



7^{mo}
Congreso de
Medio Ambiente

Actas 7mo Congreso de Medio Ambiente AUGM
22 al 24 de mayo de 2012. UNLP. La Plata Argentina

ANÁLISIS MULTIRESIDUO DE 45 PESTICIDAS EN PRODUCTOS DE LA COLMENA: APLICACIÓN DE UN MÉTODO SENCILLO DE EXTRACCIÓN

Multi residual analysis of 45 pesticides from beehive products: application of a simple extraction method

Silvina Niell ^{a,b}, Verónica Cesio ^{a*}, Julia Hepperle ^c, Daniela Roux ^c, Larissa Kirsch ^c, Diana Kolberg ^c, Michelangelo Anastassiades ^c, Horacio Heinzen ^a

^a Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, Gral. Flores 2124 Montevideo, Uruguay

^b Polo Agroalimentario y Agroindustrial, Departamento de Química del Litoral, Centro Universitario Paysandú, Universidad de la República, Ruta 3 km 363, Paysandú, Uruguay

^c CVUA Stuttgart, European Union Reference Laboratory-SRM, Schaflandstrasse 3/2, Fellbach, Alemania

*Autor para correspondencia: +59829244068. cs@fq.edu.uy

Palabras clave: miel, cera, análisis, pesticidas

Keywords: honey, beeswax, analysis, pesticides

Título Abreviado: Análisis multiresiduo de 45 pesticidas en productos de la colmena

ABSTRACT

From an environmental point of view, beehive products contain very valuable information about the environmental quality of the region where the beehive is placed. Therefore, in Europe, bees (*Apis mellifera*) and hives are used as bioindicators of environmental quality of a region. When bees search for nectar and pollen through the vegetation, they collect contaminants that are distributed within the hive according to their physicochemical properties. For this reason it is more likely to find pesticides with high K_{ow} in higher amounts in beeswax than in honey for example. The first step to be able to adapt and use all these knowledge in our region is to choose which pesticides will be looked for. The evaluated pesticides were selected based on the probability to be found in hive products, reflected by the frequency of residue findings in hive products derived from literature and the pesticides-online database. Recent data concerning the usage and import of pesticides in Uruguay was also considered. From an analytical point of view, hive products are complex matrices for pesticide multiresidue analysis due to the large amounts of co-extractives that are obtained in traditional methods which require several clean-up steps and different, specific procedures for each matrix. The application of a quick and simple methodology named QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) is presented. It has been mainly applied for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables, but with small modifications is suitable for the analysis of beeswax and honey. The extraction is made with acetonitrile at room temperature adding water for honey and at 80 °C in water bath for beeswax, it is then followed by freeze-out clean-up (-20 °C in freezer for 15 hs). Further clean-up of the extract is achieved adding PSA (Primary and Secondary Amine) afterwards. The method presented recoveries in both matrices between 70 and 120 % with RSD below 20 % for more than 90 % of the evaluated pesticides analyzed by LC-MS/MS.

RESUMEN

Los productos de la colmena como cera y miel son desde el punto de vista ambiental reservorios de información muy valiosa sobre la calidad del ambiente en el que se encuentra la colmena, tanto es así, que las abejas (*Apis mellifera*) y la colmena se utilizan en Europa como bioindicador de calidad ambiental de una región. Las abejas en su recorrido por la vegetación en busca de néctar y polen colectan contaminantes que luego se distribuyen dentro del ecosistema de la colmena según las propiedades fisicoquímicas de los mismos. De esta forma es que es más probable encontrar en mayor concentración los pesticidas con K_{ow} alto en cera que en miel por ejemplo. El primer paso para poder adaptar y utilizar todo este conocimiento en nuestra región es conocer y elegir bien qué pesticidas buscar. En este caso, la selección de los pesticidas evaluados se realizó en base a la probabilidad de ser encontrados en productos de la colmena, determinada mediante la frecuencia de aparición de muestras positivas en la bibliografía y en la base de datos “pesticides-online”. Se consideraron además datos recientes de la importación de pesticidas en Uruguay. Desde el punto de vista analítico, para el análisis multiresiduo de pesticidas, los productos de la colmena son matrices complejas debido al gran número de co-extractivos que se obtienen con los métodos tradicionales de análisis requiriendo varios pasos de purificación de los extractos y procedimientos específicos y diferentes para cada matriz. En este trabajo se presenta la aplicación de una metodología de extracción sencilla y rápida llamada QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) que ha sido utilizada fundamentalmente para el análisis de trazas de pesticidas en frutas y hortalizas, que con pequeñas modificaciones es adaptable tanto para el análisis de cera como miel. El solvente de extracción es acetonitrilo y la misma se realiza a temperatura ambiente agregando agua para miel y a 80°C en baño de agua para cera, luego se realiza una purificación que consiste en

