

# Trabajo Fin de Grado

## Facultad de Ciencias Experimentales



Grado en Química

Determinación de neuropéptidos en cerebro de abeja europea (*Apis mellifera*) mediante LC-QqQ-MS

Determination of neuropeptides in the brain of honeybees (*Apis mellifera*) by LC-QqQ-MS

Germán Muñoz Bruque  
(Curso académico 2016-2017)  
06/07/2017

Tutor/es  
Dra. M<sup>a</sup> Dolores Gil García  
Departamento de Química y Física  
Dra. María Martínez Galera  
Departamento de Química y Física



**Determinación de neuropéptidos en cerebro de abeja europea (*Apis mellifera*) mediante LC-QqQ-MS**

Memoria del Trabajo Fin de Grado en Química presentada por  
Germán Muñoz Bruque

Almería, 6 de Julio de 2017

Fdo: Germán Muñoz Bruque

Fdo: M<sup>a</sup> Dolores Gil García

Fdo: María Martínez Galera



*“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”*

*Albert Einstein*

*“Un científico debe tomarse la libertad de plantear cualquier cuestión, de dudar de cualquier afirmación, de corregir errores”*

*Robert Oppenheimer*

### **Agradecimientos**

Quiero agradecer en primer lugar a mis tutoras Dña. María Dolores Gil García y Dña. María Martínez Galera por su gran ayuda y conocimientos.

También quería agradecer a D. Amadeo Rodríguez Fernández-Alba y a todo su grupo de investigación por haberme permitido hacer el Trabajo Fin de Grado en su laboratorio y por lo bien que me han tratado cada día que he pasado allí. Especialmente a Dña. María del Mar Gómez Ramos, por todo lo que me ha ayudado, enseñado y aguantado durante este tiempo.

Sin todos ellos este trabajo no sería posible, muchas gracias.



**MEMORIA**



## ÍNDICE

1. RESUMEN .....	1
2. ABSTRACT.....	1
3. INTRODUCCIÓN .....	3
3.1. LAS ABEJAS MELÍFERAS .....	3
3.1.1. Importancia de las abejas melíferas y otros polinizadores. Valor económico de la polinización .....	3
3.1.2. Factores relacionados con la despoblación de las abejas.....	4
3.1.3. Antecedentes relativos al efecto de los plaguicidas sobre las abejas.....	7
3.1.4. Papel de los neuropéptidos en la organización y el comportamiento de la abeja melífera.....	12
3.2. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS .....	14
3.2.1. Características generales de la Cromatografía de Líquidos.....	14
3.2.2. Cromatografía de Líquidos en fase reversa.....	14
3.3. ESPECTROMETRÍA DE MASAS .....	16
3.3.1. Características generales de la Espectrometría de Masas.....	16
3.3.2. Componentes de un Espectrometro de Masas .....	17
3.3.2.1 Sistema de entrada de la muestra.....	17
3.3.2.2 Fuentes de ionización en LC.....	17
3.3.2.3 Analizadores de Masas .....	22
3.4. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE NEUROPEPTIDOS EN ABEJA.....	25
4. OBJETIVOS .....	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
5.1. REACTIVOS Y MATERIALES.....	29
5.2. PROCEDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS DE NEUROPEPTIDOS MEDIANTE LC-MS .....	30
5.2.1. Análisis mediante LC-QqQ-MS/MS.....	30
5.2.2. Análisis mediante LC-TOF-MS.....	30
5.3. PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE NEUROPEPTIDOS EN ABEJA.....	31
5.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO.....	31
5.5. MUESTRAS REALES DE ABEJAS.....	32
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	32
6.1. PARÁMETROS DE LC-MS/MS .....	32
6.2. OPTIMIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE NEUROPEPTIDOS EN ABEJA .....	36

6.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO.....	37
6.4. APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES .....	40
7. CONCLUSIONES.....	46
8. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS .....	47

## 1. RESUMEN

La disminución del número de abejas, el polinizador más importante de la naturaleza, ha puesto en alerta a los investigadores. Entre las causas de este fenómeno se encuentra el uso de plaguicidas, especialmente los insecticidas. Estudios parecen indicar que los plaguicidas afectan a la concentración de los neuropéptidos en abejas, siendo estos los responsables de actividades relacionadas con la organización y el comportamiento en los polinizadores.

Este trabajo presenta un método de extracción de neuropéptidos en cerebros de abeja para su identificación y cuantificación mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo. Para poder estudiar si la asociación a plaguicidas afecta a la concentración de neuropéptidos, se valida un método en términos de linealidad, efecto matriz, límite de cuantificación, exactitud y precisión y se aplica a muestras de abejas melíferas procedentes de colmenares españoles. Los resultados obtenidos confirman la disminución en la concentración de neuropéptidos en cerebros de abejas expuestas a plaguicidas.

**Palabras clave:** *Neuropéptidos, abejas, cromatografía de líquidos, espectrometría de masas, Apis mellifera.*

## 2. ABSTRACT

The decrease of the number of bees, the most important pollinator in nature, has put the researchers on alert. Among the causes of this phenomenon is the use of pesticides, especially insecticides. Studies suggest that pesticides affect the concentration of neuropeptides in bees, which are responsible for activities related to organization and behavior in pollinators.

This work presents a method of extracting the neuropeptides in bee brains for their identification and quantification by liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. In order to study if the association with pesticides affects the concentration of neuropeptides, a method is validated in terms of linearity, matrix effect, limit of quantification, accuracy and precision, and is applied to samples of honey bees from Spanish apiaries. The results obtained confirm the decrease in the concentration of neuropeptides in brains of bees exposed to pesticides.

**Keywords:** *Neuropeptide, bee, liquid chromatography, mass spectrometry, Apis mellifera.*



### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. LAS ABEJAS MELÍFERAS

##### 3.1.1. Importancia de las abejas melíferas y otros polinizadores. Valor económico de la polinización

Aunque las abejas no son los únicos polinizadores ni los más eficientes, sí son los más importantes. Entre las más especializadas se encuentra la abeja melífera (*Apis mellifera* ssp), de la cual podría decirse que es el polinizador dominante y principal desde el punto de vista económico en la mayoría de las regiones geográficas. Según Klein y col.<sup>1</sup>, de los 115 principales productos alimenticios mundiales, 52 dependen de la polinización para la producción de frutos o semillas. Estos autores han puesto de manifiesto que 5 de los alimentos cuya producción depende de las abejas experimentarían una reducción  $\geq 90\%$  en su ausencia y, por otra parte, la producción de los cultivos en cuanto a tamaño de frutos, calidad y cantidad se vería reducida en el rango del 90-40% para 16 productos, en el intervalo 10-40% para 19 productos y en un porcentaje  $< 10\%$  para 13 productos.

En 1997 se publicó el primer cálculo relativo al valor económico de la polinización, arrojando un valor de 117 mil millones de dólares (88 mil millones de euros)<sup>2</sup>, valor que en 2009 se incrementó hasta 153 mil millones de dólares (115 mil millones de euros)<sup>3</sup> pasando a 265 mil millones de euros en 2012<sup>4</sup>. Los datos más recientes estiman que los polinizadores, incluyendo abejas melíferas, abejorros y abejas silvestres, contribuyen cada año en al menos 22 billones de euros a la industria agrícola europea<sup>5</sup> y aseguran la polinización de aproximadamente un 80% de los cultivos y plantas silvestres en Europa. Sin embargo, si se considera que si la polinización natural cesase sería imposible de sustituir, su valor puede considerarse infinito.

Además, hasta un 90% de la flora Silvestre necesita de la polinización por insectos para su reproducción, por lo que otros compartimentos ecológicos y habitats naturales también dependen de manera directa o indirecta de estos polinizadores<sup>6</sup>.

Por otra parte, las abejas proporcionan otros productos apícolas con un considerable valor económico como miel, polen, cera, própolis y jalea real.

Con una producción de alrededor de 250.000 toneladas al año, la UE es el segundo productor mundial de miel después de China<sup>7</sup>, mientras que a nivel nacional

---

<sup>1</sup> Klein, A.M.; Vaissière, B.E.; Cane, J.H.; Steffan-Dewenter, I.; Cunningham, S.A.; Kremen, C.; Tscharntke, T., Importance of pollinators in changing landscapes for world crops, *Proc. Biol. Sci.* **2007**, *274*, 303–313.

<sup>2</sup> Costanza, R.; d'Arge, R.; de Groot, R.; Farber, S.; Grasso, M.; Hannon, B.; Limburg, K.; Naeem, S.; O'Neill, R.V.; Paruelo, J.; Raskin, R.G.; Sutton, P.; van den Belt, M., The value of the world's ecosystem services and natural capital, *Nature* **1997**, *387*, 253-260.

<sup>3</sup> Gallai, N.; Salles, J.M.; Settele, J.; Vaissière, B.E., Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline, *Ecol. Econ.* **2009**, *68*, 810-821.

<sup>4</sup> Lautenbach, S.; Seppelt, R.; Liebscher, J.; Dormann, C.F., Spatial and temporal trends of global pollination benefit, *PLoS ONE* **2012**, *7*(4): e35954. doi:10.1371/journal.pone.0035954.

<sup>5</sup> European Commission [https://ec.europa.eu/food/animals/live\\_animals/bees\\_en](https://ec.europa.eu/food/animals/live_animals/bees_en)

<sup>6</sup> Bees in decline. A review of factors that put pollinators and agriculture in Europe at risk. Greenpeace Research Laboratories Technical Report (Review) 01/2013

la producción ha sido de 6888 toneladas de miel y 269 toneladas de cera en Andalucía en el año 2015, superadas ligeramente por la Comunidad Valenciana y Extremadura<sup>8</sup>.

### 3.1.2. Factores relacionados con la despoblación de abejas

Actualmente, se considera que son numerosos los motivos por los que las abejas melíferas se encuentran amenazadas en todo el mundo, si bien ninguno de ellos puede considerarse por sí solo el responsable de la disminución en su número o del deterioro de su salud, pudiendo actuar independientemente o en combinación<sup>6</sup>.

La aparición del “colony collapse disorder” (CCD), primero en EEUU<sup>9,10</sup> y después en otros países<sup>11</sup>, incrementó los estudios relativos a las causas implicadas en la disminución en el número de este importante polinizador. El CCD consiste en el abandono de la colmena por parte de las abejas obreras, quedando en ellas alimentos (miel, néctar y polen) en buenas condiciones, así como crías en diferentes etapas de su desarrollo, sin que sean ocupadas por abejas procedentes de otras colmenas<sup>12</sup>.

Este fenómeno, que tiene lugar a nivel mundial, fue destacado por Naciones Unidas, haciendo un llamamiento para introducir cambios en el manejo de las colmenas a fin de preservar este importante insecto.

Además del CCD, cabe citar como otros factores causantes de la reducción de las poblaciones de abejas melíferas el ácaro *Varroa destructor*, que constituye el principal problema de la apicultura europea, seguido por los microsporidios *Nosema apis* y *Nosema ceranae* y, en menor extensión, por el ácaro *Acarapis woodi* y el hongo *Ascosphaera apis*, así como la exposición a pesticidas.

Dado que la agricultura depende del uso de plaguicidas para controlar las plagas y conseguir adecuados rendimientos, las abejas resultan expuestas a estos productos durante el pecoreo y a través de la alimentación.

El grupo de agroquímicos que implica un mayor riesgo para los polinizadores son los insecticidas, resultando los más peligrosos los neonicotinoides<sup>13</sup>. Estos son

---

<sup>7</sup> Aplicación de las medidas relativas al sector apícola del Reglamento (UE) n.º 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo por el que se crea la organización común de mercados de los productos agrarios; <http://ec.europa.eu/transparency/regdoc/rep/1/2016/ES/COM-2016-776-F1-ES-MAIN-PART-1.PDF>

<sup>8</sup> Subdirección General de Productos Ganaderos, El sector de la miel en cifras. 2015 [http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-anaderos/indicadoreseconomicossectorapicola2015\\_tcm7-381460.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-anaderos/indicadoreseconomicossectorapicola2015_tcm7-381460.pdf)

<sup>9</sup> Vanengelsdorp, D.; Underwood, R.; Caron, D.; Hayes Jr., J., An estimate of managed colony losses in the winter of 2006 – 2007: A report commissioned by the apiary inspector of America, *Am. Bee J.* **2007**, *147*, 599-603.

<sup>10</sup> Vanengelsdorp, D.; Hayes Jr., J.; Underwood, R.M., Pettis, J., *PLoS ONE*/ [www.plosone.org](http://www.plosone.org), **2008**, *3*, e4071, 1-6.

<sup>11</sup> Bacandritsos, N.; Granato, A.; Budge, G.; Papanastasiou, E.; Roinioti, E.; Caldon, M.; Falcaro, C.; Gallina, A.; Mutinelli, F., Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies, *J. Invertebr. Pathol.* **2010**, *105*, 335-340.

<sup>12</sup> Spivak, M.; Mader, E.; Vaughan, M.; Euliss Jr. N.H., The Plight of the Bees, *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 34-38.

<sup>13</sup> Godfray H.C.J.; Blacquière T.; Field L.M.; Hails R.S.; Petrokofsky G.; Potts S.G.; Raine N.E.; Vanbergen A.J.; McLean A.R., A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators, *Proc. R. Soc. B* **2014**, *281*: 20140558.

insecticidas sistémicos que, tras ser aplicados, penetran en el sistema vascular de la planta distribuyéndose por toda ella. Además, algunos insecticidas de este grupo se utilizan para el recubrimiento de semillas, las cuales quedan protegidas de posibles plagas entre la siembra y la germinación. Sin embargo, durante la germinación y el crecimiento de la planta, los neonicotinoides se extienden a través de la planta, alcanzando los tallos y hojas e incluso el agua de gutación, llegando, más tarde, al polen y el néctar. Por lo tanto, en el polen recogido por las abejas, que constituye su principal fuente de proteínas y que juega un papel importantísimo en la salud de la colonia, pueden encontrarse niveles elevados de residuos de plaguicidas<sup>6</sup>.

Aparte de los neonicotinoides, las abejas melíferas se encuentran expuestas a otros insecticidas, herbicidas y fungicidas que pueden ejercer efectos sinérgicos.

Otros polinizadores, como los abejorros, presentan una sensibilidad semejante a los parásitos similares al *Nosema* y a los plaguicidas y sus poblaciones también están disminuyendo<sup>14-17</sup>.

Por estos motivos, la mayoría de los países ha publicado marcos legales para proteger a las abejas melíferas y otros insectos polinizadores de los efectos negativos de los plaguicidas, con decretos relevantes como la Directiva Europea del Consejo 91/414/CEE, modificada por la directiva 2010/21/UE<sup>18</sup> y la Ley Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas (FIFRA) que regula la distribución, venta y uso de los plaguicidas en EEUU<sup>19</sup>.

A causa de diferentes episodios de liberación accidental de clotianidina, tiametoxam, fipronil e imidacloprid, que tuvieron lugar en diferentes Estados Miembros de la UE, originando considerables pérdidas en la población de las colmenas<sup>20</sup>, la Comisión publicó la Directiva 2010/21/UE de la Comisión de 12 de marzo de 2010 por la que se modifica el anexo I de la directiva 91/414/CEE en lo que respecta a las disposiciones específicas relativas a clotianidina, tiametoxam, fipronil e imidacloprid, estableciendo la obligación de desarrollar programas de

---

<sup>14</sup> Williams, P.H.; Osborne, J.L., Bumblebee vulnerability and conservation world-wide, *Apidologie*, **2009**, *40*, 367-387.

<sup>15</sup> Winfree, R.; Aguilar, R.; Vázquez, D.P.; LeBuhn, G.; Aizen, M.A., A meta-analysis of bees' responses to anthropogenic disturbance, *Ecology*, **2009**, *90*, 2068-2076.

<sup>16</sup> Alaux, C.; Brunet, J.-L.; Dussaubat, C.; Mondet, F.; Tchamitchan, S.; Cousin, M.; Brillard, J.; Baldy, A.; Belzunces, L.P.; Le Conte, Y., Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*), *Environ. microbiol.*, **2010**, *12*, 774-782.

<sup>17</sup> Cameron, S.A.; Lozier, J.D., Strange, J.P.; Koch, J.B.; Cordes, N.; Solter, L.F.; Griswold, T.L., Patterns of widespread decline in North American bumble bees, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **2011**, *108*, 662-667.

<sup>18</sup> Directiva 2010/21/UE de la Comisión Europea de 12 de marzo de 2010 por la que se modifica el anexo I de la Directiva 91/414/CEE por lo que respecta a las disposiciones específicas relativas a la clotianidina, el tiametoxam, el fipronil y el imidacloprid. *Diario Oficial de la Unión Europea*, **2010**.

<sup>19</sup> Federal de insecticide, fungicide, and rodenticide act, **Sept. 28, 2012**, 112-177. URL: <https://www.agriculture.senate.gov/imo/media/doc/FIFRA.pdf>

<sup>20</sup> Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Programa de vigilancia piloto de las enfermedades de las abejas, **2012**. URL: <http://rasve.mapa.es/publica/programas/NORMATIVA%20Y%20PROGRAMAS%5CPROGRAMAS%5C2012%5CAPICULTURA%5CPROGRAMA%20DE%20VIGILANCIA%20PILOTO%20DE%20LAS%20ENFERMEDADES%20DE%20LAS%20ABEJAS.PDF>

seguimiento de estas sustancias activas para llevar a cabo la verificación de la exposición real de las abejas a esas sustancias.

En abril de 2013, aún sin el acuerdo de todos los Estados Miembros, la Comisión de apelación de la UE aprobó una propuesta (*Abejas y plaguicidas. La comisión procederá con un plan para proteger mejor las abejas*)<sup>21</sup> para restringir el uso de 3 neonicotinoides (clotianidina, imidacloprid y tiametoxam) en el tratamiento de semillas, aplicación en suelo y tratamiento foliar sobre cereales y plantas atractivas para las abejas, quedando reservado el resto de usos solo para profesionales.

Como excepción, se mantuvo el tratamiento de cultivos atractivos para las abejas dentro de invernaderos, pero en campo abierto solo después de la floración.

Estas restricciones fueron aprobadas para ser aplicadas a partir del 1 de diciembre de 2013, de manera que dentro de los siguientes 2 años la Comisión revisaría la aprobación de los 3 neonicotinoides para tener en cuenta los desarrollos técnicos y científicos relevantes.

