



Universidad de Valladolid

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Química

PRESENCIA DE NEONICOTINOIDES EN POLEN

Autor: Janes France Casimiro Mestre

Tutor: Dra. Maria Teresa Martín Gómez.

Valladolid, 2016

A mi familia, ya que incluso a miles de kilómetros de distancia han sido capaces de motivarme, y llevarme a dar lo mejor de mi hasta el final. Gracias por haberme enseñado a amar y valorar, no solo a las personas, sino a las cosas más sencillas. A todas las personas que se han cruzado en mi camino, y que han estado cuando más los he necesitado para darme su apoyo incondicional.

La experimentación recogida en esta memoria ha sido llevada a cabo en los laboratorios del grupo TESEA en el Instituto CINQUIMA de la Universidad de Valladolid, a quienes expreso mi sincero agradecimiento por guiarme en cada etapa de la investigación.

Hago extensivo este agradecimiento al resto de Profesores y compañeros de Departamento de Química Analítica por la preocupación mostrada con respecto a mi trabajo.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I. RESUMEN Y ABSTRACT.....	3
CAPÍTULO II. INTRODUCCIÓN Y SITUACIÓN DEL TEMA.....	5
CAPÍTULO III. OBJETIVOS DEL PROYECTO.....	11
CAPÍTULO IV. PARTE EXPERIMENTAL.....	13
IV.1. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS.....	13
IV.1.1. Material empleado.....	13
IV.1.2 Reactivos y disolventes.....	13
IV.1.3. Equipo cromatográfico.....	14
IV.2. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.....	15
IV.2.1. Condiciones de detección.....	15
IV.2.2. Condiciones para la separación.....	18
IV.3. TRATAMIENTO DE MUESTRA.....	19
IV.3.1. Extracción sólido-líquido.....	19
IV.3.1.1. Extracción en diclorometano.....	20
IV.3.1.2. Pruebas con otros extractantes.....	23
IV.3.2. Método QuEChERS.....	26
IV.4. MÉTODO PROPUESTO.....	30
IV.4.1. Linealidad y Límites	34
IV.5. APLICACIÓN DEL METODO	36
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	37
CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA.....	39
CAPÍTULO VII. ABREVIATURAS	45

I. RESUMEN

Los neonicotinoides son un grupo de insecticidas sistémicos que afectan al sistema nervioso central de los insectos, causando parálisis y después la muerte de estos.

El extensivo uso de los neonicotinoides ha llevado a una creciente preocupación sobre la toxicidad que causan sobre los insectos polinizadores, como las abejas. Ello ha provocado que sean identificados como uno de los factores potenciales más relevantes ante el despoblamiento de las colmenas de abejas.

Para evaluar la exposición de las abejas a esta familia de insecticidas se analiza principalmente el polen, ya que es la fuente de alimento para las abejas así como un indicador ambiental.

Se empleó la cromatografía líquida de alta eficacia junto con un espectrómetro de masas, para la determinación simultánea de siete neonicotinoides, dinotefuran, nitenpyram, tiametoxam, clotianidina, imidacloprida, acetamiprida, y tiacloprida. La fuente de ionización más adecuada para el análisis fue la Ionización por Electro spray (ESI) en modo positivo.

Para la separación de los analitos fue empleada una columna cromatográfica Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm, 2,6 μ m de tamaño de partícula; Phenomenex, Torrance, CA, USA).

En cuanto al tratamiento de muestra se propuso la metodología QuEChERS (**Q**uick, **E**asy, **C**heap, **E**ffective, **R**ugged and **S**afe) en la que se evaluó cada una de las etapas que la constituye, con el fin de obtener cromatogramas lo más limpio posibles.

ABSTRACT

The neonicotinoids are a group of systemic insecticides, which affects the central nervous system of bugs, causing paralysis and then death.

The extensive use of this agrochemicals has led to an increasing concern about toxicity to natural pollinators, like honey bees. This, has provoked the neonicotinoids to be indentified as a potential contributing factor to sudden decline in adult honey bee population, commonly known as Colony Collapse Disorder (CCD).

The main consideration when evaluating honey bee exposure to neonicotinoids is based on the analysis of pollen, as it is the main food source for honey bees apart from being a noteworthy environmental indicator.

A High Performance Liquid Chromatography - Electrospray Ionization - Mass Spectrometry (HPLC-ESI-MS) method was developed for the simultaneous determination of seven neonicotinoids, including dinotefuran, nitenpyram, thiamethoxam, clothianidin, imidacloprid, acetamiprid and thiacloprid. The most suitable ionization source for the analysis was the positive ion mode.

The chromatographic separation was performed on a Kinetex C18 column (150 mm x 4,6 mm, 2,6 µm particle size; Phenomenex, Torrance, CA, USA).

With regard to the sample preparation, QuEChERS (**Q**uick, **E**asy, **C**heap, **E**ffective, **R**ugged and **S**afe) methodology was proposed, appraising his specific stages with the aim of getting the cleanest chromatograms.

II – INTRODUCCIÓN Y SITUACIÓN DEL TEMA

Las abejas y otros insectos polinizadores juegan un papel muy importante en la naturaleza, no solo desde el punto de vista biológico, sino también para el mantenimiento de la biodiversidad. Se conoce que el 70% de los alimentos vegetales consumidos por los seres humanos son polinizados por las abejas; que dichos insectos aumentan la producción de semillas, polinizando además las zonas verdes como bosques y selvas.

Lamentablemente y desde comienzos de esta centuria se ha apreciado a nivel mundial una notable y creciente disminución del número de abejas y colmenas. Dicho fenómeno se caracteriza porque las abejas obreras dejan la colonia y no vuelven a ella, muriendo en las cercanías del lugar, mientras que el resto de la población (abejas adultas, crías y reina) permanece en la colmena.

Como consecuencia del debilitamiento de la colmena ésta es más susceptible a la invasión de otros insectos.

Han sido muchas las causas indicadas para explicar este fenómeno, tales como las sequías [1,2], distintas plagas [2], el monocultivo [3], , la urbanización en zonas rurales [4] y un largo etcétera. Sin embargo existe una explicación en la que coinciden numerosos adeptos: achacar el efecto de la desaparición de las abejas a los plaguicidas, y en especial a nuevos insecticidas derivados de la nicotina, los neonicotinoides [4].

Geraldine Wright, principal autora de estudios del Instituto de Neurociencia de la Universidad de Newcastle, explicó que “una cosa mucho más grave es que esos insectos no consiguen sentir el sabor de los neonicotinoides en sus comidas, lo que hace que el riesgo de envenenamiento sea mayor”. Además asegura que “los neonicotinoides funcionan como una droga: las plantas contaminadas con pesticidas se convierten en más atractivos para las colonias de abejas” [5].

Los neonicotinoides afectan al sistema nervioso central de los insectos y, con menor toxicidad, al de vertebrados como aves y mamíferos. Su mecanismo de acción implica la interrupción del sistema nervioso mediante la estimulación de los receptores nicotínicos de la acetilcolina.

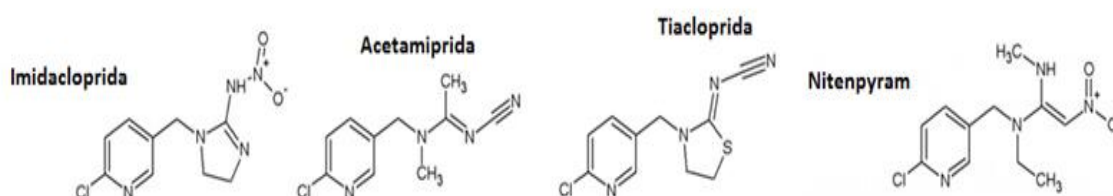
Estos insecticidas comenzaron a desarrollarse en la década de los 90, siendo la imidacloprida, la clotianidina y el tiametoxam los primeros en utilizarse ampliamente. Sin embargo, recientemente el uso de ciertos compuestos químicos de esta familia está siendo restringido en países debido a su relación con el despoblamiento de las colonias de abejas [5].

Según su estructura química existen tres generaciones distintas de neonicotinoides:

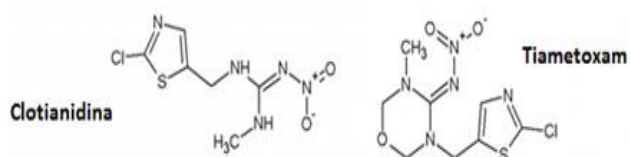
- La primera, formada por acetamiprida, imidacloprida, nitenpyram y tiacloprida, cuya característica estructural es un anillo heterocíclico 6-cloro-3-piridilo.
- La segunda generación se caracteriza por contener un anillo 2-cloro-5-tiazolil y se compone de compuestos como la clotianidina y el tiametoxam.
- La tercera generación presenta un anillo 3-tetrahidrofuranil, y la forma el dinotefuran.

En la figura # 1 se recoge la estructura de los neonicotinoides estudiados según la generación a la cual pertenecen.