colocar el extracto en freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 hs y filtrar. Una purificación más exhaustiva se logra agregando luego PSA (Primary and Secondary Amine). El método presentó recuperaciones entre 70 y 120 % con DSR menores a 20 % para más del 90 % de los pesticidas evaluados en ambas matrices analizados por LC-MS/MS.

INTRODUCCIÓN

Los productos de la colmena como cera y miel son desde el punto de vista ambiental reservorios de información muy valiosa sobre la calidad del ambiente en el que se encuentra la colmena, tanto es así, que las abejas (*Apis mellifera*) y la colmena se utilizan en Europa como bioindicador de calidad ambiental de una región. (Balayiannis & Balayiannis, 2008; Celli & Maccagnani, 2003; Chauzat *et al.*, 2011; Ghini *et al.*, 2004; Porrini *et al.*, 2002). Las abejas en su recorrido por la vegetación en busca de néctar y polen colectan contaminantes que luego se distribuyen dentro del ecosistema de la colmena según las propiedades fisicoquímicas de los mismos. De esta forma es que es más probable encontrar en mayor concentración los pesticidas con K_{ow} alto en cera que en miel por ejemplo. Recientemente se han realizado distintos monitoreos y estudios en Europa y Estados Unidos encontrándose residuos de pesticidas en productos de la colmena (Fell & Cobb, 2009; Johnson *et al.*, 2010; Mullin *et al.*, 2010; Porrini *et al.*, 2003).

Sin embargo, los pesticidas y agroquímicos que se emplean en los sistemas productivos mixtos como los de la región MERCOSUR donde coexisten actividades ganaderas y agrícolas no son idénticos a los de los estudios mencionados, por lo que una selección adecuada de los pesticidas a monitorear es el primer paso para adaptar y utilizar todo este conocimiento en nuestra región.

Desde el punto de vista analítico, para el análisis multiresiduo de pesticidas, los productos de la colmena son matrices complejas debido al gran número de co-extractivos que se obtienen con los métodos tradicionales de análisis requiriendo varios pasos de purificación de los extractos y procedimientos específicos y diferentes para cada matriz.

Existen distintos métodos analíticos para el análisis de residuos en productos de la colmena donde se utiliza tanto cromatografía líquida como gaseosa acoplada a detectores clásicos como arreglo de diodos, detector fotométrico de llama y de nitrógeno y fósforo y detectores de última generación como masas en tándem para la determinación instrumental de los pesticidas (Bargańska & Namieśnik, 2010; Bonzini *et al.*, 2011; Fernandez *et al.*, 2002; Fernández *et al.*, 2002a; Herrera *et al.*, 2005; Pirard *et al.*, 2007; Rissato *et al.*, 2007; Tomasini *et al.*, 2011; Wiest *et al.*, 2011). Las ventajas de los detectores de masas en tándem frente a los detectores clásicos son su exactitud en la determinación del compuesto, su elevada sensibilidad y capacidad para detectar concentraciones de pesticidas mucho más bajas (Fernández *et al.*, 2002; Wiest *et al.*, 2011).