Siguiendo una solicitud de la Comisión Europea, la EFSA (European Food Safety Authority) publicó en enero de 2013 sus resultados relativos a los riesgos asociados al uso de los 3 pesticidas mencionados anteriormente, sobre la salud de las abejas y, tomándolos como base, la Comisión elaboró una propuesta para ser discutida por expertos de los Estados miembros, que no fue aprobada y que fue transferida al Comité de Apelación.

En 2014, la EFSA publicó los resultados de los trabajos que llevó a cabo en colaboración con los Estados Miembros y la Comisión Europea, dedicados a la revisión de proyectos anteriores y detección de carencias, elaborando recomendaciones para futuros trabajos científicos y de investigación a llevar a cabo en el marco del programa Horizonte 2020<sup>22</sup>.

En España, en septiembre de 2012, la Secretaría General de Agricultura y Alimentación del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente presentó un Programa de Vigilancia Piloto de las Enfermedades de las Abejas para ser desarrollado entre enero y junio de 2013, que tenía como objetivos: (i) Armonizar los procedimientos de vigilancia activa para conseguir una estimación apropiada de las pérdidas de colonias de abejas a nivel nacional y europeo y (ii) Apoyar la implementación de los estudios de prevalencia sobre las enfermedades prioritarias de las abejas con el objetivo de estimar la incidencia siguiendo procedimientos armonizados que utilicen indicadores epidemiológicos comunes a nivel nacional y europeo. Dicho programa de vigilancia incluía el control de enfermedades diana (varroosis, loque americana, loque europea, nosemosis, parálisis, DWV, ABPV y aethinosis) y de las materias activas recogidas en la Directiva 2010/21/UE, con posibilidad de ampliar el estudio a otros principios activos de interés, en muestras de abejas y polen<sup>20</sup>.

---

<sup>21</sup> Commission to proceed with plan to better protect bees, EU, 2013. URL: [http://ec.europa.eu/food/animals/live\\_animals/bees\\_en](http://ec.europa.eu/food/animals/live_animals/bees_en)

<sup>22</sup> Towards an integrated environmental risk assessment of multiple stressors on bees: review of research projects in Europe, knowledge gaps and recommendations. EFSA 2014, <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3594>

Por otra parte, desde hace casi veinte años, el sector apícola cuenta con un programa operativo comunitario de apoyo, desarrollado en todos los Estados Miembros de la UE a través de programas nacionales, y conocido en España como el Programa Nacional de Ayudas a la Apicultura o Plan Nacional Apícola (PNA).

La planificación del PNA a nivel nacional se ha concretado, finalmente, en medidas a disposición de las CCAA para el desarrollo de sus respectivas convocatorias de ayudas. Dada la competitividad y profesionalidad del sector apícola español, el PNA es necesariamente ambicioso y práctico, enfocado en exclusividad en los apicultores profesionales. Entre las medidas recogidas por el programa apícola 2014-2016 se incluyen “Programas de investigación aplicada”, una línea que prevé financiar la colaboración con organismos especializados en la realización de programas de investigación aplicada en el sector de la apicultura y de los productos procedentes de la apicultura, con los objetivos prioritarios de investigación siguientes:

- Investigación sobre el síndrome de despoblamiento de colmenas en España («síndrome de desabejado»).
- Significado sanitario, factores epidemiológicos y análisis de riesgos.
- Estudio epidemiológico del despoblamiento de las colmenas.
- Investigación sobre virosis y otras enfermedades de las abejas en función de la evolución de las patologías apícolas en España.
- Nuevos desarrollos para limitar los efectos de la invasión por la avispa asiática (*Vespa velutina*).
- Otros objetivos que plantee el escenario de la apicultura española en los próximos años a propuesta de los distintos participantes en la elaboración del presente Programa Nacional de Ayudas a la Apicultura.

### 3.1.3. Antecedentes relativos al efecto de los plaguicidas sobre las abejas

En contraste con la intoxicación aguda de las abejas, que es fácilmente observable, los efectos sub-letales de los plaguicidas son mucho más difíciles de demostrar ya que no provocan mortalidad en la población, si bien están recibiendo cada vez mayor interés científico. Estos efectos sub-letales se presentan tras una exposición prolongada y pueden afectar a las diferentes etapas de la vida y a los niveles de organización de las abejas melíferas, que van desde la fisiología celular o el sistema inmune de cada abeja individual hasta consecuencias que afectan a la colonia en su totalidad, tales como efectos sobre el aprendizaje, el comportamiento y la comunicación<sup>23</sup>.

En este sentido, se ha observado que el insecticida deltamethrin afecta a numerosas funciones celulares de las abejas melíferas, con consecuencias importantes como pueden ser los cambios en la frecuencia y en la intensidad de las

---

<sup>23</sup> vanEngelsdorp, D.; Meixner, M.D., A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them, *J. Invertebr. Pathol.* **2010**, *103*, S80-S-95.

contracciones cardíacas y que asociado con procloraz afecta a la termorregulación produciendo hipotermia<sup>24</sup>.

Estudios realizados sobre abeja melífera africanizada (o africana) expuesta a dosis subletales de imidacloprid han puesto de manifiesto la presencia de células muertas o hinchadas en diferentes zonas de su cerebro concluyendo que los lóbulos ópticos son más sensibles a este insecticida que otras regiones del cerebro<sup>25</sup> y que la exposición a dosis subletales del neonicotinoide tiametoxam puede causar deficiencias en sus funciones cerebrales e intestinales y contribuir a acortar su ciclo de vida<sup>26</sup>.

Otro estudio demostró que la exposición a dosis subletales de imidacloprid producía cambios notables en el ritmo respiratorio de las abejas y en las glándulas hipofaríngeas, que eran de menor tamaño que en abejas no tratadas<sup>27</sup>. Asimismo, se han encontrado efectos nocivos en el desarrollo de colonias de abejorros tratados con dosis muy bajas de imidacloprid, que consisten en la disminución del tamaño de la colonia (8-12% menores) y en un elevado descenso en el número de reinas (1-2 frente a 14 en colonias no tratadas), lo que resulta fundamental ya que son los únicos miembros de la colonia que pueden fundar colonias nuevas en primavera<sup>28</sup>.

En cuanto al efecto de dosis subletales de plaguicidas sobre el aprendizaje, el comportamiento y la comunicación, ya en 1995 se demostró que el tratamiento tópico de abejas con dosis subletales de deltametrin alteraba los viajes de retorno de las abejas pecoreadoras a la colmena<sup>29</sup> y, desde entonces, son abundantes los trabajos realizados en esta línea. Así, se ha demostrado que dosis subletales de imidacloprid, suministradas a abejas criadas en el laboratorio mediante aplicación tópica en el torax<sup>30</sup> o suministradas en una disolución de sacarosa<sup>31,32</sup> afectaban al rendimiento del

---

<sup>24</sup> Desneux, N.; Decourtye, A.; Delpuech, J.-M., The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods, *Annu. Rev. Entomol.* **2007**, *52*, 81-106.

<sup>25</sup> de Almeida Rossi, C.; Roat, T.C.; Tavares, D.A.; Cintra-Socolowski, P.; Malaspina, O., Brain morphophysiology of Africanized bee *Apis mellifera* exposed to sublethal doses of imidacloprid, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2013**, *65*, 234-243.

<sup>26</sup> Oliveira, R.A.; Roat, T.C.; Carvalho, S.M.; Malaspina, O., Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the Africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), *Environ. Toxicol.* DOI 10.1002/tox **2013**, 1-12.

<sup>27</sup> Hatjina, F.; Papaefthimiou, C.; Charistos, L.; Dogaroglu, T.; Bouga, M.; Emmanouil, C.; Arnold, G., Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees in vivo, *Apidologie* DOI: 10.1007/ s13592-013-0199-4 **2013**.

<sup>28</sup> Whitehorn, P.R.; O'Connor, S.; Wackers, F.L.; Goulson, D., Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production, *Science* **2012**, *336*, 351-352.

<sup>29</sup> Vandame, R.; Meled, M.; Colin, M.E.; Belzunces, L.P., Alteration of the homing-flight in the honey bee *Apis mellifera* L. Exposed to sublethal dose of deltamethrin, *Environ. Toxicol. Chem.* **1995**, *14*, 855-860.

<sup>30</sup> Guez, D.; Suchail, S.; Gauthier, M.; Maleszka, R.; Belzunces, L.P., Contrasting effects of Imidacloprid on habituation in 7- and 8-day-old honeybees (*Apis mellifera*), *Neurobiol. Learn. Mem.* **2001**, *76*, 183-191.

<sup>31</sup> Decourte, A.; Lacassie, E.; Pham-Delègue, M.-H., Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L) are differentially affected by imidacloprid according to the season, *Pest. Manag. Sci.* **2003**, *59*, 269-278.

<sup>32</sup> Decourte, A.; Armengaud, C.; Renou, M.R.; Devillers, J.; Cluzeau, S.; Gauthier, M.; Pham-Delègue, M.-H., Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.), *Pest. Biochem. Physiol.* **2004**, *78*, 83-92.

aprendizaje olfativo a través del reflejo de extensión de la probóscide (PER), un componente del comportamiento en la alimentación y el pecoreo de la abeja melífera.

En otro experimento de laboratorio se comprobó que dosis subletales de imidacloprid provocaron una reducción significativa en la movilidad de las abejas tratadas, las cuales sufrieron además una reducción en la capacidad de comunicación<sup>33</sup>. Un estudio llevado a cabo con abejas en condiciones de laboratorio y en semi-libertad, alimentadas con una disolución de sacarosa conteniendo deltametrin o imidacloprid, puso de manifiesto que el primero tenía efectos letales sobre las abejas obreras pero no ejercía influencia sobre el aprendizaje asociativo, establecido a través de un ensayo PER en el laboratorio, mientras que imidacloprid daba lugar a efectos negativos en este ensayo y sobre otras tareas de aprendizaje en la discriminación olfativa. Con ambos plaguicidas se observó una disminución en la actividad del pecoreo sobre la fuente de alimentos y en la actividad de las abejas a la entrada de la colmena<sup>34</sup>. Por otra parte, se comprobó que el insecticida CRy 1 Ab (proteína con actividad pesticida expresada por *B. thuringiensis*) no afectaba a la mortalidad, al consumo de la disolución azucarada ni a la capacidad de aprendizaje, pero sí redujo la actividad del pecoreo durante y después del tratamiento, mientras que deltametrin e imidacloprid afectaron al consumo de la disolución azucarada y a la actividad del pecoreo, con una reducción en la capacidad de aprendizaje en las abejas tratadas con deltametrin<sup>35</sup>.

Experimentos llevados a cabo mediante tratamiento de abejas melíferas por ingestión oral y por contacto con fipronil mostraron una reducción significativa de la sensibilidad a la sacarosa tras la aplicación torácica del insecticida y ningún efecto tras el tratamiento oral, observándose, asimismo, un deterioro en el aprendizaje olfativo de las abejas con aplicación torácica de dosis más bajas de fipronil<sup>36</sup>. En un estudio similar se estableció el efecto que 9 insecticidas (deltametrin,  $\lambda$ -cihalotrin, cipermetrin,  $\tau$ -fluvalinato, procloraz, triazamato, endosulfan, dimetoato y fipronil), suministrados en una disolución azucarada, ejercía sobre el rendimiento del aprendizaje en abejas obreras, encontrando una reducción en el PER tras el tratamiento con fipronil, deltametrin, endosulfan y procloraz<sup>37</sup>. En condiciones de laboratorio, dosis subletales de tiametoxam y fipronil redujeron la memoria olfativa

---

<sup>33</sup> Medrzycki, P.; Montanari, R.; Bortolotti, L.; Sabatani, A.G.; Maini, S.; Porrini, C., Effects of imidacloprid administered in sub-lethal doses on honey bee behaviour. Laboratory tests, *Bull. Insectology* **2003**, *56*, 59-62.

<sup>34</sup> Decourte, A.; Devillers, J.; Cluzeau, S.; Charreton, M.; Pham-Delègue, M.-H., Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2004**, *57*, 410-419.

<sup>35</sup> Ramírez-Romero, R.; Chaufaux, J.; Pham-Delègue, M.-H., Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach, *Apidologie* **2005**, *36*, 601-661.

<sup>36</sup> El Hassani, A.K.; Dacher, M.; Gauthier, M.; Armengaud, C., Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*), *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2005**, *82*, 30-39.

<sup>37</sup> Decourtye, A.; Devillers, J.; Genecque, E.; Le Menach, K.; Budzinski, H.; Cluzeau, S.; Pham-Delègue, M.H., Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, *Environ. Contam. Toxicol.* **2005**, *48*, 242-250.

de las abejas melíferas y las tratadas con fipronil sufrieron, asimismo, una reducción en la movilidad<sup>38</sup>.

Otros experimentos llevados a cabo alimentando abejas melíferas con una disolución de sacarosa conteniendo imidacloprid demostraron alteraciones en la actividad de pecoreo con retrasos en el retorno a la fuente de alimento y con pérdida de las abejas y retrasos de incluso un día cuando se utilizaron dosis altas del plaguicida<sup>39</sup>. El mismo comportamiento, en cuanto al retorno a la colmena, se encontró en abejas melíferas en condiciones de semi-libertad, tratadas con dosis muy bajas del neonicotinoide tiametoxam<sup>40</sup>.

Por otra parte, se ha encontrado que los acaricidas tau-fluvalinato, coumafos y fenpiroximato, muy utilizados en las colmenas para combatir el ácaro *Varroa*, tienen un efecto negativo sobre la movilidad y el pecoreo de las abejas, solos o en combinación con imidacloprid<sup>41</sup>.

El interés por el efecto que niveles subletales de insecticidas o familias de ellos, como es el caso del fipronil (fenilpirazol), el neonicotinoide tiacloprid, los nicotinoides imidacloprid, tiametoxam y algunos piretroides, así como organofosforado coumafos ha ido en aumento en los últimos 5 años, habiéndose publicado un elevado número de trabajos que han sido recopilados recientemente por J. Benuszak y col<sup>42</sup>.

Aunque, como se ha indicado anteriormente, los insecticidas constituyen la familia de fitosanitarios más peligrosa para los insectos polinizadores, otros plaguicidas pueden suponer un peligro potencial debido a su acción individual o a sus efectos sinérgicos. Así, los herbicidas pueden afectar a los polinizadores porque reducen la abundancia y biodiversidad de flores<sup>43</sup> reduciendo la disponibilidad de sus recursos alimentarios, a la vez que empobrecen su alimentación, que queda limitada por las prácticas agrícolas intensivas<sup>44</sup>.

---

<sup>38</sup> Aliouane, Y.; El Hassani, A.K.; Gary, V.; Armengaud, C.; Lambin, M.; Gauthier, M., Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: Effects on behavior, *Environ. Toxicol. Chem.* **2009**, *28*, 113-122.

<sup>39</sup> Yang, E.C.; Chiang, Y.C.; Chen, Y.L.; Chang, L.H., Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae), *J. Econ. Entomol.* **2008**, *101*, 1743-1748.

<sup>40</sup> Henry, M.; Béguin, M.; Requier, F.; Rollin, O.; Odoux, J.-F.; Aupinel, P.; Aptel, J.; Tchamitchian, S.; Decourtye, A., A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees, *Science* **2012**, *336*, 348-350.

<sup>41</sup> Williamson, S.M.; Wright, G.A., Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees, *J. Exp. Biol.* **2013**, *216*, 1799-1807.

<sup>42</sup> Benuszak, J.; Laurent, M.; Chauzat, M.P., The exposure of honey bees (*Apis mellifera*; Hymenoptera: Apidae) to pesticides: Room for improvement in research, *Sci. Total Environ.* **2017**, *587-588*, 423-438.

<sup>43</sup> Albrecht, H., Development of arable weed seedbanks during the 6 years after the change from conventional to organic farming, *Weed Res.* **2005**, *45*, 339-350.

<sup>44</sup> Goulson, D.; Nicholls, E.; Botías, C.; Rotheray, E.L., Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers, *Science* **2015**, *347*, 1255957.

Aunque los fungicidas están clasificados como menos tóxicos para las abejas melíferas, algunos han demostrado serlo<sup>45</sup> o han incrementado la toxicidad de los insecticidas.

En este sentido, diferentes estudios señalan la presencia de interacciones sinérgicas entre fungicidas inhibidores de la síntesis de ergosterol (EBI) y diferentes insecticidas. Así, la exposición a deltametrin en combinación con los fungicidas EBI prochloraz o difenoconazol provocó hipotermia en abejas melíferas cuando se utilizaron en dosis que, por separado, no la producían<sup>29</sup> y el neonicotinoide tiacloprid duplicó su toxicidad frente a las abejas melíferas en combinación con el fungicida propiconazole y la triplicó en combinación con trifluomizole<sup>46</sup>. Adicionalmente, se ha encontrado que los fungicidas EBI prochloraz, triflumizole y propiconazole inhiben el sistema de detoxificación de las abejas, incrementando cien veces la toxicidad aguda de acetamiprid y tiacloprid<sup>46</sup> y algunas veces la de tau-fluvalinato, coumafos y fenpiroximato<sup>47</sup>. Estos compuestos se utilizan como acaricidas en el tratamiento de la *Varroa*, por lo que su sinergismo con los fungicidas supone un verdadero dilema<sup>48</sup>.

Además de con otros plaguicidas, los insecticidas interactúan con otros factores de estrés vinculados a las abejas melíferas. Así, se encontró que la interacción entre el microsporidio *Nosema* y el neonicotinoide imidacloprid debilitaba significativamente a las abejas melíferas, de manera que la combinación de ambos agentes causaba las tasas más altas de mortalidad individual y estrés energético<sup>16, 49</sup>. Uno de estos experimentos mostró una disminución en la actividad de la glucosa oxidasa, que permite a las abejas esterilizar la colonia y los alimentos de las crías, sugiriendo una interacción sinérgica y, a largo plazo, una mayor susceptibilidad de la colonia frente a los patógenos<sup>16</sup>. A exposición de abejas infectadas con *Nosema ceranae* a dosis subletales de fipronil o tiacloprid dio lugar a una mayor mortalidad en relación a las abejas que no estuvieron expuestas a plaguicidas, pero este efecto sinérgico no fue debido a la inhibición del sistema de eliminación de toxinas del insecto<sup>50,51</sup>.