Primera generación:



Segunda generación:



Tercera generación:

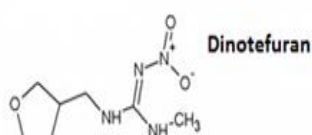


Figura # 1. Estructura de los neonicotinoides estudiados [13].

Los neonicotinoides sometidos a análisis son insecticidas sistémicos muy eficaces por contacto y por ingestión. Normalmente son usados por agricultores para el tratamiento de los suelos, como tratamiento foliar en cultivos de arroz, algodón, cereales, etc. y para controlar insectos chupadores de savia en cultivos tales como cítricos, manzanos, vides, algodón, plantas ornamentales, etc.

Algunos como el nitenpyram son utilizados en agricultura y en veterinaria para matar parásitos externos, tanto del ganado como de animales domésticos.

Cabe resaltar la clotianidina, que es un insecticida fácilmente absorbido por las plantas; llega a formar parte del polen y néctar de las flores, lo que la hace altamente tóxica para los insectos que se alimentan de estos productos, como las abejas [6].

Las investigaciones se han visto incrementadas en los últimos años debido al auge que han tenido los neonicotinoides en la agricultura. Así, se puede encontrar una amplia variedad de matrices estudiadas: en frutas y verduras [7, 8-15] agua y suelos [16-20], granos [9-11, 21, 22], té [22], aceites [23, 24], carnes y huevos [24-26], néctar en flores [27-29], abejas y productos de la colmena [30-34]. En lo que se refiere a metodología analítica, la mayoría de las investigaciones han sido realizadas mediante cromatografía líquida con una columna de relleno C_{18} y fase móvil formada por una mezcla acetonitrilo/agua. Los detectores más utilizados son el espectrómetro de masas (MS) dada su capacidad para detectar concentraciones de pesticidas muy bajas, y el de absorción ultravioleta.

En lo referente al tratamiento de muestra para la determinación de trazas de neonicotinoides en muestras de polen, miel y abejas, la bibliografía sugiere el método QuEChERS, que consta de dos etapas: extracción y clean-up.

En la etapa de extracción una gran cantidad de estudios [8, 11, 14, 35-38] se centra en el uso de acetonitrilo/agua como extractante. Para facilitar la extracción se resalta el empleo de sulfato de magnesio ($MgSO_4$) o cloruro de sodio (NaCl); aunque fueron propuestas otras alternativas como el uso de trisodiocitrato dihidratado (Na_3 citrato * 2 H_2O), trisodiocitrato hexahidratado (Na_3 citrato * 6 H_2O) e incluso la mezcla de estas sales en función de la matriz con la que se trabaja [37, 38].

Para la etapa de *clean up* o limpieza se sugiere la extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) que consiste en el empleo de PSA (*Primary and Secondary Amine*; Amina Primaria y Secundaria) junto con octadecil C_{18} o bien sílica, aminopropil (NH₂-), carbón grafitizado (GCB), etc.

Otros estudios llevados a cabo [26, 39, 40] propusieron el uso de nanomateriales como Nanotubos de Carbono Multicapa dada las propiedades físico-químicas de estos materiales. Estas experimentaciones verificaron que es posible el análisis multiresiduo de pesticidas, incluidos los neonicotinoides, en frutas y verduras como col, uva, espinaca y naranja, obteniendo bajos límites de detección y de cuantificación. Se alcanzaron además recuperaciones de entre el 71 % y el 110 % para los siete neonicotinoides en las cuatro matrices estudiadas.

Recientemente algunas investigaciones centradas en el análisis de trazas de neonicotinoides en muestras de polen [30, 41, 42] han optado por establecer modificaciones en el *clean up*, como son:

- A. Llevar a cabo una extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) con PSA + C_{18} .
- B. Realizar una etapa de congelación (freeze-out) y después la etapa de limpieza mediante dSPE con PSA + C_{18} .
- C. Establecer la etapa de congelación previa a la dSPE con PSA + C_{18} + Z-Sep. (*Zirconium Dioxide-Based Sorbent*, que consiste en la mezcla de C_{18} y sílica recubierta con dióxido de zirconio, ZrO₂)
- D. Congelación seguida del *clean up* mediante dSPE con PSA + C_{18} y extracción en fase sólida (SPE) con Z-Sep.

Fueron alcanzados porcentajes de recuperación que rondaron el 70-120 %, con una desviación estándar relativa (RSD) menor al 20%; a la vez que se obtuvieron límites de detección (LODs) entre 5-50 µg/Kg y límites de cuantificación (LOQs) menores a 1 µg/Kg, en un rango lineal de 4-400 µg/Kg.

Para comprobar la incidencia de los neonicotinoides sobre el despoblamiento de las colmenas debe disponerse de metodología que permita el análisis de posibles residuos de neonicotinoides en los productos apícolas. Nuestra experimentación se ha centrado

en el polen como alimento básico de la colmena, y como un importante indicador de la contaminación ambiental.

Dada las características físico-químicas de los compuestos se ha utilizado como técnica de análisis la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detección mediante espectrometría de masas

Se ha desarrollado la investigación prestando una especial atención en el tratamiento de muestra, empleándose diferentes procedimientos de extracción sólido- líquido, con el fin de obtener los extractos más limpios y los mejores porcentajes de recuperación.

III. OBJETIVOS DEL PROYECTO

El **objetivo general** de la investigación ha sido la modificación de una metodología desarrollada previamente para el análisis de residuos de neonicotinoides en polen. Esta metodología se basaba en una extracción sólido-líquido empleando diclorometano como extractante.

Para conseguirlo se han establecido los siguientes **objetivos específicos**:

- Se pretende eliminar el empleo de diclorometano como disolvente para la extracción, por ello se va a probar el uso de diferentes extractantes en el tratamiento de muestra.
- Establecer un tratamiento de muestra lo más rápido, sencillo, eficaz, y eficiente posible que permita obtener buenos porcentajes de recuperación.
- Incluir en el tratamiento de muestra alguna etapa de limpieza con el fin de obtener cromatogramas más limpios, y que el efecto matriz sea lo más bajo posible.

IV. PARTE EXPERIMENTAL

IV.1. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS

IV.1.1. MATERIAL EMPLEADO

- Balanza analítica de precisión Mettler AE-240. Mettler Instrumente G1987 (Zurich, Suiza).
- Baño de ultrasonidos modelo Brasonic 5. Selecta (Barcelona, España).
- Micropipetas Eppendorf AG (Hamburgo, Alemania).
- Agitador Vórtex REAX Control. Heidolph (Schwabach, Alemania).
- Agitador oscilante Vibromatic. Selecta (Barcelona, España).
- Centrífuga termostatada 5810R Eppendorf AG (Hamburgo, Alemania).
- Molinillo.
- Rotavapor RE 111 Büchi, baño de agua Büchi 461 y bomba de vacío Vacuubrand GMBH + CO KG (Alemania).
- Sistema de purificación de agua Milipore que consta de dos unidades de purificación, Milo-RO y Mili Q. (Millipore, Bedford, MA, USA).
- Tubos de centrífuga de 45 mL Eppendorf AG (Hamburgo, Alemania).
- Viales ámbar.
- Filtros de jeringa de nylon (17mm, 0.45µm). Microfiltration Systems
- Placa calefactora. IKA C-MAG HS 7.
- Microondas.
- Material de vidrio de uso general y volumétrico graduado.

V.1.2. REACTIVOS Y DISOLVENTES

- Acetonitrilo calidad HPLC suministrado por Lab Scan, (Polonia).
- Metanol calidad HPLC suministrado por Panreac (Barcelona, España).
- Ácido fórmico 98-100% de pureza. P.A. suministrado por Sigma Aldrich (Madrid, España)
- Diclorometano grado HPLC suministrado por Lab Scan, (Polonia).

- Patrones de los neonicotinoides: Imidacloprida (99%), Nitenpyram (98,6%), Acetamiprida (99%), Tiametoxam (98,5%), Tiacloprida (98,5%), Clotianidina (99,5%) y Dinotefuran (98,5%) fueron suministrados por Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburgo, Alemania).
- Las disoluciones patrón preparadas en agua como disolvente (100 mg/L) fueron almacenadas a 4°C. La disolución mezcla de los siete patrones de 10 mg/L fue preparada por dilución.
- Las muestras con las que se realizó el estudio eran de polen comercial, sin contenido en neonicotinoides. Cada muestra de polen fue secada en el horno a 40°C entre 1 y 2 días, hasta pesada constante, y posteriormente fueron trituradas en un molinillo. Ello nos garantiza eliminar el máximo contenido en agua de las muestras, y también que estas sean lo más homogéneas posible antes de su análisis.

IV.1.3 EQUIPO CROMATOGRÁFICO

Para la determinación de los siete neonicotinoides en polen se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), marca Agilent Technologies, modelo 1100, acoplado a un espectrómetro de masas (MS). El espectrómetro está equipado con dos fuentes de ionización, una de ElectroSpray (ESI) y otra de Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI). En la siguiente figura puede verse el equipo HPLC-ESI-MS.



Figura # 2. Equipamiento experimental para el análisis de los neonicotinoides en polen.

