perdieron más de un tercio de las colonias [3], Europa registró pérdidas similares. Este fenómeno se caracteriza porque las abejas obreras salen a recolectar polen, para alimentar a la colmena, pero no vuelven a la misma, con lo que la colonia se vuelve débil. Además de que las obreras no retornan, las pérdidas mayores se producen por invasión de otros insectos como el ácaro *Varroa sp.* o microsporidios como *Nosema ceranae* que son letales al estar debilitada la colmena [4].

Se admite que el CCD es un fenómeno multifactorial, puede ser debido a las plagas que afecten a la colmena como las citadas con anterioridad, a la mala manipulación de las colmenas por parte de los apicultores, o la explicación más controvertida y con más seguidores que culpa al uso de plaguicidas, en este caso, los neonicotinoides [5].

3.1.- LOS NEONICOTINOIDES

Este tipo de plaguicidas son relativamente nuevos, sus estructuras pueden verse en la Figura 1.



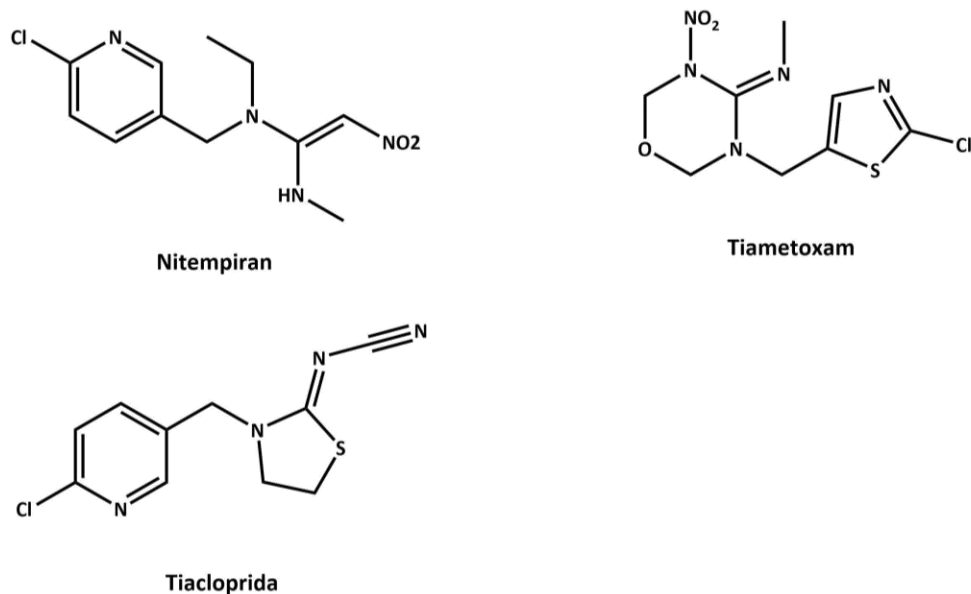


Figura 1.- Estructuras de los siete neonicotinoides estudiados

El primero de ellos en utilizarse fue la imidacloprida en 1991, también es el más empleado. Se adjuntan en la Figura 1 y 2 como ejemplo datos de su uso hasta 2013 en EEUU [6], año en el que se prohibió su uso en la UE para el tratamiento de semillas. Cabe mencionar que allí su uso es más pronunciado que en Europa debido al modelo de agricultura extensiva allí vigente.

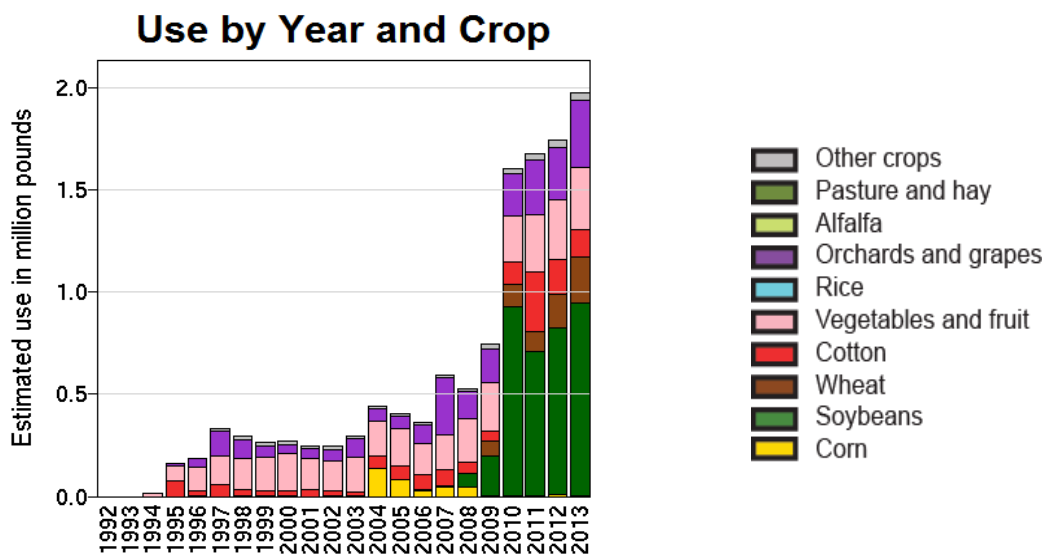


Figura 2.- Uso estimado de imidacloprida en diversos cultivos hasta el año 2013 en EEUU

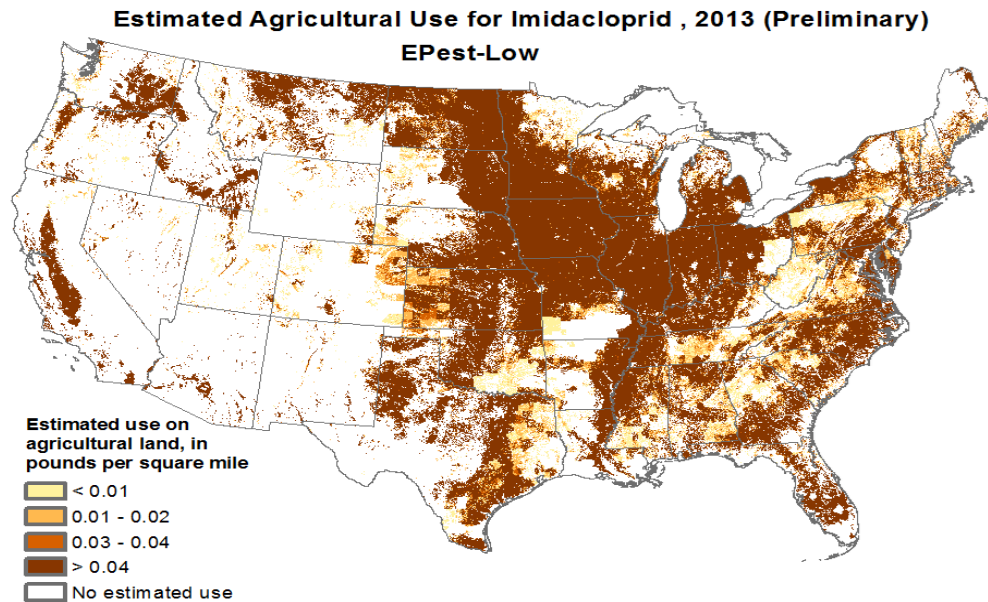


Figura 3.- Uso estimado de imidacloprida en EEUU durante 2013

Tras la imidacloprida se empezaron a utilizar otros insecticidas neonicotinoides como acetamiprida y nitempiran en 1995, tiametoxam y tiacloprida en 2000, clotianidina en 2001 y por último dinotefuran en el 2002 [7].

3.1.1. Características y modo de acción de los neonicotinoides

Los neonicotinoides se clasifican como insecticidas sistémicos cuyo modo de acción se basa en inhibir la transmisión nerviosa, mediante la interacción con los receptores nicotínicos de la acetilcolina. Aunque se indica que este tipo de compuestos son inocuos para los mamíferos, recientemente se han presentado estudios donde se vincula el uso de los mismos con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson [8].

Una de sus ventajas es la eficacia contra muchas familias de insectos. Además son versátiles en cuanto al modo de aplicación: pueden inyectarse en el tronco, con el agua de riego, por spray o lo más novedoso, por aplicación directa a la semilla, eficaz debido a que el plaguicida se trasloca hacia toda la planta [9]. Este modo fue prohibido por la UE durante dos años a partir de 2013 por considerarse el más perjudicial [10].

Una vez sembradas las semillas los compuestos se traslocan hasta el polen de las flores que sirve de alimento para las abejas. Este hecho hace que sean señalados como los principales culpables del CCD [5].

Todos ellos son compuestos polares, muy solubles en agua y no volátiles.

3.2.- LA CERA DE ABEJA

La cera de abeja es una matriz extremadamente compleja compuesta por mezcla de muchos compuestos lipofílicos, entre los que cabe destacar los ésteres de ácidos grasos de cadena larga con alcoholes alifáticos, también de cadena larga. Igualmente tiene ácidos grasos libres, alcoholes, diésteres...

Los plaguicidas pueden llegar a ella de manera directa si se añaden a la colmena para exterminar una plaga que afecte a la misma; o de manera indirecta, es decir, este caso, en el cual los compuestos se encuentran en las plantas para controlar otras plagas que les afecten.

El interés que presenta la cera es que está en permanente contacto con las abejas y puede actuar como reservorio de neonicotinoides liberándolos gradualmente.

3.3.- ELECCIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS

Cada vez se investiga más entorno a los neonicotinoides debido a la preocupación por establecer las causas del CCD, pero también porque son los más empleados entre los agricultores actualmente. Estos compuestos se analizan en infinidad de matrices, principalmente en verduras y frutas [11][12]. El más estudiado de todos es la imidacloprida, para el que incluso se ha desarrollado un biochip capaz de realizar análisis semicuantitativo ayudado de un Smartphone [13].

Los neonicotinoides presentan una elevada solubilidad en agua con lo que se plantea un problema a la hora de extraerlos de la cera, pues es una matriz lipofílica.

Atendiendo a la determinación de estos plaguicidas se observa que lo más empleado actualmente es el método QuEChERS, suele emplearse en matrices con mucho agua y poca grasa, típicamente vegetales, frutas...[14], aunque se ha probado su eficacia en matrices grasas y sin agua como el cacao [15], similar a la cera en cuanto a esas características.