Miel y cera son las primeras matrices seleccionadas para comenzar un estudio que involucrará además el análisis de abejas y polen. Lo que se buscará a través de este experimento será entender y poder predecir la distribución de los contaminantes dentro de la colmena para estudiarla como bioindicador evaluando cuál o cuáles de sus productos son más sensibles y adecuados para conocer el estado ambiental de la región en la que se encuentra. Para alcanzar estos objetivos, se obtendrán muestras reales de todas estas matrices a partir de experimentos específicamente diseñados, controlando la mayor cantidad posible de fuentes de error, con un esquema de muestreo ajustado para obtener resultados confiables.

Como base y disparador del presente trabajo se cuenta con el estudio realizado por nuestro grupo en el que se utilizaron métodos para el análisis de residuos de pesticidas

en miel, cera, abejas y propóleo en colmenas activas y despobladas utilizando los detectores clásicos (GC-FPD, GC-ECD y LC-DAD) (Pareja *et al.*, 2011).

En este trabajo se presenta la aplicación de una metodología de extracción sencilla y rápida, QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) (Anastassiades, 2007) que ha sido utilizada fundamentalmente para el análisis de trazas de pesticidas en frutas y hortalizas, que con pequeñas modificaciones es adaptable tanto para el análisis de cera como miel para la determinación de pesticidas por cromatografía líquida acoplada a masas en tándem (LC-MS/MS-QLiT) en modo positivo y negativo, logrando de esta manera límites de detección adecuados para la cuantificación de contaminantes traza.

METODOLOGÍA

Preparación de muestras

Se ajustó la metodología de análisis multiresiduo, QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) (Anastassiades, 2007) a la que se le realizaron las variaciones necesarias de acuerdo a las dos matrices en estudio, miel y cera. Se busca de esta manera la optimización de los parámetros analíticos (recuperación, precisión, exactitud, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) para analizar los 45 pesticidas seleccionados.

Para el caso de miel, se agrega agua al inicio de la extracción y se procede según el protocolo estándar de QuEChERS.

Para el caso de la cera, se realiza una extracción líquido-líquido a 80 °C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El primer paso del estudio fue seleccionar los pesticidas que son relevantes para la región para poder luego comenzar a probar la metodología analítica en las matrices del estudio. En la Tabla 1 se encuentra la lista de los pesticidas seleccionados para el estudio. Se incluyeron en esta selección los pesticidas que son mayormente utilizados tanto en la agricultura, en agropecuaria así como en apicultura. Éstos últimos, son utilizados en la colmena para controlar enfermedades de las abejas, principalmente varroasis y nosemosis. Los más empleados en apicultura son amitraz, bromopropilato, cumafos y tau-fluvalinato. Como se observa en la tabla 1, son pesticidas lipofílicos con un pK_{ow} alto (entre 4.13 y 5.5) que tienden a acumularse en la cera, hecho que es corroborado en la literatura (Adamczyk *et al.*, 2010; Bonzini *et al.*, 2011; Lodesani *et al.*, 2008; Martel *et al.*, 2007; Mullin *et al.*, 2010; Tremolada *et al.*, 2004). Este tema reviste especial importancia pues la concentración que alcanzan los residuos de estos pesticidas es de 100 mg.kg^{-1} o mayor. Las causas más probables para esta acumulación son principalmente dos, por un lado, son pesticidas aplicados directamente dentro de la colmena y por otro la cera ya contaminada es reciclada por los apicultores al iniciar un nuevo núcleo para una instalar una nueva colmena. En miel en cambio, los residuos de estos pesticidas son por lo general no cuantificables o están por debajo de los límites máximos de residuos permitidos en Europa y Estados Unidos (Bonzini *et al.*, 2011; Fell & Cobb, 2009; Tremolada *et al.*, 2004). Sin embargo, Mullin *et al.* reportó la aparición de residuos de fluvalinato y cumafos a 204 y 92 mg.kg^{-1} respectivamente en mieles de Norteamérica. Por otra parte en Uruguay fue reportado por nuestro grupo la aparición de residuos de cumafos, imidacloprid, fipronil, endosulfan, cipermetrina, etion y clorpirifos a niveles entre 0.06 y 1 mg.kg^{-1} (Pareja *et al.*, 2011).