El equipo cromatográfico se constituye de los siguientes módulos:

- Desgasificador.
- Bomba de gradiente cuaternario.
- Inyector automático.
- Compartimento de columna termostataada.
- Detector de Diodos alineados (DAD).
- Detector de Masas (MS) cuadrupolo.
- Interfase ESI (ElectroSpray Ionization).

IV.2. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

IV.2.1. CONDICIONES PARA LA DETECCIÓN

Para la detección de los compuestos se utilizó el detector de masas, con la interfase ESI (adecuada para compuestos de polaridad media-alta).

En cuanto a la detección de los iones, los analitos pueden presentar ionización positiva y negativa lo que significa que dichos iones se protonan o deprotonan

respectivamente. Los resultados más satisfactorios se dieron para la fuente de ionización en modo positivo.

Así mismo se llevó a cabo una optimización de los diferentes parámetros que afectan directamente a la respuesta del detector mediante un análisis por inyección de flujos (FIA). Ello nos permite alcanzar la máxima sensibilidad en la detección para cada uno de los siete analitos.

Dichos factores se estudiaron de manera independiente, y los valores óptimos se muestran en la tabla # 1.

Tabla # 1. Resultados obtenidos a partir del análisis por inyección de flujos (FIA) para los parámetros MS-ESI (+).

Parámetro MS	Intervalo estudiado	Valor óptimo
Voltaje del fragmentador (V)	20-380	100
Temperatura (°C) del gas secante (N ₂)	10-350	340
Presión (psi) del gas nebulizador (N ₂)	10-60	60
Flujo (L/min) del gas secante (N ₂)	2-12	9
Voltaje del capilar(V)	2000-5000	2500

Se obtuvieron, mediante un barrido en modo SCAN, los espectros de cada uno de los neonicotinoides.

Estos espectros permiten obtener los iones de cuantificación así como los de confirmación, como puede observarse en la siguiente figura para el tiametoxam.

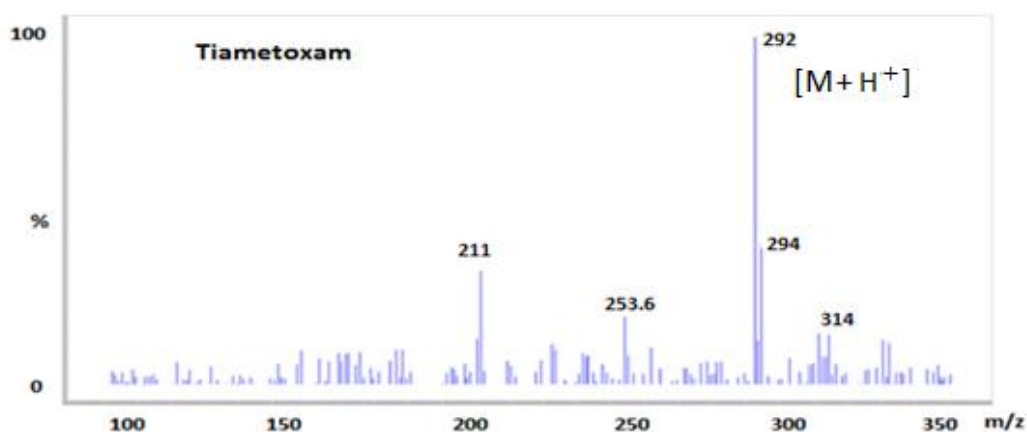


Figura # 3. Espectro en modo SCAN del tiametoxam.

En el espectro en modo SCAN del tiametoxam puede verse que el ion 292 (m/z) es el mayoritario, y corresponde al ion molecular $[M+H^+]$. Este ion se tendrá en cuenta para la cuantificación. Los valores masa-carga (m/z) correspondientes a los iones 294 y 211 respectivamente, son para la confirmación del analito.

La tabla # 2 muestra los iones mayoritarios de cuantificación y de confirmación obtenidos mediante el barrido en modo SCAN para cada uno de los analitos.

Tabla # 2. Iones mayoritarios y de confirmación obtenidos por MS-ESI modo positivo de los siete compuestos.

Compuesto	Masa molecular (g/mol)	Ion de cuantificación $[M+H^+]$	Iones de confirmación (m/z)
Dinotefuran	202	203	204/225
Nitenpyram	270	271	273/156
Tiametoxam	291	292	294/211
Clotianidina	249	250	252/251
Imidacloprida	255	256	258/257
Acetamiprida	222	223	225/167
Tiacloprida	252	253	255/185

IV.2.2. CONDICIONES PARA LA SEPARACIÓN

La separación de los analitos se llevó a cabo trabajando en régimen de gradiente. Fue utilizada una columna Kinetex C18 de 150 mm x 4.6 mm de diámetro interno y tamaño de partícula 2,6 μm .

La tabla # 3 muestra el gradiente seleccionado para la fase móvil (ácido fórmico 0,1% en agua y acetonitrilo, ACN), con el fin de conseguir la máxima resolución entre picos cromatográficos en el menor tiempo de análisis posible.

Tabla # 3. Gradiente seleccionado para la separación de los siete analitos.

Tiempo (min)	%A (Ac. fórmico 0.1 % /Agua)	%B (ACN)
0	90	10
8	65	35
13	60	40
17	10	90
21	10	90
23	90	10

El volumen de inyección y la temperatura de la columna fueron 25 μL y 35⁰C respectivamente.

En la figura # 4 se muestra el cromatograma en modo SIM (que permite la detección selectiva de cada uno de los iones sometidos a análisis) correspondiente a una disolución patrón de los siete neonicotinoides, analizada bajo las condiciones cromatográficas anteriores.

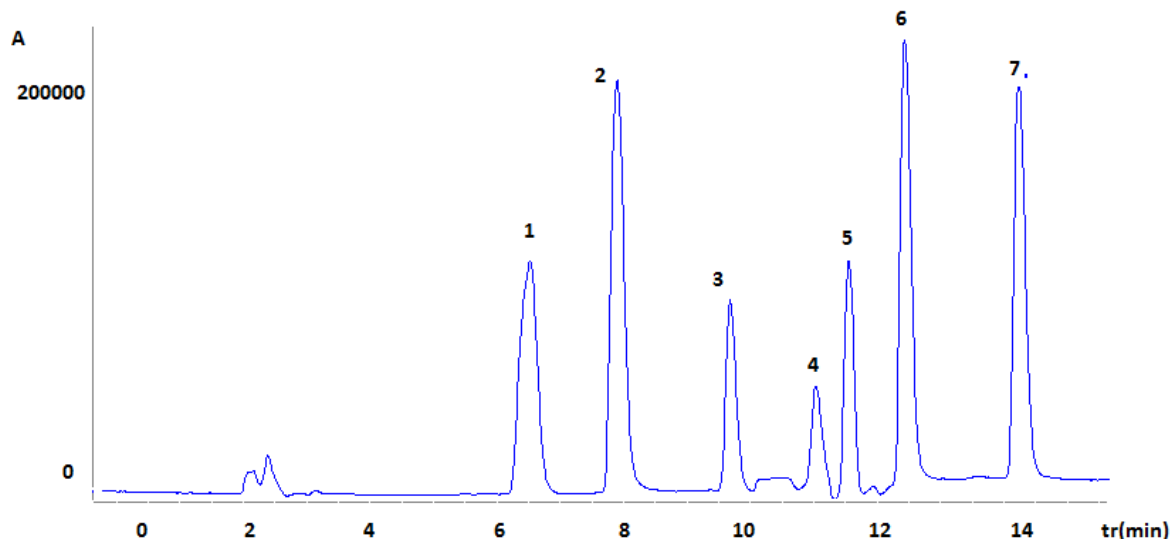


Figura # 4. Cromatograma LC-ESI-MS correspondiente a un patrón que contiene dinotefuran (1), nitenpyram (2), tiametoxam (3), clotianidina (4), imidacloprida (5), acetamiprida (6) y tiacloprida (7) bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas.

IV.3. TRATAMIENTO DE MUESTRA

El polen recolectado de las colmenas además de presentar una variada composición de proteínas, vitaminas, aminoácidos y flavonoides. Una vez obtenido el polen de la colmena es necesario establecer un procedimiento que permita tratar la muestra, detectar los siete neonicotinoides de manera selectiva, consiguiendo límites de detección y cuantificación lo más bajo posibles.

Todos los ensayos se realizaron utilizando polen comercial.

IV.3.1. EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO

El método puesto a punto con anterioridad se basaba en una extracción sólido-líquido usando diclorometano como extractante [43].

Se pretende llevar a cabo un tratamiento de muestra en el cual se emplee como extractante diferentes disolventes, o la mezcla de estos con agua en diferente proporción.