El método consiste en una extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) en dos etapas. La primera, de extracción; en la que se añade a la muestra el extractante orgánico que debe contener un porcentaje de agua y las sales, MgSO₄ anhidro y NaCl para ayudar a extraer los plaguicidas de la matriz. La segunda, de limpieza; a los extractos anteriores se les añade PSA para eliminar ácidos grasos, C₁₈ para eliminar compuestos no polares y GBC para eliminar compuestos coloreados [16]. Esta metodología se usa mucho por su facilidad y buenos

resultados en la determinación de plaguicidas, incluso las casas comerciales venden kits “QuEChERS” con todas las sales previamente pesadas.

No se ha probado la metodología QuEChERS para neonicotinoides en cera pero si en otros productos apícolas como el polen obteniéndose resultados muy buenos en cuanto a recuperación y limpieza [17].

En cuanto a referencias que analicen residuos de estos neonicotinoides en cera o en otros productos apícolas se extrae la siguiente información en cuanto a tratamientos de muestra y determinaciones posteriores, los trabajos más significativos son:

- En trabajos previos del grupo de investigación, se determinaron estos mismos compuestos en cera, mediante extracción líquido-líquido en caliente. Para ello se disolvía 1 g de cera en 15 mL de Hexano:IPA (80:20, v/v), los neonicotinoides son polares con lo que una vez disuelta la cera se extraían del disolvente orgánico con 10 mL de agua. Posteriormente se decantaban las fases en un embudo de decantación previamente calentado a 70°C para que la cera no solidificara de nuevo. Algunos de los compuestos de la matriz pasaban al agua con lo que se producían interferencias, para eliminarlas se procedía a limpiar la fase acuosa usando cartuchos de tierra de diatomeas, que se eluían con acetona. Se evaporaban a sequedad y se reconstituían para posteriormente analizarse por LC-MS, se obtienen porcentajes de recuperación del 85-105% y LOD inferiores a 2,3 µg/kg para todos los analitos [18].
- En otro trabajo reciente del grupo, se han determinado los mismos siete analitos en polen de colmena usando metodología QuEChERS. En la etapa de extracción se emplean 2 mL de agua y 6 mL de ACN como extractante, en cuanto a las sales se añaden 1,0 g de MgSO₄ anhidro, 0,5 g NaCl y 0,8 g de citrato trisódico, para mantener el pH entre 5,5 y 6,5. En la etapa de limpieza se añade 150 mg de MgSO₄ anhidro, 25 mg de PSA y 25 mg de C₁₈. Se evapora a sequedad 1 mL de los extractos, se reconstituye y se pasa a través de un filtro de nylon (0,45 µm). Se inyectan 10 µL en UHPLC-qTOF. Se obtienen porcentajes de recuperación de 90-104 % y LODs de 0,6 – 1,3 µg/kg para todos los analitos [17].
- Otro trabajo que los analiza pero en miel usa como tratamiento de muestra microextracción líquido-líquido dispersiva extrayendo 5 mL de miel con 2 mL de

diclorometano y 0,5 mL de ACN. Se agita y se coloca 10 minutos en un baño de ultrasonidos. Después se centrifuga y el líquido se evapora a sequedad por flujo de N₂. Se reconstituye para su análisis por LC-MS/MS. Las recuperaciones obtenidas oscilaban entre 74-113% y los LODs entre 0,5 - 1 µg/ kg para los siete analitos [19].

En cuanto a la separación-cuantificación de estos compuestos lo más común es la cromatografía líquida, bien detectando por absorción UV-Vis [12] o con espectrómetro de masas [18][20][21]. Aunque se emplea en menor medida también puede hacerse mediante GC-MS derivatizando los compuestos previamente.

En cuanto a las columnas cromatográficas que se emplean en LC suele emplearse mayoritariamente C₁₈ como fase estacionaria, es decir, trabajando en fase inversa [19][22][23]. Destaca también el uso de UHPLC [14][17] con las ventajas que presenta puesto que las columnas son más cortas y con tamaño de partícula mucho más pequeño, traducido en un menor tiempo de análisis.

Las conclusiones obtenidas de esta revisión bibliográfica son:

- Los analitos son muy solubles en agua, pero también muchos compuestos de la matriz con lo que debe añadirse una etapa de limpieza para que estos no interfieran.
- Se debería probar la metodología QuEChERS para los neonicotinoides en cera de abeja, puesto que se ha empleado con éxito en polen.
- La mejor técnica de análisis es LC en fase inversa empleando columna C₁₈ acoplado al detector de espectrometría de masas.
- Un trabajo previo que analiza los mismos neonicotinoides en cera de abeja consta de una extracción líquido-líquido en caliente, debe buscarse algo más simple y rápido.

4.-OBJETIVOS

- Desarrollar y optimizar una metodología analítica rápida y sencilla que permita determinar residuos de siete neonicotinoides en cera de abeja. Para ello se empleará RP-LC con detección por DAD y posteriormente espectrómetro de masas, MS, con el fin de llegar a analizar los compuestos a nivel de trazas.
 - Optimizar la separación cromatográfica.
 - Seleccionar un procedimiento eficaz para la extracción de los analitos de la cera.
 - Seleccionar un método de limpieza para eliminar las interferencias de la matriz.

5.- PARTE EXPERIMENTAL

5.1.- INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS

5.1.1.- Equipos utilizados

- Cromatógrafo de líquidos Agilent Technologies (Palo Alto, California, USA) serie 1200; equipado con: depósito de disolventes, desgasificador, bomba cuaternaria, inyector de muestra automático con bandeja muestreadora de 100 viales, compartimento de columna termostatado, detector de diodos en fila (DAD). Todo ello controlado por el software 3D Systems ChemStation Rev. B.03.02.
- Cromatógrafo de líquidos Agilent Technologies (Palo Alto, California, USA) serie 1100; equipado con: depósito de disolventes, desgasificador, bomba cuaternaria, inyector de muestra automático con bandeja muestreadora de 100 viales, compartimento de columna termostatado, detector de diodos en fila (DAD) y detector de espectrometría de masas cuadrupolar (MS). Todo ello controlado por el software HPLC/MSD ChemStation Rev. A.10.02.

5.1.2.- Equipo adicional y consumibles

- Agitador oscilante Vibromatic de Selecta (Barcelona, España).
- Balanza analítica de precisión EA-240 de Mettler Toledo (Darmstadt, Alemania).
- Baño de ultrasonidos de Selecta (Barcelona, España).
- Cartuchos Isolute (Tierra de diatomeas) de Biotage (California, USA).
- Cartuchos StrataX de Phenomenex (Torrance, USA).
- Columna Kinetex C₁₈ (150 x 4,6 mm, 2,6 µm) de Phenomenex (Torrance, USA).
- Equipo de extracción en fase sólida con sistema de vacío Visiprep™ de Supelco (Sant Luis, USA).
- Equipo de microfiltración de Millipore (Bedford, USA).
- Filtros de nylon (0,45 µm) de Nalgene (Rochester, USA).
- Material de vidrio de laboratorio de uso general
- Molino de análisis Ika ® Werke M20 (Staufen, Alemania).
- Pipetas y micropipetas de Eppendorf AG (Hamburg, Alemania).
- Precolumna Security Guard C₁₈ de Phenomenex (Torrance, USA).
- Ultracentrífuga 5810 de Eppendorf AG (Hamburg, Alemania).

5.1.3.- Reactivos

- Acetonitrilo (ACN), metanol (MeOH) y etanol (EtOH) de grado HPLC de Panreac Química SAU (Barcelona, España).
- Ácido fórmico (98%) de Sigma-Aldrich (Madrid, España).
- Agua ultrapura obtenida por un equipo compacto que consta de dos unidades de purificación (Milli-RO y Milli-Q) de Millipore (Beldford, USA).
- Cloruro sódico certificado patrón primario de E.Merck (Darmstad, Alemania).
- MgSO₄ anhidro (99,5%) de Sigma-Aldrich (Madrid, España).
- Patrón de: dinotefuran (98,8%), nitempiran (99,8%), tiametoxam (99,6%), clotianidina (99,9%), imidacloprida (99,9%), acetamiprida (99,9%) y tiacloprida (99,9%) de Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Alemania).

5.1.4.- Disoluciones

Las disoluciones iniciales de 100 mg/L de los siete neonicotinoides se prepararon por separado, por pesada de una cantidad exacta de 1 mg de cada compuesto enrasando a 10 mL con MeOH. Las disoluciones de trabajo se prepararon por diluciones sucesivas utilizando como disolvente la mezcla MeOH:H₂O (40:60, v/v), estas disoluciones son mezcla de los siete analitos.

5.2.- SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

En la mayoría de las referencias bibliográficas consultadas se proponen métodos para el análisis de neonicotinoides que emplean el mecanismo de reparto en fase inversa con un régimen de elución de gradiente, utilizando como fase móvil disoluciones de ácidos, fundamentalmente ácido acético o fórmico, y como modificador orgánico metanol o acetonitrilo.

Dada la experiencia previa del grupo y las referencias bibliográficas consultadas, la separación se llevó a cabo empleando una columna Kinetex C₁₈ de (150 x 4,6 mm, 2,6 μm) y equipada con una precolumna C₁₈ de Phenomenex.

Como detectores se emplean absorción molecular y posteriormente MS con el fin de alcanzar límites de detección y cuantificación que permitan la determinación de trazas.

Se estudió la influencia de las distintas variables cromatográficas en la separación con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas que permitan realizar una correcta determinación

de los analitos en cera. Para ello, se procedió a modificar una variable manteniendo las demás fijas y así comprobar el efecto que produce cada una de ellas en la separación cromatográfica. Se ha preferido examinar el comportamiento individual de cada compuesto y variable dadas las diferencias entre sus propiedades físico-químicas.

A continuación se recogen los parámetros establecidos para cada una de las variables estudiadas, en ambos equipos empleados.

5.2.1.- LC-DAD

Condiciones de detección

Puesto que los compuestos, debido a sus estructuras aromáticas, presentan fuerte absorción molecular a varias longitudes de onda, se decidió emplear el DAD como detector. Se trata de un detector asequible económicamente y que se encuentra prácticamente en todos los laboratorios de análisis.