---

<sup>45</sup> Mullin, C.A.; Frazier, M.; Frazier, J.L.; Ashcraft, S.; Simonds, R.; Pettis, J.S., High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health, *PLoS ONE*/ [www.plosone.org](http://www.plosone.org), **2010**, 3, e9754, 1-19.

<sup>46</sup> Iwasa, T.; Motoyama, N.; Ambrose, J.T.; Roe, R.M., Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*, *Crop. Prot.* **2004**, 23, 371-378.

<sup>47</sup> Johnson, R.M.; Dahlgren, L.; Siegfried, B.D.; Ellis, M.D., Effect of in-hive miticides on drone honey bee survival and sperm viability, *PLoS One* **2013**, 8, e54092.

<sup>48</sup> Sánchez-Bayo, F.; Goulson, D.; Pennacchio, F.; Nazzi, F.; Goka, K.; Desneux, N., Are bee diseases linked to pesticides? - A brief review, *Environ. Int.* **2016**, 89-90, 7-11.

<sup>49</sup> Wu, J.Y.; Smart, M.D.; Anelli, C.M.; Sheppard, W.S., Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection, *J. Invertebr. Pathol.* **2012**, 109, 326-329.

<sup>50</sup> Vidau, C.; Diogon, M.; Aufauvre, J.; Fontbonne, R.; Viguès, B.; Brunet, J.L.; Texier, C.; Biron, D.G.; Blot, N.; El-Alaoui, H.; Belzunces, L.P.; Delbac, F., Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*, *PLoS One* **2011**, 6, e21550.

<sup>51</sup> Aufauvre, J.; Biron, D.G.; Vidau, C.; Fontbonne, R.; Roudel, M.; Diogon, M.; Vignes, B.; Belzunces, L.P.; Delbac, F.; Blot, N., Parasite-insecticide interactions: A case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee, *Sci. Rep.* **2012**, 2, 326.

### 3.1.4. Papel de los neuropéptidos en la organización y el comportamiento de la abeja melífera

El complejo comportamiento de las abejas está controlado por su sistema nervioso central, siendo el tamaño de su cerebro de 1 mm<sup>3</sup> y conteniendo menos de 1 millón de neuronas<sup>52</sup>.

En el sistema nervioso, las conexiones entre neuronas y la comunicación entre ellas es llevada a cabo mediante moléculas de señalización tales como acetilcolina, glutamato, ácido gamma-aminobutírico, aminas biogénicas y péptidos, entre los cuales, los neuropéptidos constituyen la categoría más grande y con mayor diversidad<sup>53</sup>.

Los neuropéptidos juegan un importante papel en la organización de los procesos fisiológicos y del comportamiento de los animales, funcionando como neurohormonas, neuromoduladores y neurotransmisores.

De los aproximadamente 100 péptidos predichos en el genoma de la abeja melífera, A. Brockman et al.<sup>54</sup> han cuantificado en su cerebro aproximadamente un 50% del total, 8 de los cuales presentan una estrecha relación con la actividad del pecoreo. Siete de los 8 neuropéptidos, APMGFQGMRamida (taquicinina), GRNDLNFIRYaamida (TWKSP), IYLPLFASRLamida (PBAN), MVPVPVHHMADELLRNGPDTVI (MVPV), IDLSRFYGHFNT, IDLSRFYGHFN (IDLSRFYGHFNT) y SPSLRLRFa (sNPF), mostraron diferencias significativas asociadas con la predisposición al pecoreo de néctar o de polen. Cinco de los 8 péptidos mostraron diferencias en función de la experiencia: APMGFQGMRamida, LRQLDIGDLQ (LRNQLDIGDLQ), IYLPLFASRLamida, IDLSRFYGHFN y IDLSRFYGHFNT para la colección de polen y APMGFQGMRamida para la colección de néctar. Dos péptidos, IDLSRFYGHFN y LRNQLDIGDLQ, se encontraron en cantidades significativamente mayores después del pecoreo, independientemente de la fuente (néctar o polen) y, finalmente, un péptido, MVPVPVHHMADELLRNGPDTVI, mostró una abundancia significativamente mayor en las recolectoras de néctar que en las de polen, tanto antes como después del pecoreo y dos péptidos adicionales (IDLSRFYGHFN y APMGFQGM) mostraron la misma tendencia. Estos autores<sup>54</sup> destacan que 3 de los 8 péptidos antes citados APMGFQGMRamida (taquicinina), IYLPLFASRLamida (PBAN) y SPSLRLRFamida (sNPF) están implicados en la recolección de alimento en insectos solitarios como *Drosophila melanogaster*<sup>55</sup> y quizá la evolución social ha modificado su función en alguna medida, regulando uno o más aspectos del pecoreo de la abeja melífera. Asimismo, las taquicininas están implicadas en la regulación de la alimentación en diferentes insectos<sup>56</sup> y en la percepción de olores y en la actividad

<sup>52</sup> Menzel, R.; Lebouille, G.; Eisenhardt, D., Small brains, bright minds, *Cell* **2006**, *124*, 237–239.

<sup>53</sup> Heuer, C.M.; Kollmann, M.; Binzer, M.; Schachtner, J., Neuropeptides in insect mushroom bodies, *Arthropod Struct. Dev.* **2012**, *41*, 199–226.

<sup>54</sup> Brockmann, A.; Annangudi, S.P.; Richmond, T.A.; Ament, S.A.; Xie, F.; Southey, B.R.; Rodríguez-Zas, S.R.; Robinson, G.E.; Sweedler, J.V., Quantitative peptidomics reveal brain peptide signatures of behavior, *PNAS* **2009**, *17*, 2383–2388.

<sup>55</sup> Melcher, C.; Pankratz, M.J., Candidate gustatory interneurons modulating feeding behavior in the *Drosophila* brain, *PLoS Biol.* **2005**, *3*:e305.

<sup>56</sup> Pascual, N.; Maestro, J.L.; Chiva, C.; Andreu, D.; Belles, X., Identification of a tachykinin-related peptide with orexigenic properties in the German cockroach, *Peptides* **2008**, *29*, 386–392.

locomotora en *Drosophila melanogaster*<sup>57</sup>. Debido a que la multifuncionalidad es común para los neuropéptidos, estos investigadores proponen que quizá los mismos péptidos puedan influir en la percepción y localización de las fuentes de alimentos y su recolección. Por otra parte, es bien conocido que PBAN es un regulador de la síntesis de feromonas en una variedad de insectos<sup>57</sup> y las señales debidas a las feromonas son importantes en el reclutamiento de abejas melíferas pecoreadoras a través del famoso sistema de comunicación mediante la danza oscilante<sup>58</sup>.

Estas consideraciones son también sostenidas en una publicación posterior<sup>59</sup> en la que se aporta información sobre la distribución de neuropéptidos en las distintas partes de la cabeza de la abeja melífera, encontrando que las taquicininas constituyen el grupo de neuropéptidos más abundante en los espectros de los ganglios frontales, que están implicados en la regulación de la alimentación<sup>60</sup>.

Más recientemente, D. Cardoen y col.<sup>61</sup> han encontrado que en el proceso de inhibición de la actividad ovárica, que tiene lugar en las abejas obreras, participan esteroides y neuropéptidos con función hormonal.

Por otra parte, M. Pratavieira y col.<sup>62</sup> han puesto de manifiesto que los neuropéptidos AmTRP-5 y AST-1 (pertenecientes a la familia de las allatostatinas y taquicininas) parecen estar específicamente relacionados con la división de tareas inherentes a la edad en las abejas melíferas, de tal manera que sus niveles aumentaron en los cerebros de las abejas con 0-15 días de edad, acompañados por un incremento en las actividades realizadas por estas abejas (abejas nodrizas) dentro de la colmena, mientras que disminuyeron en las abejas con 15-25 días de edad, periodo en el cual comienzan a realizar actividades de pecoreo y vigilancia fuera de la colmena.

En otro estudio, B. Han y col.<sup>63</sup> identificaron 158 neuropéptidos en el cerebro de abejas de dos razas (*Apis mellifera ligústica*, ITb, y *royal jelly producing bee*, RJb) a la edad de 0 días, 7 días, 14 días (abejas nodrizas) y 21 días (abejas obreras), encontrando 158 péptidos, 77 de los cuales no habían sido identificados previamente. Cuando compararon la abundancia de neuropéptidos en ambas razas, no encontraron diferencias significativas en las abejas de 0 y 7 días, pero sí aparecían diferencias

---

<sup>57</sup> Winther, A.M.; Acebes, A.; Ferrus, A., Tachykinin-related peptides modulate odor perception and locomotor activity in *Drosophila*, *Mol. Cell. Neurosci.* **2006**, *31*, 399-406.

<sup>58</sup> Thom, C.; Gilley, D.C.; Hooper, J.; Esch, H.E., *PLoS Biol*/www.plosbiology.org **2007**, *5*, 1862-1867.

<sup>59</sup> Boerjan, B.; Cardoen, D.; Bogaerts, A.; Landuyt, B.; Schoofs, L.; Verleyen, P., Mass spectrometric profiling of (neuro)-peptides in the worker honeybee, *Apis mellifera*, *Neuropharmacology* **2010**, *58*, 248-258.

<sup>60</sup> Audsley, N.; Weaver, R.J., Neuropeptides associated with the regulation of feeding in insects, *Gen. Comput. Endocrinol.* **2009**, *162*, 93-104.

<sup>61</sup> Cardoen, D.; Ernst, U.R.; Boerjan, B.; Bogaerts, A.; Formesyn, E.; de Graaf, D.C.; Wenseleers, T.; Schoofs, L.; Verleyen, P., Worker honeybee sterility: A proteomic analysis of suppressed ovary activation, *J. Proteome Res.* **2012**, *11*, 2838-3850.

<sup>62</sup> Pratavieira, M.; Da Silva Menegasso, A.R.; Garcia, A.M.C.; Dos Santos, D.S.; Gomes, P.C.; Malaspina, O.; Palma, M.S., MALDI imaging analysis of neuropeptides in the africanized honeybee (*Apis mellifera*) brain: Effect of ontogeny, *J. Proteome Res.* **2014**, *13*, 3054-3064.

<sup>63</sup> Han, B.; Fang, Y.; Feng, M.; Hu, H.; Qi, Y.; Huo, X.; Meng, L.; Wu, B.; Li, J., Quantitative Neuropeptidome Analysis Reveals Neuropeptides Are Correlated with Social Behavior Regulation of the Honeybee Workers, *J. Proteome Res.* **2015**, *14*, 4382-4393.

significativas entre las abejas nodrizas y pecoreadoras. Para ambos estadios observaron que el número de neuropéptidos que aumentaban sus niveles era mayor en las RJb que en las ITb, por lo que los autores sugieren que estos compuestos se encuentran implicados en la producción de jalea real.

## **3.2. CROMATAGRAFÍA DE LÍQUIDOS**

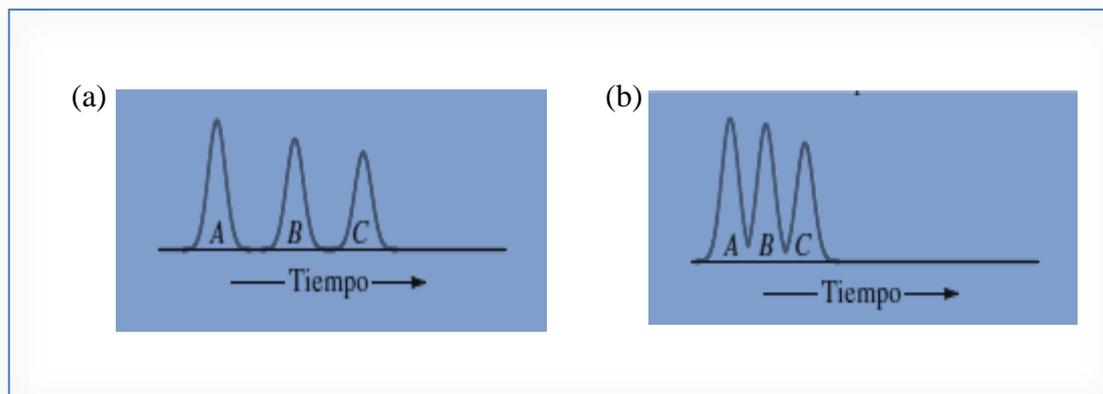
### **3.2.1 Características generales de la Cromatografía de Líquidos**

La cromatografía de líquidos (LC) es una técnica de separación de compuestos de baja volatilidad y polaridad media-alta, que está basada en la afinidad que los componentes de una mezcla tienen entre dos fases inmiscibles: una fase móvil líquida, que fluye sobre una fase estacionaria sólida que se encuentra empaquetada en el interior de una columna. En la LC, el paso de la fase móvil a través de la fase estacionaria se realiza en condiciones de alta presión utilizando para ello sistemas de bombeo, lo que incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna, reduciendo así su difusión y mejorando la resolución cromatográfica. La separación cromatográfica tiene lugar debido a la diferencia entre los coeficientes de distribución de los componentes de la muestra, produciéndose múltiples etapas de adsorción y desorción de los mismos a través de la fase estacionaria. La fase móvil suele estar compuesta por una mezcla de disolventes de distinta fuerza eulotrópica a la que se le pueden añadir tampones, sales o compuestos que ayuden a la separación de los analitos. Para mejorar la separación cromatográfica, se suele llevar a cabo una elución en gradiente, que consiste en modificar las condiciones de la fase móvil, tanto en composición como en flujo, durante el análisis.

Existen dos modalidades de trabajo, la LC en fase normal, en la que la fase estacionaria es de naturaleza polar (como por ejemplo sílice) y la fase móvil de naturaleza apolar, y permite la separación de analitos de carácter polar, y la LC en fase reversa en la que los analitos de polaridad media-alta se separan en fases estacionarias de naturaleza apolar (C18, C8) con fases móviles moderadamente polares, siendo esta última modalidad la más empleada para la separación de neuropéptidos.

### **3.2.2 Cromatografía de Líquidos en fase reversa**

El fundamento de la separación en LC en fase reversa consiste en las interacciones hidrofóbicas que tienen lugar entre un disolvente de polaridad moderada, una fase estacionaria apolar y un compuesto de polaridad moderada-alta. En la **Figura 1** se muestra cómo varía la retención del analito en función de su polaridad y de la polaridad de la fase móvil.



**Figura 1.** Relación entre la polaridad de la fase móvil y los tiempos de elución en cromatografía en fase reversa. (a) Fase móvil de polaridad elevada y (b) Fase móvil de polaridad media. Polaridades de los analitos  $A > B > C$ <sup>64</sup>

Además de la polaridad de la fase móvil, otros factores pueden afectar a la separación de los compuestos, como por ejemplo la adición de sales inorgánicas ya que estas originan un aumento de la tensión superficial aumentando el tiempo de retención. También influye el pH de la muestra, puesto que puede hacer que el analito se encuentre en su forma molecular o ionizada, influyendo generalmente en la separación cromatográfica. Es de interés comentar que, generalmente, los compuestos ramificados eluyen más rápidamente que sus isómeros lineales, ya que la superficie total se ve reducida.

En la modalidad de LC en fase reversa, la fase estacionaria polar suele ser de sílice químicamente modificada con grupos alquilo, siendo los más utilizados los grupos octadecil (C18) y octil (C8), teniendo las columnas diferentes longitudes (5-25 cm) y tamaños de partícula ( $\sim 4 \mu\text{m}$ ). Uno de los principales avances en el análisis mediante LC ha sido el desarrollo de columnas empacadas con partículas de tamaño reducido ( $\leq 2 \mu\text{m}$ ) que presentan una mayor eficiencia, permitiendo la separación de un elevado número de compuestos en tiempos de análisis menores en comparación con las columnas de mayor tamaño de partícula. Otra de las ventajas del uso de estas columnas es principalmente económico ya que requieren flujos de fase móvil bajos ( $200\text{-}300 \mu\text{L min}^{-1}$ ), lo que conlleva un menor gasto de disolventes orgánicos<sup>65</sup>. No obstante, el empleo de estas columnas implica presiones de trabajo elevadas ( $> 10.00$  psi) por lo que necesitan de instrumentos especialmente diseñados que permitan soportar esas presiones tan altas, como la cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (UPLC) o la microLC. Por otra parte, el acoplamiento de estos sistemas de microflujo a la Espectrometría de Masas incrementa la eficacia de la ionización debido a que se generan gotas de pequeño tamaño, lo que conlleva un considerable aumento de la sensibilidad y menor efecto matriz<sup>66</sup>.

<sup>64</sup> Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A., *Principios de Análisis Instrumental, Quinta Edición*, McGraw-Hill/Interamericana de España, Madrid, España, 2001, pp. 269.

<sup>65</sup> Desmet, G.; Eeltink, S., *Fundamentals for LC Miniaturization*, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 543-556.

<sup>66</sup> Uclés Moreno, A.; Herrera López, S.; Reichert, B.; Lozano Fernández, A.; Hernando Guil, M.D.; Fernández-Alba, A.R., *Microflow liquid chromatography coupled to mass spectrometry-an approach to significantly increase sensitivity, decrease matrix effects, and reduce organic solvent usage in pesticide residue analysis*, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 1018-1025.

### 3.3. ESPECTROMETRIA DE MASAS

#### 3.3.1. Características generales de la Espectrometría de Masas

En la actualidad, la Espectrometría de Masas (MS) es una de las herramientas analíticas con mayor potencial en el análisis de muestras debido a que es capaz de proporcionar información sobre<sup>64</sup>:

- (1) La composición elemental de una muestra
- (2) La estructura de especies inorgánicas, orgánicas y biológicas
- (3) La composición cualitativa y cuantitativa de mezclas complejas
- (4) La estructura y composición de superficies sólidas
- (5) Las relaciones isotópicas de átomos en las muestras

La técnica de MS se basa en la medida de los iones que son generados a partir de moléculas neutras y que son separados en base a su relación masa/carga, obteniendo así espectros de masas característicos para cada especie. En esta técnica, el comportamiento de una corriente de iones en fase gaseosa a través de una campo electromagnético es dependiente de la relación masa-carga ( $m/z$ ) de los iones y dicha relación es usada por el analizador para distinguir unos de otros, consiguiéndose su separación.