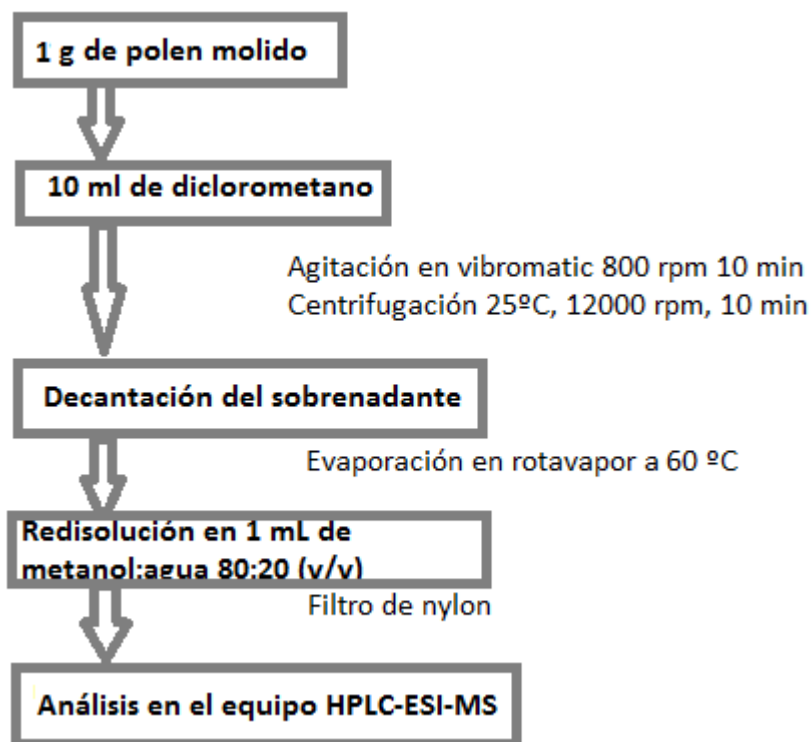
Además, se quiere establecer para el tratamiento una metodología QuEChERS en la que se va a realizar una adición de sales para facilitar la extracción, así como una etapa de limpieza con el fin de obtener cromatogramas más limpios.

IV.3.1.1. EXTRACCIÓN CON DICLOROMETANO

Se analizaron por este procedimiento blancos de polen, libres de neonicotinoides y blancos de polen adicionando una cantidad conocida de disolución patrón de los neonicotinoides.

Las muestras de polen con las que se realizaron los ensayos fueron de 1 g de polen, a las que se adicionó una alícuota de disolución de los siete neonicotinoides en agua, de tal manera que la concentración fuese de 500 µg/Kg.

Una vez que se tuvieron los blancos de polen con los patrones adicionados se llevó a cabo el proceso de extracción. Las condiciones de la extracción ya estaban optimizadas por el equipo de investigación. El tratamiento de muestra llevado a cabo se puede ver en la figura # 5 de manera detallada.



Figura·# 5 Tratamiento de muestra.

La determinación de los analitos se realizó teniendo en cuenta las condiciones cromatográficas del apartado IV.2.

En la figura # 6 se puede observar un cromatograma de un blanco de polen tratado.

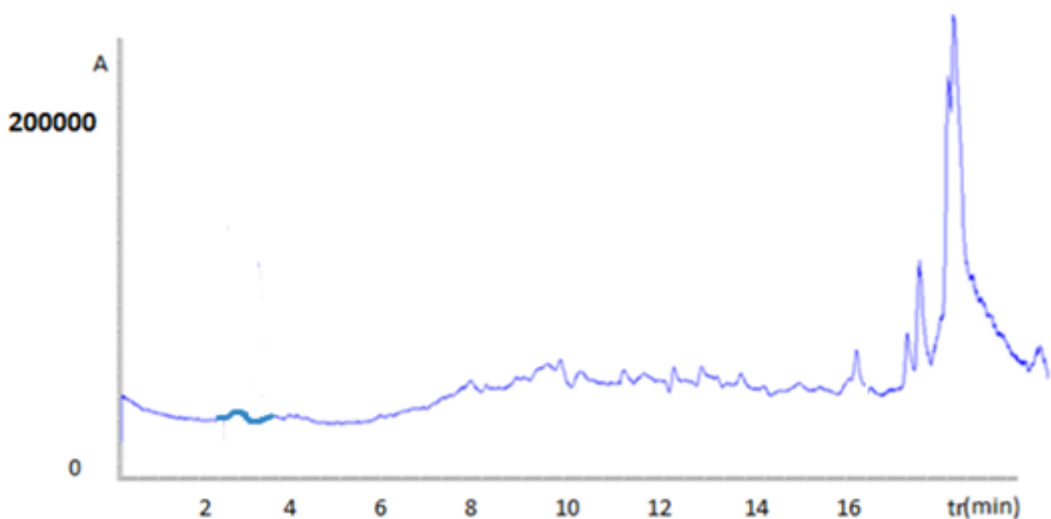


Figura # 6. Cromatograma LC-ESI-MS de un blanco de polen tratado.

En la figura # 7 se muestra el cromatograma de un blanco de polen al cual se le adicionó una disolución patrón de los analitos después de realizar el tratamiento de muestra indicado.

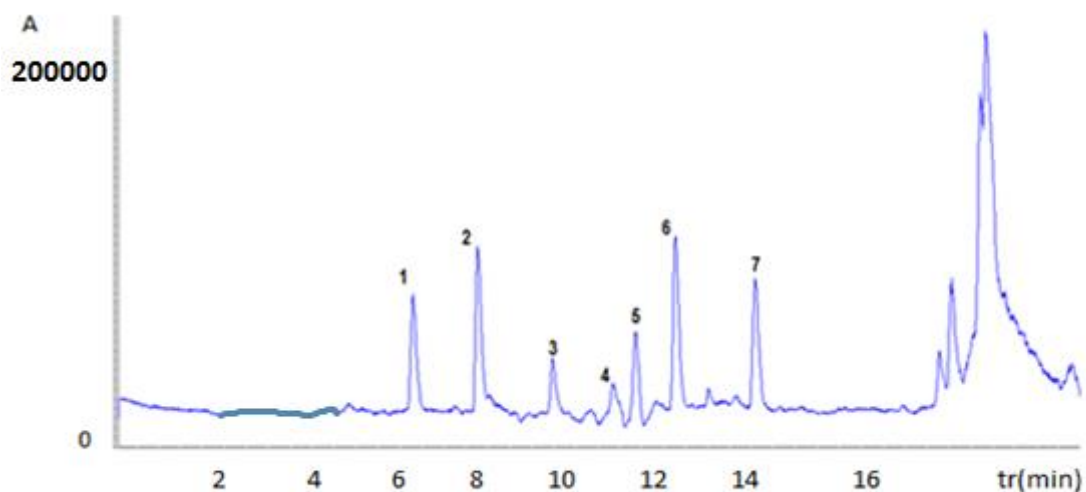


Figura # 7. Cromatograma LC-ESI-MS de un blanco de polen tratado con una disolución patrón de dinotefuran (1), nitenpyram (2), tiametoxam (3), clotianidina (4), imidacloprida (5), acetamiprida (6) y tiacloprida (7) bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas.

Como puede verse en los cromatogramas en el blanco no aparece ninguna señal al tiempo de retención de los analitos que impida la cuantificación de estos.

En la tabla # 4 se muestran las recuperaciones tras el tratamiento de muestra indicado, así como los porcentajes de desviación estándar relativa (% RSD) asociados a cada recuperación.

Tabla # 4. Recuperaciones obtenidas con diclorometano. (n=3)

Compuesto	% Recuperación ± %RSD
Dinotefuran	104 ± 6
Nitenpyram	102 ± 7
Tiametoxam	99 ± 9
Clotianidina	88 ± 8
Imidacloprida	97 ± 9
Acetamiprida	85 ± 8
Tiacloprida	87 ± 9

De los resultados se desprende que los porcentajes de recuperación no descienden del 85 %, lo cual implica una buena extracción de los analitos. Se obtuvo un % RSD ≤ 9, adecuado para este tipo de análisis.

Para verificar el efecto de la matriz sobre la ionización, se realizó la comparación de las pendientes de las líneas de calibrado de cada analito en fase móvil y las pendientes de las líneas de calibrado de pólenes tratados a los cuales se les adicionó los analitos después del tratamiento de muestra. De esta manera se pudo evaluar un efecto matriz que oscila entre el 18 y 55 %, por lo que la cuantificación de los analitos debe realizarse mediante un calibrado en polen.

Debido a que la matriz afecta a la ionización de los analitos, se pretendió buscar un tratamiento en el cual existiera una mayor limpieza de la muestra, lo cual supondría un menor efecto matriz.

IV.3.1.2 PRUEBAS CON OTROS EXTRACTANTES

Con el fin de eliminar como extractante el empleo de diclorometano se probó el uso de otros extractantes, siguiendo el mismo tratamiento de muestra de la figura # 5.

En primer lugar se pensó emplear como extractante agua. Se realizaron pruebas empleando 10 ml de agua sometida a diferentes procesos físicos: agitación en vibromatic, agitación en el equipo de ultrasonidos, agitación y calentamiento en placa calefactora y calentamiento en microondas. Los mejores resultados se obtuvieron cuando se empleaba agua agitada en vibromatic. En este caso se obtuvieron recuperaciones que oscilaban entre el 62-75 % con un %RSD \leq 9. El método cromatográfico era selectivo y presentaba efecto matriz.