Se realiza un barrido en el intervalo de 200-400 nm con el fin de establecer la longitud máxima de absorción de cada compuesto, éstas se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1.- Longitudes de onda máximas de absorción de los neonicotinoides estudiados

Compuesto	λ máxima (nm)
Dinotefuran	236
Nitempiran	270
Tiametoxam	252
Clotianidina	268
Imidacloprida	270
Acetamiprida	246
Tiacloprida	242

En la Figura 4 se muestra a modo de ejemplo el espectro de absorción del tiametoxam, cuya longitud de onda máxima de absorción es de 252 nm.

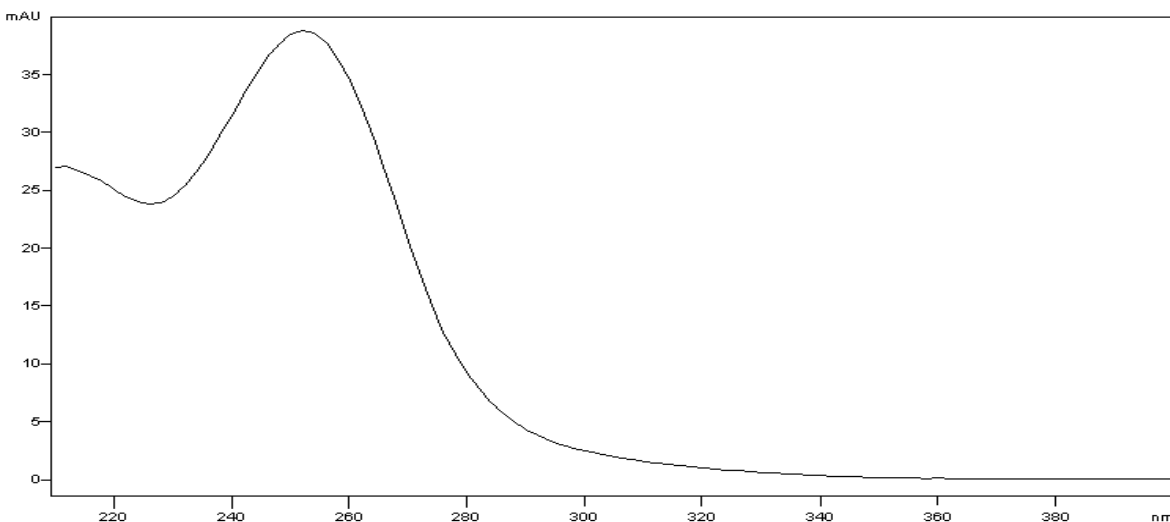


Figura 4.- Espectro de absorción del TMX, concentración de 5 mg/L

Composición de la fase móvil

Considerando las características de la columna, se estableció el flujo de la fase móvil en 0,5 mL/min, la fase móvil seleccionada fue ACN:Ácido fórmico (0,1% v/v en agua) en régimen isocrático al (25:75, v/v).

Cuando se adicionó a un extracto de cera una cantidad conocida de los analitos, se pudo observar que había componentes de la matriz que presentaban retenciones muy elevadas, por lo que fue necesario realizar la separación en régimen de gradiente de elución. Tras realizar varias pruebas con distintos gradientes, se seleccionó el que mostraba mejores resultados en cuanto a resolución y tiempo de análisis, recogido en la Tabla 2.

Tabla 2.- Gradiente de elución empleado en LC-DAD

Tiempo (min)	% Ácido fórmico 0,1 (%)	ACN (%)
0	90	10
8	65	35
10	50	50
14	30	70
15	10	90
22	10	90
24	50	50
28	90	10

Se estableció un post-time de 5 minutos para recuperar la línea base y obtener reproducibilidad en los tiempos de retención.

Con este gradiente se consiguen eluir todos los compuestos de interés en 13,9 minutos, cuyos tiempos de retención se recogen en la Tabla 3. El resto del tiempo del gradiente se emplea en eluir compuestos extraídos de la matriz que quedan más retenidos.

Tabla 3.- Tiempos de retención de los analitos en LC-DAD

Compuesto	t _R (min)
Dinotefuran	6,4
Nitempiran	7,0
Tiametoxam	9,7
Clotianidina	10,9
Imidacloprida	11,5
Acetamiprida	12,3
Tiacloprida	13,9

En la figura 5 se muestra un cromatograma de una disolución patrón de 5 mg/L de cada uno de los siete neonicotinoides a 270 nm.

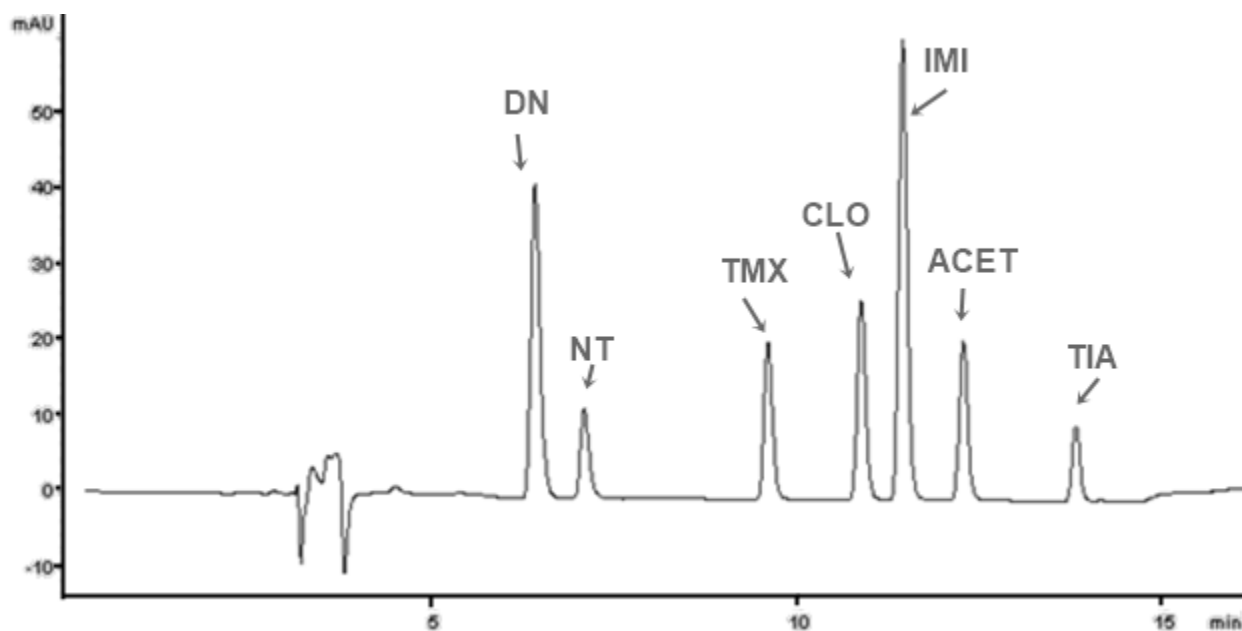


Figura 5.- Cromatograma de una disolución patrón de 5 mg/L de los siete analitos a 270 nm

Temperatura

Se estudió la influencia que la temperatura podría ejercer sobre la separación, para ello se realizaron una serie de ensayos variándola entre 25 y 45 °C, en intervalos de 5°C. A la vista de los resultados se seleccionó una temperatura de separación de 30°C ya que proporcionaba una mejor simetría de los picos.

Volumen de inyección

Con el objetivo de aumentar la relación señal/ruido y obtener límites de detección menores se probaron distintos volúmenes de inyección comprendidos entre 5 y 30 µL de una disolución patrón de los siete analitos. Se estableció el volumen de inyección en 10 µL puesto que proporcionaba la mejor relación señal/ruido.

5.2.2.- LC-MS

Condiciones de detección

En este caso se emplea un espectrómetro de masas cuadrupolar equipado con fuente de ionización por electrospray (ESI) para llegar a determinar los compuestos a nivel de trazas.

Para establecer las condiciones óptimas de detección se realizaron pruebas por análisis por inyección de flujo (FIA). Se siguieron tanto iones negativos como positivos, se obtuvieron señales más intensas en modo positivo con lo que se selecciona ESI (+) como modo de ionización.

El análisis FIA se ha llevado a cabo con un flujo de 0,3 mL/min y volumen de inyección de 5 µL, se realizó con patrones de cada analito por separado en concentración de 50 µg/L. Se estudió cada parámetro de manera individual en un intervalo seleccionado. El intervalo de estudio y el valor óptimo de cada parámetro se recogen en la Tabla 4.

Tabla 4.- Parámetros MS-ESI modo positivo

Parámetro	Valor óptimo	Intervalo estudiado
Voltaje del fragmentador (V)	100	20 – 380
Voltaje del capilar (V)	3000	2000 – 5500
Flujo de gas secante N ₂ (L/min)	10	6 – 12
Temperatura de gas secante (°C)	350	100 – 350
Presión del gas nebulizador (psig)	40	10 – 60

Con las condiciones de detección seleccionadas se realizó un barrido (modo SCAN), entre 50-350 unidades de m/z, para encontrar los iones más abundantes de cada compuesto. De esta manera se seleccionaron los iones de cuantificación y de confirmación de cada analito. La relación masa/carga de los iones seleccionados para cada neonicotinoide se recoge en la Tabla 5. Como ion de cuantificación se selecciona el pico base y como iones de confirmación los dos iones con mayor abundancia, a excepción del pico base, y que ésta sea superior al 20%.

Tabla 5.- Relaciones masa/carga de los neonicotinoides

Compuesto	Ion cuantificación	Iones confirmación
Dinotefuran	203	113
		129
Nitempiran	271	99
		225
Tiametoxam	292	132
		211
Clotianidina	250	132
		169
Imidacloprida	256	175
		209
Acetamiprida	223	56
		126
Tiacloprida	253	126
		186

A modo de ejemplo en la Figura 6 se muestra el espectro de masas del tiametoxam en disolución de concentración 50 µg/L, en él se puede observar el ion de cuantificación (pico base) y los dos iones de confirmación.