Tabla 1. Lista de los pesticidas del estudio, su clase química, actividad, pK_{ow} y uso.**Table 1.** List of pesticides from this study, its chemical class, activity, pK_{ow} and use.

Pesticida	Clase química	Actividad	pK_{ow}	Uso
Amitraz	formamidina	Acaricida	5.5	apícola/veterinario
Azoxistrobin	estrobilurina	Fungicida	2.5	agrícola
Boscalid	piridincarboxamida	Fungicida	2.96	agrícola
Bromopropilato	benzilato	Acaricida	5.4	apícola/veterinario
Carbaril	carbamato	Insecticida	2.36	agrícola/veterinario
Carbendazim	benzimidazole	Fungicida	1.5	agrícola
Carboxin	oxatin	Fungicida	2.3	agrícola
Clorpirifos	organofosforado	Insecticida	4.7	agrícola/veterinario
Clodinafop-propargyl	ariloxifenoxipropiónico	Herbicida	3.9	agrícola
Cumafos	organofosforado	Insecticida	4.13	apícola/veterinario
Cialotrina-lambda	piretroide	Insecticida	7	agrícola/veterinario
Dicamba	auxina	Herbicida	-0.55	agrícola
Dimetoato	organofosforado	Insecticida	0.704	agrícola
Epoxiconazol	triazol	Fungicida	3.3	agrícola
Fluvalinato-tau	piretroide	Insecticida	4.26	apícola/veterinario
Flutriafol	triazol	Fungicida	2.3	agrícola
Haloxifop	ariloxifenoxipropiónico	Herbicida	1.59	agrícola
Hexitiazox	tiazolidinacarboxamida	Acaricida	2.53	agrícola
Imazalil	imidazol	Fungicida	2.56	agrícola
Imazapir	imidazolinona	Herbicida	0.11	agrícola
Imazetapir	imidazolinona	Herbicida	1.49	agrícola
Imidacloprid	neonicotinoide	Insecticida	0.57	agrícola/veterinario
Iprodiona	dicarboximida	Fungicida	3	agrícola
Linuron	Urea	Herbicida	3	agrícola
Metalaxil	acilalanina	Fungicida	1.75	agrícola
Metomilo	carbamato	insecticida	0.09	agrícola/veterinario
Metoxifenocide	diacilhidrazina	insecticida	3.72	agrícola
Metolaclo	cloroacetamida	herbicida	2.9	agrícola
Metribuzin	triazinona	herbicida	1.6	agrícola
Metsulfuron-metil	sulfonilurea	herbicida	1.7	agrícola
Miclobutanil	triazol	fungicida	2.94	agrícola
Ometoato	organofosforado	insecticida	-0.74	agrícola
Pirimicarb	carbamato	insecticida	1.7	agrícola
Picloram	picolínico	herbicida	-1.92	agrícola
Profenofos	organofosforado	insecticida	4.44	agrícola
Piraclostrobin	estrobilurina	fungicida	3.99	agrícola
Tebuconazol	triazol	fungicida	3.7	agrícola
Tebufenozide	diacilhidrazina	insecticida	4.25	agrícola
Teflubenzuron	benzoilurea	insecticida	4.98	agrícola

Tetraconazol	triazol	fungicida	3.56	agrícola
Tiacloprid	neonicotinoide	insecticida	1.26	agrícola
Tiametoxan	neonicotinoide	insecticida	-0.13	agrícola/veterinario
Tiodicarb	carbamato	insecticida	1.62	agrícola
iofanato-metil	benzimidazol	fungicida	1.45	agrícola/veterinario
Triflumuron	benzoilurea	insecticida	4.9	agrícolaveterinario

Fuente: base de datos <http://www.pesticides-online.com>

La evaluación del método se realizó utilizando los porcentajes de recuperación de los pesticidas para cada matriz que es uno de los parámetros establecidos por las guías europeas para la validación de una metodología para análisis de residuos de pesticidas en alimentos (DG-SANCO, 2011). Se tomó para la evaluación y comparación el criterio establecido por esta reglamentación que define como aceptables las recuperaciones que se encuentran entre 70 y 120 %. El método presentó recuperaciones aceptables (entre 70 y 120 %) con DSR menores a 20% para más del 90% de los pesticidas evaluados en ambas matrices (Figura 1).