Con el objetivo de obtener mejores recuperaciones se realizaron otras pruebas basadas en la modificación de algunos parámetros en la extracción, como el tiempo de agitación con el vibromatic (5, 15 y 20 minutos) y el volumen de extractante empleado (5, 15, 20 ml).

No se observó mejoría en los resultados, por lo que se pensaron otras posibles alternativas.

Ello llevó a plantearse el empleo de metanol como extractante observándose un aumento en los porcentajes de recuperación de los analitos. Así mismo se realizaron una serie de pruebas utilizando como extractante mezclas de metanol/agua (MeOH: H₂O) en diferente proporción. Los resultados obtenidos en estas pruebas se muestran en la tabla # 5.

Tabla # 5. Porcentajes de recuperación y % RSD empleando MeOH: H₂O .(n=3)

Compuesto	% Proporción de MeOH: H ₂ O (v,v)			
	0:100 MeOH: H ₂ O	50:50 MeOH: H ₂ O	80:20 MeOH: H ₂ O	100:0 MeOH: H ₂ O
Dinotefuran	75 ±9	73± 8	76± 7	79± 7
Nitenpyram	66 ±8	67± 8	73± 8	93± 6
Tiametoxam	67 ±8	62± 7	92± 7	88± 5
Clotianidina	73 ±6	62± 6	90± 6	72± 4
Imidacloprida	68± 7	100± 5	98± 5	91± 4
Acetamiprida	62± 5	83± 5	89± 8	80± 8
Tiacloprida	70± 6	82± 4	88± 6	83± 6

Los resultados de la tabla anterior muestran que las mejores recuperaciones se obtuvieron empleando la mezcla MeOH: H₂O en proporción 80:20 v/v. Sin embargo, los cromatogramas obtenidos no eran muy limpios, y presentaban un elevado efecto matriz con un método selectivo. Es decir, los diferentes analitos se podrían cuantificar al no aparecer ninguna señal en el blanco cromatográfico al tiempo de retención de los analitos, pero diferentes compuestos que eran coextraídos de la matriz producían una débil ionización de los neonicotinoides en la fuente para su posterior detección.

Se continuó buscando otras alternativas, esta vez usando como extractante acetonitrilo (ACN).

Se realizaron una serie de pruebas empleando en la extracción mezclas de acetonitrilo/ agua (ACN: H₂O). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla # 6.

Tabla # 6. Porcentajes de recuperación y % RSD empleando ACN: H₂O .(n=3)

Compuesto	% Proporción de ACN: H ₂ O (v,v)		
	0: 100 ACN: H ₂ O	75:25 ACN: H ₂ O	100: 0 ACN: H ₂ O
Dinotefuran	75± 9	82± 5	71± 6
Nitenpyram	66± 8	84± 6	80± 7
Tiametoxam	67± 8	95± 4	84± 7
Clotianidina	73± 6	93± 5	80± 5
Imidacloprida	68± 7	98± 3	81± 7
Acetamiprida	62± 5	99± 4	63± 4
Tiacloprida	70± 6	90± 4	81± 6

Como puede observarse en la anterior tabla los mejores porcentajes de recuperación se obtuvieron al emplear una mezcla ACN: H₂O (75:25, v/v).

Si se comparan estos resultados con los obtenidos cuando se empleó la mezcla MeOH: H₂O (80:20, v/v), se observa un ligero incremento en los porcentajes de recuperación de los analitos para el primero de los casos.

Al verificarse el efecto matriz cuando se utiliza la mezcla ACN: H₂O (75:25, v/v) se observaron porcentajes de ionización entre un 23-45 %. Con el fin de eliminar en lo posible la coextracción de compuestos de la matriz que impiden la correcta ionización, se pensó emplear la metodología QuEChERS, que conlleva tras la extracción una etapa de limpieza de los extractos.

IV.3.2 MÉTODO QuEChERS

El uso de ACN: H₂O (75:25, v/v) da mejores resultados respecto del empleo de MeOH: H₂O (80:20, v/v). Por ello quiso probarse la metodología QuEChERS para el tratamiento de muestra, centrándonos en el empleo de dicha mezcla de extractantes.

Como ya se comentó en apartado II.1.1, el método QuEChERS consta de dos etapas, una de extracción y otra de limpieza. En primer lugar se hicieron pruebas para comprobar la influencia del empleo de sales en los porcentajes de recuperación

El tratamiento de muestra seguido puede observarse en la figura # 8.

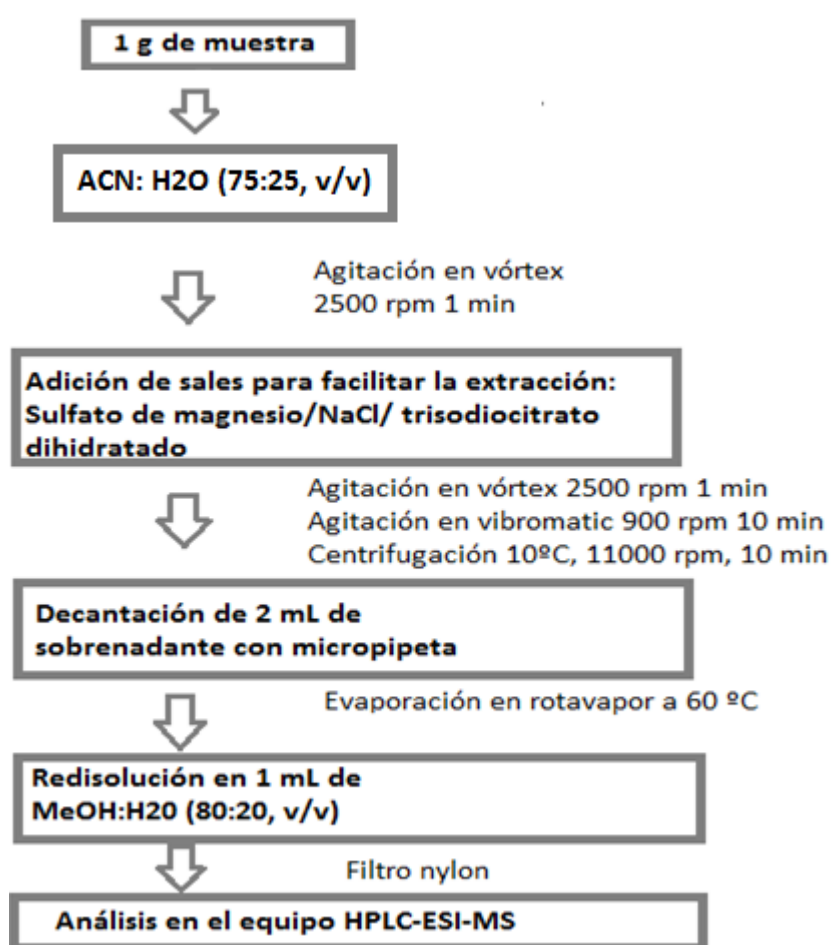


Figura # 8. Tratamiento de muestra método QuEChERS.

Se adicionaron sobre la mezcla extractante MgSO₄, NaCl y trisodiocitrato dihidratado. Dichas sales son las más empleadas en diferentes matrices en el método QuEChERS.

Se estudió la influencia de la adición de $MgSO_4$ sobre los porcentajes de recuperación de los diferentes analitos. No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de recuperación.

Se estudió la influencia de las otras dos sales, manteniéndose constante la cantidad de $MgSO_4$ (1 g) y de NaCl (0.5 g) añadida, variándose la cantidad de trisodiocitrato dihidratado (entre 0.2- 0.8 g). Los resultados se muestran en la tabla # 7.

Tabla # 7. Porcentajes de recuperación y % RSD empleando en la etapa de extracción diferentes sales o mezcla de estas. (n=3)

Compuesto	1 g de $MgSO_4$, 0.5 g de NaCl.		
	+ 0.2 g de trisodiocitrato dihidratado	+ 0,5 g de trisodiocitrato dihidratado	+ 0.8 g de trisodiocitrato dihidratado
Dinotefuran	77± 7	79± 6	89± 4
Nitenpyram	70± 7	72± 4	90± 5
Tiametoxam	79± 6	70± 5	102± 5
Clotianidina	68± 5	80± 7	100± 6
Imidacloprida	73± 6	88± 8	99± 5
Acetamiprida	76± 5	85± 7	101± 7
Tiacloprida	80± 7	79± 6	106± 6

Como puede observarse en la tabla # 7, los mejores porcentajes de recuperación se obtuvieron al usar 1 g $MgSO_4$, 0.5 g NaCl y 0.8 g de trisodiocitrato dihidratado. Estas recuperaciones superan a las obtenidas sin emplear sales.

Es por ello que para la etapa de extracción se va a utilizar esta proporción de sales.

Con el fin de eliminar los compuestos coextraídos de la matriz se realizaron una serie de pruebas empleando una etapa de limpieza o *clean up*. Se utilizó PSA y C18.

Se obtuvieron cromatogramas más limpios cuando en la etapa de limpieza se utilizaba 50 mg de PSA, 50 mg de C18 y 300 mg de MgSO₄.