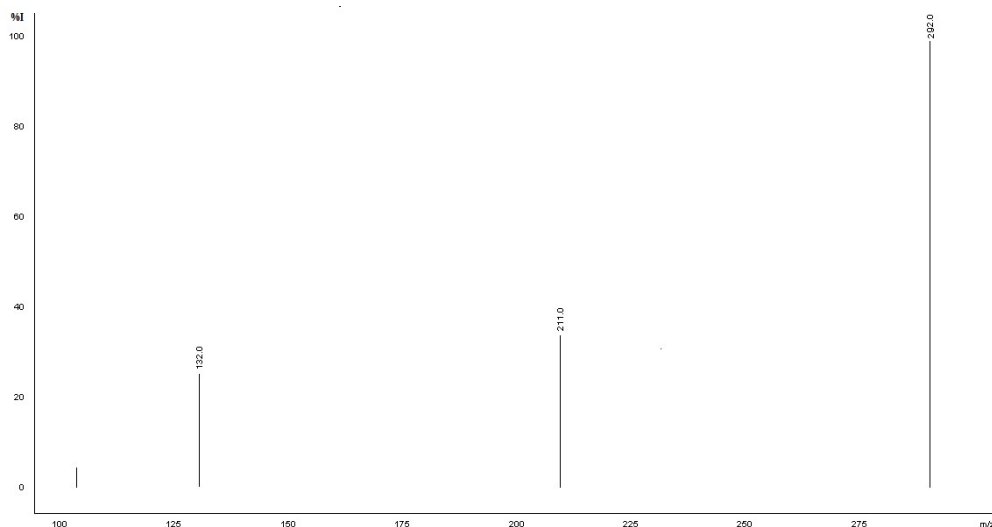


Figura 6.- Espectro de masas del tiametoxam

Una vez seleccionados los iones de confirmación y cuantificación se ha trabajado en modo SIM, registrando cada ion por separado, con el fin de incrementar la sensibilidad.

Composición de la fase móvil

Partiendo del gradiente usado en LC-DAD, manteniendo el flujo de fase móvil a 0,5 mL/min (ver Tabla 2) se estudió la posibilidad de acortar el tiempo de análisis.

Se probaron diferentes gradientes y se seleccionó el que proporcionó mejores resultados en cuanto a resolución y reproducibilidad en los tiempos de retención. En la Tabla 6 se muestra el gradiente utilizado.

Tabla 6.- Gradiente de elución empleado en LC-MS

Tiempo (min)	Ácido fórmico 0,1% (%)	ACN (%)
0	75	25
4	75	25
6	20	80
9,5	5	95
15	5	95
17	30	70
19	50	50
22	75	25

Se estableció un post-time de 5 minutos con lo que el tiempo de análisis se redujo a 27 min.

Con estas condiciones los tiempos de retención de los analitos son los que se muestran en la Tabla 7. En 10 minutos se consiguen eluir todos los analitos, como antes, el resto del tiempo se emplea en eluir compuestos extraídos de la matriz.

Tabla 7.- Tiempos de retención de los analitos en LC-MS

Compuesto	t _R (min)
Dinotefuran	3,5
Nitempiran	3,5
Tiametoxam	5,5
Clotianidina	7,0
Imidacloprida	7,8
Acetamiprida	9,3
Tiacloprida	10,0

En la Figura 7 se muestra un cromatograma total de iones (TIC) correspondiente a la inyección, en las condiciones cromatográficas establecidas, de 15 µL de una disolución patrón de concentración 50 µg/L.

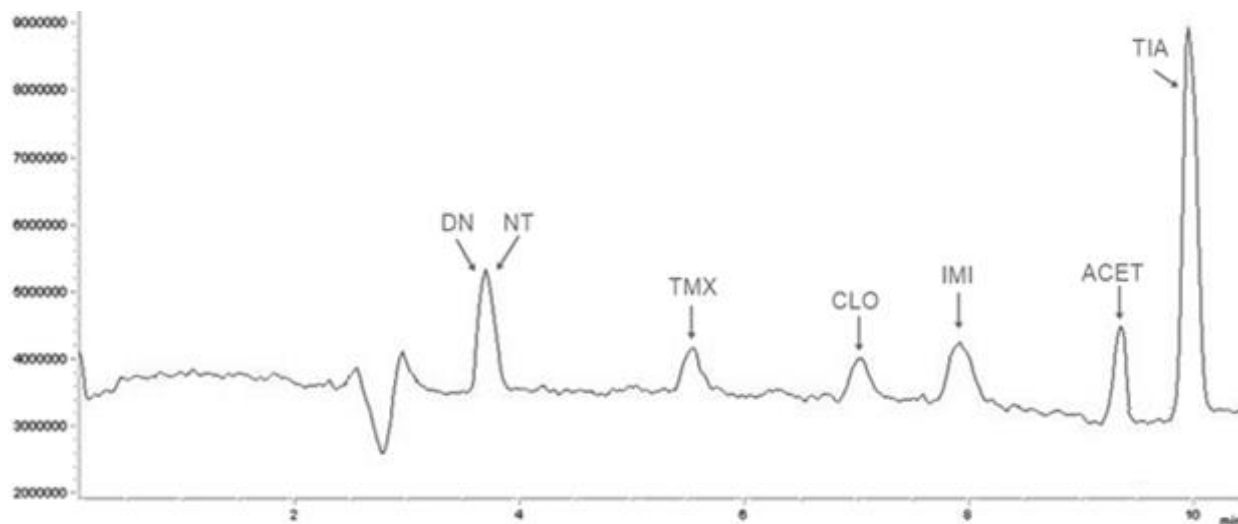


Figura 7.- Cromatograma total de iones (TIC) de una disolución patrón de 50 ppb

Como se observa los dos primeros compuestos coeluyen, sin embargo, esto no es problema debido a que cada uno se evalúa en el cromatograma de iones extraídos, con lo que no interfiere el uno en la determinación del otro.

Temperatura

Al igual que antes se fijó en 30°C por obtenerse la mejor simetría en los picos. Se evaluó en el intervalo 25 – 40 °C en intervalos de 5°C.

Volumen de inyección

Al igual que en el DAD con el objetivo de aumentar la señal/ruido y obtener límites de detección menores se probaron diferentes volúmenes de inyección, comprendidos entre 1 y 20 µL, de una disolución patrón de los siete analitos. Se seleccionó un volumen de inyección de 15 µL puesto que proporcionaba la mejor relación señal/ruido.

5.3.- TRATAMIENTO DE MUESTRA

5.3.1.- Preparación de la cera

Para poder desarrollar un método analítico se necesita fortificar muestras de cera que no contienen los analitos (blancos) con una cantidad conocida de los mismos. Para ello, basándose en experiencias previas del grupo, se fundían porciones de cera en un baño termostataado a 65°C. Una vez líquida, se añadía sobre ella y con agitación constante la cantidad de patrón deseada. Después se deja enfriar en el congelador, se parte y se muele. Este procedimiento es laborioso.

A la hora de moler se planteó un problema porque a partir de 30°C la cera se vuelve blanda, se soluciona añadiendo hielo seco para que no se eleve la temperatura en el molino, debido a la fricción de las cuchillas. Se consigue un fino polvo.

Se pensó en mejorar el procedimiento de fortificación, añadiendo a la cera blanco molida directamente la cantidad de patrón deseada, sin necesidad de fundir. Para ello se coloca en un vidrio de reloj y se añade directamente la disolución de patrón. Se homogeneiza y se deja secar al aire, después se coloca en un desecador para eliminar posibles restos de humedad. Este procedimiento es mucho más rápido, y por ello se ha empleado a lo largo de todo el desarrollo del método analítico. Este método se comprobó frente al anterior para ver si era igualmente válido.

5.3.2.- Pruebas previas

El método propuesto previamente por el grupo de investigación para el análisis de neonicotinoides en cera de abeja implicaba disolver la cera en hexano:IPA y realizar una extracción líquido-líquido con agua; con un émbudo de decantación en caliente, para que la cera no solidifique en el proceso. Debido a su complejidad se ha buscado un procedimiento más simple y rápido.

Se ha pensado usar el método QuEChERS, el inconveniente de este método es que requiere que la matriz contenga un alto contenido en agua y poca grasa.

El procedimiento QuEChERS consiste en añadir a la muestra un volumen de extractante que debe determinarse, y que debe contener un porcentaje de agua. Se añaden $MgSO_4$ y $NaCl$, la cantidad debe optimizarse, para favorecer la extracción. Tiene una segunda etapa, de limpieza, para la que se emplea $MgSO_4$ para eliminar agua y adsorber compuestos no deseados, PSA para eliminar ácidos grasos, C_{18} para eliminar los compuestos no polares y opcionalmente se puede añadir GBC para eliminar compuestos coloreados.

Se probó si este método podía emplearse en la determinación de los neonicotinoides en cera de abeja. La cantidad de muestra se fijó en 1,00 g de cera, previamente dopada con una cantidad conocida. Como volumen de extractante se fijaron 15 mL de una mezcla de diferentes disolventes en agua. La cantidad de sales de extracción se estableció en 1,5 g de $MgSO_4$ y 0,5 g de $NaCl$, debido a trabajos previos del grupo.

Inicialmente sólo se estudió el proceso de extracción, no la limpieza. Una vez fijado el volumen de extracción y la cantidad de sal, se variaba la composición y naturaleza del extractante, para ver su influencia en la recuperación de los analitos.

Los disolventes empleados fueron mezclas $MeOH/H_2O$ entre 40-80% v/v y ACN/H_2O entre 10-60% v/v. Las pruebas se realizaron tanto a temperatura ambiente como en un baño termostático a $70^\circ C$, es decir, con la cera fundida. Todas se realizaron simultáneamente frente a un blanco de cera tratado de la misma manera.

Todas las pruebas proporcionaron recuperaciones menores al 20% para cada analito, con lo que los resultados no fueron aceptables. Éstas fueron calculadas como relación de áreas de la señal obtenida tras someter a una muestra dopada a todo el tratamiento y la señal al añadir a un blanco tratado con el mismo procedimiento una concentración conocida de cada uno de los

analitos. Se puede calcular también frente al área de una disolución patrón pero se cometería error si hubiera efecto matriz.

Se comprobó que el hecho de fundir la cera no mejoraba los resultados de la extracción, además de dificultar el proceso de limpieza del material con lo que no se vuelve a trabajar en caliente.

5.3.3.- Extracción sólido-líquido

Como el hecho de emplear sales no supuso una mejora en la recuperación de los analitos se probó a realizar una extracción sólido-líquido a temperatura ambiente. Para ello se deben de optimizar los siguientes parámetros:

- Naturaleza y composición del extractante
- Volumen de extractante
- Tiempo de agitación

Una vez realizada la extracción se separan las fases mediante filtración, se elimina el extractante a sequedad en rotavapor (60°C, a vacío) y se reconstituye en 1 mL de MeOH:H₂O (40:60, v/v). Previo a la inyección en el sistema cromatográfico se pasa por un filtro de nylon de 0,45 µm.