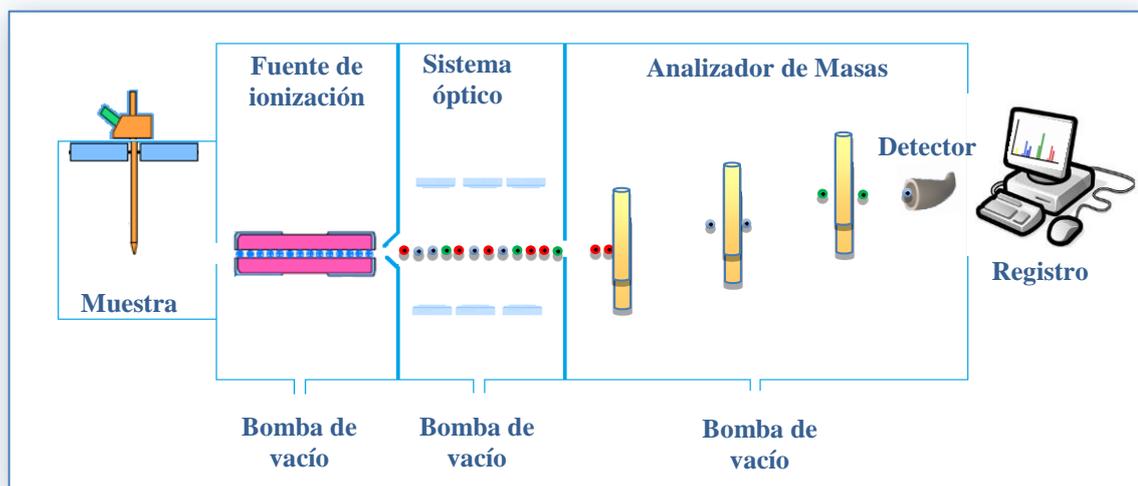
Entre sus principales ventajas se pueden citar las siguientes:

- Elevada capacidad de *identificación* de la mayoría de sustancias, desde especies más simples como la mayoría de elementos de la Tabla Periódica hasta moléculas más complejas de elevado peso molecular (PM).
- Elevada *sensibilidad*, lo que posibilita la cuantificación de concentraciones del orden de “ppb” (partes por billón) e incluso, en algunos casos, de “ppq” (partes por cuatrillón).
- Posibilidad de cuantificar uno o varios componentes en una muestra de forma simultánea.
- Capaz de *diferenciar* sustancias con estructuras moleculares muy similares.
- Proporciona *información estructural* de la molécula analizada, permite calcular su PM, energía de enlaces, información cinética, físico-química, cuántica, etc.
- Medida de relaciones *isotópicas* de isótopos estables o radiogénicos
- Técnica muy *rápida*, ya que puede obtener un espectro de masas completo en décimas de segundo.

Sin embargo, cuando se quiere analizar un gran número de compuestos en muestras reales es necesario su acoplamiento a técnicas separativas como la cromatografía de gases o de líquidos debido a la gran complejidad de los espectros que se obtienen por el gran número de iones generados. En este sentido la combinación de estas técnicas (GC-MS y LC-MS) da lugar a nuevos instrumentos analíticos más potentes que son capaces de analizar un elevado número de analitos en muestras muy complejas.

### 3.3.2. Componentes de un Espectrómetro de Masas

Un espectrómetro de masas para análisis de especies moleculares consta de un sistema para la introducción de la muestra, una fuente de ionización que genera iones a partir de moléculas neutras, un analizador que separa los iones en función de su relación masa/carga, un detector que transforma el haz de iones en una señal eléctrica y, por último, un sistema de procesamiento y registro de datos (**Figura 2**).



**Figura 2.** Componentes principales de un Espectrómetro de Masas

#### 3.3.2.1 Sistema de entrada de la muestra

En GC/MS y LC/MS el acoplamiento se realiza entre la salida de la columna cromatográfica y el espectrómetro de masas, y ahí es donde los componentes que eluyen de la columna se convierten en iones gaseosos.

En GC/MS el empleo de columnas capilares permite trabajar con caudales lo suficientemente bajos como para que la salida de la columna pueda acoplarse directamente a la fuente de ionización del espectrómetro de masas.

Sin embargo, uno de los principales problemas del acoplamiento LC-MS es la gran diferencia que existe entre los caudales de la fase móvil en LC y los requerimientos de vacío de la detección mediante MS, por lo que se hace necesario el empleo de sistemas de entrada especiales para conseguir la volatilización de la muestra líquida antes de la entrada en la fuente de ionización, donde se transforma en iones gaseosos. Este problema ha sido resuelto mediante el empleo de dos tipos de interfases: las que eliminan el disolvente por volatilización, antes de la entrada de la muestra en la fuente de ionización, y las que consiguen la eliminación del disolvente y la ionización simultáneamente. Entre las primeras, la más empleada es la interfase denominada *Particle Beam Interface* (PB) mientras que en las técnicas de *Thermospray* (TSP) y de ionización a presión atmosférica (API) tiene lugar tanto la volatilización del disolvente como la ionización de los analitos.

#### 3.3.2.2 Fuentes de ionización en LC

En función del método empleado para la generación de los iones, las fuentes de ionización se pueden clasificar en dos categorías: fuentes en *fase gaseosa* o fuentes de *desorción*<sup>64</sup>. En las fuentes en *fase gaseosa*, primero la muestra se volatiliza y después se ioniza, y se incluyen dentro de este grupo las fuentes de impacto de

electrones (EI), la ionización química (CI) y la ionización por campo (FI). En las fuentes de *desorción*, la muestra en estado sólido o líquido se transforma en una sola etapa en iones gaseosos y, como se ha indicado anteriormente, las más empleadas son TSP y API. La elección de la fuente de ionización depende de la naturaleza de los analitos en cuanto a su estabilidad térmica y su PM; así las fuentes en fase gaseosa solo se pueden aplicar a analitos térmicamente estables y con PM inferiores a  $10^3$  Dalton mientras que las fuentes de desorción se aplican a compuestos térmicamente inestables y con PM más elevados.

Por otra parte, las fuentes de ionización también se pueden clasificar como fuentes *duras* y *blandas*, en función de la energía empleada en el proceso de ionización. En las fuentes *duras*, se aplican energías muy elevadas de manera que las moléculas se encuentran en estados vibracionales y rotacionales excitados y su relajación produce en ellas una gran fragmentación, dando como resultado una gran cantidad de iones con una relación  $m/z$  mucho menor que la del ion molecular. Por el contrario, en las denominadas como fuentes *blandas* se aplican energías más bajas, lo que produce relativamente poca fragmentación y los espectros obtenidos contienen muy pocos iones producto, obteniéndose en algún caso solo el ion molecular. En este caso, la selección de la fuente dependerá del objetivo del análisis, de manera que si se quiere obtener información estructural se utilizan fuentes *duras* mientras que las fuentes *blandas* son útiles para conocer el PM, ya que permiten conocer la masa exacta de los compuestos.

Debido a que en este trabajo se ha empleado la técnica de LC-MS para el análisis de neuropéptidos en abejas, a continuación se describen las fuentes de ionización más empleadas en esta técnica.

En la actualidad, la mayoría de instrumentos de LC/MS utilizan como interfases las fuentes *blandas* API. Estas fuentes trabajan a presión atmosférica suministrando energía a la muestra sólida o líquida para generar de forma directa iones gaseosos. A continuación, los iones son transportados desde la fuente a las regiones de alto vacío del analizador de MS a través de diferentes etapas de vacío y, en la siguiente etapa, los iones son enfocados y guiados a través de los orificios de las lentes hacia el Analizador, gracias a la aplicación de campos eléctricos adecuados. Como consecuencia, se obtienen espectros muy sencillos que, a menudo, consisten solo en el ion molecular ( $M^+$ ) o el ion molecular protonado ( $MH^+$ ). Estas técnicas tienen un alto rendimiento y su eficacia y robustez son muy superiores a las obtenidas con otras interfaces como TSP o PB. Las fuentes API incluyen los siguientes componentes<sup>67</sup>:

1. Dispositivo de introducción de la muestra, donde se nebuliza la muestra en forma de aerosol
2. Cámara de ionización, donde se generan los iones a presión atmosférica mediante diferentes mecanismos (ESI, APCI, ...)
3. Cono de muestreo, por donde entran los iones generados

---

<sup>67</sup> Niessen, W.M.A., Advances in instrumentation in liquid chromatography–mass spectrometry and related liquid-introduction techniques, *J. Chromatogr. A* **1998**, 794, 407-435

4. Una interfase entre la zona a presión atmosférica y la zona de vacío, que incluye un sistema de transporte y enfoque de los iones hacia el analizador de MS (cuadrupolo, hexapolo u optapolo)
5. Sistema óptico de lentes, donde los iones son transferidos a la región de alto vacío del detector de MS

Estas fuentes que trabajan a presión atmosférica presentan las siguientes ventajas<sup>68</sup>:

- Permiten trabajar con los volúmenes procedentes de las fases móviles utilizados en LC
- Son apropiadas para compuestos no volátiles, polares y térmicamente inestables
- Son sensibles, con límites de detección iguales o inferiores a los que se obtienen en GC-MS
- Son robustas y fáciles de manejar

En las fuentes API se pueden distinguir dos tipos de configuraciones: Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI) y Electrospray (ESI).

#### *a) Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI)*

La primera interfase APCI para LC-MS fue desarrollada por Horning en los años 70<sup>69</sup>. Esta técnica de ionización *blanda* permite trabajar en modo de ionización positivo o negativo generando iones positivos o negativos, respectivamente.

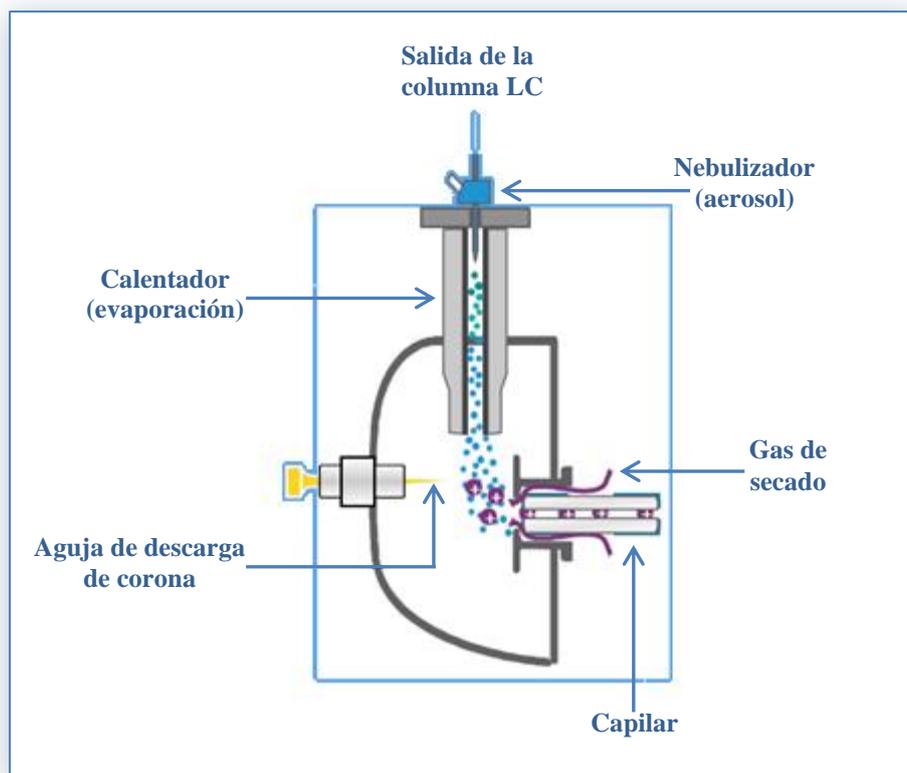
En la **Figura 3** se muestran de forma esquemática los componentes de una fuente APCI. La fase móvil líquida conteniendo los analitos, procedente de la columna LC, se nebuliza en un tubo de sílice fundida calentado a elevada temperatura (~ 400-500 °C) y en contacto con el gas de nebulización (N<sub>2</sub>), consiguiéndose la casi completa evaporación del disolvente. A continuación, la mezcla gas-vapor pasa a través del orificio de entrada hacia la fuente de ionización a presión atmosférica, donde se somete a una descarga en corona (2.6 kV), produciéndose la ionización de las moléculas de los analitos y de la fase móvil. Además, tienen lugar reacciones de transferencia de carga entre ellas, aumentando así la eficacia de la ionización (**Figura 4**). Los iones que se forman pueden ser moléculas de analito protonadas, desprotonadas y aductos con las moléculas de disolvente de la fase móvil, siendo muy común la formación de aductos de sodio y de amonio.

La sonda de APCI presenta ventajas frente a otros sistemas de ionización, ya que su flujo óptimo de trabajo (~1,0 mL/min) es muy similar al utilizado en la técnica de LC acoplada a detectores tradicionales como los UV y, además, los componentes de la matriz interaccionan con los sitios activos del tubo calefactor, lo que generalmente causa una menor pérdida de analitos en esta etapa y, por tanto, un aumento en la eficacia de la ionización mejorando la sensibilidad.

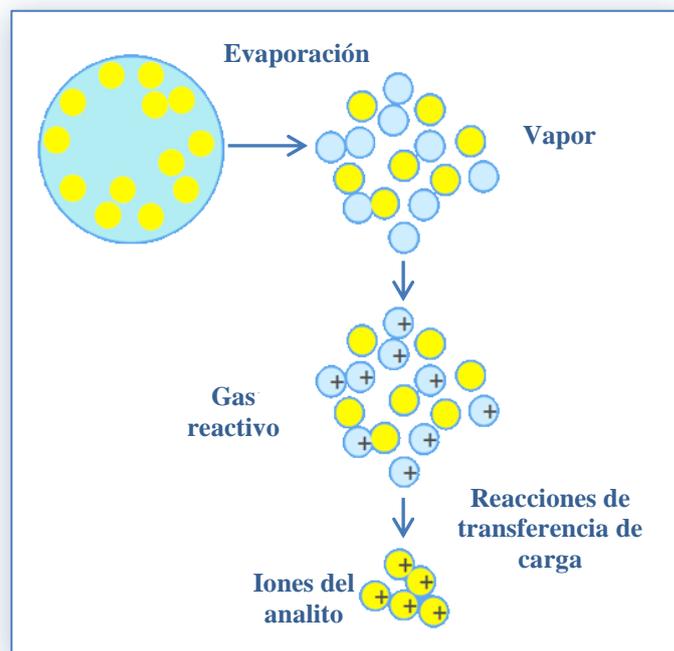
---

<sup>68</sup> Cole, R.B., Electrospray ionization mass spectrometry. Fundamentals, instrumentation and applications. Wiley Interscience. 1997.

<sup>69</sup> Horning, E.C.; Carroll, D.I.; Dzidic, I.; Haegele, K.D.; Horning, M.G.; Stillwell, R.N., Liquid chromatograph-mass spectrometer-computer analytical systems, *J. Chromatogr.* **1974**, *99*, 13-21.



**Figura 3.** Componentes de una fuente APCI<sup>70</sup>



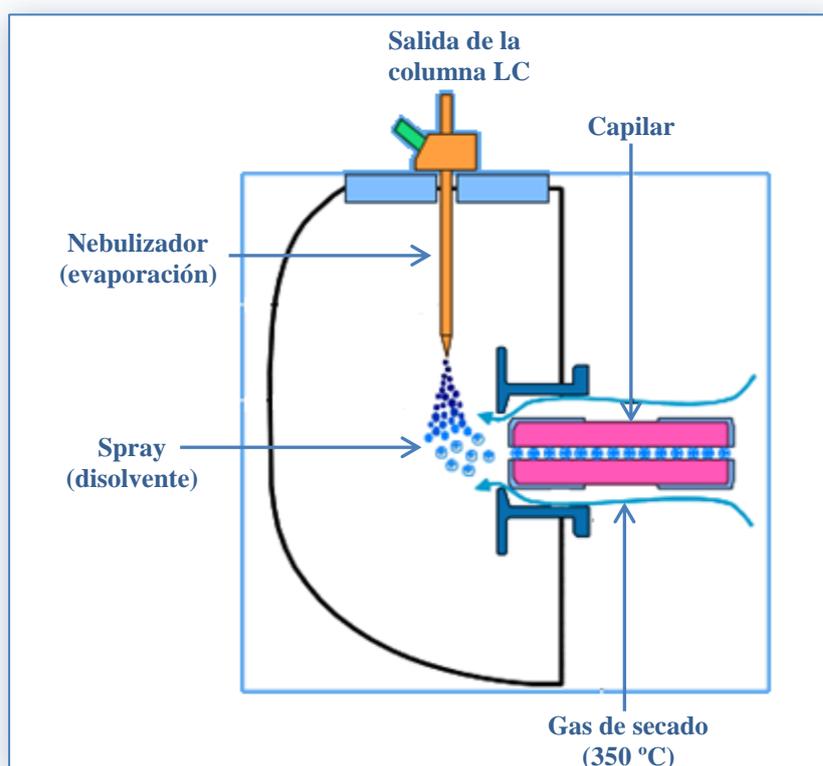
**Figura 4.** Etapas de vaporización e ionización en APCI<sup>70</sup>

<sup>70</sup> Espectrometría de Masas. Fundamentos y Teoría. Agilent Technologies 2016. [www.agilent.com/cs/library/.../public/5991-5857\\_Agilent\\_MS\\_Theory\\_ES.pdf](http://www.agilent.com/cs/library/.../public/5991-5857_Agilent_MS_Theory_ES.pdf)

### b) Electrospray (ESI)

El acoplamiento LC-ESI-MS fue descrito por primera vez por Yamashita y Fenn en 1984<sup>71,72</sup>, lo que le supuso a Fenn el premio Nobel en Química en 2002 «for the development of soft desorption ionisation methods for mass spectrometric analyses of biological macromolecules (electrospray)». En esta técnica de ionización se aplica un campo eléctrico de gran intensidad a las gotas de disolución procedentes de LC, favoreciendo la producción de iones sin necesidad de una etapa previa de evaporación del disolvente como ocurre en APCI.