Se evaluó el efecto de estas sales sobre el porcentaje de ionización, para lo cual se inyectó en el sistema cromatográfico una disolución patrón de concentración conocida, y también una muestra a la cual se le añadió al final del tratamiento una cantidad conocida de disolución patrón, de tal manera que la concentración fuera la misma para ambos casos.

Tabla # 8. Evaluación del porcentaje de ionización (en %) y % RSD extrayendo con 1 g de MgSO₄, 0.5 g de NaCl y 0.8 g de trisodiocitrato dihidratado, con y sin clean up. (n=3)

Compuesto	% Ionización sin clean up	% Ionización con clean up
Dinotefuran	49± 4	82± 5
Nitenpyram	51± 5	88± 5
Tiametoxam	64± 5	85± 7
Clotianidina	73± 6	81± 6
Imidacloprida	68± 5	85± 4
Acetamiprida	69± 7	89± 6
Tiacloprida	74± 5	93± 7

Cabe destacar de la anterior tabla que los porcentajes de ionización aumentan cuando hay una etapa de limpieza o clean up, lo cual significa que el efecto de la matriz sobre la ionización es menos notable. Estos porcentajes oscilaban del 82-93 %.

Existen estudios que sugieren una etapa de congelación o *freeze out* antes de la etapa de clean up, para una mejor limpieza de la muestra.

Por esta razón se quiso ver cómo influye sobre la ionización de los analitos el hecho de introducir una etapa de congelación.

Tras la etapa de extracción y centrifugación se realizaron pruebas en las que se modificó el modo de congelación de la muestra, ya sea con hielo seco (a -78°C) o metiendo las muestras al frigorífico (aproximadamente a -4°C).

Tras varios ensayos se comprobó que se obtienen cromatogramas mucho más limpios enfriando con hielo seco a -78°C .

Se estudió la influencia del tiempo de congelación sobre la limpieza de la muestra (% de ionización) variándose de 0-6 minutos.

En la tabla # 9 se muestran los porcentajes de ionización para cada uno de los analitos sin congelar y congelando a 2 minutos. No se muestran los resultados a tiempos superiores porque no existieron variaciones significativas.

Tabla # 9. Evaluación del porcentaje de ionización (en %), y %RSD con y sin enfriamiento previo a la etapa de clean up. (n=3)

Compuesto	Tiempo de congelación	
	t=0`	t=2`
Dinotefuran	82± 5	89± 5
Nitenpyram	88± 5	99± 4
Tiametoxam	85± 7	98± 5
Clotianidina	81± 6	98± 6
Imidacloprida	85± 4	100± 5
Acetamiprida	89± 6	98± 4
Tiacloprida	93± 7	104± 7

Puede observarse que al congelar durante dos minutos ($t=2'$) el porcentaje de ionización de los neonicotinoides es superior al 89 %.

IV.4. MÉTODO PROPUESTO

Finalmente, a la vista de los resultados obtenidos, el método propuesto ha sido el siguiente :

A 1 gramo de muestra de polen pulverizado se adicionan 2 ml de agua y después 6 ml de ACN, agitando tras cada adición en vórtex durante 1 minuto a 2500 rpm.

Posteriormente se añaden las sales de deshidratación: 1 g de sulfato de magnesio anhidro, 0.5 g de NaCl y 0.8 g de trisodiocitrato dihidratado. La mezcla es agitada, primero en vórtex, y después en vibromatic durante 10 minutos a 900 rpm.

Se centrifuga a 10°C y 11000 rpm durante 10 minutos, y se somete la muestra a enfriamiento con hielo seco a -78°C durante 2 minutos.

Se decantan 2 ml de fase orgánica, y se establece la etapa de limpieza. En esta etapa se añaden 50 mg de PSA, 50 mg de C18 y 300 mg de sulfato de magnesio anhidro, centrifugando a 10 °C y 11000 rpm durante 10 minutos.

El siguiente paso consiste en decantar el líquido sobrenadante en un vial y llevarlo a sequedad con un rotavapor a 60 °C.

Se redisuelve en 1 ml de MeOH: H₂O (80:20, v/v) y se filtra el extracto a un vial con un filtro de nylon de 0,45 µm de tamaño de poro.

Por último el extracto se analiza en el sistema HPLC-ESI-MS.

En la figura # 9 se muestra esquemáticamente el método final propuesto.

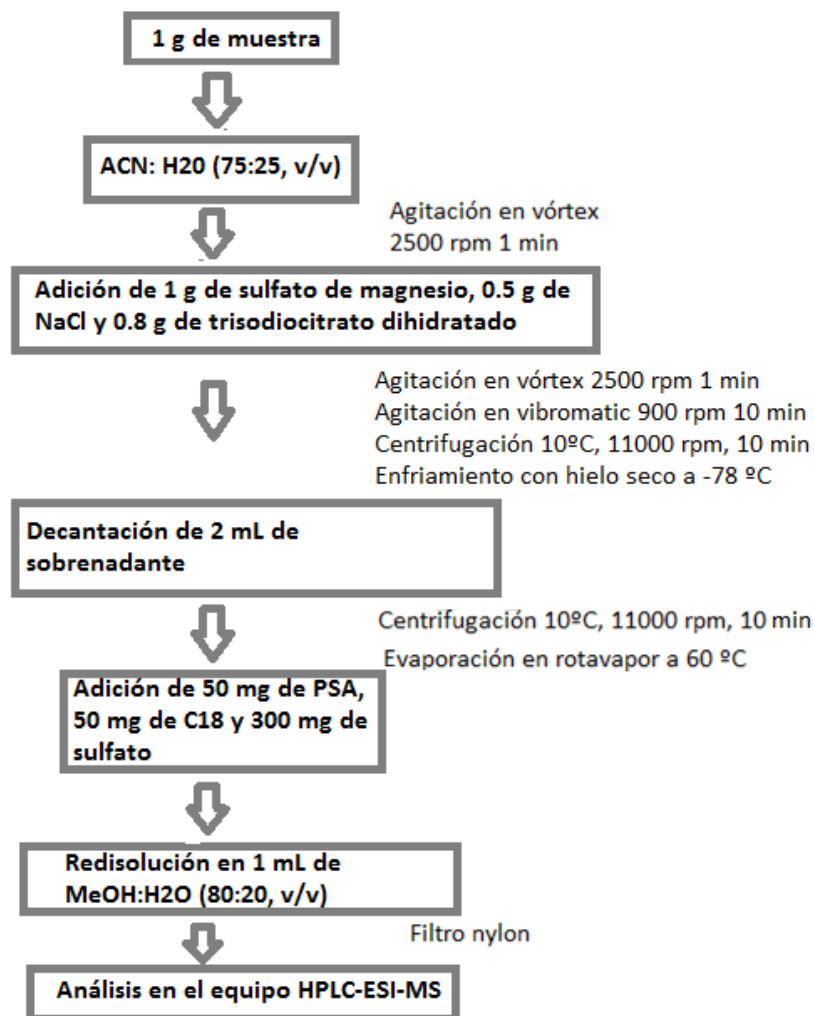


Figura # 9. Método final propuesto.

En la tabla # 10 pueden observarse las recuperaciones obtenidas así como el % RSD. Se comparan los resultados de este método con los obtenidos para los otros procedimientos de extracción.

Tabla # 10. Porcentajes de recuperación según el procedimiento de extracción empleado.

Compuesto	% Recuperación y % RSD				
	CH_2Cl_2	H_2O	MeOH: H_2O 80:20	ACN: H_2O 75:25	QueChERS ACN: H_2O 75:25
Dinotefuran	104 ± 6	75 ± 9	76 ± 7	82 ± 5	95 ± 5
Nitenpyram	102 ± 7	66 ± 8	73 ± 8	84 ± 6	99 ± 4
Tiametoxam	99 ± 9	67 ± 8	92 ± 7	95 ± 4	99 ± 2
Clotianidina	88 ± 8	73 ± 6	90 ± 6	93 ± 5	102 ± 5
Imidacloprida	97 ± 9	68 ± 7	98 ± 5	98 ± 3	105 ± 4
Acetamiprida	85 ± 8	62 ± 5	89 ± 8	99 ± 4	102 ± 4
Tiacloprida	87 ± 9	70 ± 6	88 ± 6	90 ± 4	96 ± 3

En la tabla anterior se observa que los porcentajes más bajos se obtuvieron cuando se empleaba agua como extractante. Estas recuperaciones mejoraban al emplearse mezclas de agua con otro disolvente orgánico.

Cuando se emplea diclorometano como extractante las recuperaciones no descienden del 85 %, pero sin embargo con este procedimiento existía un acusado efecto matriz, por lo que la ionización de los analitos en muchos casos fue baja.

Con el uso de la metodología QuEChERS se consiguió una mayor limpieza de la muestra, y por consiguiente un efecto de la matriz sobre la ionización prácticamente nulo. Además se mejoran los porcentajes de recuperación para muchos de los analitos. Es por ello que se propone como método de tratamiento de muestra.