Para evaluar la influencia de cada uno en la extracción se han fijado todos salvo el que se estudia que se variaba.

Selección de la naturaleza y composición del extractante

Inicialmente se fijaron las siguientes condiciones: cantidad de muestra en 1,00 g, volumen de extractante en 10 mL y tiempo de agitación en 1 min de vórtex (2500 rpm), 15 min de vibromatic (900 U/min) y 1 min de vórtex (2500 rpm).

Lo primero que se probó como extractante fue sólo agua, debido al carácter polar de los analitos y su alta solubilidad en él. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 8.

Tabla 8.- Recuperaciones obtenidas empleando 10 mL de agua

H ₂ O	
Compuesto	%Recuperación
Dinotefuran	24
Nitempiran	26
Tiametoxam	47
Clotianidina	28
Imidacloprida	44
Acetamiprida	20
Tiacloprida	28

La recuperación no supera el 50% para ninguno de los analitos, por ello se probaron mezclas acuosas con EtOH, MeOH y ACN en distintas proporciones.

Tabla 9.-Recuperaciones obtenidas empleando 10 mL de diferentes mezclas EtOH/H₂O

% EtOH:H ₂ O (v/v)	5%	10%	15%	20%	25%
Compuesto	% Recuperación				
Dinotefuran	71	53	21	64	40
Nitempiran	52	42	30	37	36
Tiametoxam	91	34	40	60	51
Clotianidina	51	34	14	52	49
Imidacloprida	60	49	19	59	42
Acetamiprida	43	35	12	42	31
Tiacloprida	59	36	16	36	26

Tabla 10.-Recuperaciones obtenidas empleando 10 mL de diferentes mezclas MeOH/H₂O

% MeOH:H ₂ O (v/v)	5%	10%	15%	20%
Compuesto	% Recuperación			
Dinotefuran	52	58	63	55
Nitempiran	35	42	43	31
Tiametoxam	33	33	86	36
Clotianidina	40	47	45	45
Imidacloprida	27	25	52	55
Acetamiprida	18	33	49	32
Tiacloprida	15	28	54	34

Tabla 11.- Recuperaciones obtenidas empleando 10 mL de diferentes mezclas ACN/H₂O

% ACN:H ₂ O (v/v)	10%	15%	20%	30%	40%	50%	80%
Compuesto	% Recuperación						
Dinotefuran	76	74	75	58	60	58	42
Nitempiran	69	65	60	53	50	45	32
Tiametoxam	85	92	78	51	58	49	29
Clotianidina	60	65	62	70	72	67	32
Imidacloprida	55	68	72	55	54	50	21
Acetamiprida	65	91	94	60	61	53	21
Tiacloprida	56	78	80	58	56	40	17

A la vista de los resultados se seleccionó como extractante ACN:H₂O 15% v/v, el porcentaje de recuperación de todos los analitos es superior al 60%. Cabe mencionar que todas las pruebas se han realizado por duplicado y la recuperación presente en la tabla es la media.

Se observó que hasta un determinado porcentaje de disolvente orgánico hay una tendencia clara, a medida que se rebaja la polaridad del extractante, los analitos menos polares (imidacloprida, acetamiprida, tiacloprida) incrementan su recuperación; a su vez los primeros disminuyen su recuperación. Por encima de dicho porcentaje las recuperaciones disminuyen para todos los analitos debido a que la polaridad del disolvente se ha rebajado tanto que no es capaz de extraerlos, por ejemplo en el ACN ocurre a partir del 30%.

Selección del volumen de extractante

Una vez seleccionada la composición y naturaleza del extractante (ACN:H₂O, 15% v/v) se probaron diferentes volúmenes, manteniendo el tiempo de agitación como en el caso anterior.

Tabla 12.- Recuperaciones obtenidas variando el volumen de extractante 15% ACN

Volumen extractante	5 mL	10 mL	15 mL	20 mL
Compuesto	% Recuperación			
Dinotefuran	70	72	74	74
Nitempiran	62	64	62	61
Tiametoxam	93	92	100	99
Clotianidina	67	66	65	66
Imidacloprida	63	68	57	60
Acetamiprida	90	91	85	86
Tiacloprida	79	77	80	81

Como se puede apreciar en la Tabla 12 no hay diferencias significativas entre los volúmenes ensayados, por economía y facilidad de concentración se eligió emplear como volumen de extracción 5mL de ACN 15%.

Optimización del tiempo de agitación

Seleccionado el volumen, naturaleza y composición del extractante en 5 mL y 15% de ACN en agua respectivamente, se procedió a evaluar la influencia del tiempo de agitación en la recuperación de los analitos.

Se estudió si el eliminar la etapa de agitación con vibromatic podría influir en la extracción. Para ello se probaron diferentes tiempos de agitación sólo con el vórtex (2500 rpm).

Tabla 13.- Recuperaciones obtenidas frente al tiempo de agitación

Tiempo vórtex	3 min	5 min	6 min
Compuesto	%Recuperación		
Dinotefuran	25	75	75
Nitempiran	26	70	70
Tiametoxam	30	95	92
Clotianidina	28	75	78
Imidacloprida	25	70	74
Acetamiprida	19	86	84
Tiacloprida	13	76	77

En la Tabla 13 se observa que 3 min de agitación son insuficientes pero con 5 min basta para extraer los siete compuestos en más de un 70%, de 5 a 6 minutos la mejora es inapreciable con lo que se opta por fijar el tiempo de agitación en 5 minutos. Además se concluyó que la agitación con vibromatic era innecesaria, con ello se acortaba el tratamiento de muestra en 12 minutos respecto al tratamiento inicial.

Segunda extracción

Se planteó si el introducir una segunda etapa de extracción podría incrementar los porcentajes de recuperación.

Para evaluar si supone una mejora respecto a una única extracción se analizan los extractos por separado.

Tabla 14.- Recuperación obtenida tras realizar dos extracciones consecutivas

Compuesto	1ª Extracción	2ª Extracción	% Recuperación total
	%Recuperación		
Dinotefuran	74	8	82
Nitempiran	69	12	91
Tiametoxam	92	2	94
Clotianidina	75	10	85
Imidacloprida	70	12	82
Acetamiprida	85	10	95
Tiacloprida	75	9	84

A partir de los resultados obtenidos se observó que introducir una segunda etapa de extracción producía mejoras significativas en cuanto a los porcentajes de recuperación. Una vez evaluada la recuperación de cada extracción por separado se decidió unir los extractos a la hora de reconstituir.

Una vez optimizado el proceso de extracción se planteó incorporar un método de limpieza. Se requiere para alargar la vida de la columna y minimizar el efecto matriz.

Concentración

Durante todo el proceso de puesta a punto del método se han evaporado a sequedad las fracciones para concentrarlas.

Para fijar las condiciones se evaporó 1 mL de disolución patrón, (a dos niveles de concentración, 500 y 50 ppb respectivamente) a vacío a 40, 50 y 60°C. Se observó que no se pierden los analitos a ninguna de las tres temperaturas, ni a ninguna de las dos concentraciones, con lo que se fijó en 60°C para ahorrar tiempo en el tratamiento de muestra.

Se planteó reconstituir en fase móvil (ácido fórmico 0,1% en agua:ACN al 75:25 v/v). Para evaluar si se perdían los analitos, se evaporó a sequedad 1mL de un patrón de 50 ppb y se reconstituyó en 1 mL de fase móvil. Todos los analitos se recuperaron en más de un 92% por lo que la reconstitución en fase móvil es viable.

Como el disolvente también puede influir en la ionización de los analitos se probó con MeOH:H₂O (40:60, v/v) puesto que los patrones están en esa mezcla. La recuperación de los

analitos fue superior al 95% para todos ellos con lo que se fija esta mezcla metanólica para reconstituir.

El problema principal de la evaporación a sequedad es el tiempo invertido puesto que el extractante, 10 mL, tiene un porcentaje muy elevado de agua.

Extracción en fase sólida (SPE)

Otra forma de concentrar es la extracción en fase sólida. Seleccionando adecuadamente el sorbente se podrían retener los analitos; pero no otros compuestos extraídos de la cera con lo que puede servir como limpieza, la ventaja de ello es eliminar el efecto matriz y poder cuantificar frente a patrones y no frente a blancos reconstituidos en patrón (adicionado después).

Las etapas de la extracción en fase sólida se muestran en la Figura 8.

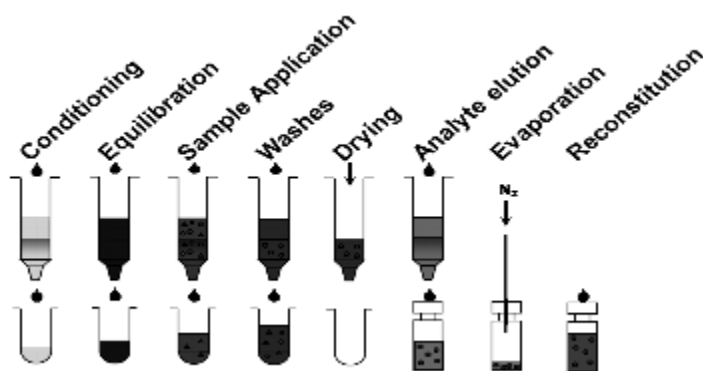


Figura 8.- Diferentes etapas de la SPE

Dependiendo del tipo de sorbente no son necesarias todas las etapas, viene especificado en cada uno de ellos.

Se probaron dos tipos de sorbentes, Strata X (polimérico C₁₈) e Isolute (tierra de diatomeas).

Los Strata X requieren etapa de acondicionamiento y equilibrado con MeOH, se pasa la muestra y se recoge el volumen del paso de muestra, después se lava con ACN y se seca para posteriormente eluirse, con 1 mL de MeOH (por lo que ya está concentrado). Todas las etapas requieren la aplicación de vacío.

Para evaluar posibles pérdidas en el paso de muestra se recogió el volumen, se evaporó a sequedad y reconstituyó en 1 mL de MeOH:H₂O al 40% v/v. Se observó que en esta etapa se

perdían entre 8-22% de cada analito, es decir, los Strata X no son buena elección puesto que se pierde un porcentaje considerable de cada analito. La ventaja es que se aíslan los analitos de los diferentes componentes de la matriz con lo que los cromatogramas salen más limpios.