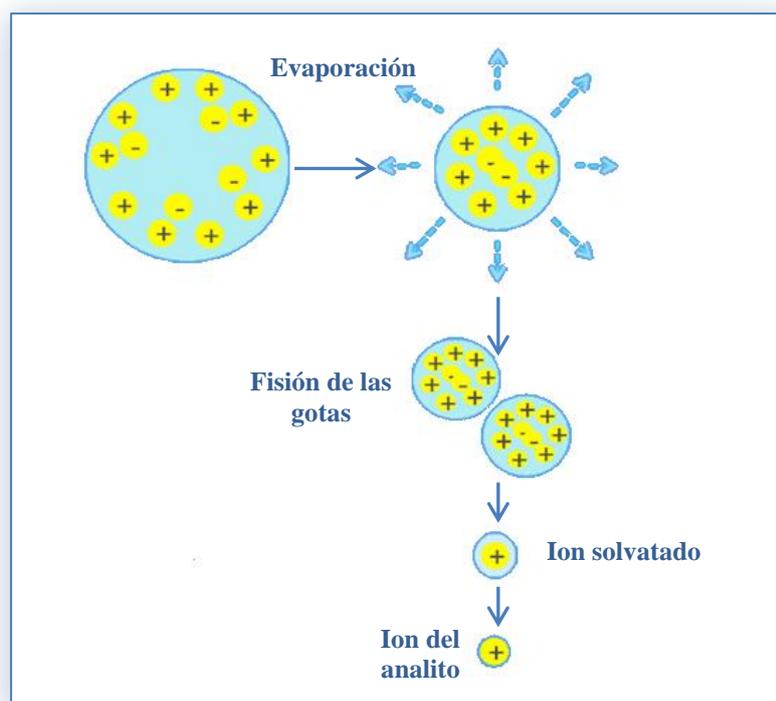
En la ionización ESI (**Figura 5**), los analitos disueltos en la fase móvil pasan a través de un capilar metálico a presión atmosférica, en cuyo extremo se aplica un potencial de alta intensidad (3 a 4 KV), de manera que la muestra emerge del capilar en forma de aerosol (nebulización) de gotas cargadas de pequeño tamaño (1  $\mu\text{m}$ ). A continuación las gotas son transportadas a través de un segundo capilar que se encuentra situado en un ángulo de 90 °, desde la región a presión atmosférica a la región de vacío del espectrómetro de masas. Durante el transporte, las gotas se hacen cada vez más pequeñas, hasta que las fuerzas repulsivas entre cargas en la superficie son capaces de superar las fuerzas cohesivas de tensión superficial y se produce la ruptura final de la gota originando iones de fase gaseosa (desolvatación) (**Figura 6**). La eliminación del disolvente se ve favorecida por el empleo de una corriente de N<sub>2</sub> a elevada temperatura (350 °C).



**Figura 5.** Componentes de una fuente ESI<sup>70</sup>

<sup>71</sup> Yamashita, M.; Fenn, J.B., Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme, *J. Phys. Chem.* **1984**, 88, 4451-4459.

<sup>72</sup> Yamashita, M.; Fenn, J.B., Negative ion production with the electrospray ion source, *J. Phys. Chem.* **1984**, 88, 4671-4675.



**Figura 6.** Etapas de la formación de iones en una fuente ESI<sup>70</sup>

En general, ESI es la fuente de ionización ideal para el análisis de moléculas de tamaño pequeño en LC aunque la posibilidad de generar iones con múltiples cargas permite también su aplicación al análisis de moléculas de gran tamaño (proteínas o péptidos).

### 3.3.2.3 Analizadores de Masas

Una vez que las moléculas de los analitos se han transformado en iones, estos son transportados hasta el analizador de masas, donde son separados en función de su carga/masa. El analizador de masas es el componente principal del espectrómetro de masas y así el nombre de la técnica depende del tipo de analizador.

Existen cuatro grandes grupos de analizadores de masas:

1. Analizadores de simple enfoque (magnéticos) y de doble enfoque (magnéticos y electrostáticos)
2. Analizador de cuadrupolo (Q)
3. Analizador de tiempo de vuelo (TOF)
4. Analizador de trampa de iones (IT)

La elección del analizador de masas dependerá principalmente del objetivo del análisis y de la sensibilidad requerida. El analizador debe conseguir separar iones con diferencias muy pequeñas entre sus relaciones masa/carga y, además, debe permitir el paso de un número suficientemente elevado de iones para que puedan ser detectados. Sin embargo, estas dos características no siempre son compatibles en un mismo diseño por lo que es necesario llegar a una situación de compromiso.

Las técnicas de ionización *blandas* utilizadas en LC-MS no originan generalmente fragmentación de los analitos, de manera que los espectros de masas que se obtienen

contienen un solo ion para cada compuesto ( $M^+$ ,  $MH^+$ ,  $M^-$ ), lo que no facilita su identificación.

La Espectrometría de Masas en tándem (MS/MS) utilizando analizadores de trampa de iones (IT) o sistemas híbridos (dos o más analizadores de masas conectados en serie) como por ejemplo el analizador Triple cuadrupolo (QqQ), permite la fragmentación de los iones precursores y la posterior detección de los iones producto. Dicha fragmentación se basa en el fenómeno de disociación inducida por colisión (CID), que ocurre dentro de una celda de colisión en la que los iones procedentes de la fuente de ionización son acelerados para incrementar su energía cinética e interactuar con una corriente de gas (gas de colisión). Dependiendo de la energía de colisión se obtienen diferentes fragmentos, también denominados iones producto, de cada uno de los analitos. A continuación estos iones producto son separados en un segundo analizador de masas en base a su relación masa/carga.

En función de que el objetivo del estudio sea el análisis de un grupo de compuestos seleccionados previamente (compuestos “objetivo”) o de compuestos desconocidos, los analizadores de masas se clasifican en instrumentos de alta resolución (HR-MS), que permiten el registro completo de todos los componentes de la matriz, e instrumentos de baja resolución, que son adecuados para la cuantificación de los compuestos “objetivo” debido a su elevada sensibilidad.

En la actualidad los Analizadores de Masas de alta resolución, como el analizador TOF, y los sistemas híbridos, como Q-TOF, están siendo cada vez más utilizados en numerosas aplicaciones, como por ejemplo la identificación de metabolitos y productos de degradación de contaminantes orgánicos como pesticidas y productos farmacéuticos<sup>73</sup>.

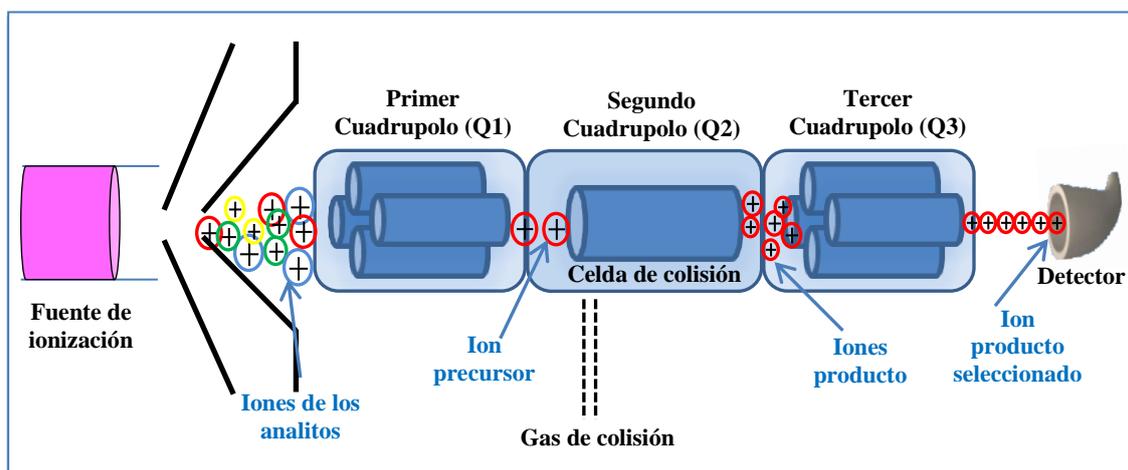
A continuación se describen los dos analizadores utilizados en esta Memoria, en primer lugar el analizador QqQ para la cuantificación de los 15 neuropéptidos seleccionados y en segundo lugar el analizador TOF de alta resolución para la detección los componentes del extracto de cabeza de abeja.

#### ***a) Analizador Triple cuadrupolo (QqQ)***

Un analizador QqQ consiste en tres cuadrupolos individuales conectados en línea (**Figura 7**). Los iones procedentes de la fuente de ionización llegan al primer cuadrupolo (Q1), donde se selecciona para cada analito el ion más intenso (ion precursor), el cual a continuación pasa al segundo cuadrupolo (Q2) que actúa como una celda de colisión en la que se genera un potencial eléctrico y junto con la acción del gas de colisión tiene lugar la fragmentación del ion precursor; finalmente, en el tercer cuadrupolo (Q3) se aíslan los iones producto generados en la fragmentación y, por último, llegan al detector donde son medidos.

---

<sup>73</sup> Ferrer, I; Writer, J.H.; Keen, O.S.; Lester, Y.; Padilla-Sánchez, J.A.; Fernández-Ramos, C.; Thurman, E.M., LC-TOF-MS for the Identification of Environmental Metabolites and Degradation Products, *Comprehensive Anal. Chem.* **2016**, *71*, 231-261.



**Figura 7.** Esquema de los componentes de un Analizador de Masas QqQ

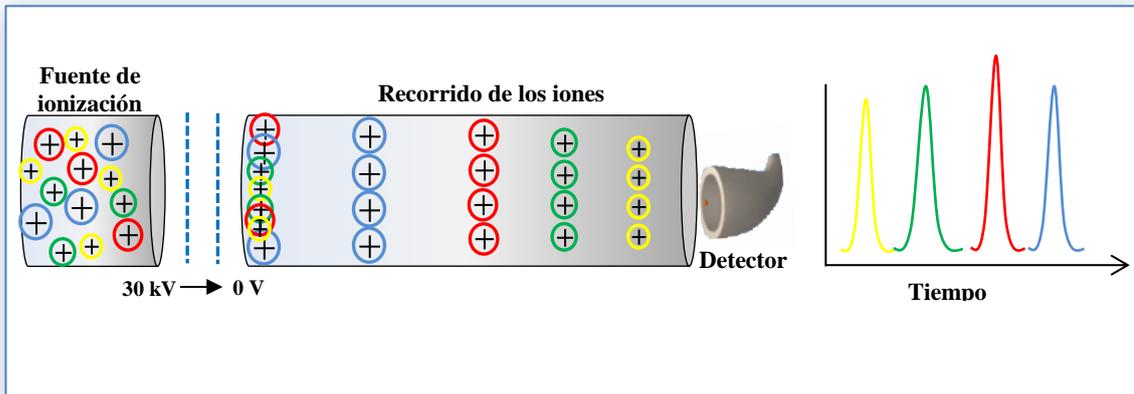
Los Espectrómetros de Masas-QqQ ofrecen cuatro posibilidades de trabajo: análisis del ion precursor (*precursor-ion scan*), análisis de los iones producto (*product-ion scan*), monitoreo de la reacción seleccionada (SRM) y pérdida neutra constante (*constant neutral loss*). Cada uno de estos modos de trabajo depende del modo de adquisición de los cuadrupolos Q1 y Q3, que pueden trabajar en modo barrido completo (*full scan*) o monitoreo de un ion seleccionado (*SIM*), registrando todas las masas en un intervalo de  $m/z$  y registrando solo un ion de  $m/z$  determinada, respectivamente.

- *Precursor-ion scan*: Q1 trabaja en modo “*full scan*” y lleva a cabo un registro completo de todos los iones procedentes de la fuente de ionización, mientras que Q3 se configura en modo SIM para el registro de un determinado ion fragmento. Este modo de trabajo es útil para compuestos de una misma familia que originen un mismo ion fragmento.
- *Product-ion scan*: Q1 trabaja en modo SIM, aislando un determinado ion precursor, que a continuación llega hasta la celda de colisión donde se fragmenta y, finalmente, en Q3 se lleva a cabo un registro *en full scan* de todos los iones fragmento obtenidos durante la fragmentación en Q2.
- *MRM (Multiple Reaction Monitoring)*: en Q1 se aísla el ion precursor (modo SIM) y una vez fragmentado en Q2, se selecciona un ion producto específico en Q3 (modo SIM). Este es el modo de operación más utilizado en análisis cuantitativo debido a su elevada sensibilidad y selectividad.
- *Constant neutral loss*: Q1 y Q3 registran en *full scan* de forma simultánea pero con una diferencia de  $m/z$  constante entre ambos cuadrupolos, se calculan las pérdidas de masa entre Q1 y Q3 y se miden aquellos picos que dan una pérdida de masa característica. Este modo de trabajo es útil para la identificación de compuestos desconocidos con grupos funcionales comunes como por ejemplo el análisis de 35 ribonucleótidos en orina<sup>74</sup> aunque no es adecuado para análisis cuantitativo debido a su falta de sensibilidad.

<sup>74</sup> Teichert, F.; Winkler, S.; Keun, H.C.; Steward, W.P.; Gescher, A.J.; Farmer, P.B.; Singh, R., Evaluation of urinary ribonucleoside profiling for clinical biomarker discovery using constant neutral loss scanning liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, 25, 2071–2082.

### b) Analizador Tiempo de vuelo (TOF)

En un analizador TOF los iones procedentes de la fuente de ionización son acelerados con igual energía en la entrada y a continuación atravesarán una región libre de campos eléctricos y magnéticos (recorrido de los iones), que está situado perpendicularmente a la fuente de iones y llegarán a un detector que está a una determinada distancia. Los iones llegarán hasta el electrodo a diferentes tiempos, dependiendo de su masa, carga y energía cinética (**Figura 8**).



**Figura 8.** Esquema de un Analizador de Masas TOF

El TOF tiene la capacidad de registrar el espectro de masas completo de los iones generados en la fuente de ionización, proporcionando información acerca de la masa exacta de los analitos. Aunque hasta hace pocos años su aplicación ha sido muy escasa, principalmente debido al elevado coste de estos instrumentos, en la actualidad están siendo cada vez más utilizados para la identificación de compuestos desconocidos<sup>75</sup>.

### 3.4. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE NEUROPEPTIDOS EN ABEJA

Gran parte de la información encontrada en la literatura sobre el desarrollo de métodos para la determinación de neuropéptidos, se centra en la identificación de los mismos mientras que los métodos que permiten su cuantificación son muy escasos hasta la fecha<sup>76-78</sup>.

En los trabajos publicados sobre identificación de neuropéptidos en abejas se utilizó la técnica de MALDI-TOF-MS, analizando directamente los tejidos o bien las muestras tras una etapa de extracción, mientras que la técnica seleccionada para la

<sup>75</sup>Gómez-Ramos, M.M.; A. I. García-Valcárcel, A.I.; Tadeo, J.L.; Fernández-Alba A.R.; Hernando, M.D., Screening of environmental contaminants in honey bee wax comb using gas chromatography–high-resolution time-of-flight mass spectrometry, *Environ. Sci. and Pollut. R.* **2016**, *23*, 4609–4620.

<sup>76</sup> Li, L.; Sweedler, J.V., Peptides in the brain: Mass spectrometry-based measurement approaches and challenges, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, *1*, 451-483.

<sup>77</sup> Lanckmans, K.; Sarre, S.; Smolders, I.; Micote, Y., Quantitative liquid chromatography/mass spectrometry for the analysis of microdialysates, *Talanta* **2008**, *74*, 458-469.

<sup>78</sup> Perry, M.; Li, Q.; Kennedy, R.T., Review of recent advances in analytical techniques for the determination of neurotransmitters, *Anal. Chim. Acta.* **2009**, *653*, 1-22.

cuantificación de los neuropéptidos fue LC-MS/MS, excepto en uno de los trabajos en el que se utilizó cromatografía de líquidos capilar acoplada off-line a MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF-MS<sup>79</sup>.

En cuanto a determinaciones más específicas en insectos, se ha identificado la familia de las pirokininas (-FXPRLamidas) mediante MALDI-TOF/MS y nanoLC-Q-TOF-MS/MS en dos especies de langosta (*L. migratoria* y *S. gregaria*) llevando a cabo la extracción de los neuropéptidos con una mezcla de metanol:agua:ácido acético 90:9:1 para el análisis mediante MALDI-TOF y con 50 µL de metanol para el análisis mediante nanoLC-Q-TOF-M/MS<sup>80</sup>. En otro trabajo, utilizando cromatografía de líquidos capilar bidimensional acoplada a Q-TOF-MS/MS, se han identificado 38 péptidos y neuropéptidos en larvas de *Drosophila* (20 de los cuales no se habían detectado en un trabajo previo utilizando cromatografía capilar monodimensional LC-MS/MS), llevando a cabo la extracción con 20 µL de metanol:agua:ácido fórmico (90:9:1)<sup>81</sup>. En cerebro de abeja melífera, se han identificado 13 neuropéptidos mediante LC acoplada off-line a MALDI-TOF, llevando a cabo la extracción primero con metanol y después con ácido trifluoroacético al 0.1%<sup>82</sup>. Utilizando el marcado con isótopos en combinación con UPLC-ESI-Q-TOF se identificaron y cuantificaron 50 neuropéptidos en abeja melífera, realizando la extracción con 400 µL de acetona:agua:HCl concentrado (40:6:1)<sup>54</sup>. Posteriormente, se identificaron 66 péptidos en las diferentes partes del sistema nervioso central de la abeja melífera, incluyendo los 50 neuropéptidos citados en el trabajo anterior y llevando a cabo la extracción con metanol: agua:ácido acético (90:9:1)<sup>59</sup>.

M. Pratavieira y col.<sup>62</sup> utilizaron “MALDI spectral imaging” para obtener imágenes de cerebro de abeja, mostrando la distribución y la concentración relativa de los neuropéptidos AmTRP-5 y AST-1. Para ello, los cerebros (a -12 °C) fueron seccionados con un micrótopo y las láminas se situaron sobre una placa MALDI, donde se sometieron a deshidratación con etanol:agua (70:v/v y 90% v/v), se recubrieron con ácido α-ciano-4-hidroxicinámico y se llevó a cabo la adquisición de espectros en modo MALDI-TOF-TOF.

B. Han y col.<sup>63</sup> extrajeron los neuropéptidos de 150 cerebros de abeja llevando a cabo una homogeneización previa de los mismos y posterior extracción de los neuropéptidos a 4°C con metanol:agua:ácido acético (90:9:1). Los extractos fueron centrifugados a 12000 g durante 10 min a 4°C y el sobrenadante fue liofilizado y almacenado a -80°C. Para su análisis mediante LC-MS/MS, las pastillas de neuropéptidos se disolvieron en ácido fórmico al 0.1% y a continuación las muestras se introdujeron en una precolumna de sílice fundida de 2 cm de longitud y 100 µm de

---

<sup>79</sup> Wei, H.; Nolkrantz, Parkin, M.C.; Chisolm, C.N.; O'Callaghan, J.P.; Kennedy, R.T., Identification and quantification of neuropeptides in brain tissue by capillary liquid chromatography coupled off-line to MALDI-TOF and MALDI-TOF/TOF-MS, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4342-4351.