Se evaluó la eficiencia del tratamiento de muestra y el efecto de la matriz sobre la ionización de los analitos a diferentes niveles de concentración. Para ello se dopó polen corbicular libre de neonicotinoides con patrones que contenían los analitos de estudio de tal manera que se obtuviera una concentración baja (5 µg/Kg), media (63 µg/Kg), y alta (500 µg/Kg).

En la siguiente tabla se establecen los valores medios de la ionización y recuperación (en %) así como la desviación estándar relativa (% RSD), para las tres concentraciones de estudio.

Tabla # 11. Evaluación de la eficiencia del tratamiento de muestra y del efecto matriz.(n=3)

Compuesto	% Ionización			% Recuperación		
	Baja	Media	Alta	Baja	Media	Alta
Dinotefuran	91 ± 5	97 ± 4	90 ± 5	91 ± 4	99 ± 2	93 ± 3
Nitenpyram	100 ± 3	94 ± 2	99 ± 3	99 ± 2	93 ± 2	99 ± 3
Tiametoxam	104 ± 5	97 ± 3	99 ± 3	98 ± 3	104 ± 4	99 ± 3
Clotianidina	94 ± 5	102 ± 4	98 ± 4	92 ± 3	98 ± 3	103 ± 5
Imidacloprida	95 ± 2	93 ± 3	101 ± 5	95 ± 4	97 ± 3	105 ± 5
Acetamiprida	92 ± 2	98 ± 3	96 ± 5	96 ± 3	101 ± 3	104 ± 4
Tiacloprida	96 ± 2	104 ± 3	102 ± 4	92 ± 2	94 ± 4	97 ± 3

Como puede verse en la tabla anterior la desviación estándar relativa obtenida para la recuperación es inferior al 5 %. Ello sugiere que el método es preciso.

Puede decirse además que existe una ionización prácticamente total de los analitos, por lo que el efecto matriz es insignificante.

IV.4.1. Linealidad y límites

La cuantificación de los analitos se llevó a cabo mediante el método del patrón externo en base al área del pico cromatográfico y usando un ajuste de mínimos cuadrados

Se realizó una línea de calibrado de cada uno de los compuestos en mezcla metanol-agua, barriendo un intervalo de concentraciones rango entre 5-500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, y además se realizó un calibrado sobre matriz.

Para ello 1 g de polen pulverizado es dopado con un determinado volumen de patrón de los siete neonicotinoides que permita obtener concentraciones finales en polen comprendidas entre los 5-500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. A partir de este punto se siguió el tratamiento de muestra descrito en el anterior apartado.

Una vez propuesto el método se calcularon los límites de detección (LODs) y límites de cuantificación (LOQs).

Ello nos permite estimar los LODs y LOQs para cada compuesto, considerando éstos como 3 veces la relación señal/ruido (LODs) y 10 veces la relación señal/ruido (LOQs).

En la tabla # 12 se ven los parámetros generales de las líneas de calibrado para los compuestos estudiados.

Tabla # 12. Datos de la línea de calibrado para cada neonicotinoide. Límites de detección y de cuantificación correspondientes a cada analito (en $\mu\text{g}/\text{Kg}$).

Compuesto	Línea de calibrado	Intervalo analítico ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	R^2	LOD ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)
Dinotefuran	Matriz	10.0-500	0.999	3.3	10.0
Nitenpyram	Matriz	9.0-500	0.999	2.8	9.0
Tiametoxam	Matriz	5.3-500	0.997	1.5	5.0
Clotianidina	Matriz	9.8-500	0.999	3.0	9.8
Imidacloprida	Matriz	5.3-500	0.999	1.5	5.3
Acetamiprida	Matriz	9.0-500	0.998	2.8	9.0
Tiacloprida	Mariz	9.5-500	0.999	3.0	9.5

Para el intervalo analítico estudiado se obtuvieron valores de $R^2 > 0.99$ por lo que puede decirse que el método es lineal.

IV.5. APLICACIÓN A MUESTRAS DE POLEN.

El método de análisis finalmente propuesto se utilizó para analizar muestras de polen (en su totalidad pan de abeja) que fueron recogidas de sus respectivas colmenas por apicultores y enviadas al Centro Apícola Regional de Marchamalo (Guadalajara, España). Posteriormente estas muestras se remitieron al laboratorio.

Cada muestra de polen fue secada en el horno a 40 °C hasta pesada constante, y posteriormente fue triturada en un molinillo hasta conseguir una homogeneidad adecuada para su análisis.

Se analizaron 21 muestras de polen, de las cuales ninguna presentó residuos de neonicotinoides en concentraciones iguales o mayores a los LODs del método propuesto.

V.CONCLUSIONES

- I. Se llevó a cabo un tratamiento de muestra para la determinación de residuos de neonicotinoides en polen. Para ello fueron desarrollados diferentes procedimientos de extracción.
- II. Se propuso un método QuEChERS mediante el cual se consiguió una mayor limpieza de la muestra. Ello condujo a que se eliminara prácticamente el efecto de la matriz sobre la ionización de los analitos, obteniéndose cromatogramas más limpios.
- III. Acorde a los datos obtenidos puede decirse que el método propuesto es coherente y fiable, con LODs y LOQs adecuados para el análisis de trazas.
- IV. Se ha aplicado el método propuesto para la determinación de residuos de neonicotinoides en muestras de polen procedentes de apiarios.
- V. No se encontraron residuos de los neonicotinoides estudiados en concentraciones iguales o superiores a los LODs del método propuesto.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. T. Kerr, A. Pindar, P. Galpern et al. Climate change impacts on bumblebees converge across continents. *Science*, 349 (6244), 177-180 (2015)
- [2] J. Y. Wu, C.M. Anelli, W.S. Sheppard. Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PLoS ONE* 6. 2, 1-11 (2011).
- [3] G. P. Dively, A. Kamel. Insecticide Residues in Pollen and Nectar of a Cucurbit Crop and Their Potential Exposure to Pollinators. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 60,449-4456 (2012)
- [4] Bee brains and colony health jeopardised by pesticide exposure .<http://www.dundee.ac.uk/news/2015>. (Última visita 20 de enero de 2016).
- [5] Neonicotinoides y la desaparición de la abejas .<http://didacforner.net>. (Última visita 20 de septiembre de 2015).
- [6] EPA Releases the First of Four Preliminary Risk Assessments for Insecticides Potentially Harmful to Bees .<http://www.epa.gov>. (Última vista 27 de enero de 2016).
- [7] C.A. Mullin, M. Frazier, J.L. Frazier, S. Ashcraft, et al. High levels of miticides and agrochemicals in North America apiaries: Implications for honey bee health. *PLoS ONE* 5. 3, 1-19 (2010).
- [8] .C. Sack, M. Smoker, N.Chamkasem, R. Thompson, G. Satterfield, C. Masse, G. Mercer, B. Neuhaus, I. Cassias, E. Chang, Y. Lin, S. MacMahon, J. Wong, K.Zhang, and R. E. Smith. Collaborative Validation of the QuEChERS Procedure for the Determination of Pesticides in Food by LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 59, 6383-6411 (2011).
- [9] C.L. Cantrell, F.E. Dayan, S. O. Duke. Natural Products As Sources for New Pesticides. *Journal of Natural Products*, 75, 1231-1242 (2012).
- [10] E. E. Wilson, C.Sheena Sidhu, K.E. Levan and D.A. Holway. Pollen foraging behaviour of solitary Hawaiian bees revealed through molecular pollen analysis. *Molecular Ecology*, 19, 4823-4829 (2010).

- [11] E. Watanabe, T. Iwafune, K. Baba et al. Organic Solvent-Saving Sample Preparation for Systematic Residue Analysis of Neonicotinoid Insecticides in Agricultural Products Using Liquid Chromatography-Diode Array Detection. *Food Analytical Methods*, 9(1), 245-254 (2016).
- [12] F. Zhang, Y. Li, C. Yu, C. Pan. Determination of Six Neonicotinoid Insecticides Residues in Spinach, Cucumber, Apple and Pomelo by QuEChERS Method and LC-MS/MS. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 88, 885-890 (2012).
- [13] G. C. Bedendo, I. C. Sales Fontes Jardim, E. Carasek. Multiresidue determination of pesticides in industrial and fresh orange juice by hollow fiber microporous membrane liquid-liquid extraction and detection by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 88, 573-580 (2012).
- [14] Q. Wu, Z. Li, C. Wang, C. Wu, et al. Dispersive Solid-Phase Extraction Clean-up Combined with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Determination of Neonicotinoid Insecticides in Vegetable. *Food Analytical Methods*, 4, 559-566 (2011).
- [15] S. Mohapatra, M. Deepa, S. Lekha, B. Nethravathi, et al. Residue Dynamics of Spirotetramat and Imidacloprid in/on Mango and Soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 89, 862-867 (2012).
- [16] A. Peña, J.A. Rodríguez-Liébana, M.D. Mingorance. Persistence of two neonicotinoid insecticides in wastewater and in aqueous solutions of surfactants and dissolved organic matter. *Chemosphere*, 84, 464-470 (2011).
- [17] E. Watanabe, Y. Kobara, K. Baba and H. Eun. Aqueous acetonitrile extraction for pesticide residue analysis in agricultural products with HPLC-DAD. *J. Agric. Food Chem.* 154, 7-12 (2014)
- [18] P. Samnani, K. Vishwakarma, S. Y. Pandey. Simple and Sensitive Method for Determination of Imidacloprid Residue in Soil and Water by HPLC. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*, 86, 554-558 (2011).
- [19] T. Reemtsma, L. Alder, U. Banasiak. A multimethod for the determination of 150 pesticide metabolites in surface water and groundwater using direct injection liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1271, 95-104 (2013).