Posteriormente se probaron tierra de diatomeas; la ventaja principal es que no requieren etapa de acondicionamiento, ni lavado; además eluyen por gravedad con lo que sólo necesitan vacío en la etapa de secado. El inconveniente es que se eluyen con volúmenes grandes de disolvente; con lo que se debe concentrar posteriormente y reconstituir en el disolvente deseado.

En el paso de muestra no se recoge líquido pues todo queda embebido en la tierra de diatomeas.

Para la elución se probaron diferentes disolventes. De todos ellos se pasaron 15 mL, 5 mL y después otros 5 mL, que se evaporan y reconstituyen por separado, esto sirve para poder evaluar el volumen necesario de elución.

Tabla 15.- Recuperación obtenida con los diferentes eluyentes probados

Compuesto	15 mL acetona	15 mL ACN	15 mL MeOH
	%Recuperación		
Dinotefuran	80	66	56
Nitempiran	86	55	50
Tiametoxam	87	55	42
Clotianidina	82	65	49
Imidacloprida	81	53	41
Acetamiprida	88	47	36
Tiacloprida	80	50	37

En la Tabla 15 se recogen los porcentajes de recuperación, no se muestran las de los 5 mL posteriores debido a que no se detectan los analitos, es decir, en los 3 casos 15 mL es volumen suficiente para eluir los siete neonicotinoides.

Se puede observar que los mejores resultados fueron obtenidos empleando 15 mL de acetona como eluyente. Además presenta una gran ventaja, de los probados, es el más volátil con lo que se reduce el tiempo empleado a la hora de evaporar-reconstituir. Se reconstituyó en 1 mL de MeOH:H₂O al 40% en volumen.

Se observó que los cromatogramas salían ligeramente más limpios pero seguía habiendo interferencias, la mayor utilidad de esta etapa es la concentración debido a que las tierras de diatomeas eliminan el agua.

Después de todos los ensayos efectuados se propone el siguiente procedimiento, esquematizado en la Figura 9.

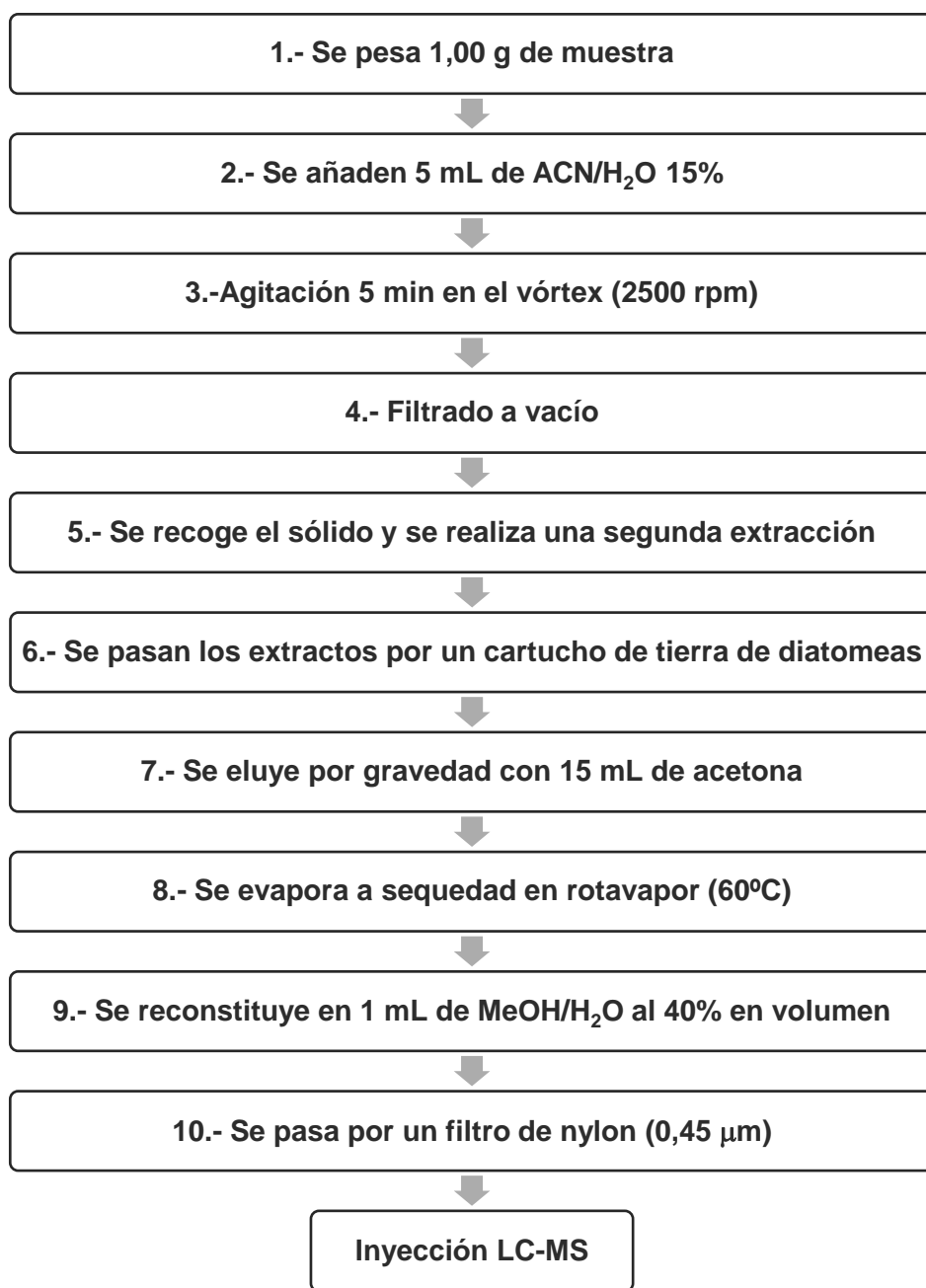


Figura 9.- Esquema del tratamiento de muestra

5.6.- CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO DESARROLLADO

5.6.1.- Selectividad

Para evaluar la selectividad del método se comparó un blanco de cera con una muestra dopada con concentración conocida (en este caso 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) tratadas del mismo modo.

Se evalúa en cada cromatograma de iones extraídos si al tiempo de retención del analito, el blanco da señal.

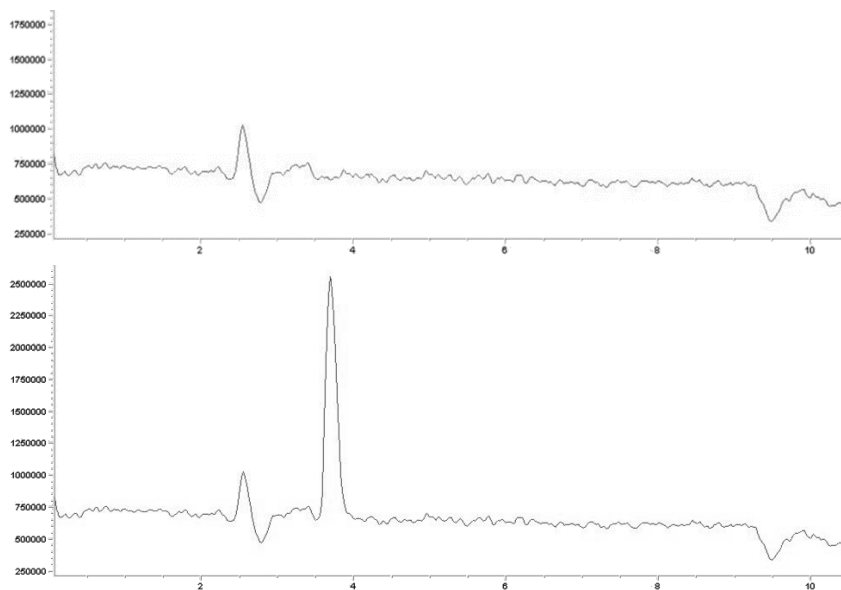


Figura 10.- Cromatograma SIM del dinotefuran, blanco y dopado de cera, respectivamente

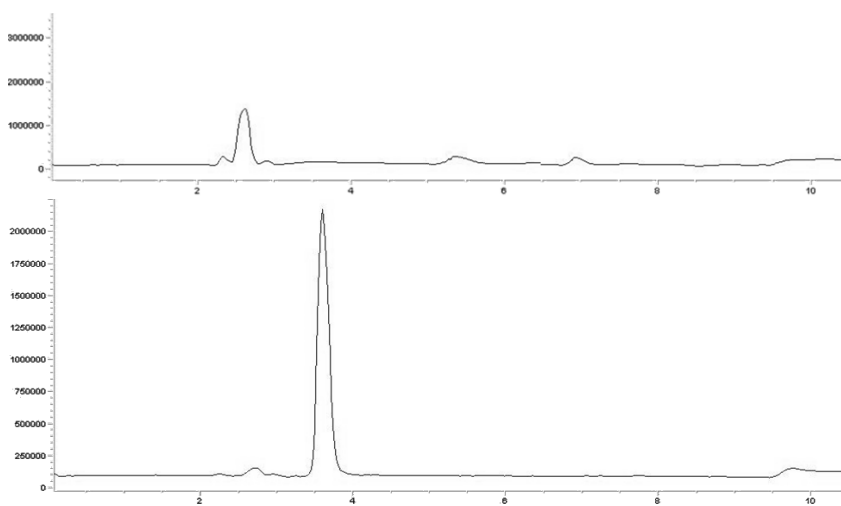


Figura 11.- Cromatograma SIM del nitempiran, blanco y dopado de cera, respectivamente

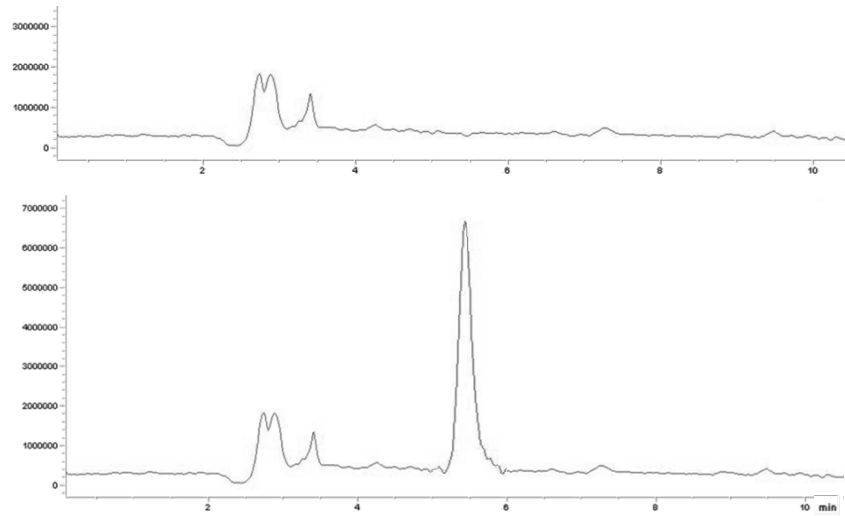


Figura 12.-Cromatograma SIM del tiametoxam, blanco y dopado de cera, respectivamente