<sup>80</sup> Clynen, E.; Baggerman, G.; Huybrechts, J.; Vanden Bosch, L.; De Loof, A.; Schoofs, L., Peptidomics of the locust corpora allata: Identification of novel pyrokinins (-FXPRLamides), *Peptides* **2003**, *24*, 1493-1500.

<sup>81</sup> Baggerman, G.; Boonen, K.; Verleyen, P.; De Loof, A.; Schoofs, L., Peptidomic analysis of the larval *Drosophila melanogaster* central nervous system by two-dimensional capillary liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* **2005**, *40*, 250-260.

<sup>82</sup> Audsley, N.; Weaver, R.J., Analysis of peptides in the brain and corpora cardiaca-corpora allata of the honey bee, *Apis mellifera* using MALDI-TOF mass spectrometry, *Peptides* **2006**, *27*, 512-520.

diámetro interno Aqua C18 con un tamaño de partícula de 5 µm, utilizando como fase móvil ácido fórmico al 0.1% a un flujo de 5 µL/min. Seguidamente, se procedió a la separación cromatográfica en una columna de C18 con tamaño de partícula de 2 µm y a su detección mediante MS/MS empleando un LTQ-Orbitrap, diferenciándose este trabajo del resto por ello.

En los últimos años también se han realizado estudios de identificación de neuropéptidos en otros insectos como en moscas de la especie *Glossina morsitans morsitans*<sup>83</sup>, en escarabajos de la especie *Nicrophorus vespilloides*<sup>84</sup> o en hormigas de la especie *Camponotus floridanus*<sup>85</sup>.

---

<sup>83</sup> Caers, J.; Boonen, K.; Van Den Abbeele, J.; Van Rompay, L.; Schoofs, L.; Van Hiel, M.B., Peptidomics of Neuropeptidergic Tissues of the Tsetse Fly *Glossina morsitans morsitans*, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2015**, *26*, 2024-2038.

<sup>84</sup> Cunningham, C.B.; Badgett, M.J.; Meagher, R.B.; Orlando, R.; Moore, A.J., Ethological principles predict the neuropeptides co-opted to influence parenting, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14225.

<sup>85</sup> Schmitt, F.; Vanselow, J.T.; Schlosser, A.; Kahnt, J.; Rössler, W.; Wegener, C., Neuropeptidomics of the Carpenter Ant *Camponotus floridanus*, *J. Proteome Res.* **2015**, *14*, 1504-1514.

#### **4. OBJETIVOS**

El objetivo general de este Trabajo Fin de Grado de Química es la puesta a punto de un método para el análisis de 13 neuropéptidos en cerebros de abeja, lo que implica los siguientes objetivos específicos:

- (1) Desarrollo de un método de análisis mediante LC-QqQ-MS/MS para la separación e identificación de los neuropéptidos seleccionados en cerebros de abeja melífera.
- (2) Optimización de un método sencillo y eficiente para la extracción de los neuropéptidos seleccionados.
- (3) Validación del método completo en términos de linealidad, efecto matriz, límite de cuantificación, exactitud y precisión.
- (4) Aplicación de la metodología desarrollada a la determinación de los neuropéptidos en 39 muestras de abejas melíferas procedentes de colmenares españoles.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. REACTIVOS Y MATERIALES

Los patrones sólidos de los 13 neuropéptidos seleccionados en este trabajo y cuyas características se muestran en la **Tabla 1**, fueron suministrados por Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA, USA).

**Tabla 1.** Fórmula molecular y masa molecular de los neuropéptidos seleccionados

Compuesto	Neuropéptido*	Fórmula molecular	Masa molecular
1	RQYSFGLA	C <sub>40</sub> H <sub>60</sub> N <sub>12</sub> O <sub>10</sub>	868.4555
2	GRDYSFGLa	C <sub>41</sub> H <sub>60</sub> N <sub>12</sub> O <sub>12</sub>	912.4454
3	GRQPYSFGLa	C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> N <sub>14</sub> O <sub>12</sub>	1022.5297
4	ALMGFQGVRa	C <sub>43</sub> H <sub>72</sub> N <sub>14</sub> O <sub>10</sub> S	976.5276
5	IDLSRFYGHFNT	C <sub>68</sub> H <sub>96</sub> N <sub>18</sub> O <sub>19</sub>	1468.7098
6	MVPVPVHHMADELLRNGPDTVI	C <sub>101</sub> H <sub>174</sub> N <sub>30</sub> O <sub>31</sub> S <sub>2</sub>	2439.2402
7	NVGTLARDFALPPa	C <sub>62</sub> H <sub>100</sub> N <sub>18</sub> O <sub>17</sub>	1368.7513
8	NVGSVAREHGLPYa	C <sub>61</sub> H <sub>96</sub> N <sub>20</sub> O <sub>18</sub>	1396.7211
9	NVASLARTYTLPQNAa	C <sub>70</sub> H <sub>116</sub> N <sub>22</sub> O <sub>22</sub>	1616.8635
10	SVSSLARTGDLPVREQ	C <sub>71</sub> H <sub>123</sub> N <sub>23</sub> O <sub>26</sub>	1713.901
11	NVPIYQEPRF	C <sub>59</sub> H <sub>87</sub> N <sub>15</sub> O <sub>16</sub>	1261.6455
12	NLDEIDRVGWSGFV	C <sub>72</sub> H <sub>107</sub> N <sub>19</sub> O <sub>23</sub>	1605.7787
13	NIDEIDRTAFDNFF	C <sub>77</sub> H <sub>109</sub> N <sub>19</sub> O <sub>26</sub>	1715.7791

\*a: amida

Metanol (MeOH) grado LC se obtuvo de Honeywell (Morristown, NJ, USA), agua ultrapura de Fisher Chemical (Waltham, MA, USA), ácido fórmico de Fluka Analytical (Steinheim, Alemania), sulfato de magnesio de Panreac (Barcelona, España) y cloruro de sodio de J.T. Baker (Deventer, Países Bajos).

A partir de los patrones sólidos de los neuropéptidos, se prepararon disoluciones patrón individuales de 200 mg/L de concentración en MeOH conteniendo ácido fórmico 0.5M. Estas disoluciones patrón se almacenaron en viales a una temperatura de - 20 °C. A partir de las disoluciones patrón individuales, se preparó una mezcla de los neuropéptidos en MeOH de 10 mg/L.

Para la extracción de los neuropéptidos se utilizó una centrifuga (Orto Alresa Consul 21, Madrid, España) y un agitador automático AGYTAX® de Cirta (Lab. S.L., España).

## 5.2. PROCEDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS DE NEUROPEPTIDOS MEDIANTE LC-MS

### 5.2.1. Análisis mediante LC-QqQ-MS/MS

La validación y el análisis de los 13 neuropéptidos se llevó a cabo mediante LC-QqQ-MS/MS, empleando un equipo Agilent UHPLC 1290 Series acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (QqQ) Agilent Technologies 6490. La adquisición y el procesado de datos se realizó mediante los softwares Agilent MassHunter QQQ Acquisition y Quantitative Analysis B.07.00 en modo Dynamic MRM con una ventana de tiempo de retención de 0.8 min.

Para la separación cromatográfica de los analitos se utilizó una columna Zorbax Eclipse Plus C8 (2.1 mm x 100 mm) de Agilent empacada con partículas de 1.8  $\mu\text{m}$  y termostatzada a 35 °C. La fase móvil estaba compuesta por una disolución A de agua ultrapura conteniendo 0.1% de ácido fórmico y una disolución B de MeOH:agua ultrapura (95:5) conteniendo 0.1% de ácido fórmico. La separación de los analitos se realizó con un flujo constante de fase móvil de 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  y utilizando el siguiente programa de gradiente: 20% de B durante 2 min, un gradiente lineal hasta el 100% de B en 13 min, 2 minutos con el 100 % de B, 2.5 min para volver a las condiciones iniciales y por último 2 min en estas condiciones para estabilizar la columna, siendo el volumen de inyección de 10  $\mu\text{L}$ .

El equipo incluía una fuente de iones ESI JetStream, que empleaba nitrógeno como gas de nebulización a 45 psi. Esta fuente de iones fue configurada como se indica a continuación: temperatura del gas de secado (*drying gas*) 120 °C a un flujo de 13 L/min y temperatura del “*super-heated sheath*” gas 375 °C a un flujo de 10 L/min. El gas de colisión fue nitrógeno (99.999% pureza) y los voltajes de fragmentación y del capilar se seleccionaron a 380 V y 3000 V, respectivamente y trabajando en modo positivo.

### 5.2.2. Análisis mediante LC-TOF-MS

Para evaluar los componentes de la matriz en el extracto de abeja se utilizó un LC Agilent 1200 Series acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF) 6550 de Agilent. Los analitos se separaron utilizando una columna analítica Eclipse plus C8 (2.1 mm x 100 mm) y 1.8  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula (Agilent Technologies, Santa Clara CA).

Para la separación de los analitos se utilizó una fase móvil compuesta por una disolución A de agua ultrapura conteniendo 0.1% de ácido fórmico, 5mM de formiato amónico y 2% MeOH y una disolución B de MeOH conteniendo 0.1% de ácido fórmico, 5mM formiato amónico y 2% agua ultrapura. El programa de gradiente fue: 20% de B durante 2 min, un gradiente lineal hasta el 100% de B en 13 min, 2 minutos con el 100 % de B y por último 2.5 min para volver a las condiciones iniciales y 2.0 min en las condiciones iniciales para la estabilización de la columna. El flujo de fase móvil fue de 0.3 mL/min y el volumen de inyección de 10  $\mu\text{L}$ .

Para la identificación de los componentes de la matriz en el extracto de abeja se operó en modo de alta resolución y para ello el Analizador Q-TOF operó como un sistema TOF-MS. Los iones se generaron empleando una fuente de iones ESI Dual Spray JetStream de Agilent. Los parámetros seleccionados en la fuente ESI fueron los siguientes: temperatura del “*super-heated sheath*” gas 350 °C a un flujo de 12 L/min, voltaje del capilar 4000 V, presión del gas de nebulización 30 psi,

temperatura del “drying gas” 160 °C a un flujo de 10 L/min y voltaje de fragmentación 360 V (fragmentación CID). El rango de masas (80-3200 m/z) fue calibrado usando la mezcla proporcionada por el fabricante, para lo cual se inyectó la mezcla en modo positivo usando las siguientes masas de referencia: 121.0509 y 922.0098 m/z (resolución de 38 000 FWHM<sub>500</sub> en 922.0098 m/z). Los datos se registraron en modo “full-scan” y fueron procesados con el software Agilent MassHunter (B.07.00).

### 5.3. PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE NEUROPEPTIDOS EN ABEJA

En primer lugar se diseccionaron 20 cabezas de abejas (aproximadamente 0.2 g), se introdujeron en un tubo Falcón de 15 mL y se les añadió 500 µL de agua ultrapura conteniendo 1% de ácido fórmico. Tras dejar la mezcla en reposo durante 30 minutos, se homogenizaron manualmente utilizando una varilla de vidrio, seguidamente, se añadieron 2 mL de MeOH conteniendo 1% de ácido fórmico y la mezcla se agitó automáticamente durante 7 minutos.

A continuación, se añadieron 0.1 g de MgSO<sub>4</sub> anhidro y 0.05 g de NaCl y se agitó automáticamente de nuevo durante 7 minutos. La mezcla se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos y una alícuota de 300 µL del sobrenadante se recogió en un vial. El extracto obtenido se llevó a sequedad con una suave corriente de N<sub>2</sub> y finalmente el residuo obtenido se redisolvió en 60 µL de MeOH/H<sub>2</sub>O 20:80 (v/v) para su análisis mediante LC-QqQ-MS/MS y LC-TOF-MS. Teniendo en cuenta el procedimiento completo, el factor de preconcentración fue de 5.

### 5.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

El método de LC-QqQ-MS/MS puesto a punto en este trabajo se validó en términos de linealidad, efecto matriz, recuperaciones medias (veracidad) y precisión (repetibilidad).

El estudio de linealidad se realizó utilizando disoluciones patrón de los neuropéptidos en MeOH/H<sub>2</sub>O 20:80 (v/v) a 7 niveles de concentración (1, 5, 10, 25, 50, 75 y 100 µ/L).

Para el estudio del efecto matriz, se prepararon disoluciones patrón de los neuropéptidos a los 7 niveles de concentración indicados anteriormente pero preparados utilizando extractos de abeja. No obstante, como no es posible encontrar un blanco de abeja que no contenga neuropéptidos, se inyectó el extracto de abeja y la señal obtenida para cada uno de los neuropéptidos se restó a la obtenida en cada uno de los niveles de concentración.

Para los estudios de recuperación y precisión se fortificaron muestras de abejas a un nivel de concentración de 2 µg/Kg por cuadruplicado y la cuantificación de los analitos se llevó a cabo utilizando el método de adición de estándar a 4 niveles de concentración (0, 10 µg/L, 20 µg/L y 30 µg/L).

## 5.7. MUESTRAS REALES DE ABEJAS

Se analizaron 39 muestras de abejas procedentes de colmenas de diferentes provincias de España. Las muestras de abeja fueron recogidas por los apicultores en botes de Teflón y fueron transportadas hasta el laboratorio en contenedores refrigerados con hielo. A continuación las muestras fueron congeladas a -20 °C hasta su análisis.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. PARÁMETROS DE LC-MS/MS

En primer lugar se inyectaron patrones individuales de cada uno de los neuropéptidos a una concentración de 100 µg/L en MeOH:agua ultrapura (50:50 v/v) directamente en el sistema MS y registrando las señales en un rango de masas de 50-800 *m/z* (“*full scan*”). A partir de las señales obtenidas se seleccionó el ion más intenso para cada uno de los analitos como ion precursor (**Tabla 2**). En la mayoría de los casos el ion precursor correspondía al ion molecular doblemente cargado  $[M-2H]^{2+}$ , excepto para el **Compuesto 1** (RQYSFGLA) cuyo ion más intenso fue el  $[MH]^+$  y para el **Compuesto 6** (MVPVPVHHMADELLRNGPDTVI) y el **Compuesto 10** (SVSSLARTGDLPVREQ) cuyos iones más intensos fueron  $[M-3H]^{3+}$ .

A continuación, los patrones individuales de los neuropéptidos (100 µg/L MeOH:agua ultrapura, 50:50 v/v) se inyectaron directamente en el sistema MS con el fin de seleccionar al menos dos iones producto de acuerdo con los criterios establecidos en la Directiva 96/23/CE en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados cuando se utiliza la MS acoplada a técnicas cromatográficas como método de confirmación<sup>86</sup>. En este caso se desarrolló un método automático utilizando el software MassHunter para seleccionar las energías de colisión (CE) óptimas de cada ion producto en el intervalo comprendido entre 5 a 40 V. Para cinco de los compuestos se seleccionaron dos iones producto, siendo en general el ion más intenso el ion de cuantificación y el segundo de ellos el de confirmación (**Tabla 2**). Sin embargo, para el resto de compuestos se obtuvieron más de dos iones producto por lo que con vistas a una extraconfirmación se seleccionaron tres iones producto para seis de ellos y cuatro iones para uno de los compuestos (NVGSVAREHGLPY\_a).

Por último, se realizó la inyección en columna de un patrón mezcla de los neuropéptidos en el modo “Product ion” y se obtuvieron los tiempos de retención ( $t_R$ ) para cada uno de ellos. En la **Tabla 2** se muestran todos los parámetros optimizados para cada uno de los neuropéptidos. Asimismo, se muestra el ratio entre los iones producto seleccionados que corresponde con el cociente entre la señal obtenida para cada uno de los iones producto de confirmación y el ion de cuantificación en porcentaje.