- [20] G. Amelin, D. S. Bolshakov, A. V. Tretiakov. Identification and Determination of Synthetic Pyrethroids, Chlorpyrifos, and Neonicotinoids in Water by Gas and Liquid Chromatography. *Zhurnal Analiticheskoi Khimii*, 67, 398-403 (2012).
- [21] P. Wang, X. Yang, J. Wang, J. Cui, et al. Multi-residue method for determination of seven neonicotinoid insecticides in grains using dispersive solid-phase extraction and dispersive liquid–liquid micro-extraction by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 134, 1691-1698 (2012).
- [22] W. Xie, C. Han, Y. Qian, H. Ding, et al. Determination of neonicotinoid pesticides residues in agricultural samples by solid-phase extraction combined with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218, 4426-4433 (2011).
- [23] A. Angioni, L. Porcu, F. Pirisi. LC/DAD/ESI/MS Method for the Determination of Imidacloprid, Thiacloprid, and Spinosad in Olives and Olive Oil after Field Treatment. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 59, 11359-11366 (2011).
- [24] Y. Li, Y. Jiang, J. Li, et al. Determination of Multiresidues in Rapeseed, Rapeseed Oil, and Rapeseed Meal by Acetonitrile Extraction, Low-Temperature Cleanup, and Detection by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. *Journal Agricultura and Food Chemistry*. 60, 5089-5098 (2012).
- [25] K. Lichtmannegger, R. Fischer, F. X. Steemann, H. Unterluggauer and S. Masselter. Alternative QuEChERS-based modular approach for pesticide residue analysis in food of animal origin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407 (13), 3727-3742 (2015).
- [26] Y-L.Wu, R-X. Chen, Y. Xue, T. Yang, J. Zhao and Y. Zhu. Simultaneous determination of amantadine, rimantadine and memantine in chicken muscle using multi-walled carbon nanotubes as a reversed-dispersive solid phase. *J. Chromatography B*, 965, 197-205 (2014).
- [27] A. Di Muccio, P. Fidente, D. A. Barbini, R. Dommarcoa, et al. Application of solid-phase extraction and liquid chromatography–mass application to behavioral dynamics. *Biomedical Chromatography*, 25, 136-146 (2011).

- [28] M. Chen, M. Collins, M. Erin, L. Tao et al. Simultaneous determination of residues in pollen and high-fructose corn syrup from eight neonicotinoid insecticides by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405 (28), 9251-9264 (2013).
- [29] P. Parrilla; A. Lozano; S. Ucles et al. A sensitive and efficient method for routine pesticide multiresidue analysis in bee pollen samples using gas and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1426, 161-173 (2015).
- [30] A.C. Martel, C. Lair. 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, 978-988 (2011).
- [31] L. Haroune, R. Cassoulet, M.-P. Lafontaine et al. Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Tandem Mass Spectrometry for the Determination of Neonicotinoid Insecticides in Honey Samples Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction. *Analytica Chimica Acta*, 891 (2015).
- [32] L. Chen, Y. Qin, X. Yang et al. Simultaneous determination of seven insecticides in soft drinks and fruit juices using ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry with product ion confirmation scan mode. *Analytical Methods*, 8 (3), 666-672 (2016).
- [33] M. Gbylik-Sikorska, T. Sniegocki, A. Posyniak. Determination of neonicotinoid insecticides and their metabolites in honey bee and honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 990, 132-140 (2015).
- [34] M. Proietto Galeano, M. Scordino, L. Sabatino, V. Pantò, G.I. Morabito, E. Chiappara, P. Traulo, and G. Gagliano. UHPLC/MS-MS Analysis of Six Neonicotinoids in Honey by Modified QuEChERS: Method Development, Validation, and Uncertainty Measurement. *International Journal of Food Science*, 2013, 1-7 (2013).

- [35] T. Blacquièrre, G. Smagghe, C.A.M. van Gestel, V. Mommaerts. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 21, 973-992 (2012).
- [36] C. J. Anagnostopoulos, P.A. Sarli, K. Liapis et al. Validation of Two Variations of the QuEChERS Method for the Determination of Multiclass Pesticide Residues in Cereal-Based Infant Foods by LC-MS/MS. *Food Analytical Methods*, 5 (4), 664-683 (2012).
- [37] J. Li, J. Zhang, H. Liu et al. A comparative study of primary secondary amino (PSA) and multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) as QuEChERS absorbents for the rapid determination of diazepam and its major metabolites in fish samples by high-performance liquid chromatography-electrospray. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96 (2), 555-560 (2016).
- [38] U. Koesukwiwat, S. J. Lehotay, K. Mastovska, K. J. Dorweiler and N. Leepipatiboon. Extension of the QuEChERS Method for Pesticide Residues in Cereals to Flaxseeds, Peanuts, and Doughs. *J. Agric. Food Chem.* 58, 5950-5958 (2010).
- [39] P-Y. Zhao, L.Wang, L. Zhou, F-Z. Zhang, S.Kang and C-P. Pan. Multi-walled carbon nanotubes as alternative reversed-dispersive solid phase extraction materials in pesticide multi-residue analysis with the QuEChERS method. *J. Chromatography. A*, 1225, 17-25 (2012).
- [40] W. Wang, Y. Li, Q. Wu, C. Wang , et al. Extraction of neonicotinoid insecticides from environmental water samples with magnetic graphene nanoparticles as adsorbent followed by determination with HPLC. *Anal. Methods*, 4, 766-772 (2012).
- [41] N. Campillo, P. Viñas, G. Férrez-Melgarejo, and M. Hernández-Córdoba. Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Tandem Mass Spectrometry for the Determination of Neonicotinoid Insecticides in Honey Samples Using Dispersive Liquid–Liquid Microextraction. *J. Agric. Food Chem.* 61, 4799-4805 (2013).

- [42]** S. Zheng, H. Wu, Z. Li, J. Wang, H. Zhang, M. Qian. Ultrasound/microwave-assisted solid–liquid–solid dispersive extraction with high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the determination of neonicotinoid insecticides in *Dendrobium officinale*. *J. Sep. Sci.* 38, 121-127 (2015).
- [43]** Karen P. Yáñez, José L. Bernal, María J. Nozal, María T. Martín and José Bernal. Analysis of seven neonicotinoid insecticides in bee pollen by solid-liquid extraction and liquid chromatography electrospray mass spectrometry. *Food Analytical Methods* 7, 2, 490-499 (2014).

VII.ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
APCI	Ionización Química a Presión Atmosférica
CAR	Centro Apícola Regional
CCD	Colony Collapse Disorder (Trastorno y colapso de las colonias)
CH_2Cl_2	Diclorometano
CV%	Coefficiente de variación porcentual
DAD	Diode Array Detection (Detección por arreglo de diodos alineados)
DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva
dSPE	Dispersive Solid Phase Extraction (Extracción en fase solida dispersiva)
EFSA	European Food Safety Authority (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)
EM	Efecto Matriz
EPA	Agencia de Protección del Medio ambiente
ESI	Ionización por Electro Spray
EtOH	Etanol
FAO	Food and Agriculture Organization (Organización por los alimentos y la agricultura)
FIA	Análisis por inyección de flujo
FLD	Fluorescencia
GC	Cromatografía gaseosa
GCB	Carbón grafitizado
GC-NPD	cromatografía de gases acoplada a un detector de nitrógeno-fósforo
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
H_2O	Agua
LC	Cromatografía líquida
LLE	Extracción líquido-líquido
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
MAE	Extracción asistida por microondas
MeOH	Metanol
$MgSO_4$	Sulfato de magnesio
MS	Espectrometría de masas

MS/MS Espectrometría de masas en tandem

MWCNTs Multi-Walled Carbon Nanotubes

NaCl Cloruro de sodio

Na₃citrato * 2 H₂O Trisodiocitrato dihidratado, o citrato trisódico dihidratado.

Na₃citrato * 6 H₂O Trisodiocitrato hexahidratado, o citrato trisódico sesquihidratado.

NQ No cuantificado

OAOC Association of Official Agricultural Chemists

OMS Organización Mundial de la Salud

PSA Amina primaria y secundaria

QuEChERS Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (Rápido, fácil, económico, eficaz, robusto y seguro).

r.p.m. Revoluciones por minuto

RSD% Porcentaje de desviación estándar relativa

SIM Monitorización de ion seleccionado

SPE Extracción en fase sólida

SFE Extracción por fluidos supercríticos

USA Estados Unidos de América

UHPLC Ultra high performance liquid chromatography

UV Ultravioleta

Z-Sep. Zirconium Dioxide-Based Sorbent