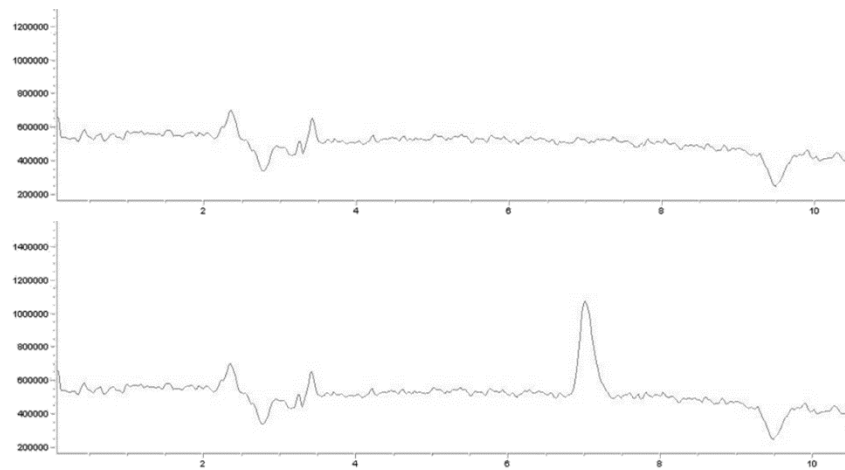


Figura 13.- Cromatograma SIM de la clotianidina, blanco y dopado de cera, respectivamente

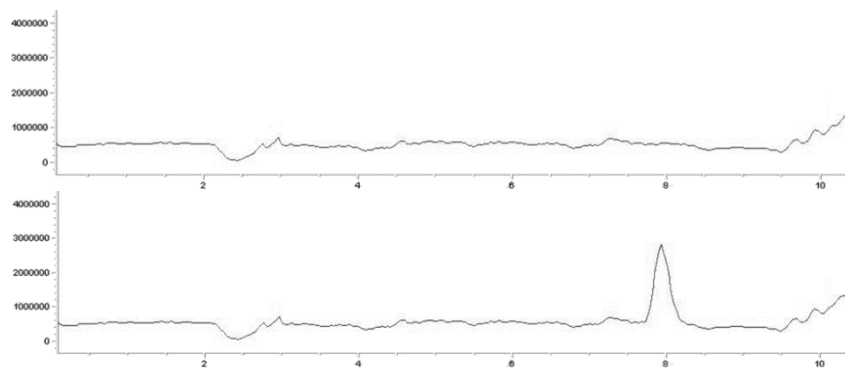


Figura 14.- Cromatograma SIM de la Imidacloprida, blanco y dopado de cera, respectivamente

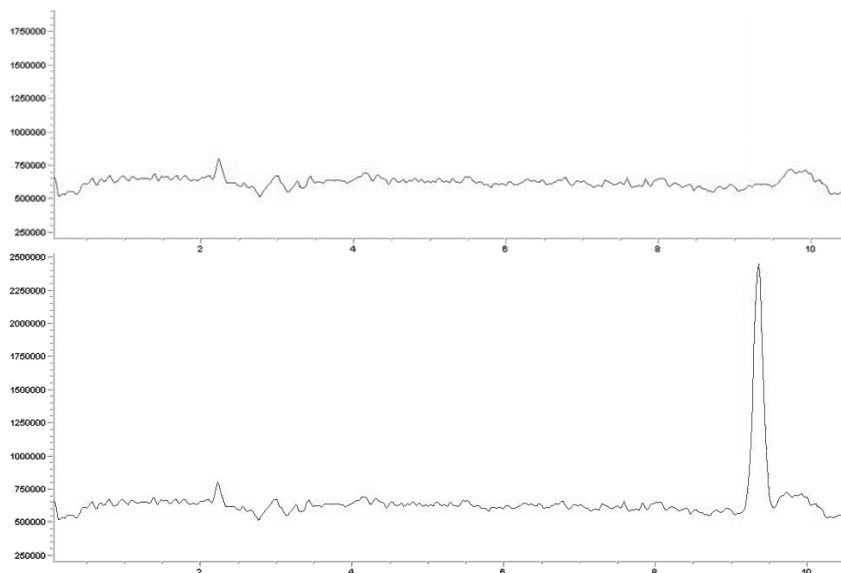


Figura 15.- Cromatograma SIM de la acetamiprida, blanco y dopado de cera, respectivamente

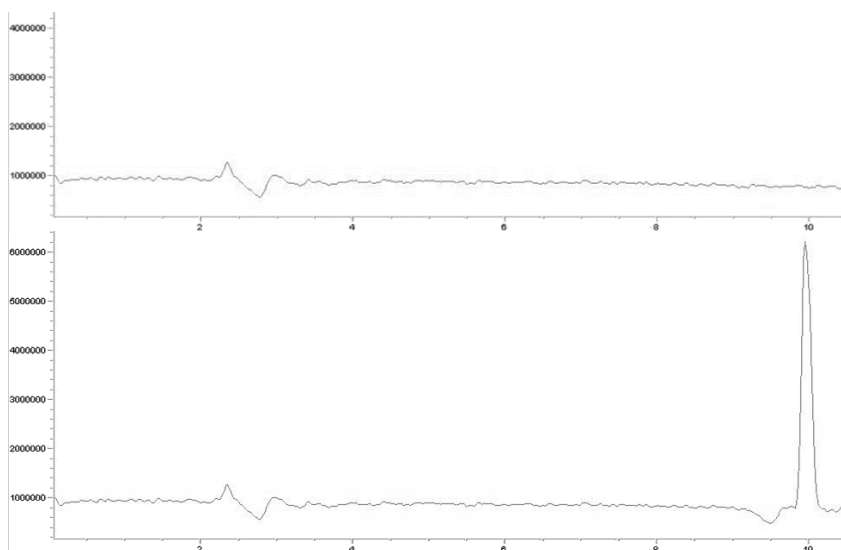


Figura 16.- Cromatograma SIM de la tiacloprida, blanco y dopado de cera, respectivamente

Como se observa en las figuras anteriores el blanco no da señal al tiempo de retención del analito con lo que puede afirmarse que el método es selectivo.

5.6.2.- Límite de detección y cuantificación

El límite de detección y cuantificación es la mínima cantidad que se puede detectar y cuantificar, respectivamente, con exactitud y precisión.

El límite de detección se define como 3 veces la relación señal/ruido (S/N), es decir, no se puede confirmar que se tiene un compuesto si su señal no es 3 veces mayor que el ruido de fondo, a ese tiempo, cuando no está presente el analito (en un blanco). A su vez, el de cuantificación debe ser 10 veces la relación S/N.

Para evaluarlo se debe calcular la relación señal ruido en un blanco que no contenga los analitos al tiempo de retención de los mismos.

Tabla 16.- Límites de detección y cuantificación del método

Compuesto	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)
Dinotefuran	1,3	15,2
Nitempiran	0,6	9,1
Tiametoxam	0,7	5,5
Clotianidina	5,6	14,3
Imidacloprida	5,0	9,4
Acetamiprida	6,0	20,5
Tiacloprida	3,5	19,8

5.6.3.- Linealidad y efecto matriz

Para evaluar la linealidad del método se prepararon patrones en el intervalo LOQ – 250 ppb, se observó que en este intervalo de concentraciones todas las relaciones eran lineales. En la Tabla 17 se recoge el intervalo estudiado, la pendiente, la ordenada en el origen y el coeficiente de correlación para cada uno de los compuestos.

Tabla 17.- Linealidad del método

Compuesto	Intervalo	Pendiente	Ordenada	R2
Dinotefuran	15,2 - 250	4,45E+05	2,10E+06	0,9993
Nitempiran	9,1 - 250	3,92E+05	1,20E+06	0,9994
Tiametoxam	5,5 - 250	1,49E+05	2,00E+05	0,9994
Clotianidina	14,3 - 250	1,86E+05	-6,30E+05	0,9994
Imidacloprida	9,4 - 250	2,58E+05	-8,00E+05	0,9999
Acetamiprida	20,5 - 250	3,50E+05	-1,80E+05	0,9997
Tiacloprida	19,8 - 250	8,60E+05	3,00E+06	0,9995

A modo de ejemplo se adjunta en la Figura 17, la representación de la línea de calibrado para la imidacloprida.

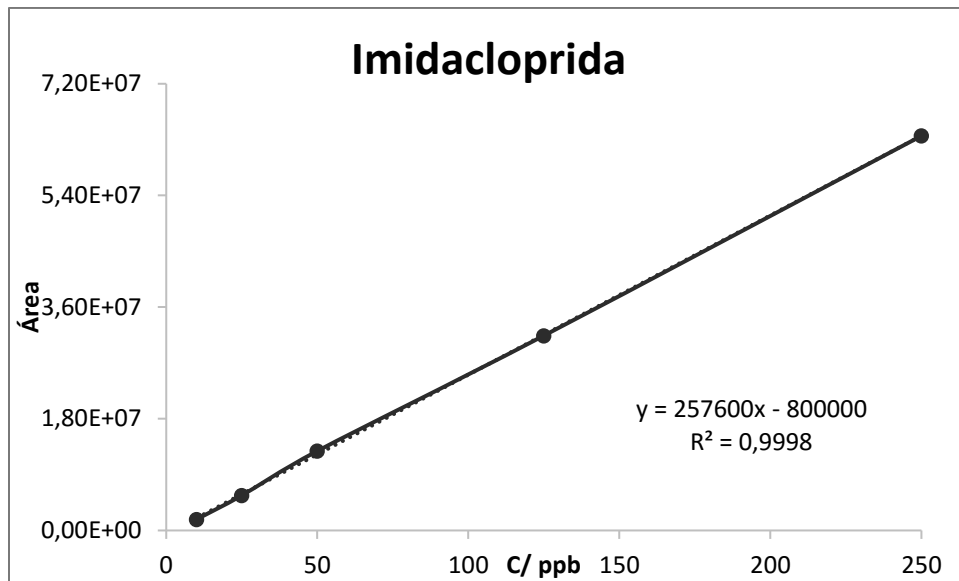


Figura 17.- Línea de calibrado de la imidacloprida

Para evaluar el posible efecto matriz se hace una línea de calibrado de adicionados después, es decir, sometiendo a blancos al mismo tratamiento pero reconstituyéndolos en los diferentes patrones en lugar de en disolvente.

El efecto matriz se calcula por relación de pendientes de la línea de adicionados después frente a las de disoluciones patrón.

El efecto se cuantificó y se observó que era relevante para dos de los analitos. El porcentaje de efecto matriz se recoge en la Tabla 18.

Tabla 18.-Porcentaje de efecto matriz

Compuesto	% de efecto matriz
Tiametoxam	87%
Tiacloprida	120%

En el caso del tiametoxam al estar en la cera en lugar de en disolución metanólica se produce una supresión de la señal. En cambio en la tiacloprida se observó lo contrario, que la cera favorece la ionización del analito y por tanto incrementa su señal. Para los otros neonicotinoides

la relación de pendientes era muy próxima al 100%, con lo que se puede concluir que para ellos no hay efecto matriz.

Como los siete analitos se manejan juntos, en disolución, para cuantificarlos en las muestras se debe comparar frente a un blanco reconstituido en patrón para tener en cuenta este efecto matriz. Si se cuantifica frente a una disolución se cometería error, al menos, en los dos citados.

6.- CONCLUSIONES

- Se ha diseñado un procedimiento de fortificación de cera sin necesidad de fundirla.
- Se ha desarrollado un método rápido y simple capaz de determinar siete neonicotinoides en cera de abeja, optimizándose las diferentes etapas de la extracción sólido-líquido.
- Debe optimizarse un método de limpieza, tanto como para alargar la vida útil de la columna como para reducir el efecto matriz.
- Los porcentajes de recuperación de los analitos superan el 80%.
- Los LODs y LOQs del método están comprendidos en el intervalo 0,6-6,0 y 5,5-20,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente.
- Debido al efecto matriz, se debe cuantificar mediante un calibrado en matriz y no con disoluciones patrón.
- El método puede emplearse para analizar muestras reales.

7.- LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

7.1.- TABLAS

Tabla 1.- Longitudes de onda máximas de absorción de los neonicotinoides estudiados

Tabla 2.- Gradiente de elución empleado en LC-DAD

Tabla 3.- Tiempos de retención de los analitos en LC-DAD

Tabla 4.- Parámetros MS-ESI modo positivo

Tabla 5.- Relaciones masa/carga de los neonicotinoides

Tabla 6.- Gradiente de elución empleado en LC-MS

Tabla 7.- Tiempos de retención de los analitos en LC-MS

Tabla 8.- Recuperaciones obtenidas empleando 10 mL de agua

Tabla 9.- Recuperaciones obtenidas empleando 10 mL de diferentes mezclas EtOH/H₂O

Tabla 10.- Recuperaciones obtenidas empleando 10 mL de diferentes mezclas MeOH/H₂O

Tabla 11.- Recuperaciones obtenidas empleando 10 mL de diferentes mezclas ACN/H₂O

Tabla 12.- Recuperaciones obtenidas variando el volumen de extractante 15% ACN

Tabla 13.- Recuperaciones obtenidas frente al tiempo de agitación

Tabla 14.- Recuperación obtenida tras realizar dos extracciones consecutivas

Tabla 15.- Recuperación obtenida con los diferentes eluyentes probados

Tabla 16.- Límites de detección y cuantificación del método

Tabla 17.- Linealidad del método

Tabla 18.- Porcentaje de efecto matriz

7.2.- FIGURAS

Figura 1.- Estructuras de los siete neonicotinoides estudiados

Figura 2.- Uso estimado de imidacloprida en diversos cultivos hasta el año 2013 en EEUU

Figura 3.- Uso estimado de imidacloprida en EEUU durante 2013

Figura 4.- Espectro de absorción del TMX, concentración de 5 mg/L

Figura 5.- Cromatograma de una disolución patrón de 5 mg/L de los siete analitos a 270 nm

Figura 6.- Espectro de masas del tiametoxam

Figura 7.- Cromatograma total de iones (TIC) de una disolución patrón de 50 ppb

Figura 8.- Diferentes etapas de la SPE

Figura 9.- Esquema del tratamiento de muestra

Figura 10:- Cromatograma SIM del dinotefuran, blanco y dopado, respectivamente

Figura 11:- Cromatograma SIM del nitempiran, blanco y dopado, respectivamente

Figura 12:- Cromatograma SIM del tiametoxam, blanco y dopado, respectivamente

Figura 13:- Cromatograma SIM de la clotianidina, blanco y dopado, respectivamente

Figura 14:- Cromatograma SIM del imidacloprida, blanco y dopado, respectivamente

Figura 15:- Cromatograma SIM de la acetamiprida, blanco y dopado, respectivamente

Figura 16:- Cromatograma SIM de la tiacloprida, blanco y dopado, respectivamente

Figura 17.- Línea de calibrado de la imidacloprida

8.- BIBLIOGRAFÍA

- [1] Sánchez-Bayo, F., Goka, K. (2014) Pesticide residues and bees – A risk assessment. *Plos One*, 9 (4), 1-14.
- [2] Programa nacional de medidas de ayuda a la apicultura, España 2011 -2013. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid (2010).
- [3] VanEngelsdorp, D., Underwood, R., Caron, D., Hayes, J. (2007) An estimate of managed colony losses in Winter of 2006-2007: a report commissioned by the Apiary Inspectors of America. *American Bee Journal*, 147 (7), 599-603.
- [4] VanEngelsdorp, D., Evans, C., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B.K., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarpay, D., Pettis, J. (2009) Colony Collapse Disorder: a descriptive study. *Plos One*, 4 (8), 1-17.
- [5] Fairbrother, A., Purdy, J., Anderson, T., Fell, R. (2014) Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33 (4), 719-731.
- [6] http://water.usgs.gov/nawqa/pnsp/usage/maps/show_map.php?year=2013&map=IMIDACLOPRID, acceso 25/05/2016 (16:00).
- [7] Elbert, A., Haas, M., Springer, B., Thielert, W., Nauen, R. (2008) Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Management Science*, 64 (11), 1099-1105.
- [8] Casida, J., Durkin, K.A. (2013) Neuroactive insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary effects. *Annual Review of Entomology*, 58, 99-117.
- [9] Pilling, E., Campbell, P., Coulson, M., Ruddle, N., Tornier, I. (2013) A Four-Year Field Program Investigating Long-Term Effects of Repeated Exposure of Honey Bee Colonies to Flowering Crops Treated with Thiamethoxam. *Plos One*, 8 (10) e77193.
- [10] https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=DOUE-L-2013-81001 acceso 15/05/2016 (17:00).
- [11] Pastor-Belda, M., Garrido, I. (2016) Determination of spirocyclic tetronic/tetramic acid derivatives and neonicotinoid insecticides in fruits and vegetables by Liquid Chromatography and Mass Spectrometry after Dispersive Liquid-liquid Microextraction. *Food Chemistry*, 202, 389-395.

- [12]** Watanabe, E., Kobara, Y. (2015) Determination of Seven Neonicotinoid Insecticides in Cucumber and Eggplant by Water-Based Extraction and High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Letters*, 48 (2), 213-220.
- [13]** Lee, K., You, M., You, M.L., Tsai, C., Lin, E.H., Hsieh, S.Y., Ho, M.H., Hsu, J.C., Wei, P.K. (2016) Nanoplasmonic biochips for rapid label-free detection of Imidacloprid pesticides with a Smartphone. *Biosensors & Bioelectronics*, 75, 88-95.
- [14]** Jiao, W.T., Xiao, Y., Qian, X.S., Tong, M.M., Hu, Y.Z., Hou, R.Y., Hua, R.M. (2016) Optimized combination of dilution and refined QuEChERS to overcome matrix effects of six types of tea for determination eight neonicotinoid insecticides by ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 210, 26-34.
- [15]** Dankyi, E., Carboo, D., Gordon, C., Fomsgaard, I.S. (2015) Application of the QuEChERS procedure and LC-MS/MS for the assessment of neonicotinoid insecticide residues in cocoa beans and shells. *Journal of Food Composition and Analysis*, 44, 149-157.
- [16]** Anastassiades, M., Lehotay, S.J. (2003). Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of Association of Official Agricultural Chemists (AOAC)*, 86 (2), 412-431.
- [17]** Valverde, S., Bernal, J.L., Martín M.T., Nozal, M.J., Bernal, J. (2016) Fast determination of neonicotinoid insecticides in bee pollen using QuEChERS and Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled to Quadrupole time-of-flight Mass Spectrometry. *Electrophoresis*, DOI 10.1002/elps.201600146
- [18]** Yáñez, K., Bernal, J.L., Nozal, M.J., Martín, M.T., Bernal, J. (2013) Determination of seven Neonicotinoid insecticides in Beeswax by Liquid Chromatography coupled to Electrospray-Mass Spectrometry using a fused-core column. *Journal of Chromatography A*, 1285, 110-117.
- [19]** Jovanov, P., Guzsvany, V., Franko, M., Lazic, S., Sakac, M., Saric, B., Banjac, V. (2013) 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, 125-133.
- [20]** Sánchez-Hernández, L., Higes, M., Martín, M.T., Nozal, M.J., Bernal, J.L. (2016) Simultaneous determination of neonicotinoid insecticides in sunflower-treated seeds (hull and

kernel) by LC-MS/MS. *Food Additives and Contaminants part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 33 (3), 442-451.

[21] Martel, A.C., Lair, C. (2011) Validation of a highly sensitive method for the determination of neonicotinoid insecticides residues in honeybees by Liquid Chromatography with Electrospray tandem Mass Spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 91 (10), 978-988.

[22] Vichapong, J., Burakham, R., Srijaranai, S. (2016) Alternative Liquid-Liquid Microextraction as Cleanup for Determination of Neonicotinoid Pesticides Prior HPLC Analysis. *Chromatographia*, 79 (5-6), 285-291.

[23] Yáñez, K., Martín, M.T., Bernal, J.L., Nozal, M.J., Bernal, J. (2014) Trace Analysis of Seven