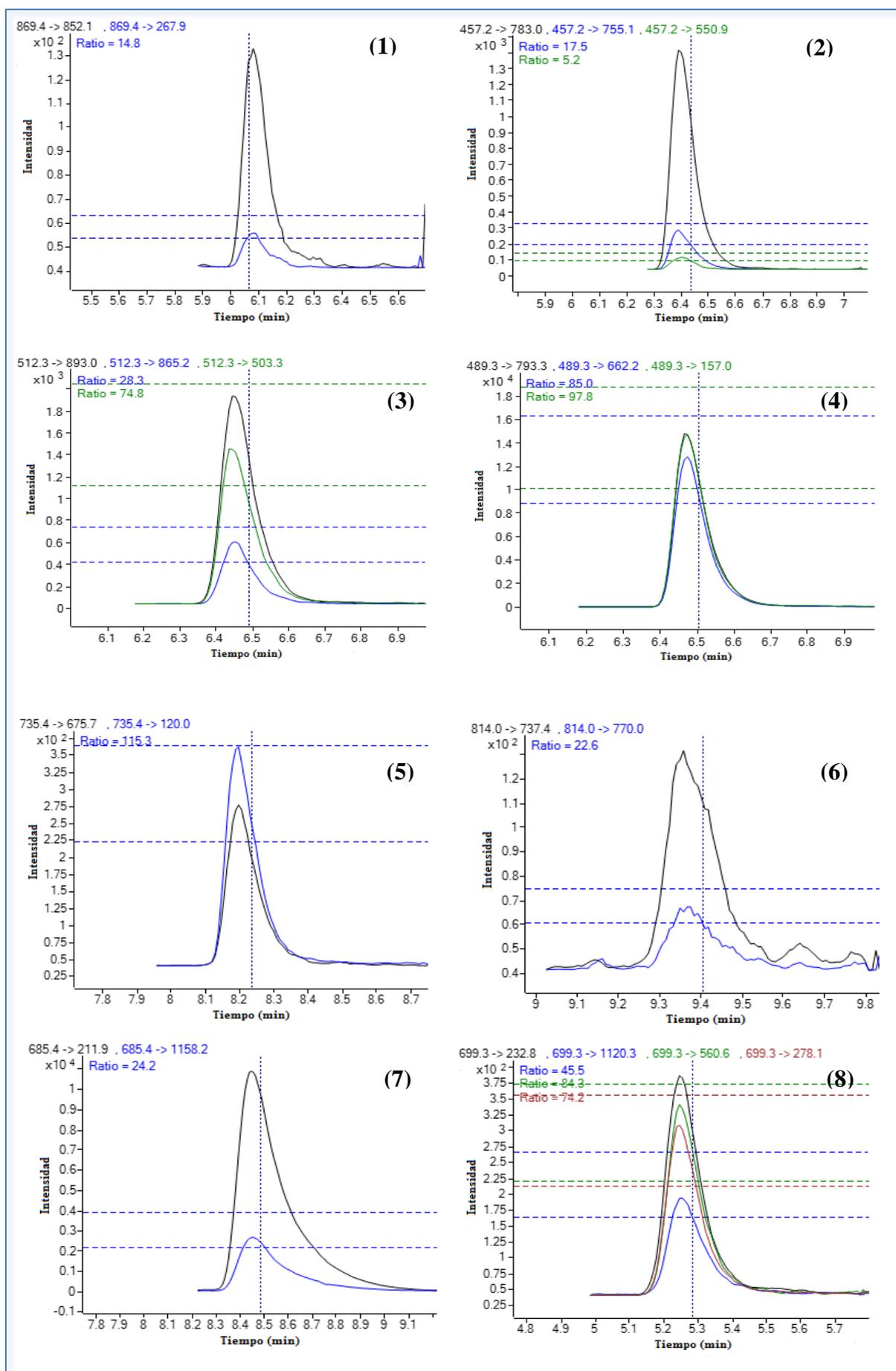
---

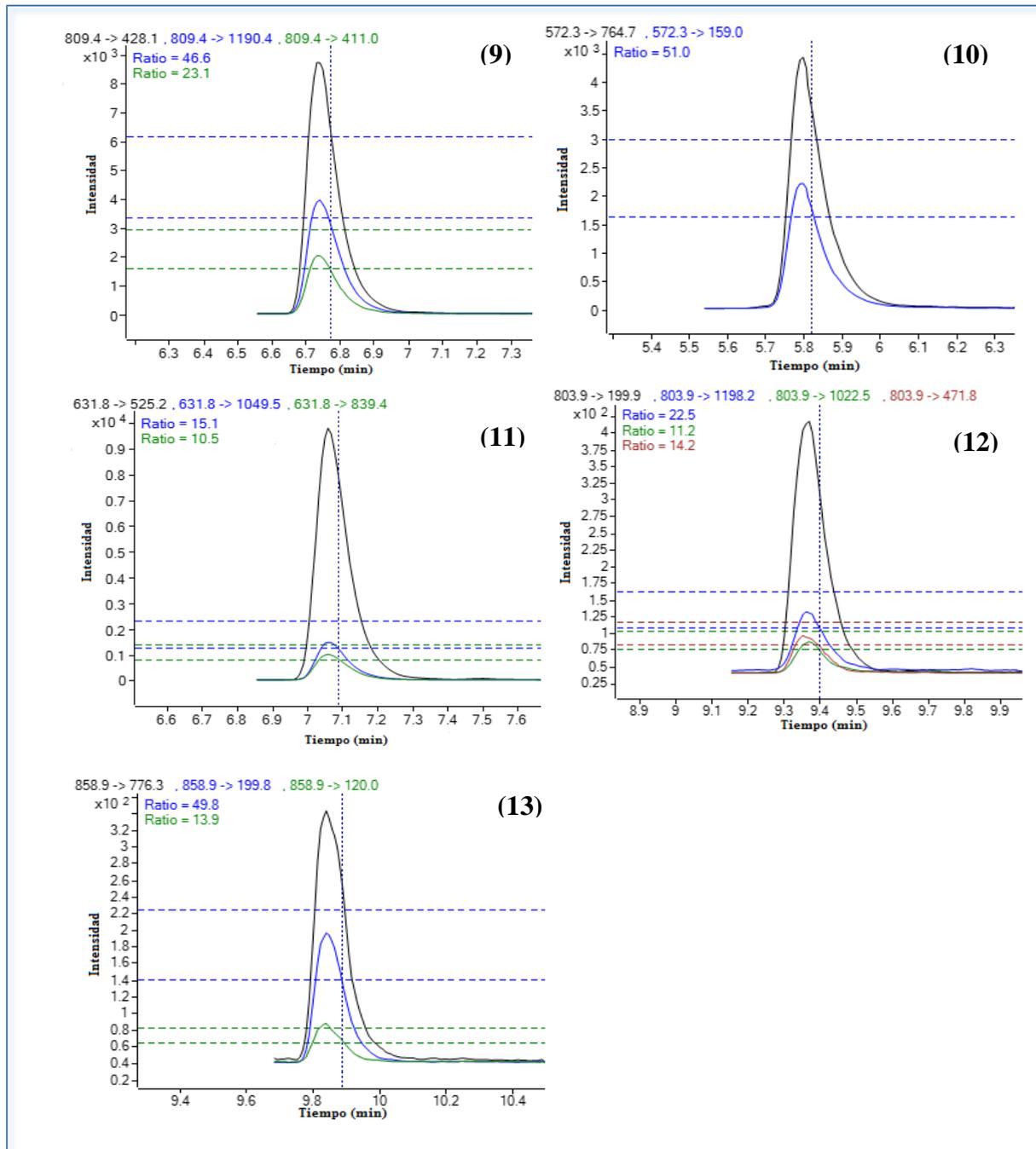
<sup>86</sup> 2002/657/CE: Decisión de la Comisión, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. <http://data.europa.eu/eli/dec/2002/657/oj>

**Tabla 2.** Parámetros del MS, tiempo de retención y transiciones seleccionados para los neuropéptidos estudiados

Neuropéptido	t <sub>R</sub> (min)	Ion precursor (m/z)	Iones producto (m/z)	Ratio	CE (eV)
<b>RQYSFLA</b>	6.3	869.4	852.1	14.8	40
			267.9		40
<b>GRDYSFGLa</b>	6.68	457.2	783	17.5	20
			755.1		20
			550.9		30
<b>GRQPYSFGLa</b>	6.58	512.3	893	74.8	20
			503.3		15
			865.2		30
<b>ALMGFQGVRa</b>	6.58	489.3	793.3	97.8	20
			157		20
			662.2		20
<b>IDLSRFYGHFNT</b>	8.35	735.4	120	115.3	40
			675.7		30
<b>MVPVPVHHMADELLRNGPDTVI</b>	9.43	814	737.4	22.6	15
			770		20
<b>NVGTLARDFALPPa</b>	8.72	685.4	211.9	24.2	20
			1158.2		20
<b>NVGSVAREHGLPYa</b>	5.4	699.3	232.8	84.3	40
			560.6		30
			278.1		40
			1120.3		20
<b>NVASLARTYYLPQNAa</b>	6.96	809.4	428.1	46.6	20
			1190.4		20
			411		30
<b>SVSSLARTGDLPVREQ</b>	5.95	572.3	764.7	51	20
			159		20
<b>NVPIYQEPFR</b>	7.26	631.8	525.2	15.1	20
			1049.5		20
			839.4		20
<b>NLDEIDRVGWSGVF</b>	9.56	803.9	199.9	22.5	30
			1198.2		20
			471.8		30
			1022.5		20
<b>NIDEIDRTAFDNFF</b>	10.1	858.9	776.3	49.8	20
			199.8		40
			120		20

A continuación en la **Figura 9** se muestran los cromatogramas de los iones producto seleccionados para cada uno de los neuropéptidos.





**Figura 9.** Cromatogramas obtenidos mediante LC-QqQ-MS/MS de un patrón de los siguientes neuropéptidos: (1) RQYSFLA, (2) GRDYSFGLa, (3) GRQPYSFGLa, (4) ALMGFQGVra, (5) IDLSRFYGHFNT, (6) MVPVPVHHMADELLRNGPDTVI, (7) NVGTLARDFALPPa, (8) NVGSVAREHGLPYa, (9) NVASLARTYYLPQNAa, (10) SVSSLARTGDLPVREQ, (11) NVPIYQEPFRF, (12) NLDEIDRVGWSGVF y (13) NIDEIDRTAFDNFF

## 6.2. OPTIMIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE NEUROPEPTIDOS EN ABEJA

Existen en la bibliografía varios métodos para la extracción de neuropéptidos en cerebros de abeja, utilizando generalmente mezclas acuosas de metanol conteniendo diferentes ácidos, como ácido acético<sup>63,80</sup>, ácido fórmico<sup>80</sup> o ácido trifluoroacético<sup>82</sup>.

Para la optimización de la extracción de los 13 neuropéptidos objeto de estudio, se ensayaron en primer lugar mezclas de metanol:agua (50:50, v/v) y acetonitrilo:agua (50:50, v/v), conteniendo en ambos casos 1 % de ácido fórmico, utilizando para ello 20 cabezas de abeja fortificadas con los neuropéptidos. Los resultados obtenidos utilizando como disolvente de extracción metanol estuvieron comprendidos entre el 25-50 % mientras que con acetonitrilo fueron inferiores en todos los casos.

Por otra parte, hay que tener en cuenta que para muestras con bajo contenido en agua como es el caso que nos ocupa, la adición de agua previa a la etapa de extracción mejora en muchos casos la recuperación<sup>87</sup>. Por este motivo, a las muestras de cerebro fortificadas con los analitos se les añadió diferentes volúmenes de agua (0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 mL) y se dejaron en reposo durante 30 minutos. A continuación, se les añadió 2 mL de MeOH conteniendo 1% de ácido fórmico y tras agitar automáticamente la mezcla durante 7 minutos se volvieron a extraer durante 7 minutos más pero añadiendo 0.1 g de MgSO<sub>4</sub> anhidro y 0.05 g de NaCl. Finalmente, una alícuota de 300 µL del sobrenadante se llevó a sequedad con una suave corriente de N<sub>2</sub> y el residuo obtenido se redisolvió en 60 µL de MeOH/H<sub>2</sub>O 20:80 (v/v).

Se observó que las recuperaciones mejoraban para todos los analitos al aumentar el volumen de agua añadido a la muestra hasta alcanzar un máximo para un volumen de 0.5 mL. Por tanto, para obtener las mejores recuperaciones sin causar una gran dilución de la muestra se seleccionó añadir un volumen de 0.5 mL de agua a las muestras de cerebro, previo a la extracción con 2 mL de metanol conteniendo 1 % de ácido fórmico.

Debido a la complejidad de la muestra, una vez optimizada la etapa de extracción se procedió a evaluar la composición del extracto obtenido. Para ello, se analizó un extracto de cerebro de abeja mediante LC-TOF-MS. En la **Figura 10** se muestran los componentes presentes en el extracto, obteniendo un total de 9760 compuestos.

A continuación se ensayaron las siguientes estrategias para reducir los componentes de la matriz, principalmente lípidos y proteínas:

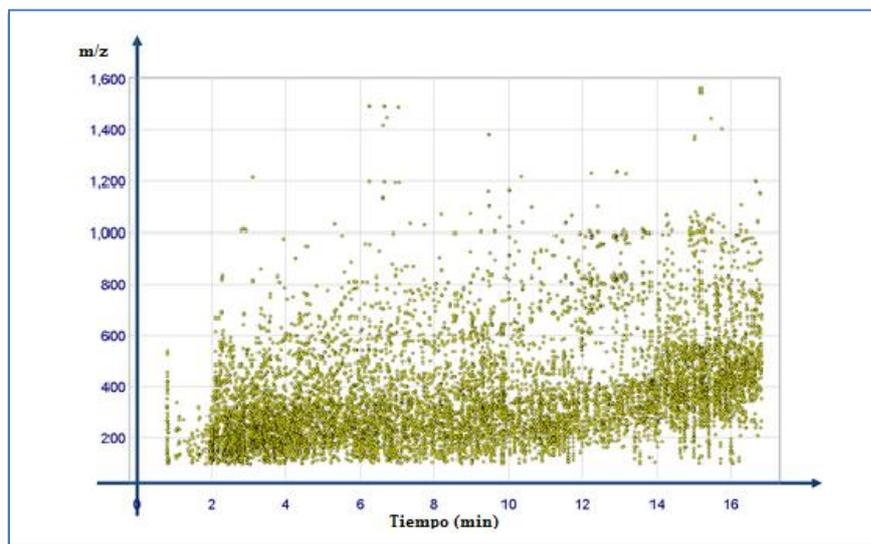
- La Congelación del extracto (freezing out) que provoca la eliminación de algunos de los componentes de la matriz (grasas)<sup>88</sup>.
- La adición de sólidos adsorbentes como por ejemplo el Z-Sep es un método muy efectivo para la limpieza de extractos<sup>89</sup>.

<sup>87</sup> Rajski, L.; Lozano, A.; Belmonte-Valles, N.; Uclés, A.; Uclés, S.; Mezcuca, M.; Fernandez-Alba, A.R., Comparison of three multiresidue methods to analyse pesticides in green tea with liquid and gas chromatography/tandem mass spectrometry, *Analyst* **2013** *138*, 921-931.

<sup>88</sup> Vázquez, P.P.; Lozano, A.; Uclés, S.; Ramos, M.M.G.; Fernández-Alba, A.R., A sensitive and efficient method for routine pesticide multiresidue analysis in bee pollen samples using gas and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *J. of Chromatogr. A* **2015**, *1426*, 161-173.

- Eliminación de proteínas a través de filtros como por ejemplo Amicon proteínas Ultra 15 3K.

Sin embargo, ninguna de las estrategias fue efectiva ya que aunque con todas ellas se conseguía la eliminación de un gran número de componentes de la matriz también se producían pérdidas de los neuropéptidos en esta etapa. Por ello, al final se decidió inyectar los extractos obtenidos sin aplicar ninguna etapa de limpieza.



**Figura 10.** Componentes presentes en la matriz de cabeza de abeja analizados mediante LC-TOF-MS

### 6.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Para evaluar la aplicabilidad del método puesto a punto al análisis de neuropéptidos en muestras reales se procedió a su validación en términos de linealidad, efecto, matriz, límite de cuantificación, exactitud y precisión

En primer lugar se determinó el intervalo de linealidad para cada uno de los neuropéptidos, analizando 7 disoluciones patrón de los analitos en MeOH:agua ultrapura (20:80, v/v). Para la mayoría de los analitos la linealidad (**Tabla 3**) estaba comprendida entre 5 y 100  $\mu\text{g/L}$ , excepto para el **Compuesto 6** entre 5 y 75  $\mu\text{g/L}$ , y para el Compuesto 13 entre 1 y 75  $\mu\text{g/L}$ .

Seguidamente se evaluó el “*efecto matriz*” definido como el efecto que sobre la señal de los analitos tienen otros componentes de la matriz. Generalmente, en el análisis de muestras complejas mediante técnicas LC-MS, los componentes de la matriz pueden causar el incremento o supresión de la señal de los analitos y, originar errores constantes y/o proporcionales en la cuantificación de los mismos.

<sup>89</sup> Gil García, M.D.; Uclés Duque, S; Lozano Fernández, A.B.; Sosa, A.; Fernández-Alba, A.R., Multiresidue method for trace pesticide analysis in honeybee wax comb by GC-QqQ-MS, *Talanta* **2017**, *163*, 54-64.

Para evaluar el efecto matriz se comparan las pendientes de las rectas de calibrado preparadas en disolvente y las obtenidas con patrones preparados en extracto de matriz utilizando la siguiente ecuación:

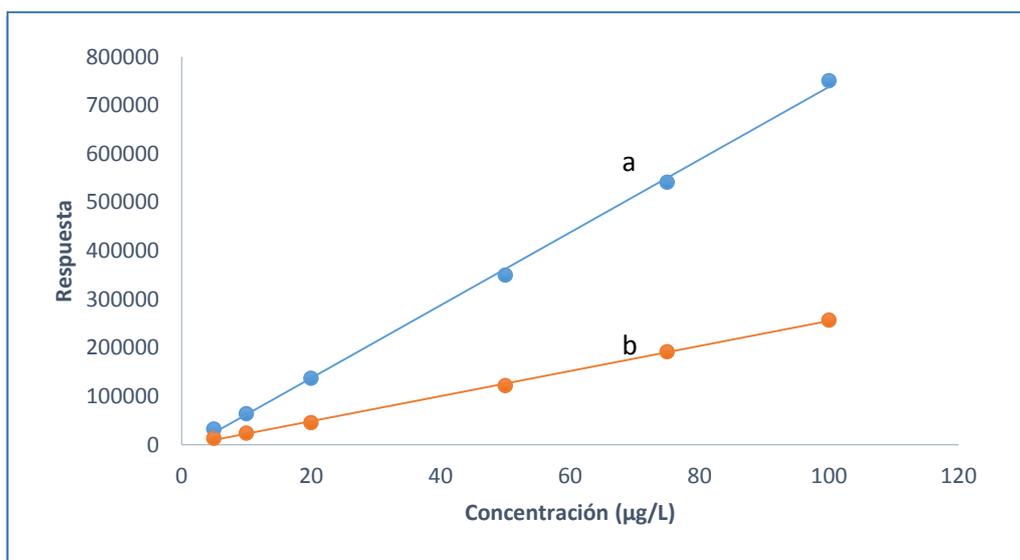
$$EM(\%) = \frac{\text{pendiente recta calibrado disolvente} - \text{pendiente recta calibrado matriz}}{\text{pendiente recta calibrado disolvente}} \cdot 100$$

A tal fin, se obtuvieron rectas de calibrado a partir de extractos de cabeza de abeja fortificados con patrones de los analitos y sus pendientes se compararon con las de las correspondientes rectas de calibrado obtenidas a partir de patrones preparados en disolvente. Los valores de EM (%) obtenidos (**Tabla 3**) muestran que para la mayoría de neuropéptidos el EM es elevado (> 50%) y para dos de ellos moderado (20-50%).

**Tabla 3.** Rango lineal y efecto matriz (%) obtenidos para los neuropéptidos

Compuesto	Neuropéptido	Rango lineal (µg/L)	EM (%)
1	RQYSFLA	5-100	53
2	GRDYSFGL_a	5-100	60
3	GRQPYSFGL_a	5-100	52
4	ALMGFQGVR_a	5-100	51
5	IDLSRFYGHFNT	5-100	53
6	MVPVPVHHMADELLRNGPDTVI	5-75	68
7	NVGTLARDFALPP_a	5-100	41
8	NVGSVAREHGLPY_a	5-100	52
9	NVASLARTYYLPQNA_a	5-100	44
10	SVSSLARTGDLPVREQ	5-100	39
11	NVPIYQEPRF	5-100	74
12	NLDEIDRVGWSGVF	5-100	56
13	NIDEIDRTAFDNFF	1-75	69

A modo de ejemplo, en la **Figura 11** se muestran las curvas de calibrado del **Compuesto 11** en disolvente y en extracto de abeja.