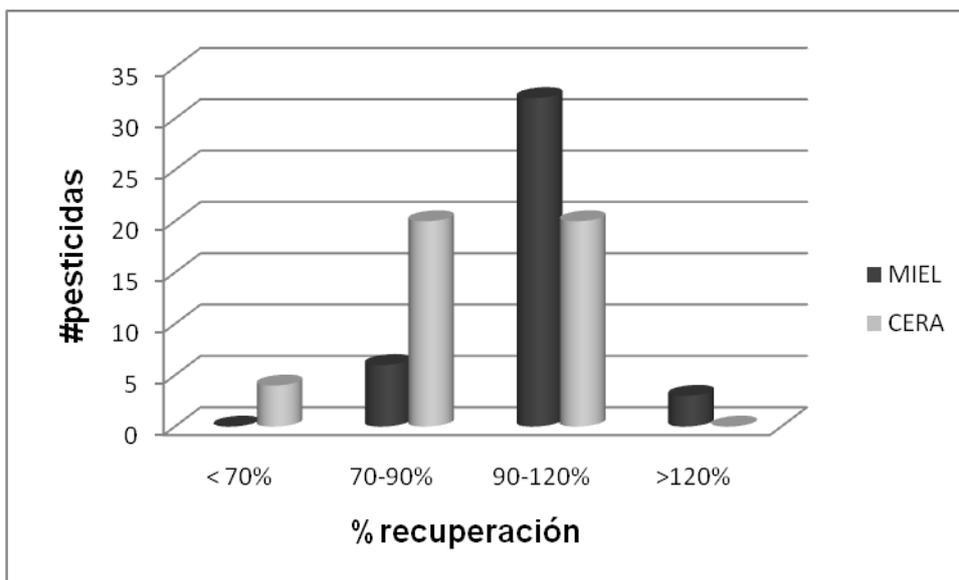


Figura 1. Recuperaciones de los pesticidas evaluados en miel y cera con el método QuEChERS.

Figure 1. Recovery of pesticides assessed in honey and wax with QuEChERS method.

Se evaluaron también los demás parámetros de validación del método, obteniéndose límites de cuantificación entre 0.01 y 0.2 mg.kg⁻¹ y límites de detección entre 0.005 y 0.1 mg.kg⁻¹.

CONCLUSIONES

El método que se presenta tiene la versatilidad de ser aplicable tanto para el análisis de residuos de pesticidas en cera como en miel siendo apropiado para obtener información de la calidad del agroecosistema en el cual se encuentra una colmena. Este es un primer paso necesario ya que el método desarrollado es un insumo analítico fundamental para el estudio global que se planifica realizar. Se plantea como trabajo futuro el análisis de muestras reales que se obtendrán de experimentos que permitan comenzar los estudios sobre la capacidad de la colmena y sus productos para ser utilizados como bioindicadores en nuestra región contemplando las particularidades que la misma presenta.

AGRADECIMIENTOS

CVUA Stuttgart, Facultad de Química, Universidad de la República, PEDECIBA Química y CSIC

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamczyk S, Lázaro R, Pérez-Arquillué C, Bayarri S, & Herrera A. 2010. Impact of the use of Fluvalinate on different types of beeswax from spanish hives. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58(3):733-739
- Anastassiades M, Tasdelen B, Scherbaum E & Stajnbaher D. 2007. Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. En: Ohkawa H, Miyagawa H & Lee PW (ed) , *Pesticide chemistry: Crop protection, public health, environmental safety*. Wiley-VCH, Weinheim: 439-458
- Balayiannis G & Balayiannis P. 2008. Bee honey as an environmental bioindicator of pesticides' occurrence in six agricultural areas of Greece. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 55(3):462-470
- Bargańska Ż & Namieśnik J. 2010. Pesticide analysis of bee and bee product samples. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 40(3): 159-171
- Bonzini S, Tremolada P, Bernardinelli I, Colombo M & Vighi M. 2011. Predicting pesticide fate in the hive (part 1): experimentally determined τ -fluvalinate residues in bees, honey and wax. *Apidologie*, 42(3):378-390
- Celli G & Maccagnani B. 2003. Honey bees as bioindicators of environmental pollution. *Bulletin of Insectology*, 56(1):137-139
- Chauzat M, Martel A, Cougoule N, Porta P, Lachaize J, Zeggane S, Aubert M, Carpentier P & Faucon J. 2011. An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30(1):103-111
- DG-SANCO. 2011. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. Document No SANCO/12495/2011

- Fell R & Cobb J. 2009. Miticide residues in Virginia honeys. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 83(6):822-827
- Fernandez M, Picó Y & Mañes J. 2002. Rapid screening of organophosphorus pesticides in honey and bees by liquid chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia*, 56 (9-10): 577-583
- Fernández M, Picó Y & Mañes J. 2002a. Analytical methods for pesticide residue determination in bee products. *Journal of Food Protection*, 65(9): 1502-1511
- Ghini S, Fernández M, Picó Y, Marín R, Fini F, Mañes J & Girotti S. 2004. Occurrence and distribution of pesticides in the province of Bologna, Italy, using honeybees as bioindicators. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 47(4):479-488
- Herrera A, Pérez-Arquillué C, Conchello P, Bayarri S, Lázaro R, Yagüe C & Ariño A. 2005. Determination of pesticides and PCBs in honey by solid-phase extraction cleanup followed by gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381(3): 695-701
- Johnson R, Ellis M, Mullin C & Frazier M. 2010. Pesticides and honey bee toxicity — USA. *Apidologie*, 41(3): 312-331
- Lodesani M, Costa C, Serra G, Colombo R & Sabatini A. 2008. Acaricide residues in beeswax after conversion to organic beekeeping methods. *Apidologie*, 39(3):324-333
- Martel AC, Zeggane S, Aurières C, Drajnudel P, Faucon JP & Aubert M. 2007. Acaricide residues in honey and wax after treatment of honey bee colonies with Apivar® or Asuntol®50. *Apidologie*, 38(6):534-544

- Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, vanEngelsdorp D, and Pettis JS. 2010. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS ONE* 5(3):e9754
- Pareja L, Colazzo M, Pérez-Parada A, Niell S, Carrasco-Letelier L, Besil N, Cesio MV & Heinzen H. 2011. Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8(10): 3844-3858
- Pirard C, Widart J, Nguyen BK, Deleuze C, Heudt L, Haubruge E, de Pauw E & Focant JF. 2007. Development and validation of a multi-residue method for pesticide determination in honey using on-column liquid-liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1152(1-2): 116-123
- Porrini C, Ghini S, Girotti S, Sabatini A, Celli G & Gattavecchia E. 2002. Use of honey bees as bioindicators of environmental pollution in Italy. En: Devillers J & Pham-Delègue M (ed) *Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals* CRC Press, United Kingdom: 186-247
- Porrini C, Sabatini AG, Girotti S, Ghini S, Medrzycki P, Grillenzoni F, Bortolotti L, Gattavecchia E & Celli G. 2003. Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination. *Apiacta*, 38:63-70
- Rissato SR, Galhiane MS, de Almeida MV, Gerenutti M & Apon BM. 2007. Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography-mass spectrometry and application in environmental contamination. *Food Chemistry*, 101(4): 1719-1726
- Tomasini D, Sampaio MRF, Cardoso LV, Caldas SS & Primel EG. 2011. Comparison of dispersive liquid-liquid microextraction and the modified QuEChERS method for the determination of fipronil in honey by high

performance liquid chromatography with diode-array detection. *Analytical Methods*, 3(8):1893-1900

- Tremolada P, Bernardinelli I, Colombo M, Spreafico M & Vighi M. 2004. Coumaphos distribution in the hive ecosystem: case study for modeling applications. *Ecotoxicology* 13(6): 589-601

- Wiest L, Buleté A, Giroud B, Fratta C, Amic S, Lambert O, Pouliquen H & Arnaudguilhem C. 2011. Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1218(34): 5743-5756