**Figura 11.** Rectas de calibrado del Compuesto 11 en: (a) disolvente y (b) extracto de cabeza de abeja

El límite de cuantificación (LOQ) se define como la concentración más baja de analito en el que el procedimiento es aceptable para una aplicación concreta. Existen diferentes criterios para la determinación del LOQ. En este trabajo se ha utilizado el criterio de la señal/ruido (S/N), que es uno de los más empleados en la mayoría de laboratorios y trabajos de investigación y, que define como “la concentración más baja de analito que proporciona una señal ruido  $\geq 10$ ”. Para su cálculo se analizaron extractos fortificados con los analitos en concentraciones cada vez más bajas y, a partir de la relación  $S/R=10$  se estableció un LOQ de 5 µg/L (correspondiente a 1 µg/Kg en la muestra) para todos los analitos, excepto para el Compuesto 13 que fue de 1 µg/L (correspondiente a 0.2 µg/Kg en la muestra).

Finalmente se evaluó la veracidad y precisión del método completo. Para ello, se fortificaron muestras de cabezas de abeja a un nivel de concentración de 2 µg/Kg de cada neuropéptido. Las muestras se extrajeron siguiendo el procedimiento propuesto en este trabajo y se analizaron mediante LC-QqQ-MS/MS por quintuplicado. Además se analizó una muestra sin fortificar para determinar sus concentraciones de neuropéptidos. El efecto matriz se corrigió cuantificando mediante el método de la adición estándar con rectas de calibrado construidas adicionando 10 µg/L, 20 µg/L y 30 µg/L de cada neuropéptido al extracto de cerebro de abeja.

En la **Tabla 4** se muestran las recuperaciones obtenidas para cada uno de los neuropéptidos y sus correspondientes desviaciones estándar, estando comprendidas entre 50-74 % para 7 de ellos y entre 35-49 % para el resto con valores de RSD < 20 % en todos los casos.

Sin embargo, a pesar de que las recuperaciones fueron relativamente bajas para la mayoría de los analitos, como la repetitividad del método era adecuada, se podría aplicar el factor de corrección correspondiente en cada caso para conocer la concentración en las muestras reales.

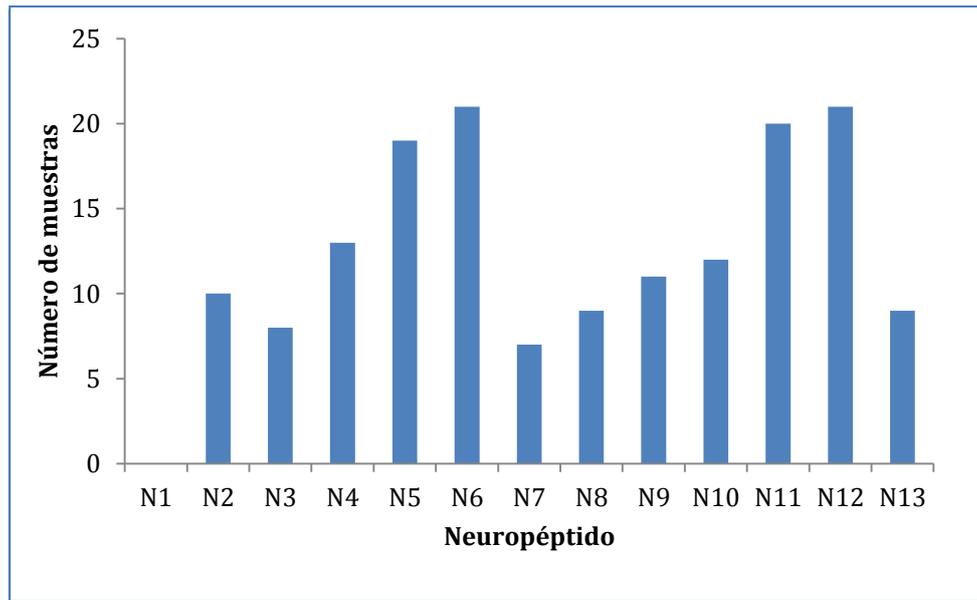
**Tabla 4.** Valores de recuperación (%) y RSD (%) obtenidos para cada neuropéptido

Compuesto	Neuropéptido	Recuperaciones (%)	RSD (%)
1	RQYSFLA	74	8
2	GRDYSFGLa	56	9
3	GRQPYSFGLa	51	7
4	ALMGFQGVRa	56	11
5	IDLSRFYGHFNT	56	10
6	MVPVPVHHMADELLRNGPDTVI	49	5
7	NVGTLARDFALPPa	35	11
8	NVGSVAREHGLPYa	46	14
9	NVASLARTYYLPQNAa	38	19
10	SVSSLARTGDLPVREQ	35	13
11	NVPIYQEPRF	61	3
12	NLDEIDRVGWSGVF	42	8
13	NIDEIDRTAFDNFF	50	5

#### 6.4. APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES

El método puesto a punto se aplicó al análisis de 39 muestras reales de abejas procedentes de colmenas de diferentes provincias españolas. En las muestras además se determinó la concentración de pesticidas mediante GC-MS y LC-MS, utilizando métodos desarrollados previamente en el Grupo de Investigación de Residuos de Plaguicidas.

En la **Tabla 5** se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los neuropéptidos ( $\mu\text{g/Kg}$ ) así como la carga total de pesticidas y neuropéptidos ( $\mu\text{g/Kg}$ ) encontrada en cada una de las muestras analizadas. En la **Figura 11** se representa el número de muestras en las que se han encontrado cada uno de los neuropéptidos. Puede observarse que en ninguna de las muestras analizadas se detectó la presencia del primer neuropéptido (N1) mientras que los neuropéptidos N5, N6, N11 y N12 fueron encontrados en un mayor número de muestras.



**Figura 12.** Neuropéptidos analizados en función del número de muestras

En la **Tabla 5** puede observarse que en 7 muestras no se detectó la presencia de ningún neuropéptido, mientras que en el resto de ellas algunos neuropéptidos se encontraron a niveles significativos, otros se encontraron a niveles inferiores al LOQ y otros no estuvieron presentes. Más concretamente, en las 32 muestras que contenían neuropéptidos en cantidades superiores al LOQ, estos se encontraron entre 1.1 y 19.5  $\mu\text{g/Kg}$  con excepción de N6 y N13 que presentaron niveles de concentración en los rangos 4.3-86.8  $\mu\text{g/Kg}$  y 5.7-45.1  $\mu\text{g/Kg}$ .

**Tabla 5. Concentraciones de los neuropéptidos en las muestras reales de abeja**

Muestra	CT pesticidas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10	N11	N12	N13	CT neuropéptidos ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
AB1	0	1.1	1.4	4.4	8.4	48.6	<1.0	2.0	1.2	2.1	2.7	8.3	45.1	125.4
AB2	1	1.6	1.7	5.7	13.4	43.5	2.5	2.5	1.5	2.8	2.3	5.2	34.6	114.7
AB3	1	1.0	<1	2.2	12.1	31.4	<1.0	2.3	2.0	2.8	2.9	3.7	8.1	69.8
AB4	4				16.3						<1.0	1.4		18.2
AB5	4.4			<1.0	2	4.5	<1.0		<1.0	<1.0	1.5	1.3		10.2
AB6	5	<1.0		3.6	8.8	18.8			<1.0	<1.0	1.8	7.6	9.0	51.7
AB7	5			1.2	8.1	35.1					1.2	1.7		47.3
AB8	6.7				31.7						<1.0	3.2		35.5
AB9	7.7	<1.0			2.2	21.5					<1.0			24.9
AB10	9	1.5	1.4	4.6	13.1	37.5	<1.0	2.4	2.0	2.7	3.8	8.8	31.4	109.8
AB11	10	1.9			9.4	6.8	<1.0	3.0	1.6	3.6	3.3	<1.0	11.3	42.2
AB12	10			<1.0	5.3	34.0		1.9			1.6	5.2		48.8
AB13	12								<1.0			2.5		2.7
AB14	17	1.9	1.8	13.1	12.3	86.8	<1.0	1.3	1.8	2.5	5.5	9.2	22.7	159.8
AB15	19.5													0
AB16	20			1.1	3.8	4.6		4.9		1.1	<1.0			16.3
AB17	25.2													0
AB18	41.1													0
AB19	46							2.5						2.5

Tabla 5 (cont.). Concentraciones de los neuropéptidos en las muestras reales de abeja

Muestra	CT pesticidas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10	N11	N12	N13	CT neuropéptidos ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
AB20	54.8								<1.0					<1.0
AB21	56													0
AB22	97			<1.0						<1.0				<1.0
AB23	98.7													0
AB24	106.1													0
AB25	134.9											1.3		1.3
AB26	495.4				2.6	4.3				1.7				8.5
AB27	513.3			4.3	4.3	17.4						2.4		24.1
AB28	612.3													0
AB29	629.3									<1.0		4.5		4.7
AB30	692.1													0
AB31	805											3.7		3.7
AB32	899.1					5.8								5.8
AB33	926.6											7.1		7.1
AB34	1114													0
AB35	1148.8				7.7	7.5				<1.0				16.1
AB36	1315													0
AB37	1525	<1.0	<1.0	5.3	19.5	38.6	<1.0		<1.0	<1.0	2.5	6.9	10.6	86.9
AB38	2142	<1.0	<1.0	<1.0	3.6	12.6					1.0	5.6		24.2
AB39	6580		<1.0	2.6	6.9	17.3			<1.0	<1.0	<1.0	5.7	5.7	39.6

Para comparar cómo afecta la concentración de pesticidas a la concentración de neuropéptidos, se han considerado dos grupos de muestras. El primer grupo (G1) está formado por las muestras que presentan una concentración de pesticidas inferior a 50 µg/kg (AB1-AB19) y en el segundo grupo (G2) las que presentan una concentración superior (AB20-AB39). Para la comparación, en cada grupo se han sumado las concentraciones de cada neuropéptido y se ha calculado la variación en la concentración de cada neuropéptido (expresada como porcentaje) y la concentración total entre el segundo grupo y el primero, empleando expresión:

$$\text{Dism. Conc. Neur. (\%)} = \frac{\text{Suma G2} - \text{Suma G1}}{\text{Suma G1}} \cdot 100$$

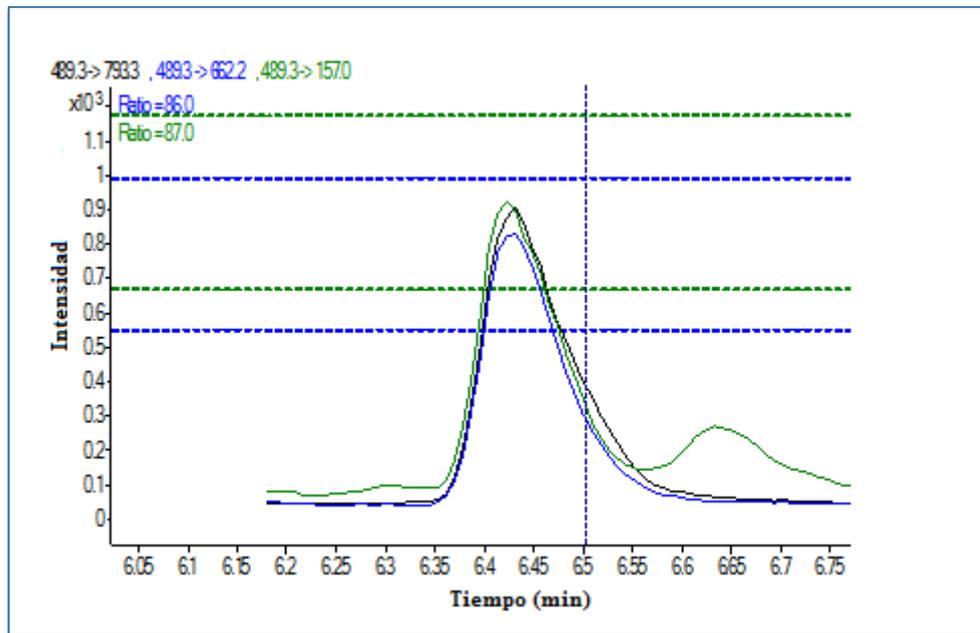
Se observa como la disminución en la concentración de los neuropéptidos del G2 comparado con el G1 es elevada, en todos los casos superior al 50%, salvo para el N12 (NLDEIDRVGWSGVF). Por lo tanto, se evidencia que la concentración de pesticidas encontrados en las abejas afecta a la concentración la mayoría de los neuropéptidos presentes en sus cerebros.

En el caso del neuropéptido NVGSVAREHGLPYa (N8) se observa que se encuentra presente en las muestras de abeja con una carga total de pesticidas menor de 50 µg/kg (G1), sin embargo no se encuentra en las muestras con una concentración de pesticidas superior (G2), por lo que se deduce que su presencia se ve afectada por la concentración de pesticidas, siendo un ejemplo claro de este fenómeno.

**Tabla 6.** Comparación de la concentración de neuropéptidos con los niveles de pesticidas

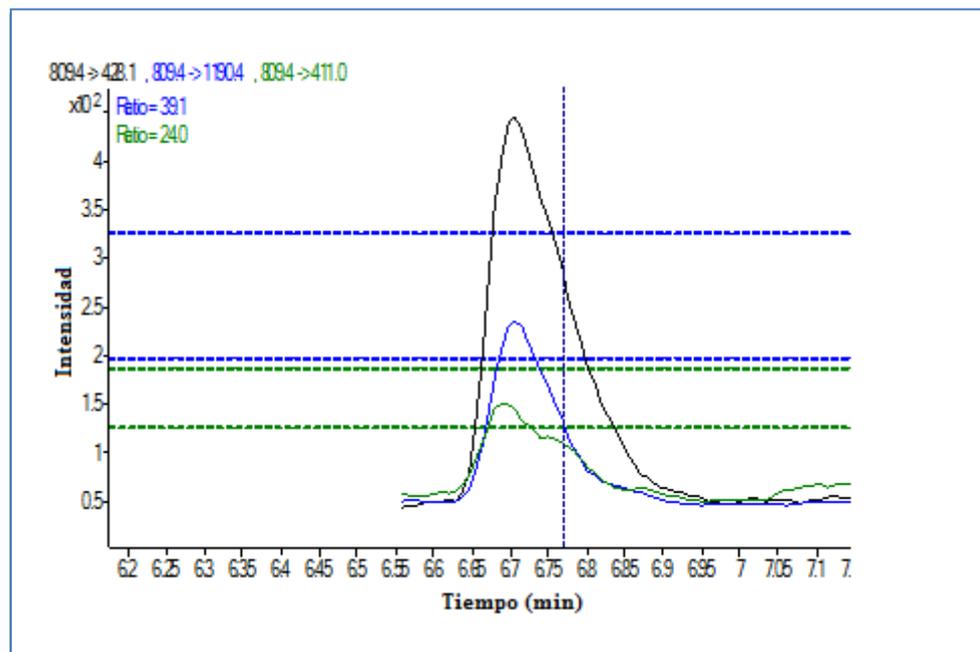
	G1(AB1-AB19)	G2(AB20-AB39)	Dism. Conc. Neu. (%)
<b>N2</b>	10.1	1.0	-90
<b>N3</b>	6.9	1.3	-81
<b>N4</b>	36.8	8.8	-76
<b>N5</b>	98.9	45.4	-54
<b>N6</b>	421	103.5	-75
<b>N7</b>	3.3	< 1.0	-89
<b>N8</b>	22.7	0	-
<b>N9</b>	11.4	< 1.0	-94
<b>N10</b>	18.5	1.3	-93
<b>N11</b>	28.9	7.4	-74
<b>N12</b>	58.9	37.4	-37
<b>N13</b>	162.2	16.3	-90
<b>Carga total neuropéptidos (µg/kg)</b>	879.7	223.4	-75
<b>Carga total pesticidas (µg/kg)</b>	244.6	19945.5	

Finalmente, a modo de ejemplo en la **Figura 13** se muestra el cromatograma obtenido para el neuropéptido N6 (ALMGFQGVRA) en una de las muestras reales analizadas



**Figura 13.** Cromatograma obtenido del neuropéptido ALMGFQGVRA en una muestra real

Otro ejemplo se muestra en la **Figura 14** que corresponde a un cromatograma obtenido del neuropéptido N7 (NVASLARTYYLPQNAa) en una muestra real



**Figura 14.** Cromatograma obtenido para el neuropéptido NVASLARTYYLPQNAa en una muestra real

## **7. CONCLUSIONES**

En el presente trabajo se ha puesto a punto un método analítico para la extracción, identificación y cuantificación de 13 neuropéptidos en cabezas de abejas melíferas, evitando el proceso de disección y extracción de cerebro.

El método es suficientemente sensible y selectivo haciendo innecesarias las etapas preconcentración y limpieza de las muestras.

La comparación de las concentraciones de neuropéptidos encontradas en las 39 muestras de abejas melíferas procedentes de colmenares españoles con las correspondientes concentraciones de pesticidas, halladas en dichas muestras en estudios previos, permite establecer que la presencia de pesticidas hace disminuir la concentración de neuropéptidos. Esto está de acuerdo con el hecho de que los neuropéptidos controlan y regulan diferentes funciones relacionadas con la salud y el comportamiento de la abeja melífera y la afectación de estas funciones en abejas expuestas a pesticidas.

## 8. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

APCI	Ionización química a presión atmosférica
API	Ionización a presión atmosférica
CCAA	Comunidades autónomas
CCD	colony collapse disorder
CE	Energía de colisión
CI	Ionización química
CID	Disociación inducida por colisión
EFSA	European Food Safety Authority
EI	Impacto de electrones
EM	Efecto matriz
ESI	Electrospray
FI	Ionización por campo
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
GC	Cromatografía de gases
IT	Trampa de iones
LC	Cromatografía de líquidos
LOQ	Límite de cuantificación
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Espectrometría de masas
PB	Particle Beam Interface
PM	Peso molecular
PNA	Plan Nacional Apícola
ppb	Partes por billón
ppq	Partes por cuatrillón
Q	Cuadrupolo
QqQ	Triple cuadrupolo
RSD	Desviación estándar
SIM	Monitoreo de un ion seleccionado
TOF	Tiempo de Vuelo
t <sub>R</sub>	Tiempo de retención
TSP	Thermospray
UPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución