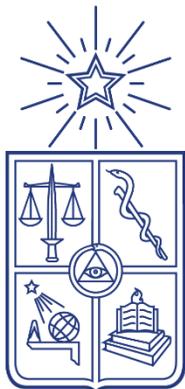


**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



**Determinación de pesticidas organofosforados, halogenados y  
neonicotinoides, en abejas de apiarios de la V y VI región en  
Chile.**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica Ambiental y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:

**ARANTZA B. BALSEBRE CAJIAO**

Director de tesis: Dr. Edwar R. Fuentes Pérez

SANTIAGO – CHILE

ENERO 2018

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

**ARANTZA B. BALSEBRE CAJIAO**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Ambiental y Título de Bioquímico, en el examen público rendido el día

**Director de Tesis:**

Dr. Edwar Fuentes P.

\_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

Dra. María Antonieta Valenzuela P.

\_\_\_\_\_

Dra. Tatiana Garrido R.

\_\_\_\_\_

Felipe Gelcich R.

\_\_\_\_\_

“The ‘*control of nature*’ is a phrase conceived in arrogance, born of the Neanderthal age of biology and philosophy, when it was supposed that nature exists for convenience of man.”

Rachel Carson - *Silent spring* - (2002).

## AGRADECIMIENTOS

Va a ser difícil resumir en una página lo agradecida que me siento de todos quienes me acompañaron en esta etapa de mi vida. Pero al menos voy a intentarlo. Es importante para mí empezar agradeciendo a mi tutor; Edwar. Gracias por darme una segunda oportunidad que fue mucho más que eso. La oportunidad de aprender tanto de la dedicación que le pones a tu trabajo y tu paciencia infinita para enseñar fue un ejemplo de vida que, con mucho esfuerzo, me gustaría replicar.

Así mismo, quiero extender mis agradecimientos al maravilloso grupo de personas con que trabajé día a día en el laboratorio 202. A la profe Maru gracias infinitas por compartir tu vasta experiencia conmigo, por tu cariño y por cada conversación de pasillo, o más bien, entre cromatógrafos, que fueron absolutamente enriquecedoras. A la profe Jeanette por todas tus muestras de cariño y detallitos con que nos sorprendiste cada día. A mis queridísimos amigos Coni, Fran, Pato y Gonzalo, su compañía fue un salvavidas cuando las cosas se ponían feas. Gracias por quedarse conmigo cuando se atrasaba un experimento, por todas las experiencias que compartimos, los almuerzos, las risas y los cafés de media tarde. Sin ustedes el día a día no hubiese sido tan entretenido como lo fue. A cada uno lo guardo en un pedazo muy especial de mi corazón fueron un apoyo invaluable en esta etapa y no sabría cómo terminar de agradecerles todo su cariño.

A mi familia partiendo por mis padres Francisco y Verónica por ser mi sostén principal en este período. Gracias por permitirme el lujo de poder dedicarme exclusivamente a sacar mi carrera sin otra preocupación. Gracias por los almuerzos y las onces, las ropitas nuevas que a veces aparecían en mi pieza, los viajes, las salidas a comer y prácticamente todo lo que tengo. Gracias a mis hermanas por evitar que saliese en pijama de la casa en los periodos de más estrés, por compartir su ropa y por las conversaciones. Y aunque no puedan leerlo quiero agradecer a mi familia de cuatro patas que siempre han sido un apoyo silencioso pero vital en mi vida, a los que ya no están (Askar y Zuri) y la que aún me queda (Helena). No sé si hay algo más tranquilizador que una cola moviéndose y un lengüetazo en la cara cuando el mundo parece venirse encima. A mi abuela, que nos dejó hace poco, lamento que no hayas podido ver esta etapa de mi vida finalizada. Te agradezco tu ejemplo de fortaleza implacable y por comenzar junto con mi abuelo

el pedacito de historia que terminó conmigo aquí. A mis prima/os, tia/os (de verdad y adoptados) y a mi familia en general gracias por los buenos momentos.

Quiero agradecer a todos mis amigos, a los viejos y a los nuevos, a los de siempre y los de vez en cuando, por acompañarme en tantas etapas de mi vida. A aquellos que me ayudaron a estudiar las complejidades de la bioquímica y a los que simplemente tuvieron la paciencia de escuchar mis quejas después de una mala semana. Gracias por el apoyo y por sobretodo por distraerme de los tormentos de mis propios pensamientos. Nombrarlos a cada uno se volvería interminable pero cada uno sabrá hacerse dueño de este pequeño agradecimiento.

Mas aún quiero agradecer a mi comisión Tatiana, María Antonieta y Felipe por transformar cada evaluación en una discusión enriquecedora que me permitió desarrollar este proyecto en lo que es ahora. Así mismo quiero extender mis agradecimientos a todas aquellas personas que participaron de mi formación como bioquímico, tuve muchas experiencias maravillosas que me han vuelto el profesional que soy ahora. Con riesgo de dejar a muchas personas afuera quiero agradecer especialmente a la profe Sandra Ampuero, a Raquel Zuloaga y a mis amiga/os en BioSigma. Gracias por ser parte de mi formación, y aunque algunos fueron parte de mi vida hace mucho tiempo o por un periodo más breve si marcaron hitos importantes en mi formación que hoy recuerdo con mucho cariño.

Quiero agradecer finalmente al proyecto fondecyt regular 1140328 que permitió el desarrollo de este proyecto. Además de agradecer a mi segundo hogar la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile por dar espacio a la realización de todo este proceso.

## **LUGAR DE DESARROLLO**

Laboratorio de Química Analítica de Contaminantes Orgánicos y Elementos Traza (LQACOET),  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas,  
Universidad de Chile,  
Santiago, Chile

## **FINANCIAMIENTO**

Proyecto Fondecyt 1140328

A la fecha, este trabajo ha dado origen a las siguientes comunicaciones científicas y proyecto:

#### Presentaciones en congresos

Poster “CROMATOGRAFÍA DE GASES ASOCIADA A DISTINTOS TRATAMIENTOS DE MUESTRAS PARA DETERMINAR PLAGUICIDAS EN ABEJAS” en XIII Encuentro de Química Analítica y Ambiental, Universidad Austral de Chile. Octubre de 2016.

Poster “CROMATOGRAFÍA GASSEOSA ASOCIADA A DETECTORES ESPECÍFICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS, ORGANOCLORADOS Y NEONICOTINOIDES EN MUESTRAS AMBIENTALES DE ABEJAS DE APIARIOS DE LA V Y VI REGIÓN.” en XIV Jornadas De Investigación En Ciencia Y Tecnología, Universidad de Chile. Septiembre 2017.

Presentación oral “EVALUACIÓN DE UN GRUPO REPRESENTATIVO DE PLAGUICIDAS EN ABEJAS MELÍFERAS DE CHILE CENTRAL CON RIESGO POTENCIAL PARA SU SALUD MEDIANTE DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES.” en XXXII Jornadas Chilenas de Química, Puerto Varas, Chile. Enero 2018.

#### Proyecto

Adjudicación 1<sup>era</sup> etapa de proyecto “DESARROLLO DE METODOLOGÍA PARA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN PRODUCTOS APÍCOLAS NACIONALES” en VII Concurso VIU (Valorización de la Investigación en la Universidad) de FONDEF. Noviembre 2017.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS	16
Objetivo General	16
Objetivos Específicos	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Materiales	17
Métodos	19
Soluciones <i>stock</i>	19
Método cromatográfico para organofosforados	19
Método cromatográfico para halogenados y neonicotinoides	20
Degradación de neonicotinoides para determinación por GC	20
Métodos de extracción de pesticidas	21
QuEChERS	21
MSPD	21
Optimización MSPD	22
Evaluación de la respuesta cromatográfica en presencia de protector de analito y matriz y obtención de parámetros analíticos.	23
Evaluación de la recuperación, precisión y reproducibilidad de las medidas cromatográficas.	24

Análisis de muestras.	25
Recolección de muestras de abejas.	25
Confirmación de la presencia de pesticidas mediante GC-MS.	28
<b>RESULTADOS</b>	<b>29</b>
1. Desarrollo de un método para la determinación de los plaguicidas organofosforados, halogenados y de neonicotinoides seleccionados, en abejas, mediante cromatografía de gases y detección por captura de electrones o fotometría de llama.	29
1.1. Determinación de pesticidas organofosforados por cromatografía gaseosa y fotometría de llama.	29
1.2. Determinación de halogenados y neonicotinoides por cromatografía gaseosa y micro captura de electrones.	31
1.3. Degradación de neonicotinoides para determinación por GC.	32
2. Evaluación de los métodos MSPD y QuEChERS como tratamiento de muestras para extraer y concentrar los plaguicidas desde abejas, para su posterior determinación mediante cromatografía de gases y detección por captura de electrones o fotometría de llama.	33
2.1. Preparación de muestra.	33
2.2. Determinación de características analíticas de la metodología MSPD-GC/FPD/ECD.	37
2.3. Evaluación de la recuperación y precisión de la metodología MSPD-GC/FPD/ECD.	44
2.4. Determinación de reproducibilidad de las medidas cromatográficas en el tiempo.	45
3. Determinar los pesticidas evaluados en muestras de abejas recolectadas en apiarios ubicados en diferentes comunas de la V y VI regiones.	49
3.1. Análisis etanol de recolección	49
3.2. Análisis de las muestras recolectadas mediante MSPD-GC.	49
3.3. Confirmación por GC-MS.	58
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>60</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>75</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>76</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>88</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Mapas de la V y VI región de Chile.</i>	26
<b>Figura 2.</b> <i>Cromatogramas obtenidos en GC-FPD de los compuestos organofosforados con el programa cromatográfico optimizado descrito.</i>	30
<b>Figura 3.</b> <i>Cromatograma obtenido en GC-<math>\mu</math>ECD de los compuestos halogenados y neonicotinoides con el programa cromatográfico optimizado descrito.</i>	32
<b>Figura 4.</b> <i>Diagrama del método utilizado para extracción y limpieza.</i>	34
<b>Figura 5.</b> <i>Cromatogramas en GC-<math>\mu</math>ECD obtenidos empleando distintos co-sorbentes en el tratamiento de abejas mediante MSPD.</i>	36
<b>Figura 6.</b> <i>Gráfico de superficie de respuesta de la optimización de MSPD con C18-Florisil (% MeOH y volumen de elución) para extracción de los plaguicidas fipronil, acrinatrina, metamidofos y azinfos-metil.</i>	37
<b>Figura 7.</b> <i>Efecto de incremento de señal generado por la matriz.</i>	39
<b>Figura 8.</b> <i>Cromatogramas en GC-FPD obtenidos para una muestra de abeja blanco tratada con MSPD (negro) y una fortificada (rojo).</i>	42
<b>Figura 9.</b> <i>Cromatogramas en GC-<math>\mu</math>ECD obtenidos para una muestra de abeja blanco tratada con MSPD (negro) y una fortificada (rojo).</i>	43
<b>Figura 10.</b> <i>Gráficos de control calidad de inyección en el tiempo para clorpirifos.</i>	46
<b>Figura 11.</b> <i>Distribución de pesticidas encontrados por localidades de V región.</i>	51
<b>Figura 12.</b> <i>Cantidad de muestras positivas por pesticida respecto del total de muestras de la V región.</i>	52
<b>Figura 13.</b> <i>Distribución de pesticidas encontrados por localidades de VI región.</i>	54
<b>Figura 14.</b> <i>Cantidad de muestras positivas por pesticida respecto del total de muestras de la VI región.</i>	55
<b>Figura 15.</b> <i>Principales plaguicidas encontrados en muestras de la V y VI región en porcentaje respecto al total encontrado.</i>	57
<b>Figura 16.</b> <i>Cromatogramas en GC-MS obtenidos para una solución de estándares.</i>	58
<b>Figura 17.</b> <i>Cromatogramas en GC-MS obtenidos para una muestra de abeja.</i>	59
<b>Figura 18.</b> <i>Concentración máxima y media encontradas en las muestras comparados con LD<sub>50</sub></i>	63

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> <i>Resumen de ventas registradas por SAG el año 2012 de los pesticidas seleccionados.</i>	8
<b>Tabla 2.</b> <i>Resumen de las propiedades fisicoquímicas de plaguidas seleccionado.</i>	10
<b>Tabla 3.</b> <i>Diseño de compuesto central empleado para la optimización de la elución en MSPD.</i>	22
<b>Tabla 4.</b> <i>Concentraciones utilizadas para evaluar el efecto del protector de analito y de la matriz sobre la respuesta cromatográfica.</i>	23
<b>Tabla 5.</b> <i>Detalle de muestreo por sector y sobre la infección por Nosema y varroa.</i>	27
<b>Tabla 6.</b> <i>Tiempos de retención y relación carga masa para los compuestos confirmados por GC-MS.</i>	28
<b>Tabla 7.</b> <i>Parámetros de linealidad y sensibilidad analíticas para el método MSPD-GC/FPD/ECD.</i>	40
<b>Tabla 8.</b> <i>Límite de cuantificación para el método MSPD-GC/FPD/ECD.</i>	41
<b>Tabla 9.</b> <i>Evaluación de la recuperación y precisión del método MSPD-GC/FPD/ECD a tres niveles de concentración.</i>	44
<b>Tabla 10.</b> <i>Comparación del método propuesto en este trabajo con otros reportados en literatura para determinar pesticidas en abejas.</i>	48
<b>Tabla 11.</b> <i>Concentración promedio en <math>\mu\text{g/g}</math> de los pesticidas en las muestras de la V región.</i>	50
<b>Tabla 12.</b> <i>Concentración promedio en <math>\mu\text{g/g}</math> de los pesticidas en las muestras de la VI región</i>	53
<b>Tabla 13.</b> <i><math>LD_{50}</math> de los pesticidas seleccionados a las 48h en <math>\mu\text{g/abeja}</math> oral y de contacto.</i>	62
<b>Tabla 14.</b> <i>Resumen de los volúmenes de venta de plaguidas y sus tiempos de degradación.</i>	71

## ABREVIATURAS

% v/v	: Porcentaje volumen volumen
µg	: Microgramo
µL	: Microlitro
µm	: Micrómetro
µECD	: Detector de microcaptura de electrones
° C	: Grados Celsius
Ach	: Acetilcolina
AchE	: Acetilcolinesterasa
AchR	: Receptores de acetilcolina
ACN	: Acetonitrilo
BQCV	: Virus de la reina negra
C18	: Octadecilsililo
CCD	: Síndrome de colapso de colonias
ECD	: Detector de captura de electrones
<i>et al.</i>	: Expresión latina <i>et alii</i> , que significa ‘y otros’.
etc	: Excétera
FPD	: Detector fotométrico de llamas
g	: Gramos
GABA	: Ácido γ amino butírico
GC	: Cromatografía Gaseosa
GCB	: Carbón grafitizado negro
h	: Hora
Ha	: Hectárea
Kg	: Kilogramo
L	: Litro
LC	: Cromatografía líquida
LD <sub>50</sub>	: Dosis letal media
LOD	: Límite de detección
LOQ	: Límite de cuantificación
m	: Metro

M	: Molar
mL	: Mililitros
mm	: Milímetro
MS	: Espectrometría de masas
MS/MS	: Espectrometría de masas masas o masas en tándem
MSPD	: Dispersión de Matriz en Fase Sólida
NO	: Neonicotinoides
NPD	: Detector de nitrógeno fósforo
HAL	: Halogenados
OPP	: Organofosforados
ODEPA	: Oficina de Estudios y Políticas Agrarias
PCNB	: Penta - CloroNitroBenceno
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
PIR	: Piretroides
PPDB	: <i>Pesticide Properties Database</i>
PSA	: Amina primaria secundaria
QuEChERS	: <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe</i>
rpm	: Revoluciones por minutos
ref	: Fuerza centrífuga relativa
RSD	: Desviación estándar relativa
SAG	: Servicio Agrícola y Ganadero
SLE	: Extracción sólido líquido
SNC	: Sistema nervioso central
SNP	: Sistema nervioso perisférico
SPE	: Extracción fase sólida
TFF	: TriFenilFosfato
ton	: Tonelada
USD	: Dólar Americano
uv	: Ultravioleta
W	: Watts
x	: Promedio

## RESUMEN

El uso masivo de pesticidas de amplio espectro en el tiempo ha generado efectos adversos sobre organismos no blanco. Las abejas domésticas (*Apis mellifera*) han sido uno de los principales organismos afectados causando gran preocupación por su importancia ecológica y económica. Las pérdidas de colonias de abejas melíferas y de otros polinizadores silvestres principalmente en Europa y América del norte han causado gran preocupación. Las causas de estas pérdidas aún no se conocen con certeza, pero se piensa que podría deberse a un problema multifactorial que incluye agentes biológicos, mala nutrición y el uso de agentes protectores de cultivos o pesticidas, entre otras causas. La intensa actividad de recolección de las abejas melíferas las expone a pesticidas de la agricultura y xenobióticos en general.

En Chile las regiones de Valparaíso (V) y O'Higgins (VI) presentan una alta actividad agrícola, alto uso de pesticidas e importante desarrollo apícola por lo que fueron consideradas como regiones de riesgo para la salud de las abejas. En el presente proyecto se desarrolló una metodología para la determinación de algunos de los pesticidas más usados en estas regiones considerando los neonicotinoides; acetamiprid y tiametoxam, el fenilpirazol; fipronil, los halogenados; acrinatrina y clorotalonil, y los organofosforados; metidation, diazinon, dimetoato, metamidofos, clorpirifos, profenofos, azinfos metil y cumafos. La metodología desarrollada fue posteriormente utilizada en la determinación de muestras de campo.

A través de la técnica de dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) para la extracción y limpieza de los analitos en conjunto con cromatografía de gases acoplada a detectores específicos de micro captura de electrones ( $\mu$ ECD) y fotometría de llamas (FPD) se logró establecer recuperaciones sobre un 60% de cada unos de los pesticidas mencionados al límite de cuantificación (LOQ; 0,005 – 0,050  $\mu$ g/g) con una desviación estándar (RSD)  $\leq$ 16%. Con esta metodología se pudo detectar 9 de los 13 pesticidas seleccionados presentes en el 65% de las muestras. Clorpirifos y acrinatrina fueron los pesticidas más frecuentemente encontrados en concentraciones que varían entre  $<0,015$  (LOQ) – 0,067  $\mu$ g/g y  $<0,020$  (LOQ) – 0,026  $\mu$ g/g respectivamente. Seguidos de diazinon encontrado exclusivamente bajo el LOQ ( $<0,015$   $\mu$ g/g). Las altas ventas de estos plaguicidas en las regiones afectadas y sus características de lipofilicidad podrían estar aumentando la exposición de las abejas de estos sectores debido a una acumulación de los plaguicidas en el ambiente (como por ejemplo en la cera de las colmenas).

## ABSTRACT

A method based on matrix solid-phase dispersion (MSPD) associated to gas chromatography-flame photometric detection (GC-FPD), GC-electron capture detection (GC-ECD) and GC-mass spectrometry (GC-MS) for confirmation purposes, was developed for the determination of a representative group of thirteen pesticides in honeybee with particular concern in the apicultural field (fipronil, thiamethoxam, acetamiprid, acrinathrin, metamidophos, dimetoathe, diazinon, chlorpyrifos, methidathion, profenophos, azinphos methyl, chlorothalonil and coumaphos). Factors influencing the extraction efficiency of MSPD were investigated and optimized through response surface method. The use of octadecylsilyl (C18) sorbent combined with a florisil clean-up and acetonitrile-methanol (99:1) elution was the optimal condition for the extraction of the selected pesticides. Under this condition the recovery of pesticides at the limit of quantification (LOQ; 0.005 to 0.050  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) ranged from 60 to 101% with RSDs  $\leq$  16%. The proposed method was applied to the analysis of honeybees collected in 68 field hives from areas of great apicultural and agricultural development in central Chile. In 65% of these samples nine different pesticides were detected. Pesticides most frequently found were chlorpyrifos (35% of the samples,  $<0.015\text{-}0.067 \mu\text{g g}^{-1}$ ), acrinathrin (34% of the samples,  $<0.020\text{-}0.026 \mu\text{g g}^{-1}$ ) and diazinon (11% of the samples at values  $<0.015 \mu\text{g g}^{-1}$ ). The incidence of these pesticides in bees can be related to their sales volume, use to combat the varroosis in hives and hydrophobicity.

## INTRODUCCIÓN

Los primeros registros del uso de pesticidas datan de hace 4500 años atrás en Sumeria con el uso de compuestos de azufre para controlar insectos y ácaros, o el uso de mercurio y arsénico para controlar piojos de cuerpo en China 3200 años atrás. Hasta el año 1940 era común el uso de productos inorgánicos y derivados del petróleo para el control de plagas, lo que presentaba grandes desventajas respecto a la alta tasa de aplicación, baja selectividad y fitotoxicidad de estos productos. Poco después de la segunda guerra mundial (1950s) se produjeron importantes cambios en la agricultura. La creciente necesidad de alimentar a la población post guerra empezó a aumentar el uso de técnicas de monocultivo afectando el balance natural entre los cultivos y con esto aumentó el ataque de plagas. Pero gracias al rápido desarrollo de la industria química de este periodo se pudo hacer frente a este problema mediante el uso de compuestos protectores de cultivo lo que motivó su estudio y desarrollo. Fue durante este período que se inició el descubrimiento de potenciales insecticidas como el organoclorado DDT en Suiza y la síntesis de los primeros organofosforados en Alemania. El uso del DDT, particularmente, se masificó debido a sus propiedades contra la malaria, fiebre amarilla y tifus descubiertas por el doctor Paule Muller (Unsworth, 2017). Sin embargo, el éxito del intensivo uso de pesticidas dejó en evidencia grandes consecuencias. Durante el año 1962 fue reportado por Rachel Carson en su libro *Silent Spring* los problemas del abuso de pesticidas en el ambiente. Entre 1970 y 1980 se desarrollaron herbicidas como el glifosato, piretroides de tercera generación y el uso de *sprays* con *bacillus thuringiensis* como insecticidas y diversos fungicidas que tenían como objetivo mejorar su selectividad. Desde la época de los '90 hasta la fecha se ha concentrado la búsqueda y desarrollo de pesticidas cada vez más específicos para los organismos que necesitan combatir (organismos blanco) y con menores impactos sobre el medio ambiente. Durante esta época se comenzaron a desarrollar los primeros neonicotinoides, pesticidas sistémicos usados principalmente como recubridores de semilla, los que el 2008 alcanzaron a representar el 80% del mercado mundial. En la actualidad, se cuestiona su efecto sobre el medio ambiente en especial sobre los polinizadores y se baraja la posibilidad de cambiar el uso de pesticidas por el desarrollo de organismos genéticamente modificados resistentes a plagas (Jeschke *et al.*, 2010; Unsworth, 2017).

A pesar de los esfuerzos por obtener compuestos más selectivos en su objetivo, muchos de los pesticidas utilizados hoy en día poseen un amplio espectro de acción lo que afecta a múltiples organismos que muchas veces no son el blanco de acción. Por otro lado, algunas características físicoquímicas de estos pesticidas pueden aumentar la probabilidad de contaminar el medio ambiente, como por ejemplo una alta lipofiliidad, alta bioacumulación, larga vida media y/o alta capacidad de lixiviación. Según Pimentel (1995) un 99,7% del compuesto activo termina en diferentes partes del ambiente y solo un 0,3% actúa sobre el cultivo. El uso masivo de pesticidas de amplio espectro a lo largo del tiempo termina induciendo resistencia de los organismos blanco, contaminación de los ecosistemas y múltiples efectos adversos sobre organismos no blanco entre otros efectos no deseados. Las abejas domésticas o melíferas (*Apis mellifera*), han sido uno de los principales organismos afectados, lo que causa una gran preocupación debido a su importancia ecológica y económica (Wilson *et al.*, 1980; Hassall, 1990).

Entre el 78 y el 94% de las especies de plantas florales, dependiendo de su ubicación geográfica, son polinizadas por animales (Ollerton *et al.*, 2011) volviendo a la polinización un proceso esencial para mantener la biodiversidad y funcionamiento de los ecosistemas (Kremen *et al.*, 2007; Klein *et al.*, 2007). Una disminución de los polinizadores podría interrumpir las interacciones de mutualismo entre estos y las plantas, afectando potencialmente la persistencia de poblaciones de plantas y desencadenando efectos en cascada de pérdida de biodiversidad (Kiers *et al.*, 2010; Aslan *et al.*, 2013). La diversidad de la polinización aumenta la respuesta reproductiva de las plantas, más aún los cambios experimentados por la disponibilidad de polinizadores pueden afectar el dinamismo de las especies en los ecosistemas (Geib & Galen 2012; Lundgren *et al.*, 2015). En el trabajo de Lundgren *et al.* (2016) se determinó una relación directa entre la reducción de la disponibilidad de polinizadores y la reducción en la diversidad y abundancia de plantas. Así mismo, la polinización afecta positivamente la biodiversidad de algunos cultivos de uso humano proporcionando mayor cantidad de frutos (Klein *et al.*, 2003).

Gran parte de los cultivos en el mundo dependen de la polinización directa por insectos por lo que los agricultores han utilizado a la abeja doméstica como principal polinizador cuando los insectos no visitan naturalmente sus cultivos (Williams, 1994; Klein *et al.*, 2007). Los últimos estudios han demostrado que la presencia de una diversidad de polinizadores disponibles

aumenta considerablemente el rendimiento de producción de frutos en la mayoría de los cultivos. La polinización con *A. mellifera* aumenta en un 14% el rendimiento, mientras que cuando los cultivos son visitados por una variedad de polinizadores se pueden observar aumentos de hasta un 41%. A pesar de esto, la práctica actual de la agricultura aun no ha masificado el uso integrado de polinizadores silvestres que suplementen la polinización con *A. mellifera* haciendo de esta actividad una de las más relevantes en los mercados de la apicultura (Garibaldi *et al.*, 2013).

En Gallai *et al.*, 2009 se estimó que el impacto económico de la polinización con insectos sobre la producción de cultivos usados directamente para la alimentación humana corresponde a USD 181 billones, lo que además corresponde al 9,5% de valor total de producción de alimentos humanos a nivel mundial. En Chile, la apicultura, como una rama de la agricultura, es un rubro de importancia económica, no sólo por sus productos derivados, sino que también por su rol fundamental en la polinización de especies vegetales productivas. En 2013 la miel fue el principal producto pecuario primario de exportación, alcanzando un valor de USD 27,2 millones para 8195 toneladas exportadas. En el caso de la polinización, el valor pagado por sus servicios se estima entre USD 10 y 15 millones. El impacto económico de la actividad se encuentra en un rango de USD 225 a 450 millones (Namdar-Irani, 2006), que en términos de superficie alcanza 177000 hectáreas polinizadas, área que considera cultivos de almendros, manzanos, perales, frutales de carozo, paltos y semillas de hortalizas, entre otros (Estay *et al.*, 2013).

La actividad agrícola de cultivos de uso humano conlleva en su práctica el uso de diferentes xenobióticos que se distribuyen en el medio ambiente exponiendo a las especies que están a su alrededor. *A. mellifera* es un insecto social, y por lo tanto los miembros de una colmena se verán afectados de manera directa o indirecta por la contaminación con pesticidas. En una colmena las abejas recolectoras son las primeras en verse afectadas y dependiendo del grado de toxicidad pueden morir en el campo, en el vuelo de vuelta o en la colmena misma. Es importante notar que las muertes de las abejas recolectoras fuerzan a las abejas más jóvenes a salir al campo antes de lo normal, alterando el funcionamiento de la colonia. Por otro lado, aunque en general las larvas presentan la mayor sensibilidad a los pesticidas, es la pérdida de una

parte importante de las recolectoras la que podría traducirse en el colapso y la muerte de la colmena debido a la reducción significativa de los suministros de néctar y polen (Sanford, 1983).

### **Pérdida de abejas melíferas en el mundo y síndrome de colapso de colonias (CCD).**

En el último tiempo se ha observado un aumento en las pérdidas de colonias de *A. mellifera* y de otros polinizadores silvestres principalmente en Europa y América del norte. Esto ha desencadenado una gran preocupación debido a la importancia de estos insectos, como ya se ha puesto de manifiesto previamente. Si bien aún se desconoce la causa de estas pérdidas inesperadas, el aumento en la mortalidad se está atribuyendo a varios factores, incluyendo agentes biológicos; como el ácaro parásito *Varroa destructor* o el microsporidio *Nosema spp.* entre otras enfermedades, mala nutrición; por los monocultivos y el uso de agentes protectores de cultivos o plaguicidas (Berthoud *et al.*, 2010; Ellis *et al.*, 2010; Le Conte *et al.*, 2010; Potts *et al.*, 2010; Meixner, 2010; Dainat *et al.*, 2013). Entre 1947 y 2008, la población total de abejas de EEUU disminuyó en un 61% (Ellis *et al.*, 2010; Meixner, 2010). Debido al comportamiento de hibernación en invierno de las abejas las pérdidas fueron determinadas de acuerdo a sobrevivencia post invierno (para EEUU el período de invierno está determinado entre 01 de octubre hasta el 01 de abril). Durante la hibernación las abejas domésticas quedan propensas a infecciones debido al confinamiento por lo que es normal que sufran ciertas bajas en la población. Sin embargo, durante el período entre 2006 y 2014 se tuvo pérdidas de alrededor del 30% cuando las pérdidas usuales, previas a este periodo en EEUU, variaban entre 13,2% a 17,6% (vanEngelsdorp *et al.*, 2007; vanEngelsdorp *et al.*, 2010; vanEngelsdorp *et al.*, 2011; vanEngelsdorp *et al.*, 2012; Spleen *et al.*, 2013; Steinhauer *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015). En el 2014 la pérdida promedio post-invierno fue de 44.8%, una de las cifras más altas de los últimos 7 años (Lee *et al.*, 2015). Este mismo escenario se ha observado en otros países como Canadá, China, Europa, Israel y Turquía, donde los apicultores también han reportado altas pérdidas post-invierno entre los periodos 2008-09 y 2009-10 (van der Zee *et al.*, 2012). Las pérdidas reportadas van desde bajas; menos del 5% (van der Zee *et al.*, 2012) hasta pérdidas altas; de 20–50% (Mutinelli *et al.*, 2010; Vejsnæs *et al.*, 2010; Brodschneider *et al.*, 2010; Aston *et al.*, 2010; Soroker *et al.*, 2010; Neumann & Carreck, 2010; Pirk *et al.*, 2014).

La aparición del denominado Síndrome de Colapso de Colonias (CCD, por su nombre en inglés *Colony Collapse Disorder*) parece ser otro contribuyente importante en el aumento de la mortalidad de estos insectos. Numerosos estudios científicos se han desarrollado con el fin de determinar sus causas, lo que ha provocado además un gran revuelo mediático. A pesar de los actuales esfuerzos científicos, aun no es posible identificar una causa común en todas las colonias afectadas, lo que parece indicar que se trata de un problema causado por múltiples factores. Una de las causas probables que se ha estudiado en el último tiempo es la contribución de factores antropogénicos que pudiesen aumentar la predisposición de las abejas a infecciones por agentes biológicos y alterar además su respuesta inmunológica frente a patógenos que antes eran fácilmente combatidos (Williams *et al.*, 2010).

El CCD se caracteriza por una rápida disminución de la población adulta (abejas obreras), dejando las larvas y la reina pobre o completamente desatendidas. Debido a la gran complejidad en la organización de la colmena, sin las abejas adultas las colonias colapsan. Es importante destacar que durante este fenómeno en particular no se observan abejas muertas alrededor de la colmena afectada (Farooqui *et al.*, 2013).

En el marco del uso de abejas melíferas como polinizadoras de los cultivos de almendras en California, en EEUU se desarrolló un seminario para discutir las causas de la disminución de la sobrevida de las abejas polinizadoras. Durante éste se clasificó las causas en probables, contribuyentes e indeterminadas. Entre las más probables se destacó la infección por parásitos, bacterias y virus, y el déficit nutricional producto de los monocultivos. Mientras que dentro de las causas contribuyentes se encuentran los pesticidas neonicotinoides y acaricidas internos, los que actuarían atenuando el sistema inmunitario de las abejas, permitiendo mayor susceptibilidad a infecciones. Finalmente, entre las causas indeterminadas se encuentra el uso de otros pesticidas, fungicidas, entre otras causas (Staveley *et al.*, 2014).

La intensa actividad de recolección de las abejas melíferas, que aseguran la polinización de la flora circundante, es el comportamiento más relevante que las expone a pesticidas de la agricultura y contaminantes en general. Una abeja puede hacer numerosos vuelos de recolección por día, con distancias que van entre 1,5 a 6 km más allá de la colmena. Se ha reportado incluso

vuelos largos de hasta 10 km (Beekman & Ratnieks, 2000). Durante su actividad de recolección toman considerables cantidades de polen, néctar y agua que llevan de vuelta a la colmena para constituir el alimento de almacenamiento para adultos y larvas. Es por esto que la exposición a productos de protección para cultivos podría no solo ocurrir en el lugar de recolección, sino que también acumularse en la colmena, afectando tanto a las abejas adultas como a las larvas y la reina.

En América del Sur, sin embargo, el escenario ha sido diferente, así como en África y Australia, no se han reportado casos de pérdidas de colonias masivas debido a pérdidas de abejas adultas sin causas determinadas como se ha visto en Europa y América del Norte (Neumann & Carreck, 2010). En Chile se han reportado pérdidas debido a *Varroa* producto de una tardía aplicación del control de ácaros o debido a problemas nutricionales. Además de un caso de pérdidas de cientos de colonias de abejas utilizadas para la polinización durante el verano de 2009 lo que podría haber sido causado por intoxicación con pesticidas debido a exposición a áreas de intensas prácticas de agricultura. Sin embargo, no ha sido reportado hasta la fecha casos de pérdidas mayores que no estén asociados a una causa determinada o a la exposición a zonas de intensa actividad agrícola (Vandame & Palacio, 2010; Agrochemicals.iupac.org, 2013).

### **Agricultura y venta de plaguicidas en la V y VI región de Chile.**

Para este estudio se seleccionaron las regiones de Valparaíso (V) y O'Higgins (VI) de Chile por su gran actividad agrícola, alto uso de pesticidas y importante desarrollo apícola (ODEPA, 2017). La superficie plantada de especies mayores de frutales en el año 2015 para la V región correspondió a 49.619 Ha mientras que la VI región 77303 Ha correspondientes al 15,72% y 24,48% respectivamente del total de frutales plantados en el país (ODEPA, 2017). Los principales cultivos que visitan las abejas melíferas en estas regiones son paltos, duraznos, nectarines, cítricos, almendros, castaños, damascos, cerezos, bayas, kiwis, perales, ciruelos y manzanos (Agdev.anr.udel.edu, 2000).

A nivel nacional, durante el año 2012 (que corresponde a la información obtenida del último informe publicado hasta la fecha) se vendieron casi 39 mil toneladas de plaguicidas

para uso agrícola. Tan solo en la VI región se vendieron 10976 ton y 2729 ton en la V región (Sag.gob.cl, 2012). De estos pesticidas se seleccionaron un grupo representativo de pesticidas NO, HAL y OPP, en la **tabla 1** se resumen algunos aspectos generales junto con el número de ventas registrados por el SAG de cada uno de los plaguicidas seleccionados. Adicionalmente, se incorporó al estudio el ectoparasiticida cumafós por su aplicación directa en las colmenas para tratar la infección por varroa, plaga que a la fecha se encuentra dispersa por todo el territorio nacional. A pesar de que no se conoce su volumen de venta fue considerado por su aplicación directa a los panales. Todos estos pesticidas son utilizados para la protección de cultivos que pueden ser visitados por las abejas o como aplicación directa en el caso de la acrinatrina y cumafos para el control de enfermedades en las colmenas.

**Tabla 1.** Resumen de ventas registradas por SAG el año 2012 de los pesticidas seleccionados. La cantidad de pesticidas vendidos está registrada en Kg o L, según corresponda a su estado a temperatura ambiente. Los últimos informes de venta de plaguicidas registrados por el SAG publicados corresponden a los del año 2012. Además, se incorporó una clasificación según el tipo de pesticida; OPP, HAL y NO, y según su efecto; insecticidas, fungicidas o acaricidas. Los volúmenes de venta de los pesticidas en mezclas entre pesticidas y con los piretroides (PIR) cipermetrina, deltametrina y lambda-cihalotrina también están incluidos.

Compuesto activo	Tipo	Efecto	Volumen de ventas (Kg o	
			V Región	VI Región
<b>Clorpirifós</b>	OPP/HAL	Insecticida	93850	309659
<b>Profenofós</b>	OPP/HAL	Insecticida	2468	23439
<b>Metamidofós</b>	OPP	Insecticida	34760	36509
<b>Dimetoato</b>	OPP	Insecticida	4861	14811
<b>Diazinón</b>	OPP	Insecticida	4685	66606
<b>Metidatión</b>	OPP	Insecticida-acaricida	3641	48671
<b>Azinfós-metilo</b>	OPP	Insecticida	17246	89364
<b>Clortalonil</b>	HAL	Fungicida	16474	46930
<b>Fipronil</b>	HAL	Insecticida	5	1
<b>Acrinatrina</b>	HAL	Insecticida-acaricida	901	1688
<b>Tiametoxam</b>	NO	Insecticida	3080	3472
<b>Acetamiprid</b>	NO	Insecticida	2918	8626
<b>Imidacloprid</b>	NO	Insecticida	14065	11056
<b>Clorpirifós / dimetoato</b>	Mezcla	Insecticida/ Insecticida	4445	13059
<b>Clorpirifós / cipermetrina</b>	Mezcla OPP/	Insecticida/ Insecticida	440	51
<b>Tiametoxam / lambda-</b>	Mezcla NO/ PIR	Insecticida/ Insecticida	4230	10983
<b>Acetamiprid / lambda-</b>	Mezcla NO/ PIR	Insecticida/ Insecticida	1120	117
<b>Imidacloprid /</b>	Mezcla NO/ PIR	Insecticida/	405	550

## **Interacción de pesticidas con patógenos.**

Otros factores de riesgo pueden verse potenciados por la exposición a pesticidas. La presencia de estos compuestos ha mostrado alterar la respuesta de las abejas a enfermedades que usualmente logran controlar con facilidad. Por un lado, el contacto de ciertos pesticidas podría inducir una mayor probabilidad de infección por patógenos como el microsporidio *Nosema* spp o aumentar la carga de virus como el de la reina negra (BQCV) (Pettis *et al.*, 2012; Doublet *et al.*, 2015). Fungicidas que habitualmente son considerados de baja toxicidad para las abejas son aplicados durante la época de floración y por ende tienen una alta exposición para las abejas, y algunos de ellos han mostrado aumentar las tasas de infección por *Nosema* spp (Pettis *et al.*, 2013). Así mismo, pesticidas como el imidacloprid actúan de manera sinérgica con este parásito, induciendo en conjunto un aumento en la mortalidad por su infección (Alaux *et al.*, 2010). Lo mismo ocurre con fipronil y *Nosema ceranae* que pueden sensibilizarse el uno al otro tras una aplicación secuencial (Aufauvre *et al.*, 2012). Durante el desarrollo embrionario la exposición a pesticidas afecta a la susceptibilidad a *Nosema* spp. en la etapa adulta de las abejas (Wu *et al.*, 2012). Más aún, la exposición a NO como el clotianidín disminuye las defensas de las abejas y permite un aumento en la replicación del virus de las alas deformes, disminuyendo el factor transcripcional NF- $\kappa$ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) en las células B de insectos, lo que también se observa con la exposición a imidacloprid (Di Prisco *et al.*, 2013).

## **Métodos de cuantificación de pesticidas en abejas.**

Las propiedades químicas y físicas de los pesticidas pueden diferir considerablemente dependiendo de su estructura. La presencia de heteroátomos (halógenos, fósforo, nitrógeno, etc.) adquiere gran relevancia a la hora de detectar estos pesticidas. Por otro lado, las diferencias en la volatilidad de los compuestos también es clave para algunas técnicas de análisis de pesticidas. En la **tabla 2** se presentan valores para algunas de las propiedades físicoquímicas de los pesticidas seleccionados en este estudio. Estas diferencias en las propiedades dificultan la posibilidad de desarrollar un método único para medición de distintos tipos de pesticidas, o métodos multiresiduos. A pesar de esto, estos métodos son altamente necesarios hoy en día para regular el

uso de químicos como los pesticidas en diferentes industrias. Los niveles máximos de residuos (o tolerancias) han sido establecidos en la mayoría de los países para regular la presencia de pesticidas en alimentos, agua de consumo y matrices ambientales con el fin de evitar impactos adversos en la salud pública. El impacto de los pesticidas sobre el medio ambiente puede causar diversos efectos tanto en el ecosistema como en los mismos cultivos de uso humano, por lo que existe un gran número de laboratorios involucrados en la supervisión de los niveles máximos de residuos y/o en la identificación y cuantificación de los residuos de pesticidas en matrices ambientales. En este contexto el desarrollo de métodos para la cuantificación de residuos de pesticidas ambientales es un área en permanente progreso (Barker, S. A., 2007).

**Tabla 2.** *Resumen de las propiedades fisicoquímicas de plaguidas seleccionado.* Se detallan las características fisicoquímicas de solubilidad en agua a 20°C, logP como medida de lipofilicidad (a 20°C y pH 7) y la presión de vapor a 25°C como medida de volatilidad (PubChem Substance and Compound databases).

Compuesto activo	Solubilidad (mg/L)	logP	Presión de vapor (mPa)
Acrinatrina	0	6,300	0.0000440
Clorotalonil	1	2,940	0,076
Clorpirifos	1	4,700	1,430
Coumafós	2	4,130	0,013
Fipronil	4	3,750	0,002
Diazinon	60	3,690	11,970
Acetamiprid	2950	0,800	0,000173
Tiametoxam	4100	-0,130	0,0000066
Metamidofos	200000	-0,790	2,300

Usualmente, los métodos para la determinación de cantidades traza de pesticidas volátiles o semi-volátiles se basan en el uso de cromatografía gaseosa (GC) en combinación con detectores específicos, como el detector de nitrógeno-fósforo (NPD), fotométrico de llama (FPD), detectores altamente sensibles como el detector de captura de electrones (ECD) o bien en conjunto a espectrometría de masas (MS) con fines confirmatorios (Lehotay, 2005 b). La popularidad de la GC asociada a los detectores ya mencionados, se basa en su mayor selectividad y resolución respecto a la cromatografía líquida (LC), buena precisión, amplio intervalo dinámico de concentraciones y elevada sensibilidad.

Cabe señalar que una vez que se han establecido los requerimientos de calidad analíticos (límite de detección y cuantificación, exactitud, precisión, sensibilidad, selectividad) para un método, es necesario también lograr algunos beneficios prácticos (alto rendimiento de muestras, robustez, facilidad de uso, bajo costo y mano de obra, mínimo uso de disolvente y generación de residuos, bajo riesgo ocupacional y ambiental, pequeñas necesidades de espacio, y materiales). Varios métodos diseñados para determinar múltiples residuos se han mejorado en el tiempo, sin embargo, es difícil lograr alcanzar resultados de alta calidad para un gran rango de pesticidas y además alcanzar los beneficios prácticos mencionados anteriormente.

La determinación de residuos en abejas es un problema analítico desafiante debido a que éstas poseen un alto contenido en ácidos grasos los que son co-extraídos con los analitos interfiriendo con los instrumentos de medición. Durante la preparación de las muestras previo al análisis, un procedimiento común es la extracción con solventes orgánicos tal como el hexano (García *et al.*, 1996; García *et al.*, 1995), diclorometano (Menkissoglu-Spiroudi *et al.*, 2000) (Fernandez *et al.*, 2001 a) o acetato de etilo (Rathi *et al.*, 1997), para luego remover potenciales interferentes, a través de un paso de limpieza, antes de empezar el análisis cromatográfico (García *et al.*, 1996; Menkissoglu-Spiroudi *et al.*, 2000); Fernandez *et al.*, 2001 b). A pesar de esto, los problemas asociados a la presencia de lípidos co-extraídos puede persistir, lo que afecta principalmente al inyector y columna capilar del instrumento, deteriorándola y conllevando a pérdidas en eficiencia (Gillespie *et al.*, 1991). Para lo cual es necesario la aplicación de métodos de extracción de los analitos y limpieza de interferentes que permitan el análisis de una muestra más pura respecto a presencia de interferentes.

### **Métodos para extracción y limpieza**

Diferentes procesos para la extracción de pesticidas desde abejas han sido reportados entre lo cuales se incluyen extracción sólido líquido (SLE) con diferentes solventes (Fernández *et al.*, 2001 b; Charlton & Jones, 2007; Walorczyk & Gnusowski, 2009; Kiljanek *et al.*, 2016), variaciones del método de QuEChERS (Walorczyk & Gnusowski, 2009; Kiljanek *et al.*, 2016), cromatografía de permeación en gel (Rossi *et al.*, 2001; Charlton & Jones, 2007), extracción en

fase sólida (SPE) (Charlton & Jones, 2007), microextracción en fase solida (Fernández *et al.*, 2001 b) y MSPD (Barker, 2007).

El método de QuEChERS (por su nombre en inglés *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*), que provee resultados de alta calidad de manera rápida, fácil y poco costosa, ha sido validado para más de 200 pesticidas (Lehotay *et al.*, 2005 b), incluso en matrices de alto contenido graso (Lehotay *et al.*, 2005 a). El método de QuEChERS tiene varias ventajas sobre otros métodos de tratamiento: altas recuperaciones (>85%), logradas para un amplio rango de polaridad y volatilidad de pesticidas; alto rendimiento de muestras (10–20 muestras en 30 a 40 minutos); poco uso de solvente y producción de desechos; bajo uso de personal sin capacitación extensiva; poco equipamiento o espacio necesario; robusto, debido a que la extracción remueve los ácidos orgánicos; económico y mínima exposición del operario a solventes.

Brevemente, este método utiliza un solo paso de extracción con acetonitrilo (ACN) desde la muestra tamponada convenientemente. Se aplica un efecto de “*salting out*” y retención de agua desde la muestra, usando sulfato de magnesio anhidro ( $\text{MgSO}_4$ ), lo que además induce la partición líquido-líquido. Para la etapa de limpieza se usa una extracción dispersiva en fase sólida, utilizando una amina primaria secundaria (PSA) y/o un adsorbente octadecilsililo (C18) para remover los ácidos grasos de los componentes y  $\text{MgSO}_4$  anhidro para reducir el agua remanente en el extracto. Luego los extractos pueden ser analizados por LC y GC combinados con MS para determinar un amplio rango de pesticidas, alcanzando límites de cuantificación (LOQ) <10 ng/g usando GC-MS. El método QuEChERS ha sido empleado en la preparación de muestras de abejas previo a la determinación de pesticidas NO y OPP, ya sea mediante LC o GC, con recuperaciones comprendidas entre 60 y 120% y límites de detección entre 1 y 10 ng/g (Kamel *et al.*, 2010; Wiest *et al.*, 2011; Tapparo *et al.*, 2013).

Otro método para extraer pesticidas desde tejidos vegetales y animales es la MSPD. Este método a sido escasamente propuesto para la extracción de pesticidas desde abejas para análisis cromatográfico (Fernández *et al.*, 2002; Totti, *et al.*, 2006; Morzycka, 2002; Łozowicka, 2013). La principal ventaja de este método es que logra simultánea y efectivamente la extracción de los analitos de interés y la limpieza del extracto. Lo que constituye una ventaja al disminuir el

número de etapas de la metodología y por ende el error experimental que cada procedimiento agrega al error total del método. La aplicación de MSPD en la determinación de muestras sólidas ricas en grasa y pigmentos como los tejidos animales puede reducir el tiempo de análisis, aumentar el rendimiento, acortar el tiempo de respuesta, reducir el uso de solventes y la producción de residuos, y eliminar la formación de emulsiones que se observan en las extracciones clásicas, mientras se provee de resultados iguales o mejores que los métodos tradicionales. En este método la muestra se coloca en un mortero que contiene un material de soporte tal como la sílica derivada de C18. El soporte sólido y la muestra son mezclados manualmente usando el mortero. De esta manera, la base sólida de sílica irregular sirve como un abrasivo que promueve la ruptura de la arquitectura general de la muestra, induciendo lisis de las células y otras estructuras. Los estudios muestran que la muestra se distribuye sobre la superficie del material sólido aumentando el área de superficie de la muestra disponible para extracción (Barker *et al.*, 2000 a y b) (Barker *et al.*, 1993); (Barker *et al.*, 1989). El material mezclado se empaca en una columna adecuada, la que puede contener sílica, florisil o carbón activo (GCB), entre otros, con el fin de eliminar interferentes por adsorción. Los analitos son entonces eluidos secuencialmente con distintos solventes. MSPD ha sido igualmente empleada en un método para la determinación de residuos de pesticidas en abejas mediante GC, utilizando florisil como dispersante-abrasivo, en una columna con C18 para limpieza y ACN para la elución de los analitos (Lozowicka B. 2013). Las recuperaciones reportadas están entre 70 y 120% con límites de detección entre 3 y 40 ng/g. También se ha reportado su uso para determinar distintos compuestos activos en abejas mediante LC-MS. En este caso, los autores mencionan el uso de C18 como dispersante-abrasivo, sin fase de limpieza adicional y el uso de diclorometano-metanol para la elución de los analitos con recuperaciones entre 60 y 99% y límites de detección (LOD) de 6 a 80 ng/g (Totti *et al.*, 2006).

### **Métodos de detección**

Para la determinación de pesticidas en abejas se ha empleado QuEChERS en conjunto con GC y LC acoplada a detectores de MS y MS/MS (Amulen *et al.*, 2017; Kiljanek, *et al.*, 2017) y GC acoplada a detectores específicos como captura de electrones (GC-ECD), obteniendo límites de cuantificación entre 0,200 – 0,696 ng/g para pesticidas HAL (Amulen *et al.*, 2017). Por otro

lado, MSPD ha sido utilizada en conjunto con LC acoplada a detector de MS y MS/MS en tándem con límites de cuantificación de 0,8 ng/g (Fernandez *et al.*, 2002; Totti *et al.*, 2006; García *et al.*, 2017) además de acoplada a detectores específicos (Lozowicka, 2013) con límites de detección variables menores a 10 ng/g. Si bien las técnicas cromatográficas acopladas a detectores MS/MS tienen bajos límites de detección y permiten identificar con certeza los analitos de interés, estas son de alto costo en equipamiento y requieren de personal especializado para su utilización. Por otra parte, las técnicas cromatográficas asociadas a detectores específicos, si bien presentan menor certeza en la identificación de los compuestos, pueden ser efectivamente utilizadas como métodos de *screening* para grandes números de muestras, tienen bajos límites de detección y con una certeza de identificación significativa en aquellas de alta especificidad en la detección (como GC-FPD). Además, gracias a su menor costo de equipamiento y menor dificultad de uso se vuelven una buena alternativa para la rápida determinación de ciertos pesticidas de amplio uso.

En el presente estudio se propone la utilización de GC asociada a detectores específicos de micro captura de electrones (GC- $\mu$ ECD) y GC-FPD para la determinación de un grupo representativo de pesticidas volátiles de los grupos HAL, OPP y NO.

### **Determinación de pesticidas neonicotinoides por cromatografía gaseosa**

En principio, debido a que los pesticidas NO tienen baja volatilidad, la cromatografía de gases podría ser descartada como método de detección. Sin embargo, en la literatura se ha descrito que es posible medir los pesticidas neonicotinoides imidacloprid, clotianidin y tiametoxam a través de algunos de sus compuestos de degradación volátiles generados ya sea por hidrólisis en medio básico (Navalón *et al.*, 1997), por oxidación (Ko *et al.*, 2014) o uso de productos derivatizantes para obtener compuestos volátiles (Schwartz *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2012). Por ejemplo, la hidrólisis de imidacloprid en medio básico a 85°C, durante 15 minutos, permitió su detección mediante GC-MS obteniendo un *peak* estable por al menos 24 h y con ello su determinación en vegetales mediante esta técnica (Navalón *et al.*, 1997). Por otra parte, en trabajos realizados en el Laboratorio de Química Analítica de Contaminantes Orgánicos y Elementos Traza, donde se desarrolló el presente proyecto; se ha observado que la foto-

degradación de imidacloprid con radiación UV en medio básico genera productos que serían volátiles y por lo tanto susceptibles de ser determinados con GC. Esta reacción es mucho más rápida que la hidrólisis común y por lo tanto podría ser una alternativa como etapa previa a la cromatografía.

De acuerdo con los antecedentes expuestos y considerando que tanto los HAL como OPP son medidos a través de GC, se propone el desarrollo de una metodología única para determinar un grupo seleccionado de pesticidas OPP, HAL y NO, en abejas mediante tratamiento de las muestras por MSPD o QuEChERS y posterior detección a través de GC asociada a detectores específicos. Esta metodología luego será utilizada para determinar el estado de exposición de apiarios de la V y VI región a plaguicidas potencialmente riesgosos para la salud apícola; datos que luego serán correlacionados con características y el volumen de venta de estos plaguicidas y con la presencia de infección por *N. ceranae*.

## **HIPÓTESIS**

Las abejas de apiarios ubicados en la V y VI región de Chile presentan contaminación por plaguicidas de los grupos organofosforados, halogenados y/o neonicotinoides que son utilizados para el control de plagas en la producción agrícolas de estas regiones.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la presencia de un grupo representativo de pesticidas organofosforados, halogenados y neonicotinoides, en muestras de abejas de la V y VI región de Chile

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Desarrollar un método para la determinación de los plaguicidas neonicotinoides; acetamiprid y tiametoxam, el fenilpirazol; fipronil, los halogenados; acrinatrina y clorotalonil, y los organofosforados; metidation, diazinon, dimetoato, metamidofos, clorpirifos, profenofos, azinfos metil y cumafós, en abejas, mediante cromatografía de gases y detección por captura de electrones o fotometría de llama.
2. Evaluar los métodos MSPD y QuEChERS como tratamiento de muestras para extraer y concentrar los citados plaguicidas desde abejas, para su posterior determinación mediante cromatografía de gases y detección por captura de electrones o fotometría de llama.
3. Determinar los compuestos antes detallados en muestras de abejas recolectadas en apiarios ubicados en diferentes comunas de la V y VI regiones.
4. Establecer posibles relaciones entre la presencia de los plaguicidas en las abejas y la de diferentes cultivos ubicados en las proximidades de los apiarios y con la presencia de infección por *Nosema ceranae*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIALES

Material de vidrio de uso general y volumétrico clase A

Tubos de ensayo 15 mL

Tubos de centrifuga de propileno co-polímero de 30 mL con tapa rosca, Naglene

Micropipetas 20 – 100  $\mu$ L y 100 – 1000  $\mu$ L

### Estándares analíticos

Los estándares analíticos de los pesticidas; Clorotalonil, Clorpirifos, Tiametoxam, Fipronil, Profenofos, Acetamiprid, Acrinatrina, Metamidofos, Dimetoato, Diazinon, Metidation, Azinfos-metil, Coumafós, se obtuvieron de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA y todos tienen una pureza  $\geq 98\%$ . Los patrones internos; Trifenifosfato y Pentacloronitrobenceno fueron obtenidos desde Aldrich y tienen una pureza  $\geq 99\%$ . El protector de analito  $\alpha$ -gluconolactona fue obtenido de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA y tiene una pureza  $\geq 97\%$ .

### Reactivos

Hidróxido de Sodio obtenido de MERCK con una pureza  $\geq 99\%$

Sufato de Magnesio anhidro para análisis; EMSURE® obtenido de MERCK (Darmstadt, Alemania) con una pureza  $\geq 96\%$

Acetato de Sodio anhidro para análisis, EMSURE® obtenido de MERCK (Darmstadt, Alemania) con una pureza  $\geq 99\%$

Columnas de limpieza para extracción en fase sólida (SPE); Clean-up® Silica (15 mL, 2 g); Clean-up® GCB no poroso (6 mL, 0.5 g) y Enviro-clean® florisil (15 mL, 2 g) y sorbente Selctrasorb® C18 para dispersión de matriz en fase solida (MSPD) fueron obtenidos de UCT (Bristol. PA, USA).

## **Solventes**

Acetonitrilo para cromatografía líquida; LiChrosolv® obtenido de MERCK (Darmstadt, Alemania) de pureza  $\geq 99,9\%$

n- Hexano para cromatografía líquida; LiChrosolv® obtenido de MERCK (Darmstadt, Alemania) de pureza  $\geq 98\%$ .

Acetato de etilo para cromatografía líquida; LiChrosolv® obtenido de MERCK (Darmstadt, Alemania) de pureza  $\geq 98,9\%$ .

Metanol para cromatografía líquida; LiChrosolv® obtenido de MERCK (Darmstadt, Alemania) de pureza  $\geq 99,8\%$ .

Agua calidad nanogrado

Acetona para GC- $\mu$ ECD LiChrosolv® obtenido de MERCK (Darmstadt, Alemania) de pureza  $\geq 99,9\%$ .

## **Equipos**

Cromatografo de gases Agilent Technologies 7890B equipado con un detector de micro captura de electrones; inyección automática y una columna capilar HP-5 (30m $\times$ 0.32 mm i.d., 0.25  $\mu$ m espesor de película). Como gas portado se utilizó argón-metano (99.995%).

Cromatografo de gases Hewlett Packard 5890 Series II equipado con detectores de captura de electrones y de fotometría de llamas y una columna capilar BPX5 (30 m  $\times$  0.25 mm i.d., 0.25  $\mu$ m espesor de película). Se utilizó como gas portador helio y como gas auxiliar nitrógeno (ambos 99.995%).

Dos rotavapores marca Heidolph con baños termoregulados OB2001 y WB2000; y regulador automático VV2000.

Dos sonicadores ISOLAB Laborgeräte GmbH y Elma TRANSONICDIGITAL.

Ultracentrífuga HERMLE Labortechnik GmbH modelo Z216MK.

Balanza analítica Precisa 40SM – 200A.

Balanza de precisión modelo precisa 4000C.

Vortex

Molinillo para café marca Sindelen modelo Mol-165

## MÉTODOS

### **Desarrollo de método cromatográfico.**

#### **Soluciones stock**

Se prepararon soluciones stock de 1000 µg/L en ACN para los plaguicidas seleccionados y a partir de estas se prepararon las soluciones de concentraciones requeridas para cada experiencia en el mismo solvente o en acetona.

#### **Método cromatográfico para organofosforados**

Se utilizó las soluciones estándar preparadas en ACN para determinar los tiempos de retención y optimizar la separación cromatográfica de los 8 plaguicidas OPP seleccionados; metamidofos (0,015 µg/mL), dimetoato (0,015µg/mL), diazinon (0,045µg/mL), clorpirifos (0,045µg/mL), metidation (0,045 µg/mL), profenofos (0,045 µg/mL), azinfos-metil (0,150 µg/mL), cumafós (0,075 µg/mL) y el patrón interno trifenilfosfato (TFF) (0,100 µg/mL) para eliminar las diferencias producidas por el efecto de la inyección manual.

Para la determinación de los pesticidas organofosforados se usó un cromatógrafo de gases (*Agilent Hewlet-Packard 5890 Serie II*) equipado con GC-FPD. Para la separación analítica de los compuestos se empleó una columna capilar BPX5 de 30 m, fase de fenil polisilfenileno - siloxano con un diámetro interno de 0,25 mm y 0,25 µm de espesor de película. Se inyectó 1 µL de estándar que contenía los ocho compuestos y TFF como patrón interno, en modo sin división con 1,5 minutos de tiempo de acumulación, 250°C temperatura del inyector y 280°C del detector. Como gas transportador se utilizó helio extra puro (99,995% de pureza) a un flujo de 1,8 mL/min y nitrógeno como gas auxiliar. Para la llama se utilizó hidrógeno y una mezcla de aire sintético instrumental (21 ± 2% O<sub>2</sub> + N<sub>2</sub>). El programa de temperatura que permitió una correcta resolución de los compuestos fue el siguiente: una temperatura inicial de 70°C que se mantuvo durante 2 minutos para luego ser aumentada a 25°C por minuto hasta los 250°C, luego una segunda rampa de 50°C por minuto hasta 320°C la que se mantuvo durante 7 minutos obteniéndose un programa de aproximadamente 18 minutos de duración.

## **Método cromatográfico para halogenados y neonicotinoides**

Se utilizó soluciones estándar preparadas en ACN para determinar los tiempos de retención y optimizar la separación cromatográfica de los 2 plaguicidas NO; tiametoxam (0,050 µg/mL) y acetamiprid (0,200 µg/mL), 3 HAL; clorotalonil (1,0 µg/mL), fipronil (0,025 µg/mL) y acrinatrina (0,100 µg/mL) y los 2 OPP, que también contienen cloro, clorpirifos (0,025 µg/mL) y profenofos (0,075 µg/mL), y el patrón interno pentacloronitrobenzeno (PCNB) (0,1 µg/mL).

Para la determinación de los pesticidas mencionados se usó un cromatógrafo de gases (*Agilent technologies 7890B*) equipado con un detector de µECD. Para la separación analítica de los estos compuestos se empleó una columna capilar HP-5 de 30 m, fase (5% fenil)-metilpolisiloxano, diámetro interno de 0,32 mm y 0.25 µm de espesor de película. Se inyectó 2 µL de estándar que contenía los compuestos y PCNB como patrón interno, en modo sin división con 1 minuto de tiempo de acumulación, 250°C temperatura del inyector y 320°C del detector. Se utilizó una mezcla de argón-metano al 99,995% de pureza como gas transportador. El programa de temperatura que permitió una correcta resolución de los compuestos fue el siguiente; se inició con 120°C por 1 minuto, luego fue llevado a 190°C a 15 °C por minuto e inmediatamente se llevó a 230°C a 8°C por minuto, finalmente, se llevó a 280°C a 20°C por minuto donde se mantuvo por 6 minutos obteniéndose un programa de aproximadamente 20 minutos.

### **Degradación de neonicotinoides para determinación por GC.**

Soluciones de imidacloprid, acetamiprid, tiametoxam y clotianidín de 40 µg/mL en ACN se sometieron a tres procesos de degradación; foto-degradación por irradiación con luz *uv*, hidrólisis en medio básico asistida con baño termostático y con microondas, para generar productos de degradación determinables a través de cromatografía gaseosa. La fotodegradación se realizó con una lámpara *uv* de 254 nm, exponiendo las soluciones a intervalos de 2 minutos entre 2 y 18 minutos. La hidrólisis en medio básico de 0,04 M de NaOH se realizó usando un baño termostático a 85 °C en intervalos de 5 minutos entre 15 a 50 minutos (adaptación de Navalón et al. (1997). La hidrólisis en el mismo medio con la asistencia de microondas fue a 200 W

durante 5 minutos. La condición de este ensayo se optimizó a través de una respuesta de compromiso de un diseño experimental Doheler con 7, 5 y 3 niveles para la potencia (140 - 200W), el tiempo (2-7 minutos) y la concentración de NaOH (0,2 – 0,6M), respectivamente.

### **Métodos de extracción de pesticidas.**

#### **QUECHERS**

Se utilizaron abejas blanco (ver detalles en sección recolección de muestras) para determinar el rendimiento de extracción del método de QUECHER descrito en Kiljanek et al. (2017) modificado como sigue. A 1 g de muestra previamente fortificada con los patrones en un tubo falcon de 15 mL se le agregó 10 mL de agua nanogrado, 10 mL de ACN con 1% de ácido acético glacial y 3 mL de *n* – hexano, la mezcla se homogeneizó con la ayuda de vortex durante 30 segundos. Luego sobre esto se agregó 4 g de MgSO<sub>4</sub>, 1 g de NaCl y 1 g de NaOAc y se homogeneizó con vortex durante 1 minuto para luego centrifugar durante 15 minutos a 1160 rcf. Se separó el sobrenadante en otro tubo y se le agregó 350 g de PSA y 1 g de MgSO<sub>4</sub>, se homogeneizó nuevamente con vortex durante 1 minuto para luego centrifugar durante 15 minutos a 1160 rcf. Se colectan 7 mL del sobrenadante los que fueron llevados a sequedad con un rotavapor y se reconstituyó en 0,5 mL de ACN.

#### **Dispersión de matriz en fase sólida (MSPD)**

Se utilizaron abejas blanco (ver detalles en sección recolección de muestras) para determinar el rendimiento de extracción del método MSPD. A 1 g de homogeneizado de abejas previamente fortificada con los patrones se le agregaron 2 g de C18 como fase adsorbente-dispersante y con ayuda de un mortero de vidrio se mezcló durante 5 minutos hasta obtener una mezcla semi seca. La mezcla se incorporó en una columna desechable pre-llenada con 2 g de florisil como co-sorbente y se cubrió con lana de vidrio silanizada. La columna preparada fue sometida a una etapa de lavado con 10 mL de *n*-hexano los que fueron descartados. Luego los analitos fueron eluidos con 12 mL de una mezcla de ACN con 1% de metanol. Posteriormente se llevó a sequedad usando un rotavapor a 50°C y se reconstituyó en 1 ml de acetona para lo cual

fue necesario añadir un paso de sonicación en orden de desprender los residuos que quedan adheridos a las paredes del balón, y uno de centrifugación 5 minutos a 21380 rcf previo al análisis cromatográfico para evitar incorporar partículas al sistema de inyección.

### Optimización de MSPD

Con abejas blanco (ver detalles en sección recolección de muestras) se probó en primer lugar la eficiencia de limpieza de matriz de tres co-sorbentes contenidos en columnas prellenadas con estos: 2 g silica, 0,5 g carbón grafitizado (GCB) o 2 g florisil. Se utilizó 1g de abejas blanco fortificadas con 0,1 µg/g de los plaguicidas. Las columnas de silica y florisil fueron pre lavadas con 10 mL de *n*-hexano y eluidas con 15 mL de ACN, mientras que la columna de GCB fue directamente eluida con 15 mL de una solución de ACN con 10% MeOH. La evaluación se realizó a través de GC-µECD.

Una vez seleccionado el co-sorbente en MSPD (florisil) y empleando C18 como disgregante, se optimizó la etapa de elución mediante un diseño de experimentos de compuesto central, considerando como factores experimentales el volumen del solvente de elución (entre 10 y 20 mL) y el porcentaje de metanol en este (entre 0 y 10 % v/v) (**tabla 3**).

**Tabla 3.** *Diseño de compuesto central empleado para la optimización de la elución en MSPD.* Los valores entre paréntesis representan al valor codificado de los dos factores experimentales optimizados.

Experimento	Volumen solvente elución / mL	Contenido de metanol / % v/v
1	12 (-1)	2 (-1)
2	18 (1)	2 (-1)
3	12 (-1)	8 (1)
4	18 (1)	8 (1)
5	10 (-1,41)	5 (0)
6	20 (1,41)	5 (0)
7	15 (0)	0 (-1,41)
8	15 (0)	10 (1,41)
9	15 (0)	5 (0)
10	15 (0)	5 (0)

**Evaluación de la respuesta cromatográfica en presencia de protector de analito y matriz y obtención de parámetros analíticos.**

Con el fin de evaluar el efecto del protector de analito y de la matriz sobre la respuesta cromatográfica de los distintos pesticidas, soluciones de estos se prepararon a las concentraciones detalladas en la **tabla 4**, tanto en medio de  $\alpha$ -gluconolactona a 4 mg/mL, como en medio de un extracto de abeja blanco obtenido por la metodología MSPD optimizada. Estas mismas soluciones se emplearon para determinar la selectividad del método cromatográfico al comparar sus cromatogramas con el obtenido para un extracto blanco sin fortificar con los analitos.

**Tabla 4.** Concentraciones utilizadas para evaluar el efecto del protector de analito y de la matriz sobre la respuesta cromatográfica. Junto con los compuestos activos se inyectó TFF a 0,100  $\mu$ g/mL cuando fue inyectado en GC- $\mu$ ECD PCNB a 0,100  $\mu$ g/mL en GC -FPD como patron interno.

<b>Tipo</b>	<b>Compuesto activo</b>	<b>Concentración (<math>\mu</math>g/mL)</b>
<i>OPP</i>	Metamidofos	0,015
	Dimetoato	0,015
	Diazinon	0,045
	Clorpirifos	0,045
	Metidation	0,045
	Profenofos	0,045
	Azinfos-metil	0,150
	Cumafós	0,075
<i>NO</i>	Tiametoxam	0,050
	Acetamiprid	0,200
<i>HAL</i>	Clorotalonil	1,000
	Clorpirifos	0,045
	Fipronil	0,025
	Profenofos	0,045
	Acrinatrina	0,100

Por otra parte, para evaluar los parámetros analíticos de linealidad, sensibilidad analítica y límite de cuantificación (LOQ) se prepararon curvas de calibrado de los pesticidas en presencia de un extracto de abejas blanco obtenido mediante MSPD, en diferentes intervalos de concentración dependiendo de la respuesta cromatográfica de cada compuesto. Entre 0,01 y 0,18  $\mu\text{g/mL}$  para clorpirifos, fipronil, acetamiprid, metamidofos, dimetoato, diazinon, y metidation, entre 0,02 y 0,036  $\mu\text{g/mL}$  para tiametoxam y acrinatrina, entre 0,04 y 0,72  $\mu\text{g/mL}$  para azinfos metil y cumafós y entre 0,1 y 0,6  $\mu\text{g/mL}$  para clorotalonil). La sensibilidad analítica y linealidad se obtuvieron con todo el intervalo de concentraciones, mientras que el LOQ se obtuvo sólo con las menores concentraciones.

La linealidad fue evaluada por el parámetro  $(S_b / b) \times 100$ , donde  $S_b$  es la desviación estándar de la pendiente y  $b$  es la pendiente. La sensibilidad analítica fue determinada como la razón  $(S_{y/x} / b)$ , donde  $S_{y/x}$  es el error estándar de la estimación. El límite de cuantificación desde la regresión (rLOQ) se obtuvo como  $10 (S_{y/x} / b) [(n-2) / (n-1)]^{1/2}$ ; donde  $n$  es el número de pares de puntos (en este caso los cuatro de menor concentración). Además, el límite de cuantificación del método (mLOQ) se obtuvo fortificando abejas blanco melíferas en el nivel inferior del rango lineal y sometándolo al método de preparación de la muestra (diez veces el error estándar de la señal obtenida para cinco extractos).

### **Evaluación de la recuperación, precisión y reproducibilidad de las medidas cromatográficas.**

Muestras de abejas libres de pesticidas (ver detalles en sección recolección de muestras) fueron fortificadas a tres niveles y las recuperaciones de los pesticidas fueron determinadas mediante el método MSPD-GC optimizado. Los niveles de fortificación se determinaron según el LOQ de cada pesticida, siendo éste el primer nivel, tres veces el LOQ el segundo y cinco veces el tercero. Todos los análisis se realizaron en triplicado con el fin de evaluar la precisión del método en su totalidad (MSPD-GC).

Para la evaluación de la reproducibilidad de las medidas cromatográficas y la estabilidad de los compuestos en presencia de la matriz en función del tiempo, un extracto de abeja blanco

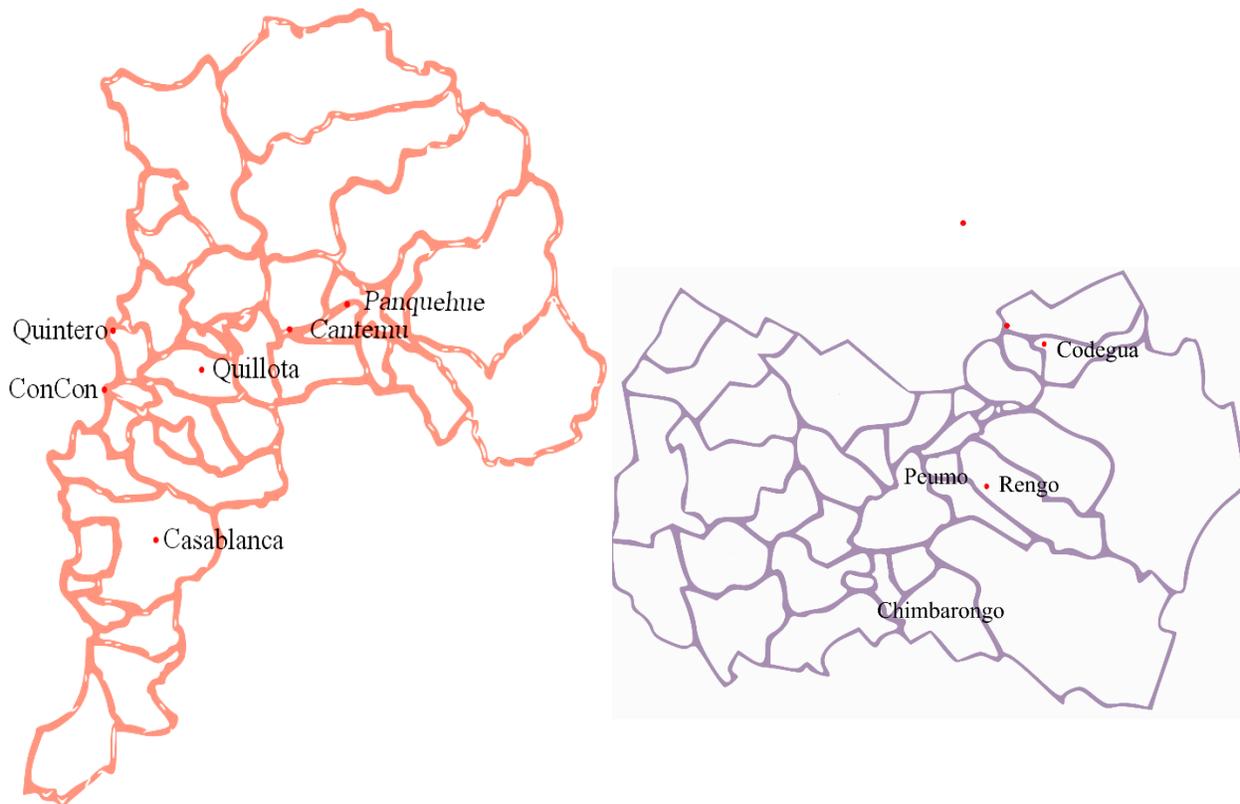
tratada mediante MSPD fue fortificado a tres veces el LOQ para la metodología y fue inyectada en ambos sistemas cromatográficos por ocho días distintos durante un período de dos semanas. Se determinó la variación de las medidas en el tiempo a través de la estandarización de los datos obtenidos según la siguiente fórmula:  $z = \frac{x_i - \bar{x}}{SD}$ , donde  $x_i$  correspondiente a la razón entre el área del patrón sobre el área del patrón interno de cada medición,  $\bar{x}$  correspondiente al promedio de las 8 mediciones y  $SD$  a la desviación estándar de estas mediciones. El promedio de los valores así estandarizados tiene media igual a cero y  $SD$  igual a 1. Se considera como desviación aceptable de los valores si estos no superan 2 veces  $SD$ .

### **Análisis de las muestras**

#### **Recolección de muestras de abejas**

Se recolectaron muestras de abejas desde apiarios ubicados en las regiones VI y V en el mes de noviembre de 2015 y 2016, respectivamente; desde los sectores que se muestran en la **figura 1**. Para la VI región se recolectaron muestras desde cuatro sectores situados en Chimbarongo (8 colonias de 2 apiarios), Codegua (4 colonias de 2 apiarios), Peumo (8 colonias de 2 apiarios) y Rengo (12 colonias de 3 apiarios), con un total de 32 colonias. Mientras que para la V región los sectores de muestreo fueron Concón-Quintero, Quillota, Catemu-Panquehue y Casa Blanca; en cada uno de los cuales se tomaron muestras de 3 colonias desde 3 apiarios distintos, con un total de 36 colonias. En la V región los sectores de Quintero y ConCon como de Cantemu y Panquehue fueron considerados como una sola localidad de muestreo debido a su cercanía. La información de las muestras se resume en la **tabla 5**. Además, se recolectó un tercer grupo de muestras proveniente de 3 colmenas ubicadas en el Instituto de Ciencias de la Facultad de Medicina de la Universidad del Desarrollo, correspondiente a un sector no agrícola por lo que se considera que la cantidad de xenobióticos posibles son muy inferiores a respecto de las colmenas que están ubicadas alrededor de áreas cultivables pudiendo ser utilizadas como muestras blanco

Cada colonia se consideró como un individuo y en cada una de ellas se recolectaron entre 50 y 70 abejas percoreras (recolectoras) que vuelven de sus actividades de recolección, prefiriéndose horas de la mañana y sectores específicos como la entrada de la colmena. Las abejas fueron eutanaziadas en etanol 70% y transportadas al laboratorio donde fueron homogeneizadas en un molinillo para café marca Sindelen modelo Mol-165, alicuotadas de a 1 g y almacenadas a -20°C. Junto al muestreo se realizó una encuesta a los apicultores para estimar la presencia de pesticidas en los cultivos aledaños a los apiarios, además de otras características como presencia de infección por *Nosema* spp o *Varroa*.



**Figura 1.** Mapas de la V y VI región de Chile. Se muestran los sectores donde se recolectaron abejas para determinar la presencia de pesticidas.

En la **tabla 5** se detalla el número de muestras por lugar de recolección además de las infecciones por *Varroa* o *N. ceranae* informadas por los apicultores. La presencia de *Nosema ceranae* se verificó mediante recuento de esporas en el microscopio y amplificación de su material genético a través de PCR en tiempo real (Martínez *et al.*, 2012), procedimientos llevados a cabo por los colaboradores del grupo del Laboratorio de Biomedicina de la Universidad del Desarrollo.

El análisis de estas muestras fue realizado en duplicado mediante el método MSPD-GC-FPD/ECD optimizado, empleando una una curva de calibrado preparada en matriz y considerando la razón de áreas entre las señales cromatográficas de los analitos y la del patrón interno.

**Tabla 5.** *Detalle de muestreo por sector y sobre la infección por Nosema y varroa.* La infección por *Nosema* fue confirmada mediante PCR en tiempo real mientras que la infección por *varroa* fue determinada mediante la información otorgada por los apicultores.

<b>Región</b>	<b>Sector</b>	<b>Lugar</b>	<b>Número de muestras</b>	<b>Infección por <i>N. ceranae</i></b>	<b>Infección por <i>varroa</i></b>
VI	Chimbarongo	La Cuesta	5	0	0
		La Viña	3	1	0
	Codegua	La Punta	4	1	4
	Peumo	Los	8	2	0
	Rengo	Las	8	0	8
		Las	4	0	0
V	ConCon/ Quintero	Las	3	0	0
		Mantagua	3	0	0
		Camino	3	1	0
	Quillota	Lo Rojas	6	0	0
		Hijuelas	3	0	0
	Catemu/ Panquehue	Los	3	0	0
		Huertos	3	0	0
		Santa	3	0	0
	Casablanca	Vinilla	6	0	0
		Vinilla	3	0	0

## Confirmación de la presencia de pesticidas mediante GC-MS

Para la verificación de la presencia de los pesticidas más encontrados en las muestras, se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas (GC-MS) marca Thermo ISQ. El programa utilizado para la separación cromatográfica fue el siguiente; 70° C por 5 minutos; luego una primera rampa hasta 190°C a 15° por minuto, seguido de una segunda rampa a 8°C por minuto hasta 230°C y una tercera rampa hasta 240°C a 20°C por minuto donde se queda por 6 minutos. La columna utilizada fue una HP-5 de 30 m de largo 0,25 µm de diámetro. Las temperaturas de la línea de transferencia y de la fuente de iones fueron de 250°C y 200°C respectivamente. Se inyectó 1 µL de 10 muestras seleccionadas para la verificación de los pesticidas encontrados además de 1 µL de un estándar de 1 µg/mL de los principales pesticidas encontrados. En la **tabla 6** se resumen los tiempos de retención y las relaciones masa carga utilizados por pesticida.

**Tabla 6.** *Tiempos de retención y relación carga masa para los compuestos confirmados por GC-MS.* Siete de los pesticidas más detectados fueron confirmados a través de GC-MS. Clorpirifos y acrinatrina requirieron un tercer fragmento para la verificación de los compuestos.

<b>Compuesto activo</b>	<b>Tiempo retención (minutos)</b>	<b>Relación masa carga fragmentos principales (m/z)</b>
Metamidofos	10,7	94; 96
Clorotalonil	16,6	266; 264
Diazinon	15,9	179; 137
Clorpirifos	17,9	97; 199; 197
Fipronil	18,8	77; 213
Acetamiprid	20,6	59; 126
Acrinatrina	22,3	93; 181; 208

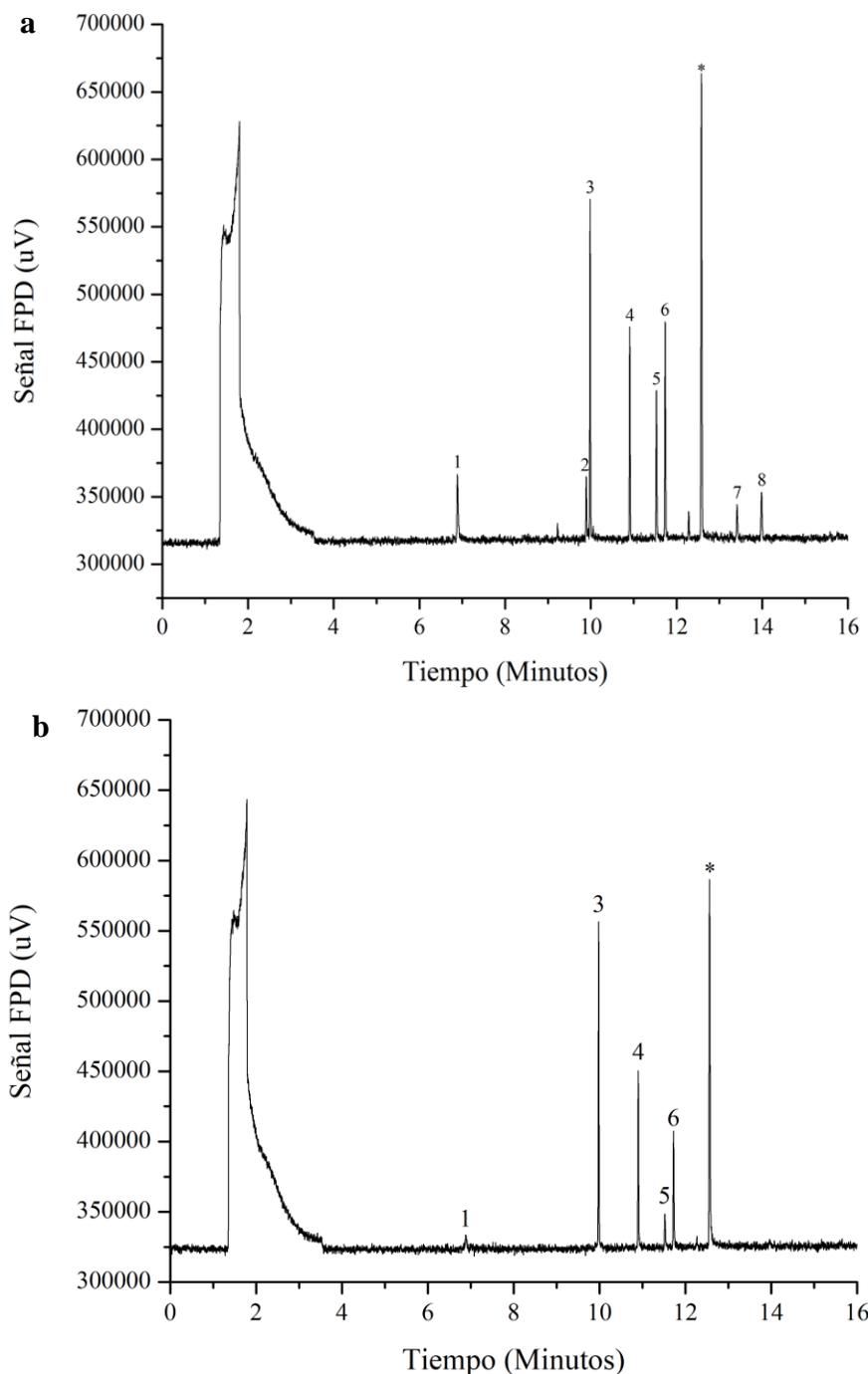
## RESULTADOS

### **1. Desarrollo de un método para la determinación de los plaguicidas organofosforados, halogenados y de neonicotinoides seleccionados, en abejas, mediante cromatografía de gases y detección por captura de electrones o fotometría de llama.**

Más allá de su relevancia debido a los efectos negativos hacia la abeja melífera los pesticidas seleccionados presentan una amplia variedad de hidrofobicidad y volatilidad (ver **tabla 2**) lo que influye en la respuesta en GC y la determinación de los niveles de residuos.

#### **1.1. Determinación de pesticidas organofosforados por cromatografía gaseosa y fotometría de llama.**

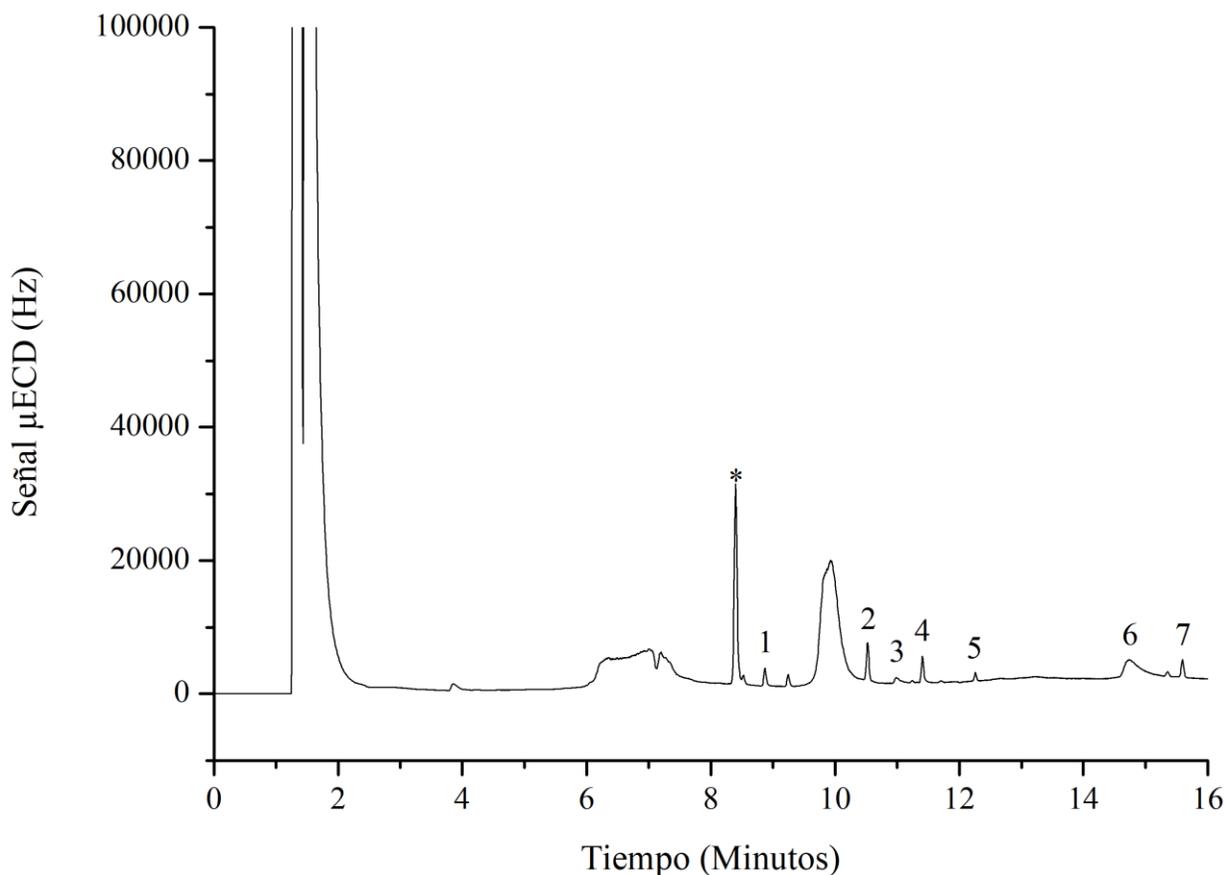
El programa optimizado (ver detalles en sección métodos) permitió una buena resolución de los ocho OPPs analizados en 14 minutos aproximadamente. Para evitar la adsorción de los pesticidas sobre el sistema de entrada (inserto) y obtener señales cromatográficas para todos ellos fue necesario incorporar el protector de analito gluconolactona a una concentración de 4 mg/mL. Como se observa en la **figura 2 b**, sin la presencia del protector de analito algunos compuestos no presentaron señal cromatográfica (dimetoato, azinfos-metil y cumafós); mientras que al estar presente (**figura 2 a**) se obtuvieron picos cromatográficos bien definidos para todos los compuestos. Este efecto de “respuesta cromatográfica mejorada” se produce cuando el protector (o componentes de la matriz) ocupa los sitios activos del sistema de entrada, reduciendo así las interacciones del analito y aumentando su transferencia a la columna cromatográfica.



**Figura 2.** Cromatogramas obtenidos en GC-FPD de los compuestos organofosforados con el programa cromatográfico optimizado descrito. En **a** las señales corresponden a metamidofos<sup>1</sup> (0,015 µg/mL), dimetoato<sup>2</sup> (0,015µg/mL), diazinon<sup>3</sup> (0,045µg/mL), clorpirifos<sup>4</sup> (0,045µg/mL), metidation<sup>5</sup> (0,045 µg/mL), profenofos<sup>6</sup> (0,045 µg/mL), azinfos-metil<sup>7</sup> (0,150 µg/mL), cumafós<sup>8</sup> (0,075 µg/mL) y trifenilfosfato\* (TFF) utilizado como patrón interno a una concentración de 0,100 µg/mL en solvente con  $\alpha$  gluconolactona a 4 mg/mL como protector de analito. En **b** no se usó el protector de analito por lo que no se observan todas las señales.

## **1.2. Determinación de halogenados y neonicotinoides por cromatografía gaseosa y micro captura de electrones.**

El programa optimizado (ver detalles en sección métodos) permitió separar correctamente tanto los plaguicidas HAL; clorotalonil, fipronil y acrinatrina, como los NO tiametoxam y acetamiprid y dos de los OPEI programa optimizado (ver detalles en sección métodos) permitió separar correctamente tanto los plaguicidas OHH; clorotalonil, fipronil y acrinatrina, como los NO tiametoxam y acetamiprid y dos de los OPP que igualmente tienen cloro en su estructura (clorpirifos y profenofos) en 16 minutos aproximadamente, tal como se observa en la **figura 3**. Sin embargo, tiametoxam y acetamiprid mostraron picos mínimos o con cola. Esto probablemente se deba a interacciones con el sistema de inyección, con la columna o a la descomposición térmica parcial de ambos compuestos. Además de las señales asociadas a los analitos, se observaron señales adicionales que fueron atribuidas a impurezas de los patrones y/o de los reactivos empleados detectadas debido a la sensibilidad del detector. Por otra parte, en el caso de este detector la presencia del protector de analito, junto con incrementar la señal, empeoró la línea base; lo que se debería al ingreso al sistema de impurezas de los reactivos utilizados y/o de los patrones de pesticidas, siendo observados entonces en este detector altamente sensible.



**Figura 3.** Cromatograma obtenido en GC- $\mu\text{ECD}$  de los compuestos halogenados y neonicotinoides con el programa cromatográfico optimizado descrito. Las señales corresponden a clorotalonil<sup>1</sup> (1,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), clorpirifos<sup>2</sup> (0,025  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), tiametoxam<sup>3</sup> (0,050  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), fipronil<sup>4</sup> (0,025  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), profenofos<sup>5</sup> (0,075 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), acetamiprid<sup>6</sup> (0,200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), acrinatrina<sup>7</sup> (0,100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y pentacloronitrobenzeno\* (PCNB) a 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  utilizado como patrón interno.

### 1.3. Degradación de neonicotinoides para determinación por GC.

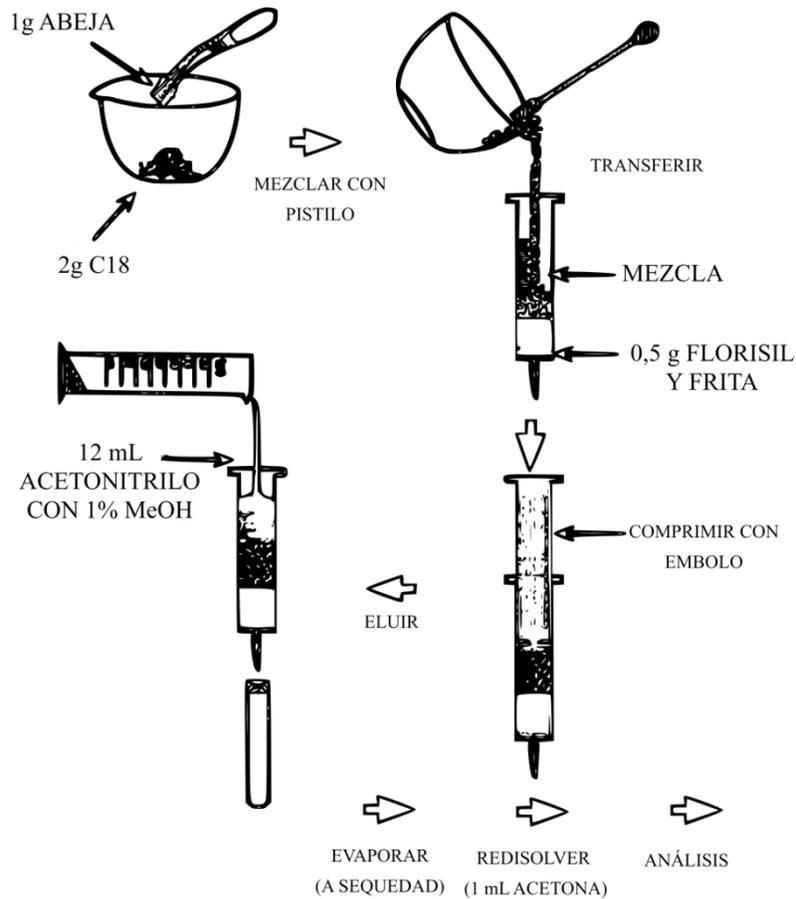
La determinación de plaguicidas NO a través de cromatografía de gases no es usual debido a su baja volatilidad. La señal de los compuestos imidacloprid y clotianidin no son detectables a las concentraciones esperables en muestras de campo y las de los NO tiametoxam y acetamiprid son detectables, pero poco simétricas, tal como se observa en la **figura 3**. La hidrólisis básica o fotodegradación de estos compuestos a productos más volátiles se consideró como una posible alternativa para mejorar su respuesta cromatográfica. Sin embargo, ninguno de estos procesos

permitió obtener límites de cuantificación suficientemente bajos para la determinación del imidacloprid y clotianidin a través de GC con detectores específicos. Por otro lado, las señales de acetamiprid y tiametoxam no mostraron mejoras en el tamaño o simetría del *peak* (*datos no mostrados*), manteniéndose los límites de detección similares a los obtenidos sin ser tratados. Sin embargo, estos valores fueron lo suficientemente bajos en GC- $\mu$ ECD para hacer aplicable el método en el análisis de muestras reales con bajas concentraciones de ambos compuestos.

## **2. Evaluar los métodos MSPD y QuEChERS como tratamiento de muestras para extraer y concentrar los plaguicidas desde abejas, para su posterior determinación mediante cromatografía de gases y detección por captura de electrones o fotometría de llama.**

### **2.1. Preparación de muestra.**

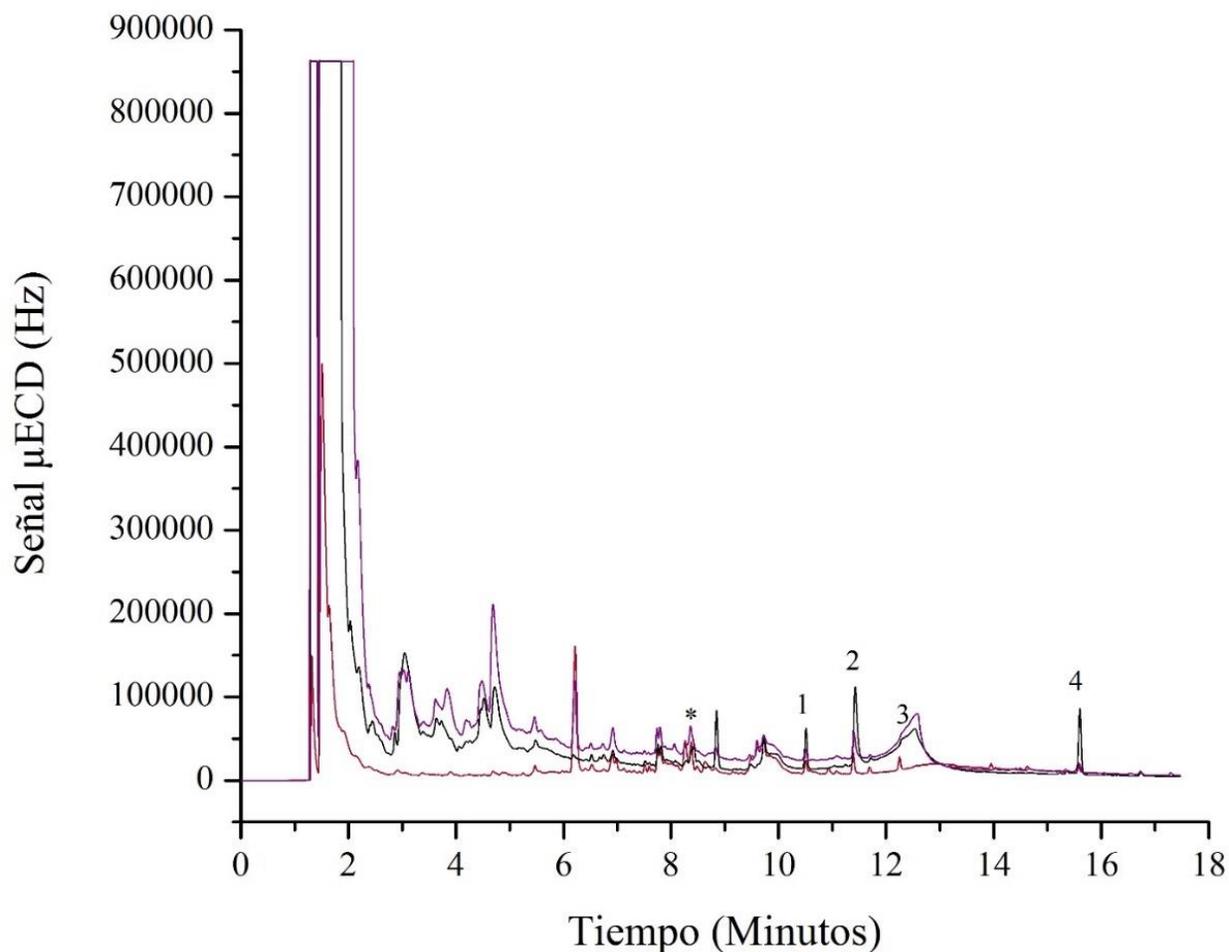
Después de probar los métodos MSPD y QuEChERS, se determinó continuar con el primero ya que se obtuvieron cromatogramas con menos interferentes. (*datos no mostrados*). Por otro lado, MSPD permite realizar la extracción de los analitos y limpieza de la muestra en una sola etapa lo que ayuda a disminuir el error de la metodología. La **figura 4** detalla las etapas del tratamiento de las abejas mediante este método.



**Figura 4.** Diagrama del método utilizado para extracción y limpieza. Imagen adaptada del esquema general de MSPD en Barker (2007).

Las fases evaluadas para la co-extracción en MSPD fueron tres co-sorbentes usados usualmente para el tratamiento de muestras para cromatografía gaseosa: columnas con 2 g de silica, 0,5 g de carbón grafitizado (GCB) o 2 g florisil. Inicialmente, se emplearon 15 mL de disolvente con polaridad creciente para la elución (acetato de etilo, acetato de etilo-metanol y ACN). Para la combinación C18-GCB, las mayores recuperaciones se obtuvieron con acetato de etilo y acetato de etilo-metanol. Sin embargo, incluso con estos solventes, algunos compuestos no excedieron el 50% de recuperación. Se obtuvieron extractos incoloros y un residuo que era insoluble en acetona con los tres disolventes de elución evaluados. En el caso de las combinaciones C18-silica y C18-florisil, la recuperación aumentó a medida que aumentaba la polaridad del disolvente, alcanzando 60-80% para los pesticidas con ACN. En ambos casos, se obtuvo un extracto amarillo claro debido a pigmentos no adsorbidos por sílice o florisil y un pequeño residuo amarillo insoluble en acetona, que se eliminó por ultracentrifugación antes del análisis cromatográfico. Sin embargo, florisil mostró extractos con menos interferentes y por ello

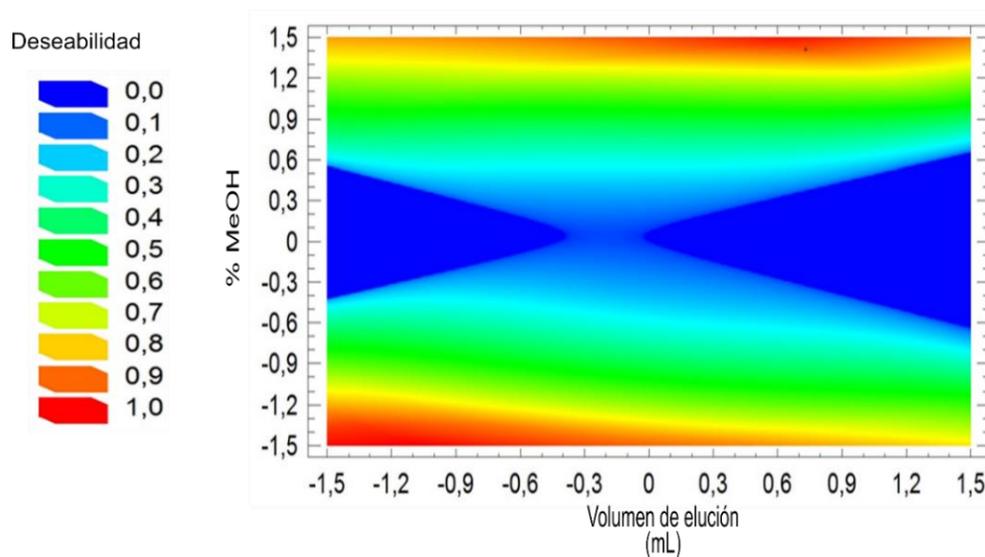
la MSPD con C18 como sorbente y florisil como co-sorbente se seleccionó para una mayor optimización. Se empleó la detección a través de GC- $\mu$ ECD para esta determinación ya que presenta menor especificidad que el detector FPD y evidenció mejor la presencia de interferentes. En la **figura 5** se muestran los cromatogramas en GC- $\mu$ ECD obtenidos para las tres fases probadas.



**Figura 5.** Cromatogramas en GC- $\mu$ ECD obtenidos empleando distintos co-sorbentes en el tratamiento de abejas mediante MSPD. En negro GCB, violeta silica y rojo florisil. Las concentraciones utilizadas fueron de 0,08  $\mu$ g/mL fipronil<sup>2</sup> y acrinatrina<sup>4</sup>, y 0,1  $\mu$ g/mL para clorpirifos<sup>1</sup> y profenofos<sup>3</sup>. Se utilizó pentacloronitrobenzeno\* (PCNB) a 0,1  $\mu$ g/mL como patrón interno.

En una segunda etapa se optimizó el volumen de disolvente de elución (10 - 20 ml) y porcentaje de metanol en este solvente (0 - 10% v/v en ACN) en la MSPD, mediante el método de superficie de respuesta, considerando un diseño de compuesto central y respuesta múltiple. Los pesticidas afectados por estos factores en el intervalo experimental estudiado fueron fipronil, acritatrina, metamidofos y azinfos metil; mientras que los otros compuestos tuvieron una recuperación mayor o igual al 90% para todo el intervalo experimental. Por lo tanto, solo los plaguicidas afectados por los factores experimentales se incluyeron en la optimización de respuesta múltiple, donde la deseabilidad parcial para cada plaguicida se obtuvo mediante la

maximización de su recuperación (unilateral, peso = 1, impacto = 3). En la **figura 6** se muestra la superficie de respuesta donde se observa que el valor óptimo se encuentra en los valores menores o iguales a 15 mL de eluyente con un mínimo porcentaje de metanol (deseabilidad cercana a 1). La condición finalmente seleccionada fue de 12 mL de ACN con un 1% de metanol, lo que permitió obtener recuperaciones superiores al 70% y cromatogramas más libres de interferencias.

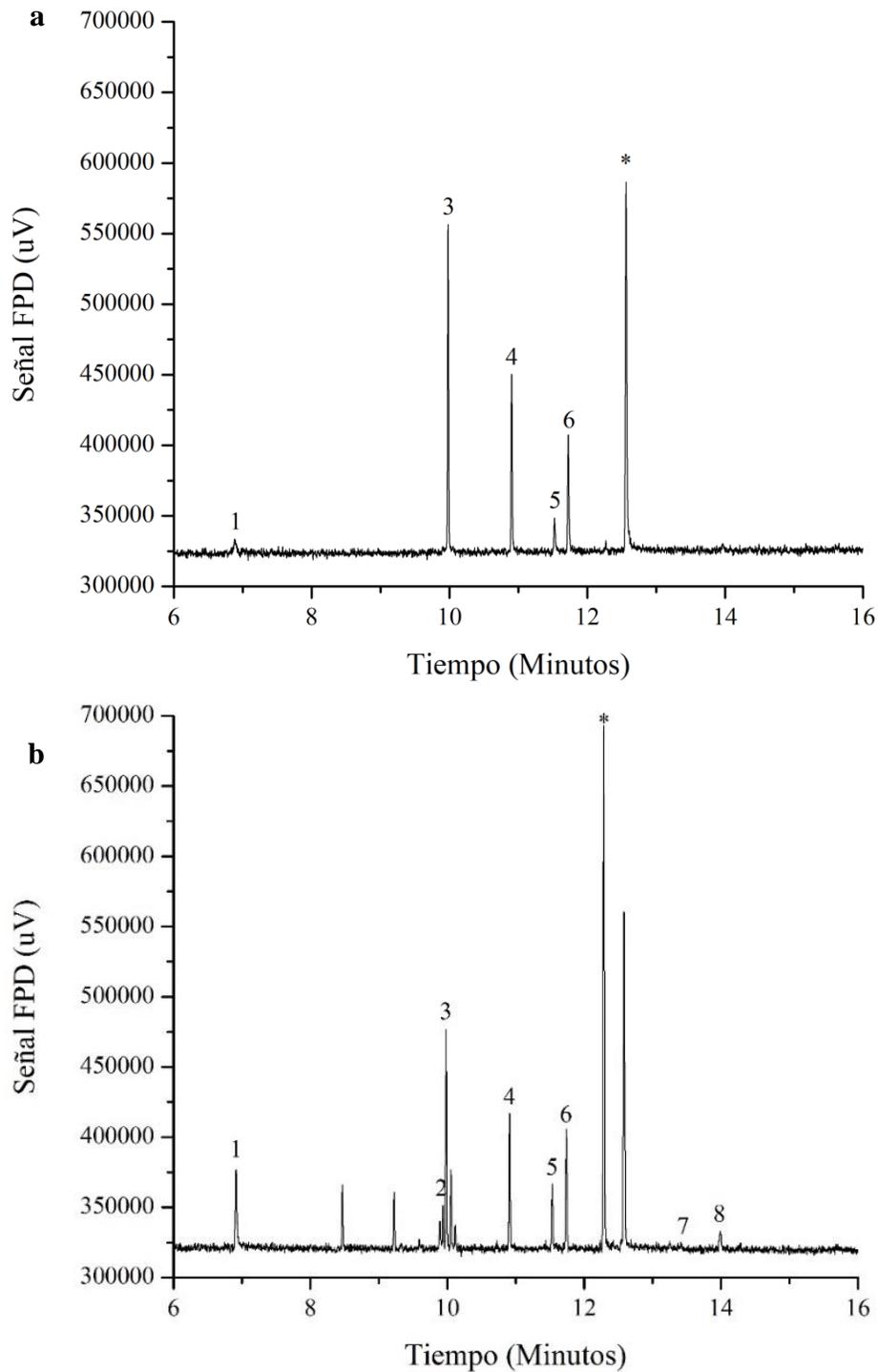


**Figura 6.** Gráfico de superficie de respuesta de la optimización de MSPD con C18-Florisil (% MeOH y volumen de elución) para extracción de los plaguicidas fipronil, acrinatrina, metamidofos y azinfos-metil. Las condiciones se optimizaron cuando su valor de deseabilidad se acerca a 1 siendo este valor que se muestra en rojo la condición óptima. En este caso se observan dos sectores con deseabilidad de 1 en ambos extremos de la superficie de respuesta.

## 2.2. Determinación de características analíticas de la metodología MSPD-GC/FPD/ECD.

En la **figura 7** se observa como los patrones detectados con GC-FPD presentan un área considerablemente menor cuando están en solvente (**figura 7 a**) que cuando están en presencia de la matriz (**figura 7 b**). Como ya se mencionó previamente, este efecto de “respuesta cromatográfica mejorada” se produce cuando componentes de la matriz ocupan los sitios activos del sistema de entrada, reduciendo así las interacciones del analito y aumentando su transferencia

a la columna cromatográfica. Los plaguicidas metamidofos, dimetoato, azinfos-metil y cumafos son los más afectados por este fenómeno, siendo los de mayor y menor polaridad de los organofosforados estudiados respectivamente. Debido a este efecto de protección de los analitos por presencia de la matriz las características analíticas de la metodología fueron determinadas usando una curva de calibrado preparada en matriz.



**Figura 7.** Efecto de incremento de señal generado por la matriz. En **a** se muestra un cromatograma en GC-FPD en solvente, donde solo se observan 5 de los 8 pesticidas (Las señales y concentraciones corresponden a las de la **figura 2**). En **b** se muestra un cromatograma en presencia de matriz donde se pueden distinguir los 8 pesticidas estudiados.

A partir de las curvas de calibración en matriz de cada compuesto se obtuvo la sensibilidad analítica, la linealidad (**Tabla 7**) y el LOQ (**Tabla 8**). La variación de la pendiente (Sr (b)) medida como índice de linealidad fue igual o inferior al 10% en todos los pesticidas, con una sensibilidad que varía entre 0,008 y 0,035 µg/mL. Por otro lado, con excepción de clorotalonil, los límites de cuantificación del modelo de regresión (rLOQ) de los pesticidas fueron iguales o inferiores a 0,050 µg/g lo que asegura su cuantificación al nivel de traza mientras que los límites de cuantificación del método (mLOQ) se mantuvieron bajo los 0,091 µg/g.

**Tabla 7.** *Parámetros de linealidad y sensibilidad analíticas para el método MSPD-GC/FPD/ECD.* Siendo R el coeficiente de correlación de linealidad, b la pendiente, Sb la desviación estándar de la pendiente, Sy/x el error estándar de la estimación, S la sensibilidad en µg/mL y Sr (b) la linealidad.<sup>1</sup>

<b>Detección</b>	<b>Compuesto</b>	<b>R</b>	<b>b</b>	<b>Sb</b>	<b>S y/x</b>	<b>S</b>	<b>Sr (b)</b>
<b>GC-µECD</b>	<b>Clorotalonil</b>	0,9800	0,454	0,046	0,006	0,014	10
	<b>Tiametoxam</b>	0,9897	6,081	0,392	0,097	0,016	6,5
	<b>Fipronil</b>	0,9883	17,026	1,177	0,145	0,009	6,9
	<b>Acetamiprid</b>	0,9826	17,219	1,456	0,179	0,010	8,5
	<b>Acrinatrina</b>	0,9872	6,561	0,537	0,154	0,023	8,2
<b>GC-FPD</b>	<b>Metamidofos</b>	0,9723	32,692	3,515	0,433	0,013	10,8
	<b>Dimetoato</b>	0,9889	21,041	1,411	0,174	0,008	6,7
	<b>Diazinon</b>	0,9745	21,731	2,236	0,275	0,013	10,3
	<b>Clorpirifos</b>	0,9891	17,434	1,163	0,143	0,008	6,7
	<b>Metidation</b>	0,9851	18,469	1,444	0,178	0,010	7,8
	<b>Profenofos</b>	0,9863	23,583	1,765	0,217	0,009	7,5
	<b>Azinfos-metil</b>	0,9897	4,679	0,339	0,164	0,035	7,2
<b>Cumafós</b>	0,9890	7,569	0,507	0,250	0,033	6,7	

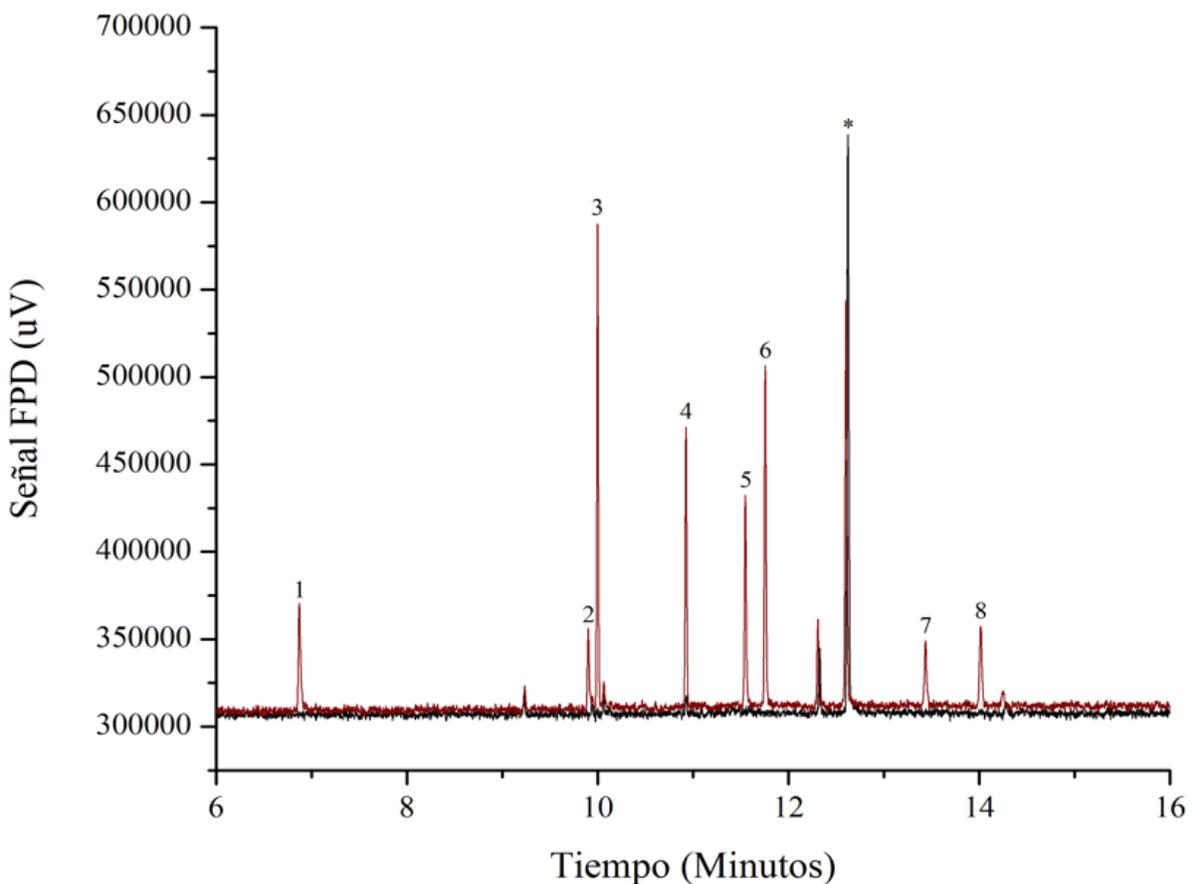
<sup>1</sup> S(sensibilidad)= Sy/x /b; Sr (b) (linealidad) = sb /b.

**Tabla 8.** Límite de cuantificación para el método MSPD-GC/FPD/ECD. Siendo R el coeficiente de correlación de linealidad, S y/x el error estándar de la estimación, b la pendiente, y LOQ en  $\mu\text{g/g}^2$ .

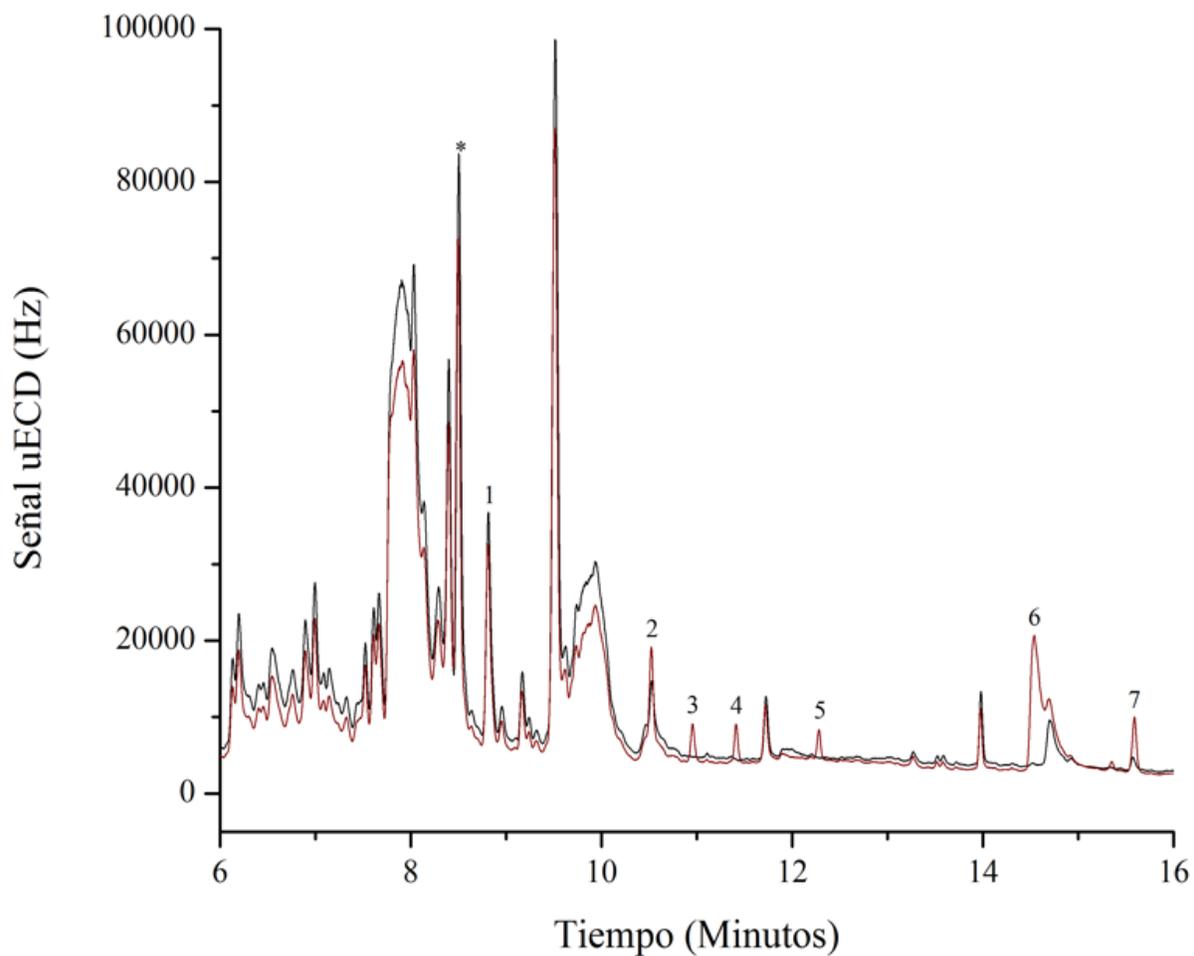
<b>Detección</b>	<b>Compuesto</b>	<b>R</b>	<b>S y/x</b>	<b>b</b>	<b>rLOQ</b>	<b>mLOQ</b>
<b>GC-<math>\mu</math>ECD</b>	<b>Clorotalonil</b>	0,9928	0,026	0,856	0.140	0,164
	<b>Tiametoxam</b>	0,9992	0,004	4,041	0.010	0.010
	<b>Fipronil</b>	0,9971	0,014	13,180	0.010	0.023
	<b>Acetamiprid</b>	0,9499	0,039	8,519	0.040	0.047
	<b>Acrinatrina</b>	0,9954	0,015	5,765	0.020	0.020
<b>GC-FPD</b>	<b>Metamidofos</b>	0,9991	0,013	22,208	0.005	0.007
	<b>Dimetoato</b>	0,9977	0,013	13,562	0.008	0.016
	<b>Diazinon</b>	0,9896	0,036	18,036	0.015	0.015
	<b>Clorpirifos</b>	0,9896	0,022	11,013	0.015	0.017
	<b>Metidation</b>	0,9853	0,031	12,907	0.015	0.028
	<b>Profenofos</b>	0,9910	0,033	17,522	0.015	0.010
	<b>Azinfos-metil</b>	0,9636	0,154	6,516	0.050	0.050
	<b>Cumafós</b>	0,9978	0,018	5,046	0.025	0.091

De esta forma se optimizó una metodología que permite la extracción de los plaguicidas seleccionados y la limpieza suficiente de la matriz para su determinación usando GC acoplada a detectores específicos. Las **figuras 8 y 9** muestran la comparación de los cromatogramas de una muestra blanco y una fortificada, obtenidos para GC- $\mu$ ECD y GC-FPD, respectivamente. No se observó interferencia cromatográfica de la matriz en los tiempos de elución de cada compuesto en GC-FPD (**Figura 8**). Sin embargo, en GC- $\mu$ ECD (**Figura 9**) se observó co-elución de clorotalonil y clorpirifos con interferencia de matriz y coelución parcial de acetamiprid, las que fueron más evidentes debido a la menor selectividad y mayor sensibilidad en GC- $\mu$ ECD que la detección GC-FPD. Sin embargo, la determinación de clorpirifos fue realizada por GC-FPD, donde este problema no estaba presente, mientras que acetamiprid tuvo una resolución suficiente con la interferencia de la matriz para llevar a cabo su determinación. La determinación de clorotalonil posterior careció de certeza.

<sup>2</sup> rLOQ:  $10 * ((S_{y/x} / b) * \text{gl})$ ; mLOQ:  $10 * \text{SD}$



**Figura 8.** Cromatogramas en GC-FPD obtenidos para una muestra de abeja blanco tratada con MSPD (negro) y una fortificada (rojo). Los pesticidas determinados fueron metamidofos<sup>1</sup> (0,015  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), dimetoato<sup>2</sup> (0,015  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), diazinon<sup>3</sup> (0,045  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), clorpirifos<sup>4</sup> (0,045  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), metidation<sup>5</sup> (0,045  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), profenofos<sup>6</sup> (0,045  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), azinfos-metil<sup>7</sup> (0,150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y cumafós<sup>8</sup> (0,075  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) junto con trifenilfosfato\* (TFF) utilizado como patrón interno a una concentración de 0,100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



**Figura 9.** Cromatogramas en GC- $\mu$ ECD obtenidos para una muestra de abeja blanco tratada con MSPD (negro) y una fortificada (rojo). Los pesticidas determinados fueron clorotalonil<sup>1</sup> (1,0  $\mu$ g/mL), clorpirifos<sup>2</sup> (0,025  $\mu$ g/mL), tiametoxam<sup>3</sup> (0,050  $\mu$ g/mL), fipronil<sup>4</sup> (0,025  $\mu$ g/mL), profenofos<sup>5</sup> (0,075  $\mu$ g/mL), acetamiprid<sup>6</sup> (0,200  $\mu$ g/mL), acrinatrina<sup>7</sup> (0,100  $\mu$ g/mL) y pentacloronitrobenzeno\* (PCNB) a 0,1  $\mu$ g/mL utilizado como patrón interno.

### 2.3. Evaluación de la recuperación y precisión de la metodología MSPD-GC/FPD/ECD.

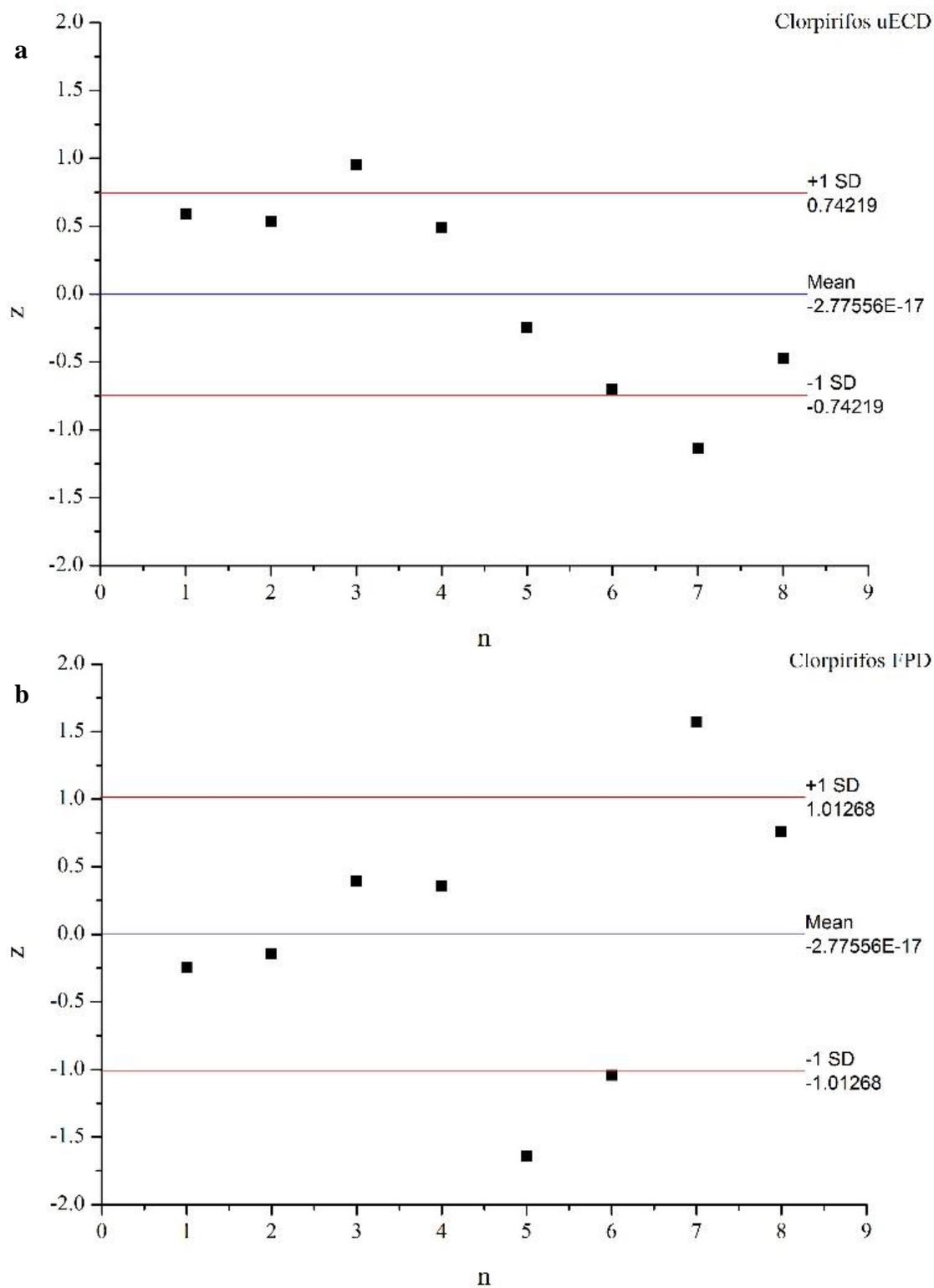
La recuperación promedio al LOQ varió entre 60 a 101% con  $RSD \leq 16\%$ ; mientras que para la concentración intermedia varió de 67 a 140%, con  $RSD$  comprendido entre 2 y 16% (**Tabla 9**). Las recuperaciones más bajas se obtuvieron para los compuestos con hidrofobicidad intermedia (dimetoato, diazinón, metidación) en la concentración más baja enriquecida. Con solo algunas excepciones particulares, estos valores están de acuerdo con la guía SANCO de la Comisión Europea (12571/2013) que estipula valores de recuperación en el rango de 70% a 120% con  $DSR \leq 20\%$  (SANCO, 2016). Lo que indicaría un desempeño aceptable del método para todos los plaguicidas. Por otra parte, las determinaciones de clorotalonil y acetamiprid fueron afectadas por interferentes de la matriz que llevaron a su sobreestimación en algunas de las muestras (5 LOQ y 3 LOQ respectivamente).

**Tabla 9.** Evaluación de la recuperación y precisión del método MSPD-GC/FPD/ECD a tres niveles de concentración. En la tabla se muestra el promedio ( $\bar{x}$ ), la desviación estándar de 3 réplicas (SD) y el coeficiente de variación o desviación estándar relativa (RSD) para tres niveles que corresponden al límite de cuantificación (1LOQ), tres veces el LOQ (3LOQ) y cinco veces el LOQ (5LOQ).

Compuesto activo	1LOQ			3LOQ			5LOQ		
	$\bar{x}$	SD	RSD	$\bar{x}$	SD	RS	$\bar{x}$	SD	RSD
<b>Clorotalonil</b>	96	8	8	84	4	5	207	34	16
<b>Tiametoxam</b>	80	10	13	86	2	2	89	14	15
<b>Fipronil</b>	85	5	6	76	7	10	99	11	11
<b>Acetamiprid</b>	96	7	8	140	16	11	102	17	17
<b>Acrinatrina</b>	79	3	4	68	2	3	97	5	5
<b>Metamidofos</b>	95	8	9	74	8	11	88	3	4
<b>Dimetoato</b>	66	8	12	83	11	13	81	8	10
<b>Diazinon</b>	66	6	9	67	1	1	71	2	3
<b>Clorpirifos</b>	75	9	12	77	12	16	77	1	1
<b>Metidation</b>	60	5	9	78	3	4	81	5	6
<b>Profenofos</b>	75	5	6	80	12	14	70	3	4
<b>Azinfos-metil</b>	101	4	4	102	11	11	78	6	7
<b>Cumafós</b>	80	13	16	79	11	14	95	6	6

#### 2.4. Determinación de reproducibilidad de las medidas cromatográficas en el tiempo.

Con el objetivo de evaluar la reproducibilidad de las medidas cromatográficas y la estabilidad de los compuestos en presencia de la matriz estudiada, una muestra de abeja blanco fortificadas a tres veces el LOQ obtenido para la metodología tratada mediante MSPD fue inyectada en ambos sistemas cromatográficos por ocho días distintos durante un período de dos semanas. En ambos detectores y para todos los pesticidas se obtuvo un valor de  $z$  menor o igual a  $|2|$  (ver sección métodos) durante el tiempo evaluado, lo que demuestra una respuesta cromatográfica relativamente constante y que los compuestos son estables en la matriz en el período evaluado. Como ejemplo se muestra en la **figura 10** el caso de clorpirifos con el detector de  $\mu$ ECD (**Figura 10 a**) y con el detector FPD (**Figura 10 b**), el resto de los resultados para cada compuesto se encuentran en la sección anexo 1.



**Figura 10.** Gráficos de control calidad de inyección en el tiempo para clorpirifos. En **a** se muestra los resultados de 8 inyecciones para el detector de  $\mu$ ECD y en **b** del detector de FPD.

Finalmente, el método MSPD-GC-FPD/ECD se comparó favorablemente en sus características analíticas con los reportados en trabajos previos sobre la determinación de pesticidas en abejas melíferas mediante cromatografía de gases o líquidos y diferentes métodos de extracción. Esta comparación se resume en la **tabla 10**. Para un nivel de fortificación comparable, las recuperaciones y la desviación estándar relativa para el método propuesto son similares a las informadas en la literatura. También se observan valores similares de LOQ. Si bien el detector FPD no se usa ampliamente, los límites de cuantificación obtenidos con él fueron similares a los obtenidos con otros detectores, siendo por lo tanto una alternativa en la determinación de los pesticidas evaluados en abejas. Además, el presente trabajo incluye la determinación de la acrinatrina en las abejas, un acaricida de amplio uso en colmenas contra la varroosis. Solo uno de los trabajos informados también ha incluido este piretroide (Walorczyk *et al.*, 2009).

**Tabla 10.** Comparación del método propuesto en este trabajo con otros reportados en literatura para determinar pesticidas en abejas.

Compuesto activo	Tratamiento de muestra/ Detección	Rango de recuperación % (Valor de fortificación) /RSD	LOQ	Referencia
<b>200</b> pesticidas multiclase	QuEChERS / LC-MS/MS, GC-MS/MS	70-120% (0.010 µg g-1) RSD < 20%	0.001-0.010 µg g-1	Kiljanek et al., 2016
<b>150</b> pesticidas multiclase	Extracción sólido líquido, precipitación a baja temperatura de ácidos grasos y SPE dispersiva / GC-MS/MS	70-120% (0.050 µg g-1) RSD < 20%	No informado	Walorczyk & Gnusowski, 2009
<b>11</b> fungicidas	Extracción Soxhlet - Cromatografía de permeación en gel/ GC-MS	51- 99% (0.010 µg bee-1) RSD 2- 35%	1-5 ng abeja-1 (LOD)	Charlton & Jones, 2007
<b>150</b> pesticidas multiclase	MSPD / GC-NPD, GC-ECD	70-118% (0.010-0.500 µg g-1) RSD < 20%	0.005 – 0.050 µg g-1	Łozowicka, 2013
<b>12</b> insecticidas multiclase	MSPD / GC-NPD	70-110% (0.010-1,000 µg g-1) RSD < 8%	0.020 – 0.120 µg g-1	Morzycka, 2002
<b>18</b> insecticidas OPP	Extracción sólido líquido, micro extracción en fase sólida/ GC-NPD	56-201% (0.050 µg g-1) RSD 1-12%	0.001 – 0.010 µg g-1	Fernández et al., 2001
<b>29</b> insecticidas OPP y carbamatos	Extracción sólido líquido, en tierra diatomea, GPC / GC-NPD, GC-ECD	80-96% (0.300-0.400 µg g-1) RSD 6-20%	0.001- 0.400 µg g-1	Rossi et al., 2001
<b>6</b> pesticidas multiclase	MSPD / LC-API-MS	61-99% (0.200 µg g-1) RSD 8-14%	0.004- 0.090 µg g-1	Totti et al., 2006
<b>18</b> insecticidas OPP	MSPD / LC-MS	76-98% (0.010 µg g-1) RSD 10-12%	0.030- 0.430 µg g-1	Fernández et al., 2002
<b>12</b> pesticidas multiclase	MSPD / GC-FPD, GC-µECD	60 – 101% (0.005-0.050 µg g-1) RSD 6 – 16%	0.005- 0.050 µg g-1	Este trabajo

### **3. Determinar los pesticidas evaluados en muestras de abejas recolectadas en apiarios ubicados en diferentes comunas de la V y VI regiones.**

#### **3.1. Análisis etanol de muestreo.**

1 mL del etanol 70% usado para el muestreo de abejas fue llevado a sequedad con corriente de nitrógeno y luego redisolto en 1 mL de acetona para ECD. 1  $\mu$ L del extracto redisolto en acetona fue analizado a través de los programas de GC- $\mu$ ECD y GC-FPD optimizados descritos en la sección de métodos para detectar residuos de pesticidas que pudiesen haber sido extraídos durante el tiempo de recolección. Los pesticidas de este estudio no fueron encontrados en el etanol de muestreo (*datos no mostrados*).

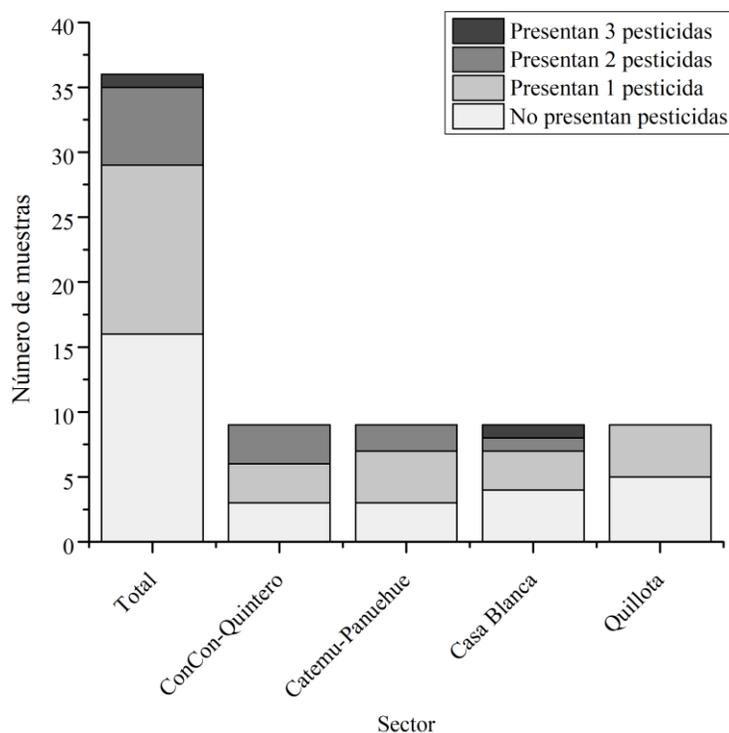
#### **3.2. Análisis de las muestras recolectadas mediante MSPD-GC.**

Utilizando el método desarrollado se determinaron los pesticidas en las muestras de abejas desde los apiarios seleccionados en la V región, los resultados se resumen en la **tabla 11**. Se analizaron 36 muestras de las cuales un 58% presentó al menos uno de los pesticidas estudiados, 19% mostraron señales para dos pesticidas y 3% para tres. El promedio de pesticidas encontrados fue de 1 y la moda 0, siendo 3 el máximo de pesticidas encontrados lo que se observó en una única muestra perteneciente a Casa Blanca. Concon-Quintero junto con Canemu-Panquehue fueron las localidades que mostraron más incidencias, en cada localidad se observó que el 67% de sus muestras mostraron al menos un pesticida mientras que en Quillota y Casa Blanca se observó un 44 y 56% respectivamente

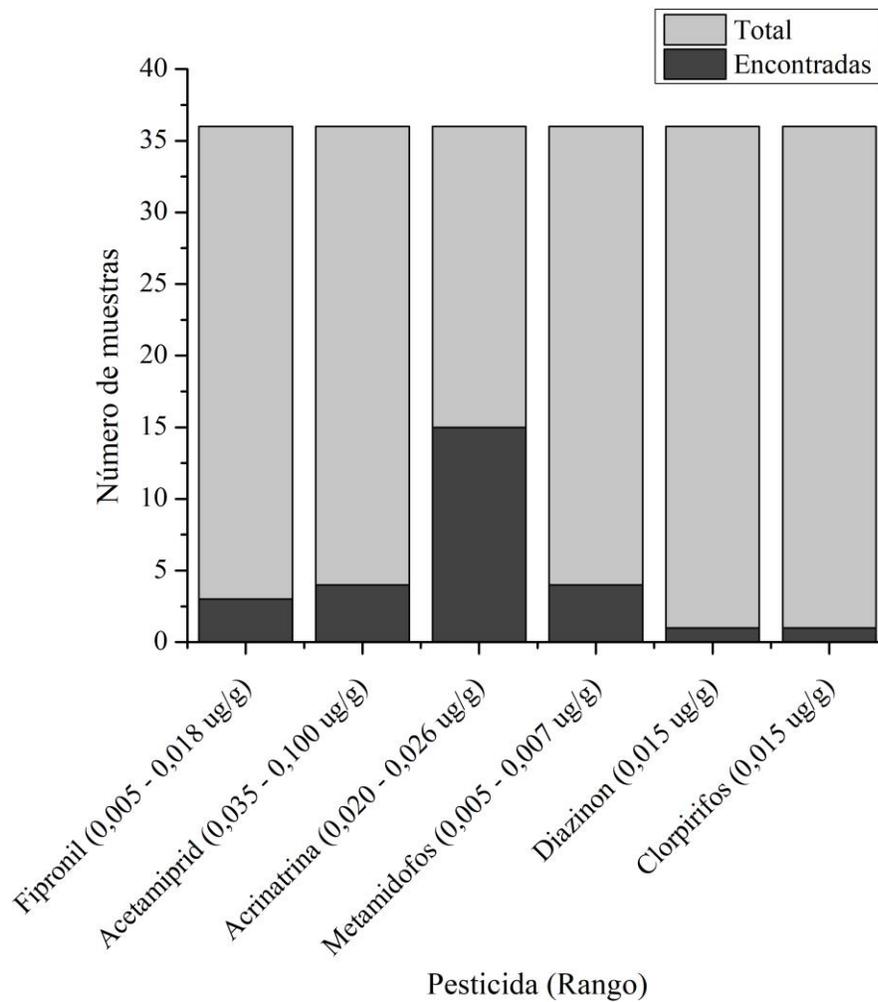
**Tabla 11.** Concentración promedio en  $\mu\text{g/g}$  de los pesticidas en las muestras de la V región. Los resultados marcados como ND son aquellos bajo el LOD del método y con < indica detectado a un valor bajo el LOQ. Para los plaguicidas metamidofos, fipronil, acetamiprid, metidation, dimetoato, azinfos-metil y profenofos no se encontraron concentraciones detectables en ninguna de las muestras.

ID muestra	Localidad	Fipronil	Acetamiprid	Acrinatrina	Metamidofos	Diazinon	Clorpirifos
CGMK 1	ConCon	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CGMK 2	ConCon	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CGMK 3	ConCon	ND	< 0,035	< 0,020	ND	ND	ND
CMPJ 1	ConCon	ND	ND	< 0,020	ND	ND	< 0,015
CMPJ 2	ConCon	ND	ND	< 0,020	ND	ND	ND
CMPJ 3	ConCon	ND	ND	< 0,020	ND	ND	ND
QCMC 1	Quintero	< 0,005	ND	< 0,020	ND	ND	ND
QCMC 2	Quintero	ND	ND	ND	ND	ND	ND
QCMC 3	Quintero	ND	ND	ND	< 0,005	ND	ND
CHJF 1	Catemu	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CHJF 2	Catemu	ND	< 0,035	ND	ND	ND	ND
CHJF 3	Catemu	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CCGG 1	Catemu	ND	ND	< 0,020	ND	ND	ND
CCGG 2	Catemu	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CCGG 3	Catemu	ND	ND	< 0,020	ND	< 0,015	ND
PSLC 1	Panquehue	ND	ND	< 0,020	ND	ND	ND
PSLC 2	Panquehue	ND	0,100	< 0,020	ND	ND	ND
PSLC 3	Panquehue	ND	ND	< 0,020	ND	ND	ND
CVGC 1	Casa Blanca	ND	ND	< 0,020	ND	ND	ND
CVGC 2	Casa Blanca	0,008	0,057	< 0,020	ND	ND	ND
CVGC3	Casa Blanca	0,018	ND	0,026	ND	ND	ND
CVNA 1	Casa Blanca	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CVNA2	Casa Blanca	ND	ND	0,024	ND	ND	ND
CVNA3	Casa Blanca	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CVOA1	Casa Blanca	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CVOA2	Casa Blanca	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CVOA3	Casa Blanca	ND	ND	ND	ND	ND	ND
QRIP1	Quillota	ND	ND	ND	ND	ND	ND
QRIP2	Quillota	ND	ND	ND	ND	ND	ND
QRIP3	Quillota	ND	ND	ND	ND	ND	ND
QRLS1	Quillota	ND	ND	ND	0,007	ND	ND
QRLS2	Quillota	ND	ND	ND	< 0,005	ND	ND
QRLS3	Quillota	ND	ND	ND	< 0,005	ND	ND
QRLA1	Quillota	ND	ND	ND	ND	ND	ND
QRLA2	Quillota	ND	ND	ND	ND	ND	ND
QRLA3	Quillota	ND	ND	< 0,020	ND	ND	ND

En las muestras de la V región se encontraron 6 de los 13 pesticidas estudiados de los cuales acrinatrina fue el más frecuentemente detectado (42% de las muestras), seguido por acetamiprid y metamidofos en 11%, fipronil en 8, y tanto diazinon como clorpirifos en 3%. Acrinatrina se presentó entre valores bajo el LOQ (0,020 µg/g) y los valores cuantificables entre 0,024 – 0,026 µg/g. Metamidofos fue encontrado entre 0,005 y 0,007 µg/g, fipronil vario entre 0,005 y 0,018 µg/g y acetamiprid entre 0,020 y 0,100 µg/g. Diazinon y clorpirifos fueron detectados una única vez bajo el LOQ (0,015 µg/g) en las localidades de Catemu y ConCon respectivamente. Los datos se ven resumidos en las **figuras 11 y 12**.



**Figura 11.** Distribución de pesticidas encontrados por localidades de V región. Se presentan el número de pesticidas encontrados por cada sector. De más claro a más oscuro se observa la cantidad de muestras sin pesticidas, con 1 pesticida, con 2 y 3 pesticidas en ese orden, para las localidades de ConCon-Quintero, Cantemu-Panquehue, Casa Blanca y Quillota.



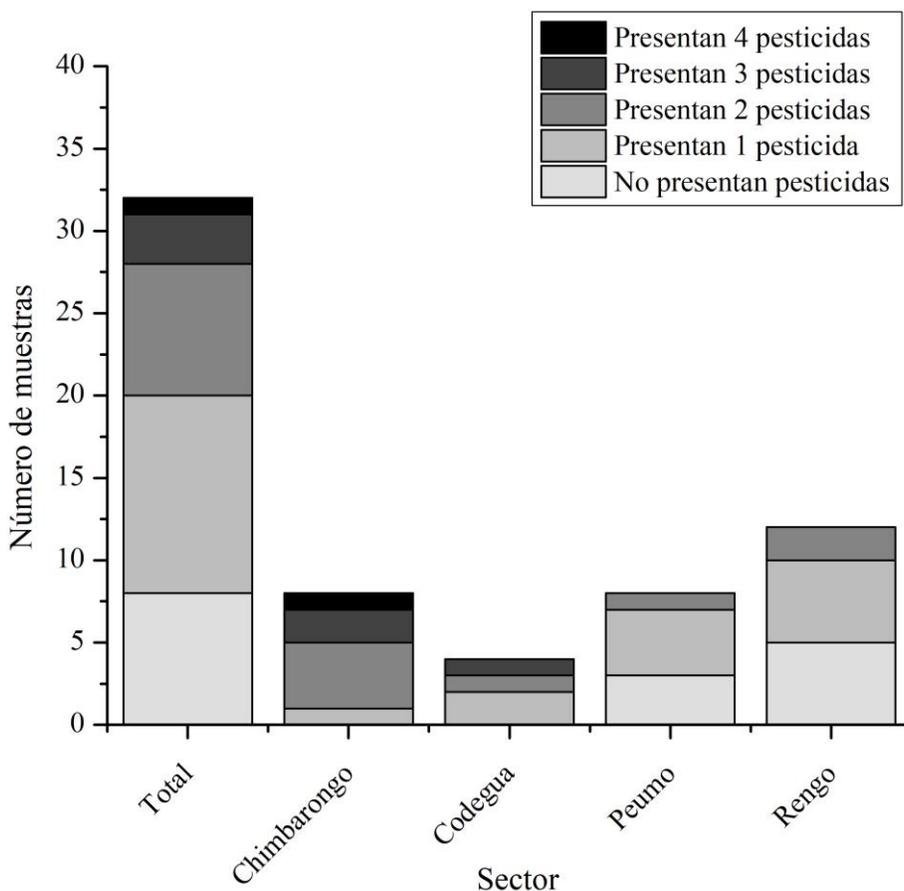
**Figura 12.** Cantidad de muestras positivas por pesticida respecto del total de muestras de la V región. La parte más oscura de la barra representa la cantidad de muestras que evidenciaron la presencia de los pesticidas fipronil, acetamiprid, acrinatrina, metamidofos, diazinon y clorpirifos. Entre paréntesis se muestra el rango de concentraciones encontradas para cada pesticida salvo el caso de diazinon y clorpirifos que fueron encontrados una única vez.

En el caso de la VI región (**tabla 12**), de las 32 muestras analizadas un 75% presentó al menos uno de los pesticidas estudiados, 38% mostraron señales para dos pesticidas, 13% para 3 y 3% para 4. Tanto el promedio como la moda de cantidad de pesticidas encontrados fue de 1 compuesto. En Chimbarongo y Codegua se encontró al menos un pesticida en la totalidad de las muestras mientras que en Peumo fue el 63% y en Rengo el 58%.

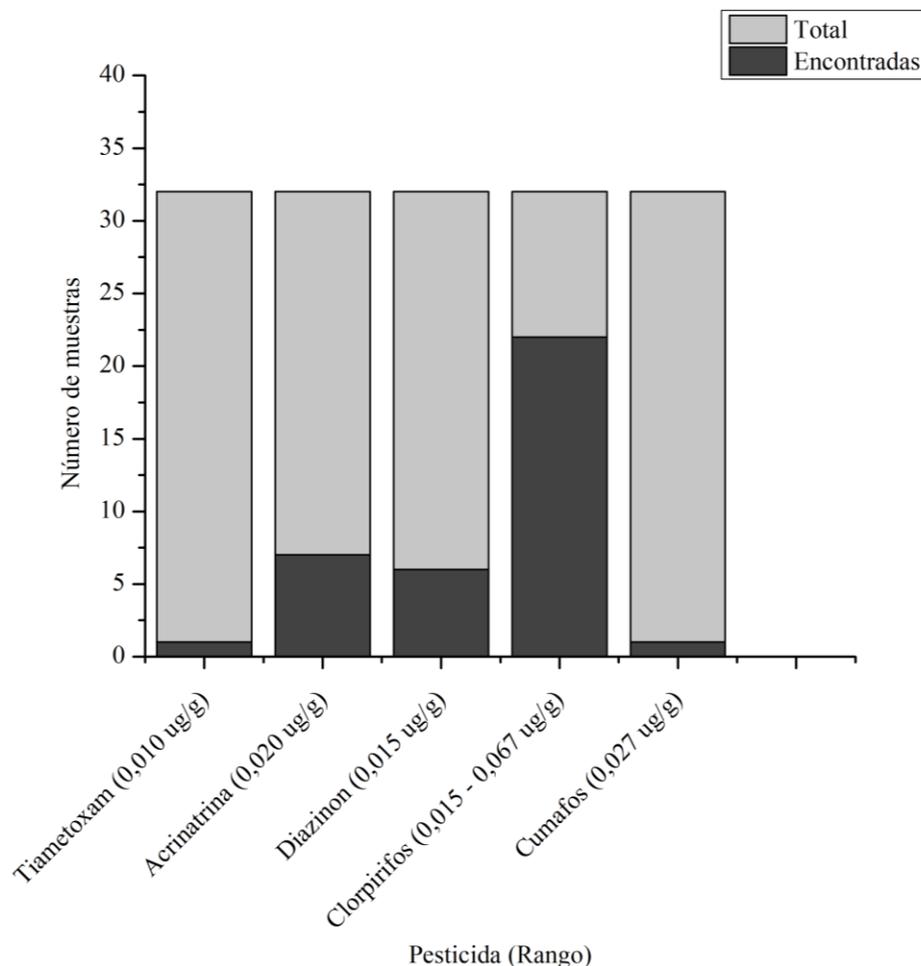
**Tabla 12.** Concentración promedio en  $\mu\text{g/g}$  de los pesticidas en las muestras de la VI región. Los resultados marcados como ND son aquellos bajo el LOD del método y con < indica detectado a un valor bajo el LOQ. Para los plaguicidas metamidofos, fipronil, acetamiprid, metidation, dimetoato, azinfos-metil y profenofos no se encontraron concentraciones detectables en ninguna de las muestras.

ID muestra	Localidad	Clorotalonil	Tiametoxam	Acrinatrina	Diazinon	Clorpirifos	Cumafós
CLC1	Chimbarongo	< 0,200	ND	ND	< 0,015	ND	ND
CLC2	Chimbarongo	ND	ND	ND	ND	0,067	ND
CLC3	Chimbarongo	ND	ND	< 0,020	ND	< 0,015	ND
CLC4	Chimbarongo	< 0,200	ND	< 0,020	< 0,015	< 0,015	ND
CLC5	Chimbarongo	ND	ND	< 0,020	< 0,015	0.016	ND
CLV1	Chimbarongo	ND	ND	< 0,020	ND	< 0,015	ND
CLV2	Chimbarongo	ND	ND	< 0,020	< 0,015	< 0,015	ND
CLV3	Chimbarongo	ND	< 0,010	ND	ND	< 0,015	ND
CPF1	Codegua	ND	ND	ND	ND	< 0,015	ND
CPF2	Codegua	0,647	ND	ND	ND	< 0,015	ND
CPT1	Codegua	ND	ND	ND	ND	< 0,015	ND
CPT2	Codegua	1,262	ND	< 0,020	ND	< 0,015	ND
PQG2	Peumo	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PQGA	Peumo	ND	ND	ND	ND	< 0,015	ND
PQGB	Peumo	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PQGC	Peumo	ND	ND	ND	ND	< 0,015	ND
PQP3	Peumo	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PQPA	Peumo	ND	ND	ND	ND	< 0,015	ND
PQPB	Peumo	ND	ND	ND	< 0,015	ND	ND
PQPC	Peumo	ND	ND	ND	< 0,015	< 0,015	ND
RNC1	Rengo	ND	ND	ND	ND	< 0,015	ND
RNC2	Rengo	ND	ND	ND	ND	ND	ND
RNC3	Rengo	ND	ND	ND	ND	< 0,015	ND
RNC4	Rengo	ND	ND	ND	ND	< 0,015	ND
RNE1	Rengo	ND	ND	ND	ND	< 0,015	ND
RNE2	Rengo	ND	ND	< 0,020	ND	< 0,015	ND
RNE3	Rengo	ND	ND	ND	ND	ND	ND
RNE4	Rengo	ND	ND	ND	ND	< 0,015	0,027
RNV1	Rengo	ND	ND	ND	ND	ND	ND
RNV2	Rengo	ND	ND	ND	ND	ND	ND
RNV3	Rengo	ND	ND	ND	ND	< 0,015	ND
RNV4	Rengo	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Clorpirifos fue uno de los más frecuentemente detectado, estando presente en un 69% de las muestras, con valores cuantificables que varían entre 0,015 a 0,067  $\mu\text{g/g}$  este último encontrado en la localidad de Chimbarongo. El siguiente plaguicida más detectado fue el organohalogenado acrinatrina que pudo ser detectado en un 22% de las muestras con valores bajo el nivel de cuantificación de la metodología propuesta (0,020  $\mu\text{g/g}$ ). Lo mismo sucedió con el organofosforado diazinon que se detectó bajo el nivel de cuantificación (0,015  $\mu\text{g/g}$ ) en un 19% de las muestras. Finalmente, en una muestra proveniente de Rengo pudo ser detectado una concentración cuantificable de cumafós con un valor cercano a los 0,027  $\mu\text{g/g}$ . Los datos se ven resumidos en las **figuras 13 y 14**.



**Figura 13.** Distribución de pesticidas encontrados por localidades de VI región. Se presentan el número de pesticidas encontrados por cada localidad. De más claro a más oscuro se observa la cantidad de muestras sin pesticidas, con 1 pesticida, con 2 y 3 pesticidas en ese orden, para las localidades de Chimbarongo, Codegua, Peumo y Rengo.



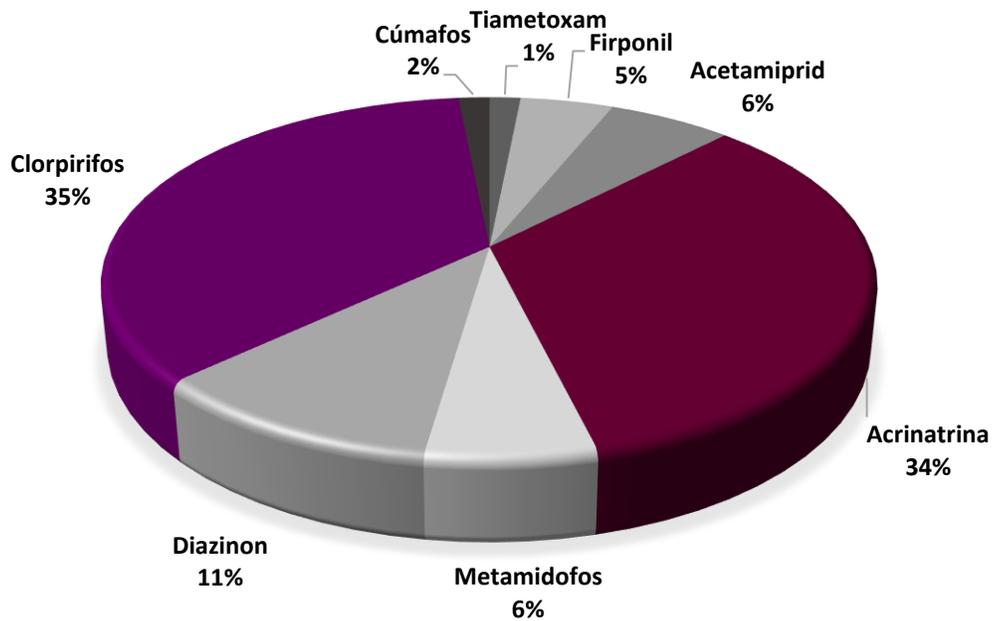
**Figura 14.** Cantidad de muestras positivas por pesticida respecto del total de muestras de la VI región. La parte más oscura de la barra representa la cantidad de muestras que evidenciaron la presencia de los pesticidas acrinatrina, diazinon, clorpirifos, y cumafos. Entre paréntesis se muestra el rango de concentraciones encontradas para cada pesticida salvo el caso de acrinatrina, diazinon y cumafos que fueron encontrados una única vez.

Tanto clorpirifos como diazinon son recomendados para la protección de cultivos de almendras y frutales como vides, cítricos y manzanas entre otros, por lo que es probable que hayan sido utilizados para proteger los cultivos de frutales de la VI región, que representan gran parte de la superficie cultivada de esta región. Mientras que la acrinatrina y cumafós son acaricidas utilizados directamente en apicultura para el control del ácaro *Varroa destructor*.

Finalmente, el tiametoxam es un neonicotinoide que ha sido ampliamente relacionado con las pérdidas de colonias a nivel mundial ya que presenta toxicidad para *Apis mellifera*.

El pesticida clorotalonil pudo ser detectado en un 13% de las muestras encontrándose valores entre LOQ (0,200 µg/g) y 1,262 µg/g. Sin embargo, los picos asociados a este pesticida en las muestras se encontraron en tiempos de retención con mayor variabilidad que el resto de los compuestos y con mayor interferencia por parte de la matriz, por lo que su detección es poco confiable. El método MSPD-GC-FPD o GC-µECD optimizado permitió eliminar parte importante las interferencias de la matriz en la cromatografía, lo que a su vez le da mayor certeza a la identificación de los compuestos basada en sus tiempos de retención. Sin embargo, dado que esto no es confirmatorio de la identidad de los analitos, los resultados determinados por el método propuesto tienen que ser verificados a través de una técnica confirmatoria tal como LC o GC acoplada a un detector de masas.

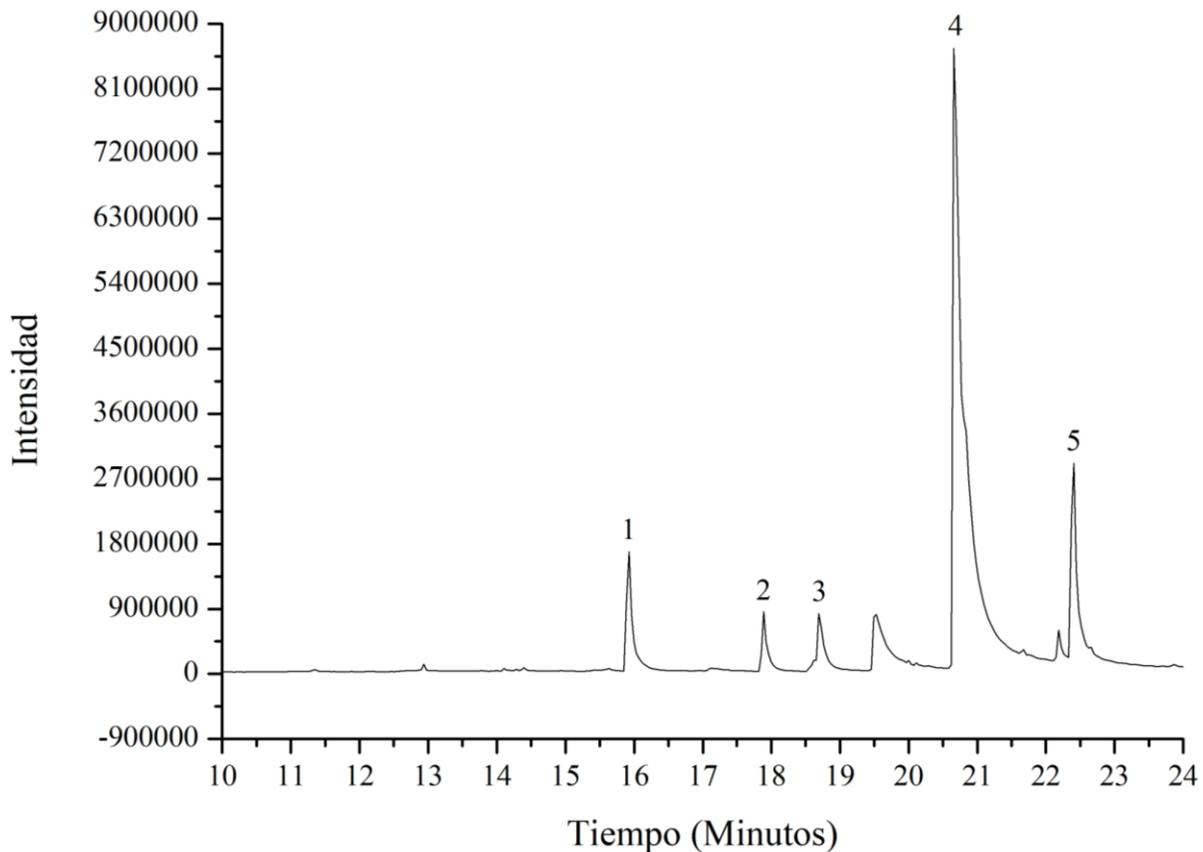
En términos generales (al considerar ambas regiones) los pesticidas más encontrados fueron clorpirifos y acrinatrina (35% y 34% de las muestras, respectivamente) (**figura 15**). Clorpirifos es usado habitualmente para la protección de cítricos, mientras que la acrinatrina se aplica directamente a las colmenas para tratar el ácaro parásito varroa destructor que actualmente se encuentra presente en todo el territorio nacional. El tercer compuesto más frecuentemente encontrado fue diazinon (11% de las muestras) que se usa para la protección de cítricos, manzanos entre otros.



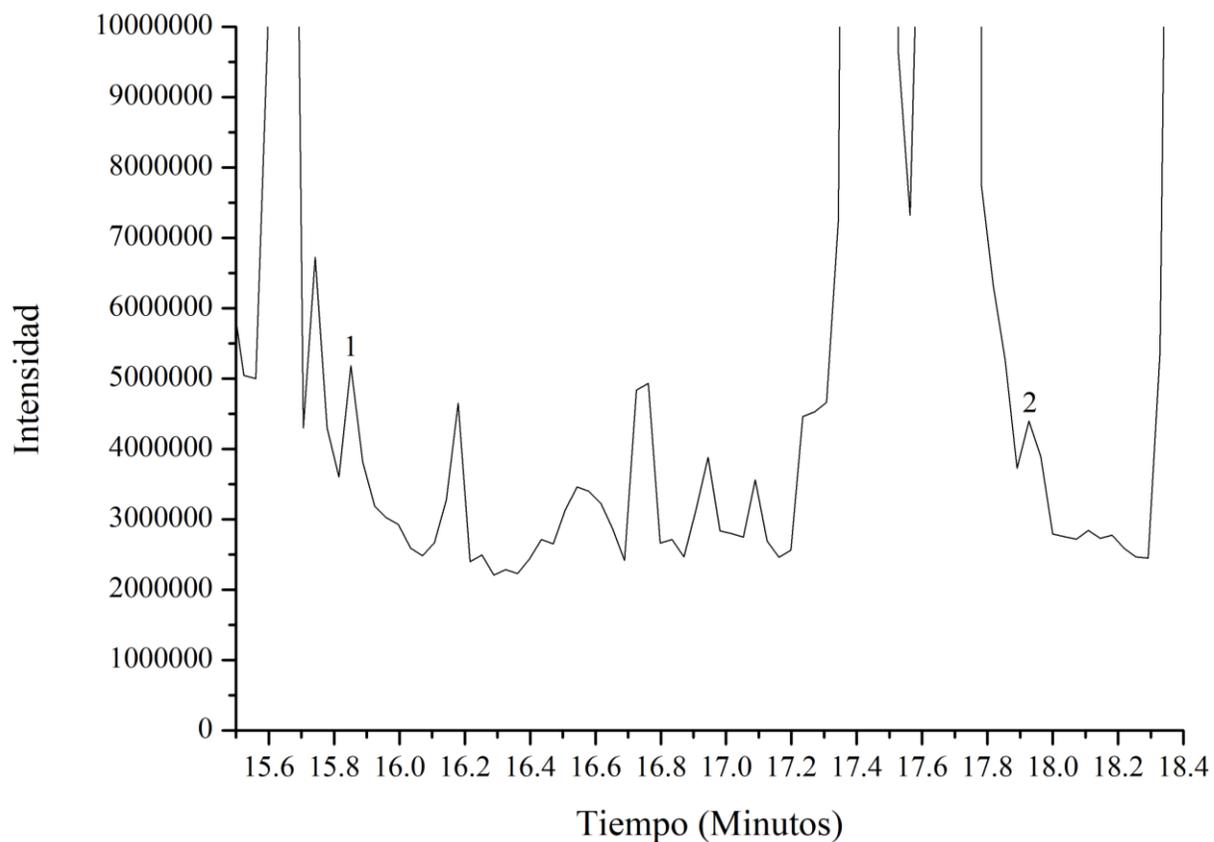
**Figura 15.** Principales plaguicidas encontrados en muestras de la V y VI región en porcentaje respecto al total encontrado. Se analizaron 68 muestras de las cuales 44 presentaron al menos un plaguicida. El máximo de plaguicidas encontrados por muestra fue de 4.

### 3.3. Confirmación por GC-MS

En las **figuras 16 y 17** se muestran los cromatogramas en GC-MS obtenidos para la solución patrón y una de las muestras seleccionadas para verificación. No todos los pesticidas pudieron ser verificados puesto que el GC-MS utilizado presenta límites de detección más altos que nuestro método. Los compuestos presentes en muestras que presentaban concentraciones por sobre el límite de cuantificación de GC-MS fueron detectados. En el caso de metamidofos no se pudo hacer la verificación puesto que no se obtuvo señal del estándar inyectado. Por otro lado, en el caso de la acrinatrina se pudo observar que existe una interferencia de un compuesto que está coeluyendo que está interfiriendo con la detección de este compuesto.



**Figura 16.** Cromatogramas en GC-MS obtenidos para una solución de estándares. Los pesticidas de la solución fueron inyectados a una concentración de 1 ppm de metamidofos, clorotalonil, diazinon<sup>1</sup>, clorpirifos<sup>2</sup>, fipronil<sup>3</sup>, acetamiprid<sup>4</sup> y acrinatrina<sup>5</sup>. Entre las señales <sup>3</sup> y <sup>4</sup>, y <sup>4</sup> y <sup>5</sup>, se muestran dos señales inespecíficas que pueden corresponder a una contaminación.



**Figura 17.** Cromatogramas en GC-MS obtenidos para una muestra de abeja. Los pesticidas encontrados en esta muestra fueron diazinon<sup>1</sup> y clorpirifos<sup>2</sup>. Diazinon fue determinado en la metodología propuesta a una concentración mayor al límite de detección (0,015  $\mu\text{g/g}$ ) mientras que clorpirifos fue determinado a 0,078  $\mu\text{g/g}$ .

## DISCUSIÓN

### **Sobre la metodología propuesta.**

El uso de la técnica de MSPD utilizando florisil como co-sorbente y una mezcla de ACN con 1% metanol como eluyente, permitió una efectiva recuperación de una variedad de compuestos con diferentes propiedades fisicoquímicas, que podrían eventualmente encontrarse juntos en una matriz ambiental como las abejas. La determinación en GC-FPD de los pesticidas con características más extremas en polaridad (metamidofos, dimetoato, azinfos metil y cumafós) se vió favorecida por el uso de protectores de analito, como la  $\alpha$ -gluconolactona, y la presencia de matriz. Algunos de estos compuestos incluso no fueron detectados sin la presencia de este protector o la matriz. El uso de acetona de alta pureza (para uso en ECD) fue un determinante en eliminar señales interferentes en la línea base cuando se mide en con este detector. En los cromatogramas registrados al usar el sistema GC- $\mu$ ECD fue común ver dos señales que aun no han podido ser detectado su origen. Se está analizando la posibilidad de que sean señales provenientes de algún sistema interno del cromatógrafo que no ha sido cambiado tal como válvulas de gas transportador o incluso el mismo gas transportador.

La hidrólisis en medio básico y la fotodegradación de los pesticidas neonicotinoides imidacloprid y clotinamidin no permitieron aumentar la sensibilidad ni bajar los límites de cuantificación en GC para ser aplicable en mediciones de muestras ambientales. Por lo que se trabajó solamente con los pesticidas acetamiprid y tiametoxam, cuyas señales cromatográficas en medio de solvente no fueron simétricas, pero si en medio de matriz, favorecida por el efecto protector de analito. Además, ambos compuestos presentaron un rango de linealidad aceptable y límites de detección suficientemente bajos para permitir su determinación en muestras de campo. Finalmente, el uso de fotodegradación mostró generar muchos más foto-productos de los pesticidas que los métodos de hidrolisis básica en especial el asistido por microondas.

La verificación del método fue realizada a través de un GC-MS. Solo aquellos compuestos que tenían las mayores concentraciones de las muestras que se seleccionaron pudieron ser pesquisadas por este equipo. Los límites de detección de esta técnica no fueron determinados

para los compuestos estudiados, pero se estima que podrían ser mayores a la del método propuesto por lo que es posible que varios de los pesticidas estudiados podrían no haber sido detectados. Más allá de eso, se pudo determinar la presencia de un compuesto que está coeluyendo con acrintrina lo que podría estar arrojando una sobreestimación de los valores detectados para este pesticida. Sería recomendable por un lado repetir la verificación con un sistema de mayor sensibilidad y, por otro lado, se podría modificar el programa para tratar de separar el coeluyente de la acrintrina para así poder determinar el porcentaje real de muestras contaminadas con este pesticida. Esto último podría ser fácilmente alcanzable con una modificación del programa cromatográfico haciendo más lenta la última rampa para aumentar la separación cromatográfica de ambos *peaks*.

### **Toxicidad aguda por exposición a pesticidas en *A. mellifera*.**

La mayoría de los plaguicidas seleccionados para este estudio presentan una alta toxicidad en abejas y larga persistencia en el medio ambiente por lo que fueron considerados como riesgosos para nuestra población apícola. En la **tabla 13** se resume las dosis letales medias (LD<sub>50</sub>) publicadas para la mayoría de los pesticidas seleccionados, la toxicidad de cada uno varía dependiendo de su aplicación (oral o de contacto). En general, el fipronil y los NO presentan una alta toxicidad para las abejas generando una alta mortalidad con dosis muy bajas (en el orden de ng por abeja). A pesar de tener un mismo modo de acción la toxicidad de los NO es variable. Por ejemplo, tiametoxam y acetamiprid presentan toxicidades muy diferentes. Tiametoxam presenta una alta toxicidad tanto oral como de contacto mientras que acetamiprid presenta una toxicidad casi 3000 veces menor. Estas diferencias podrían deberse tanto a diferencias estructurales como de los metabolitos que generan cada uno en las abejas. Hasta ahora es conocido que los metabolitos del acetamiprid no presentan mayor toxicidad por lo que cualquier mecanismo que los produzca correspondería a un mecanismo de desintoxicación. Mientras que uno de los principales metabolitos del tiametoxam es el clotianidin, metabolito y pesticida propiamente tal que presenta una alta toxicidad para las abejas. Esto sucede con otros neonicotinoides como el imidacloprid por lo que es considerado como una de las causas de la alta toxicidad de estos pesticidas a las abejas (Iwasa *et al.*, 2004).

Por otro lado, pesticidas de alto uso agrícola como el clorpirifos presentan también toxicidad para las abejas. Dependiendo de la forma de aplicación estos pesticidas pueden formar verdaderas nubes tóxicas que han desencadenado muertes masivas de abejas recolectoras en especial en la época del florecimiento. Por esta razón, en muchas partes de Europa se ha limitado el uso de estos pesticidas en las épocas de mayor riesgo, obteniéndose resultados variables.

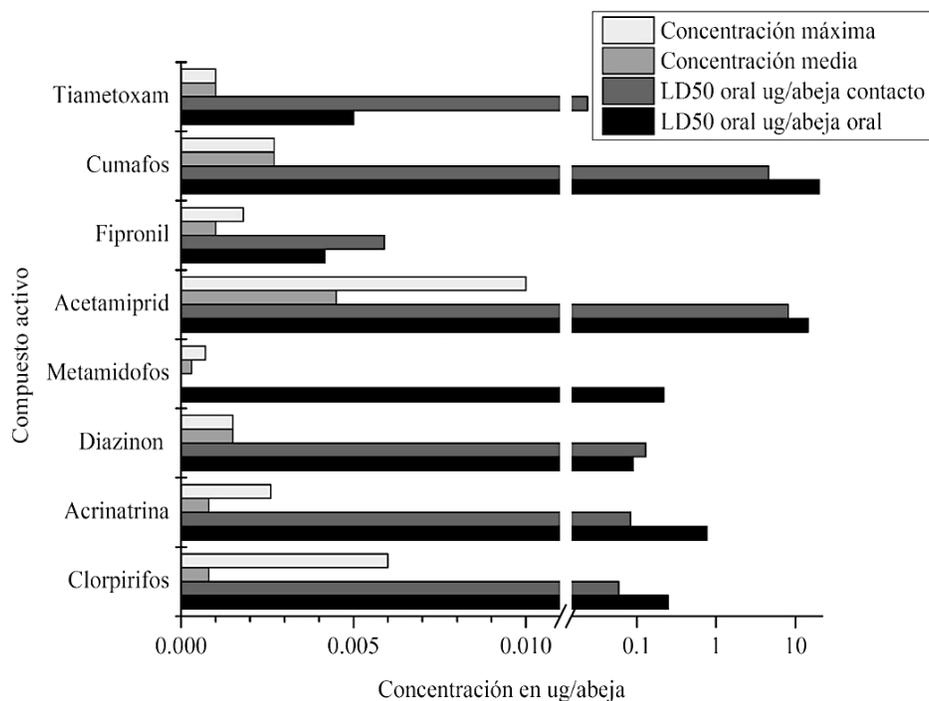
**Tabla 13.** *LD<sub>50</sub> de los pesticidas seleccionados a las 48h en µg/abeja oral y de contacto.* Todos los datos fueron obtenidos de la *Pesticide Properties Database (PPDB)* de la Universidad de Hertfordshire. Solo cumafós fue obtenido de *Sanchez-Bayo & Goka, 2014*, donde no se especifica el número de horas.

Compuesto activo	LD50 oral	LD50 contacto
Clotianidin	-	-
Metidati3n	-	> 0,130
Profenof3s	-	0,095
Azinf3s-metilo	-	0,420
Fipronil	0,004	0,006
Imidacloprid	0,004	0,081
Tiametoxam	0,005	0,024
Diazinon	0,090	0,130
Diazin3n	0,090	0,130
Metamidofos	> 0,220	-
Clorpirifos	0,250	0,059
Acrinatrina	0,770	0,084
Acetamiprid	14,530	8,090
Cumafos	20	4,600
Clorotalonil	> 63	> 101

En diferentes partes del mundo se han hecho determinaciones de residuos de m3ltiples pesticidas tanto en abejas como en sus subproductos; miel, cera o polen, as3 como tambi3n en los sectores que rodean a los apiarios. Clorpirifos es uno de los pesticidas m3s frecuentemente detectado en abejas a concentraciones que varian entre 1 y 10 ng/g (Mullin *et al.*, 2010) o incluso hasta 180 ng/g (Wiest *et al.*, 2011). La LD<sub>50</sub> oral de clorpirifos corresponde 0,250 µg/abeja o aproximadamente 2,5 µg/g, <sup>1</sup>/<sub>10</sub> de la LD<sub>50</sub> corresponder3a entonces a 250 ng/g, concentraci3n

mucho mayor que las habitualmente encontradas para este pesticida. Esta misma situación se presenta para varios de los pesticidas seleccionados. Salvo excepciones las concentraciones encontradas no suelen superar el límite de residuos permitido para cada región y están muy por debajo de las LD<sub>50</sub>.

En nuestro estudio se analizaron los resultados considerando un peso de 0,10 g por abeja. Con esto se comparó las concentraciones medias y máximas encontradas con los datos de LD<sub>50</sub> de contacto y oral a las 48h para los pesticidas encontrados. Para todos los casos las concentraciones medias encontradas fueron mucho menores que las LD<sub>50</sub> tanto de contacto como oral (**figura 18**). La concentración más alta encontrada no supera los 0,010 µg/abeja mientras que las LD<sub>50</sub> para la mayoría de los casos están sobre los 0,1 µg/abeja.



**Figura 18.** Concentración máxima y media encontradas en las muestras comparados con LD<sub>50</sub>. Para metamidofos solo se encontró LD<sub>50</sub> oral, mientras que para todo el resto se tienen los valores de LD<sub>50</sub> oral y de contacto tras 48 horas de la aplicación. Las concentraciones máximas y medias de tiametoxam, cumafós, y diazinon se consideraron como el LOD ya que no fueron encontradas concentraciones a valores cuantificables.

Los resultados obtenidos corroboran lo descrito en la literatura sobre la baja exposición de las abejas a concentración letales en campo. A pesar de esto, hay una preocupación creciente por los efectos que puede tener la exposición crónica a concentraciones subletales de la mayoría de los pesticidas encontrados. Se vuelve importante entonces considerar los efectos que pudiesen tener dosis subletales, consideradas como  $1/10$ ,  $1/50$  o incluso  $1/100$  de la  $LD_{50}$ , y como la exposición a estas dosis por periodos prolongados afecta no solo la sobrevivencia de las abejas, sino que su comportamiento individual y social.

Los NO y el fipronil difieren de los insecticidas clásicos en que estos se aplican como recubrimiento en las semillas y se vuelven sistémicos en la planta, es decir, se distribuyen en toda la planta pudiendo ser detectados en el polen y néctar mucho después del periodo de florecimiento (Cutler *et al.*, 2007). En consecuencia, las abejas pueden estar expuestas a ellos por largos períodos de tiempo (exposición crónica). Los estudios de cultivos con semillas tratadas con estos pesticidas no han demostrado tener efectos negativos sobre las abejas melíferas, sin embargo, algunos estudios que establecen el efecto de exposición crónica con dosis subletales de pesticidas en abejas sí muestran algunos efectos sobre las abejas (Nguyen *et al.*, 2009).

Varios pesticidas de amplio uso tanto NO como OPP y HAL afectan tanto a la mortalidad como a la sobrevivencia de las abejas adultas y larvas (Wu *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2008). Más allá de los efectos en la sobrevivencia de estos insectos también se han logrado establecer claros cambios en su comportamiento. El aprendizaje y la memoria son aspectos que ayudan a la abeja en sus tareas de recolección de alimento en la navegación desde y hacia la colmena, en la detección de las flores por su olor (aprendizaje olfatorio) y la memorización de estos olores, localización de fuentes de alimentos, entre otras funciones que se han visto alteradas por la exposición a bajas dosis de pesticidas en el tiempo (Decourtye *et al.*, 2003; El Hassani *et al.*, 2008; Aliouane *et al.*, 2009). Por otro lado, también se ha visto interferencias en los procesos de orientación y demoras en el tiempo de retorno a la colmena (Bortolotti *et al.*, 2003; Ramirez-Romero *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008; Decourtye *et al.*, 2010) el reconocimiento de polen, néctar y agua entre otros productos clave para el funcionamiento de la colmena (El Hassani *et al.*, 2008; Démarets *et al.*, 2016).

El blanco de la mayoría de estos pesticidas es el SNC de los insectos por lo que no es raro observar que pequeñas dosis de ciertos pesticidas alteran la movilidad de las abejas impidiendo acciones básicas como caminar y volar, o incluso inducen síntomas como caídas, movimientos descoordinados, hiperactividad y temblores, (Lambin *et al.*, 2001; Nauen *et al.*, 2001; Guez *et al.*, 2001; Medrzycki *et al.*, 2003; Colin *et al.*, 2004). Esto afecta la capacidad de las abejas no solo de desplazarse, sino que de comunicarse con el resto de la colmena. Es conocido que las abejas se comunican a través de distintos patrones de vuelo que indican la locación de fuentes de alimento entre otras cosas (Dornhaus & Chittka, 2004).

Más aún la reproducción de las abejas también se ve afectada; efectos adversos en la producción y el desarrollo de las larvas, problemas durante la eclosión y posterior desarrollo en abejas y otros polinizadores, bajas en la producción de reinas o de los zánganos, entre otros fenómenos que alteran la correcta reproducción de estos insectos (Decourtye *et al.*, 2010; Decourtye *et al.*, 2005; Abbott *et al.*, 2008; Tasei *et al.*, 2000; Tasei *et al.*, 2001; Gregorc & Ellis, 2011).

El fipronil junto a los neonicotinoides se consideran como una de las causas probables del CCD (Stokstad, 2012). Estudios del efecto de dosis subletales ( $1/100$  LD50) de fipronil en la abeja melífera africanizada muestran que se producen varios daños de tipo fisiológicos, lo que podría causar un comportamiento anormal y posiblemente muerte (Roat *et al.*, 2013). Al igual que el imidacloprid y el clotianidin, el fipronil induce comportamientos que reducen la eficiencia del vuelo (como quedarse mucho tiempo en la misma fuente de alimento) (El Hassani *et al.*, 2005; 2009).

Cabe señalar que existen ciertas discrepancias entre los resultados de estudios de exposición crónica a pesticidas en terreno y laboratorio (Henry *et al.*, 2012). En Cutler *et al.* (2007) por ejemplo, no se observaron efectos colaterales en abeja melífera cuando eran expuestas a canola crecida de semillas tratadas con clotianidin, lo mismo sucedió para imidacloprid administrado en suplementos de sacarosa (Faucon *et al.*, 2005), en semillas de maravilla (Schmuck *et al.*, 2001) o maíz tratadas (Nguyen *et al.*, 2009). De la misma manera no se observó efectos negativos con el tratamiento con tiacloprid a las dosis permitidas (Schmuck *et al.*, 2003). En el

estudio de Decourtye et al. (2010) se propone que esta clara discrepancia entre los estudios de campo y laboratorio podría deberse a la capacidad de las abejas de cambiar su comportamiento en respuesta a la percepción de pesticidas, lo que disminuiría la cantidad de pesticidas recolectados cuando se hacen los estudios fuera del laboratorio.

Más allá de los NO y el fipronil, los OPP se han visto implicados en incidentes de envenenamiento de abejas (Fletcher *et al.*, 2003; Kamler *et al.*, 2003). Los residuos de OPP se detectan frecuentemente en matrices de colmenas de abejas melíferas, pero como no sobrepasan los límites permitidos se sugiere que no están directamente involucrados en las pérdidas de colmenas (Mullin *et al.*, 2010; Chauzat *et al.*, 2011; Wiest *et al.*, 2011; Cutler *et al.*, 2014; Al Naggar *et al.*, 2015). Sin embargo, es necesario considerar la posibilidad de que se encuentren interactuando con otros estresores, o en combinación entre ellos, pudiendo comprometer el bienestar de las abejas o la colmena (Cornman *et al.*, 2012).

### **Modo de acción de pesticidas seleccionados**

Es raro encontrar exposición a un solo pesticida en las abejas; ya que generalmente están expuestas a diversos insecticidas, fungicidas y acaricidas, entre otros; por lo que sus efectos pueden ser aditivos (Mullin C. A., 2010; Chauzat M. P., 2011; Wiest *et al.*, 2011; Amulen *et al.*, 2017; Darko *et al.*, 2017; García *et al.*, 2017; Ghini *et al.*, 2004; Kiljanek *et al.*, 2017; Orso *et al.*, 2016; Tong *et al.*, 2016). Los pesticidas pueden presentar un efecto aditivo cuando ambos ejercen su efecto sobre un mismo blanco celular; mientras que pueden tener efectos sinérgicos cuando ejercen su efecto sobre blancos distintos.

Los neonicotinoides y el fipronil son pesticidas relativamente nuevos que se usan a gran escala a nivel mundial (Pisa *et al.*, 2015), son altamente persistentes y tienden a acumularse en los suelos y sedimentos (Bonmatin, 2015), así como también en los tejidos grasos de seres vivos. Los NO son derivados de la nicotina e imitan la acción de la acetilcolina (Ach), que es uno de los principales neurotransmisores excitatorios en el sistema nervioso central (SNC) de los insectos. Bajo condiciones fisiológicas normales luego de que la Ach es liberada por la célula presináptica se une a los receptores colinérgicos (AchR) y activa un canal catiónico intrínseco. La apertura del

canal resulta en una depolarización de la célula postsináptica principalmente debido a la entrada de ion sodio ( $\text{Na}^+$ ). La acción sináptica de la Ach se termina cuando la enzima acetilcolinesterasa (AChE) hidroliza rápidamente la Ach. Los NO por su parte activan los AchR, pero no son sensibles a la degradación de la AChE por lo que la activación persiste (**Anexo 2**). Esta activación persistente desencadena una sobreestimulación de las sinapsis colinérgicas y resulta en la hiperexcitación, convulsiones, parálisis y muerte del insecto (Bloomquist, 2009).

Los OPP presentan estructuras químicas diversas con un amplio rango de propiedades fisicoquímicas y una actividad toxicológica primaria; la inactivación de la AChE. Este proceso bloquea la degradación del neurotransmisor Ach lo que provoca un aumento de su concentración generando la hiperexcitación del SNC. Esto se traduce en grandes descargas del potencial de acción provenientes de un mismo estímulo. En insectos los efectos de los OPP están ligados al SNC donde todas las sinapsis colinérgicas están localizadas. La reactivación de la AChE se puede lograr a través de una hidrólisis en agua, sin embargo, puede tomar varias horas e incluso días lo que hace que la acción de los OPP, si bien es más lenta que la acción de los PIR, sea persistente (**Anexo 2**.) (Bloomquist, 2009).

El fipronil es un fenilpirazol que, así como los neonicotinoides, presenta una alta toxicidad aguda para las abejas melíferas. Interfiere con la función de los canales ligados a ácido  $\gamma$  amino butírico (GABA) interrumpiendo el flujo normal de iones cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) a través de su unión a los canales de  $\text{Cl}^-$  ligados a GABA. En dosis suficientes causa una excitación neuronal excesiva, parálisis severa y muerte. Fipronil tiene una afinidad mayor por los canales de  $\text{Cl}^-$  regulados por GABA de insectos que los de mamíferos (Gunasekara *et al.*, 2007) (**Anexo 2**). La unión de fipronil a los receptores de GABA induce una hiperpolarización de los cuerpos pedunculados (o *corpora pedunculata*) que están ubicados en varias partes del cerebro de la abeja y son relevantes para la modulación del aprendizaje, memoria y percepción sensorial (Schäfer & Bicker, 1986; Narahashi *et al.*, 2007; El Hassani *et al.*, 2009; Aliouane *et al.*, 2009; Bernadou *et al.*, 2009).

La acrinatrina es un HAL aplicado directamente en las colmenas para el control de varroa un ácaro parásito que se encuentra diseminado prácticamente en todo el territorio nacional

(Lesser, 1998). Corresponde a un PIR fluorado que afecta el sistema nervioso de los ácaros de una manera similar que otros miembros de la familia de los PIR, bloqueando la señal nerviosa a través de la prolongación de la apertura de los canales de ion  $\text{Na}^+$  (**Anexo 3**) (Dekeyser, 2005). La intoxicación por PIR resulta de sus potentes efectos en la generación del impulso nervioso tanto en el SNC como en el sistema nervioso periférico (SNP). Bajo condiciones normales las neuronas poseen un voltaje transmembrana de  $-60$  mV al interior. El impulso nervioso o potencial de acción consiste en una despolarización transiente que está dirigida por una entrada de iones  $\text{Na}^+$  seguido por una repolarización debida a la salida de ion potasio ( $\text{K}^+$ ). Estos flujos de iones ocurren debido a la apertura y cierre de canales iónicos que se encuentran en la membrana de los nervios. El potencial de acción se propaga por el axón hasta que llega al terminal nervioso donde estimula la liberación de transmisores químicos. La apertura prolongada de los canales de  $\text{Na}^+$  causan los efectos de hiperexcitación de las células postsinápticas (Bloomquist, 2009).

El clorotalonil por su parte es un fungicida que es clasificado por su modo de acción como “multisitio”. Este reacciona en las células a través de la sustitución del  $\text{Cl}^-$  por los grupos sulfhidrilos del glutatión y otros tioles de bajo peso molecular lo que inhibe la oxidación de la glucosa fuertemente y por ende interfiere con la cadena respiratoria de los hongos (Vincent & Sisler, 1968).

Como se menciona anteriormente, la mayoría de estos estudios consideran la exposición a un solo pesticida cuando en la realidad la exposición de las abejas es a múltiples pesticidas además de otros factores como agentes biológicos, cambios climáticos, mala nutrición, etc. Los efectos tóxicos de mezclas de pesticidas en abejas están siendo cada vez más estudiados (Pilling *et al.*, 1993; Gill *et al.*, 2012; Johnson *et al.*, 2013). La combinación de pesticidas clorpirifos, clorotalonil y cumafos han mostrado poseer efectos negativos sinérgicos (Zhu *et al.*, 2014). Los estudios en terreno del imidacloprid junto con el OPP cumafos han mostrado que disminuyen el aprendizaje olfatorio y la formación de memoria en abejas (Williamson *et al.*, 2013 a). Las mezclas de algunos acaricidas también han mostrado tener efectos sinérgicos entre ellos lo que también ocurre cuando son incorporados en conjuntos con algunos fungicidas, dependiendo de la manera en que interactúan con los mecanismos de detoxificación de las abejas. Más aún, los

efectos con otros xenobióticos tal como pesticidas naturales, antibióticos y productos de la formulación de algunos pesticidas supuestamente “inertes” también han sido estudiados encontrándose diferentes efectos por si mismos o en combinación con pesticidas (Johnson *et al.*, 2013).

En nuestro estudio las mezclas que ocurrieron con más frecuencia fueron de clorpirifos con acrinatrina y acetamiprid con acrinatrina. En la primera mezcla clorpirifos inhibe la enzima AchE mientras que la acrinatrina inhibe el cierre de los canales de sodio. En la segunda mezcla el neonicotinoide acetamiprid de baja toxicidad simula la acción de la acetilcolina en las neuronas postsinápticas. De acuerdo a esto, en ambos casos los pesticidas actúan sobre blancos distintos por lo que, aunque no esta descrito, podría observarse un efecto sinérgico en la toxicidad de estos pesticidas usados en conjunto.

Más aún la presencia de algunos componentes llamados “inertes” de la formulación de los pesticidas ha mostrado tener una toxicidad mayor incluso que los mismos pesticidas. Habitualmente en la formulación de los pesticidas tan solo un 50% corresponde al compuesto activo, sin embargo, muy pocos estudios sobre la toxicidad de los pesticidas a las abejas han considerado los otros componentes de la formulación (Johnson *et al.*, 2013).

### **Relación con volumen de ventas y características fisicoquímicas**

Como se menciona anteriormente el pesticida más frecuentemente encontrado en las muestras fue clorpirifos. Este es uno de los plaguicidas más vendidos en las dos regiones consideradas en el estudio, con un total de 400 toneladas para el año 2012 (último registro disponible del SAG). Este pesticida es utilizado principalmente para la protección de cultivos cítricos y paltos ambos cultivos presentes en en las regiones estudiadas y que podrían ser visitados por las abejas. Además, la aplicación por aspersion puede generar la diseminación del compuesto hacia otras fuentes de néctar de las abejas, lo que explicaría igualmente su alta frecuencia de aparición en las muestras. Estos hechos y ser considerado como de alto riesgo por poseer alta toxicidad tanto aguda como crónica subletal para las abejas hacen de este compuesto un componente de riesgo para estos insectos. Por otra parte, uno de los principales metabolitos del clorpirifos, el clorpirifos

oxon, ha sido considerado como de alto riesgo por poseer una toxicidad aún mayor que su compuesto parental y estar involucrado en múltiples cambios en el comportamiento de las abejas a concentraciones subletales (Williamson *et al.*, 2013 b). Por lo que la metabolización de clorpirifos podría ser una de las principales vías de intoxicación para las abejas expuestas a este pesticida.

El periodo de vida de una abeja obrera durante primavera-verano varía entre las 4 a 5 semanas lo que reduce significativamente la exposición a pesticidas encontrados en el medio ambiente. Sin embargo, en invierno este se extiende hasta por seis meses debido a la hibernación, momento en el que aumenta la exposición a los pesticidas que se puedan encontrar dentro de la colmena, principalmente acumulados en el polen y la cera. Clorpirifos presenta una alta lipofiliidad por lo que es factible que se encuentre acumulado en estructuras como la cera de las colmenas. En este sentido cabe señalar que la cera de las colmenas ha mostrado contener una gran cantidad de pesticidas que pueden generar diferentes efectos no deseados en las abejas. Además de la lipofiliidad de los pesticidas que les permite acumularse en matrices lipídicas como la cera y la reutilización de esta por parte de los apicultores también propicia la acumulación de diferentes compuestos; lo que podría ser un factor contribuyente al deterioro de la salud apícola.

El segundo pesticida más frecuentemente encontrado es la acrinatrina, acaricida ampliamente utilizado para tratar las infecciones por varroa. Este pesticida se encuentra en altas concentraciones en la cera de las colmenas y tiene una toxicidad oral y de contacto considerable para las abejas. Hasta la fecha no se han encontrado estudios que determinen los efectos que pudiera tener la aplicación constante de bajas dosis de este pesticida sobre las colmenas. Sin embargo, ha sido encontrado tanto en la cera de las colmenas como en la miel por lo que podría pensarse que las abejas están expuestas de manera crónica a dosis considerables de este y otros pesticidas que podrían tener efecto sobre el comportamiento de estos insectos.

Entre los pesticidas analizados, los más frecuentemente encontrados (clorpirifos, acrinatrina y diazinon) también presentan una elevada lipofiliidad (**Tabla 2**). Por un lado, su capacidad de almacenarse en los tejidos grasos de la abeja podría ser una de las razones de por que es más frecuente encontrarlos en estos insectos o en la cera de las colmenas, haciendo no solo que las

abejas recolectoras estén en contacto, sino que la colmena en general. El prolongado tiempo de permanencia de clorpirifos en los cultivos, árboles y el medio ambiente (considerado como muy persistente en plantas y suelos); tal como se observa en la **Tabla 14**, hacen que las abejas tengan más posibilidades de encontrarlo en sus vuelos de recolección, aun varios días después de su aplicación. En relación las ventas, tanto clorpirifos como diazinon se encuentran entre los más vendidos para ambas regiones (**Tabla 14**). Metamidofos también presenta un gran volumen de venta para ambas regiones; sin embargo, fue detectado en un bajo número de muestras. La baja lipofilidad y rápida degradación de este compuesto podría evitar que las abejas tengan contacto con él y por lo tanto no ser detectado en las muestras. Lo mismo ocurre con el clorotalonil que tiene una rápida degradación en planta y una lipofilidad media. Por otro lado, se podría estar sobrestimando el uso de pesticidas a través de las ventas registradas en SAG; puesto que no explicaría directamente la aplicación de pesticidas en el periodo estudiado (**Tabla 14**).

**Tabla 14.** *Resumen de los volúmenes de venta de plaguidas y sus tiempos de degradación. Se detallan los tiempos de degradación en campo, en plantas y en agua en días y los volúmenes de venta antes presentados para ambas regiones estudiadas.*

<b>Compuesto</b>	<b>T hidrólisis</b>	<b>T deg campo</b>	<b>T deg planta</b>	<b>Ventas V</b>	<b>Ventas VI</b>
Clorpirifos	26	21	247	93.850	309.658
Diazinon	138	18,4	9,6	4.685	66.606
Clorotalonil	30	44	5,5	16.474	46.930
Metamidofos	5	4	2,8	34.760	36.509
Acetamiprid	500	3	6,3	2.917	8.626
Tiametoxam	500	39	3,2	3.080	3.472
Acrinatrina	500	22	2,6	901	1.688
Fipronil	500	65	3,3	5	1
Coumafos	-	24	122	-	-

La degradación de los pesticidas en el medio ambiente puede incluir igualmente su metabolización en las mismas abejas. Se conoce que la producción de ciertos metabolitos en las abejas también podría ser una vía importante de intoxicación de estos insectos con los pesticidas originales. Metabolitos provenientes de pesticidas como imidacloprid o clorpirifos podría ser potencialmente más tóxicos que el compuesto parental, volviendo de suma importancia su detección en las abejas además de la determinación de sus efectos (Iwasa *et al.*, 2004;

Williamson *et al.*, 2013 b). Más aún la rápida metabolización de estos compuestos en las mismas abejas podría estar impidiendo su determinación por el método planteado.

### ***Apis mellifera* como bioindicador de contaminación ambiental**

Debido a los hábitos de recolección de néctar por parte de las abejas (recorren alrededor de 5 kms en torno a la colmena), la detección de pesticidas en ellas permite evaluar la situación temporal inmediata sobre la presencia de estos compuestos en los sectores aledaños a los apiarios. Esto permite generar un sondeo de los principales plaguicidas aplicados en esa zona, los que eventualmente podrían considerarse un riesgo tanto para las mismas abejas como para otros polinizadores.

Más allá de la contaminación en el momento de la aplicación se ha observado que entre un 80-90% del compuesto activo de los pesticidas no es retenido en el cultivo al cual fue aplicado llegando fácilmente al suelo o aguas que puedan estar contiguas a la zona de aplicación (Sur & Stork, 2003; Morrissey *et al.*, 2015; Long & Krupke 2016). Además del medio que rodea a las abejas las mismas colmenas también llegan a ser una fuente importante de contaminación. Las abejas recolectoras vuelven a las colmenas contaminadas de pesticidas o con productos de recolección contaminados que se los pasan a las abejas obreras las cuales a su vez lo traspasan al interior de la colmena.

En Mullin *et al.*, 2010 se detectaron un promedio de 6.5 pesticidas por colmena en diferentes localidades de Canada siendo gran parte de ellos NO. Entre las muestras de cera y polen el 60% contenía al menos un pesticida sistémico y casi el 50% contenía acaricidas de uso interno como el cumafós, y el fungicida de amplio uso clorotalonil. En el polen recolectado por las abejas se encontró clorotalonil en concentraciones de hasta 99 µg/g y otros insecticidas como clorpirifos e imidacloprid junto con algunos fungicidas y herbicidas a niveles de 1 µg/g. La mayoría de las colmenas y muestras de cera estructurales (98%) estaban contaminadas con cumafós y clorotalonil, llegando a encontrar concentraciones máximas de 94 µg/g de cumafós. En promedio se encontraron 6 incidencias de pesticidas por muestra y un máximo de 39. En la abejas adultas y larvas se encontraron menores incidencias de pesticidas excepto de aquellos

relacionados con abejas muertas como el fipronil a concentraciones letales de 3,1 µg/g. Al contrario de lo que sucede con el polen y la cera la cantidad de residuos de pesticidas encontrados en abejas es generalmente menor. Incluso aquellos pesticidas encontrados en más altos niveles correspondían a niveles mucho menores que el LD50, y por lo tanto no explicaban directamente las altas tasas de mortalidad encontradas. Clortalonil fue encontrado en niveles 100 veces menor en abejas que en polen o cera lo que también habla de su rápida biotransformación y la importancia de la determinación de metabolitos. La biotransformación y rápida excreción también puede explicar la falta general de residuos de pesticidas sistémicos en abejas los que si se han encontrado de manera constante en polen y miel independiente de la temporada de muestreo (Lu *et al.*, 2015).

El polen constituye otra fuente de contaminación. Este al ser almacenado en las celdas se ve contaminado producto de la gran cantidad de pesticidas que se acumulan en la cera (Bogdanov *et al.*, 2004). La cera presenta, comúnmente, las concentraciones más altas de pesticidas. Por otro lado, el polen, principal fuente proteica en la alimentación de las abejas, también es una fuente importante de toxinas en la colmena (Chauzat, 2006; Long & Krupke, 2016). Estudios han mostrado que el polen presenta una gran cantidad de PIR, OPP y algunos fungicidas, como por ejemplo clortalonil que ha sido encontrado en concentraciones promedio de 4400 ng/g (Pettis *et al.*, 2013). Los contenidos del floema en la planta son traspasados al polen y al néctar pudiéndose encontrar pesticidas incluso días después de la aplicación y donde además pueden permanecer por meses para luego ser usados para alimentar tanto a larvas como a la reina (Barker *et al.*, 1980; Waller *et al.*, 1984; Byrne *et al.*, 2014). Así mismo, el agua como también abejas muertas por exposición a pesticidas pueden llegar a ser fuentes de contaminación por pesticidas constituyendo un riesgo para las otras abejas (Robinson *et al.*, 1984; Gunasekara, 2007). Sin embargo, la metabolización de pesticidas como los NO en las abejas es un proceso que solo toma algunas horas por lo que su detección incluso analizando abejas muertas por contaminación aguda de pesticidas puede ser nula (Chauzat *et al.*, 2009; Tapparo *et al.*, 2012).

Por lo que las abejas y mas aún sus subproductos pueden ser utilizados como indicadores de contaminación ambiental. Especialmente la cera que por sus características de polaridad presenta

mayor acumulación de pesticidas lipofílicos, lo que podría entregar información de la contaminación expuesta por largos periodos de tiempo del sector donde están ubicados.

## CONCLUSIONES

El uso de dispersión de matriz en fase sólida, utilizando la mezcla de sorbente/co-sorbente C18 y florisil, asociado a GC-FPD/ECD permitió la extracción y determinación simultánea de una variedad de plaguicidas halogenados, organofosforados y neonicotinoides desde una matriz de alta complejidad como las abejas melíferas. El uso del detector FPD, infrecuentemente usado para la determinación de pesticidas en abejas, mostró ser comparable con detectores de alta sensibilidad como el detector de ECD, por lo que se posiciona como una alternativa viable para la determinación de múltiples pesticidas organofosforados en abejas.

Por otro lado, la aplicación del método optimizado permitió la detección de nueve de los trece plaguicidas estudiados, en abejas recolectadas en la V y VI región de Chile. Si bien las concentraciones de los pesticidas determinadas en las abejas en este estudio podrían considerarse como de “bajo riesgo” para estos insectos, debido a que ninguna sobrepasa la  $LD_{50}$ , se debe tener en cuenta que los efectos agudos no son el real problema al que nos estamos enfrentando. La  $LD_{50}$  como medida de riesgo de un pesticida para las abejas es una determinación imprecisa del riesgo real que estos presentan. La exposición crónica a dosis subletales generadas por la acumulación de estos pesticidas en el ambiente ha mostrado ser la causa del real daño que se está causando. Consecuentemente las actividades de reutilización de cera que causan la acumulación de pesticidas en las colmenas sostienen la exposición en el tiempo, con los mencionados efectos negativos que esto acarrea.

Considerando los diferentes factores y las múltiples relaciones entre estos que pueden afectar a las colmenas, como por ejemplo el uso inadecuado de pesticidas, se hace imperioso replantearse las prácticas tanto en la agricultura como en la apicultura; de modo que se cautele por la salud de un organismo tan relevante para el medio ambiente. Más aún es preciso extender la atención a aquellos polinizadores silvestres que no están bajo el alero protector de la humanidad y que se están viendo afectados por estos mismos fenómenos. La disminución o pérdida de estos organismos podría conllevar a peligrosas desestabilizaciones del ecosistema aún más relevantes que las pérdidas de abejas domésticas. Es necesario tomar en consideración su protección a la hora de usar productos de protección en la agricultura y otros rubros.

## REFERENCIAS

- Abbott, V. A., Nadeau, J. L., Higo, H. A., & Winston, M. L. (2008). Lethal and sublethal effects of imidacloprid on *Osmia lignaria* and clothianidin on *Megachile rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae). *Journal of Economic Entomology*, 101(3), 784-796.
- Agdev.anr.udel.edu. (2000). Mid Atlantic Apicultural Research & Extension Consortium. [online] Available at: [https://agdev.anr.udel.edu/maarec/wp-content/uploads/2010/03/Pollination\\_PM.pdf](https://agdev.anr.udel.edu/maarec/wp-content/uploads/2010/03/Pollination_PM.pdf) [Accessed 27 Nov. 2017].
- Agrochemicals.iupac.org. (2013). | IUPAC. [online] Available at: [http://agrochemicals.iupac.org/index.php?option=com\\_sobi2&sobi2Task=sobi2Details&catid=3&sobi2Id=31](http://agrochemicals.iupac.org/index.php?option=com_sobi2&sobi2Task=sobi2Details&catid=3&sobi2Id=31). [Accessed 24 Nov. 2017].
- Al Naggar, Y., Codling, G., Vogt, A., Naiem, E., Mona, M., Seif, A., & Giesy, J. P. (2015). Organophosphorus insecticides in honey, pollen and bees (*Apis mellifera* L.) and their potential hazard to bee colonies in Egypt. *Ecotoxicology and environmental safety*, 114, 1-8.
- Alaux, C., Brunet, J. L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S., Cousin, M., ... & Le Conte, Y. (2010). Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental microbiology*, 12(3), 774-782.
- Aliouane, Y., El Hassani, A. K., Gary, V., Armengaud, C., Lambin, M., & Gauthier, M. (2009). Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(1), 113-122.
- Amulen, D. R., Spanoghe, P., Houbraken, M., Tamale, A., de Graaf, D. C., Cross, P., & Smagghe, G. (2017). Environmental contaminants of honeybee products in Uganda detected using LC-MS/MS and GC-ECD. *PloS one*, 12(6), e0178546.
- Aslan, C. E., Zavaleta, E. S., Tershy, B., & Croll, D. (2013). Mutualism disruption threatens global plant biodiversity: a systematic review. *PLoS One*, 8(6), e66993.
- Aston, D. (2010). Honey bee winter loss survey for England, 2007–8. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 111-112.
- Aufauvre, J., Biron, D. G., Vidau, C., Fontbonne, R., Roudel, M., Diogon, M., Viguès, B., Belzunces, L. P., Delbac, F. & Blot, N. (2012). Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Scientific reports*, 2.
- Barker RJ, Lehner Y, Kunzmann MR (1980) Pesticides and honey bees: nectar and pollen contamination in alfalfa treated with dimethoate. *Arch Environ Contam Toxicol* 9:125–133.
- Barker, S. A. (2000) a. Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 880(1), 63-68.
- Barker, S. A. (2000) b. Matrix solid-phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, 885(1), 115-127.
- Barker, S. A. (2007). Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of biochemical and biophysical methods*, 70(2), 151-162.

- Barker, S. A., Long, A. R., & Hines, M. E. (1993). Disruption and fractionation of biological materials by matrix solid-phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, 629(1), 23-34.
- Barker, S. A., Long, A. R., & Short, C. R. (1989). Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, 475(2), 353-361.
- Beekman, M., & Ratnieks, F. L. W. (2000). Long-range foraging by the honey-bee, *Apis mellifera* L. *Functional Ecology*, 14(4), 490-496.
- Bernadou, A., Démares, F., Couret-Fauvel, T., Sandoz, J. C., & Gauthier, M. (2009). Effect of fipronil on side-specific antennal tactile learning in the honeybee. *Journal of insect physiology*, 55(12), 1099-1106.
- Berthoud, H., Imdorf, A., Haueter, M., Radloff, S., & Neumann, P. (2010). Virus infections and winter losses of honey bee colonies (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 60-65.
- Bloomquist, J. R. (2009). Insecticides: chemistries and characteristics. *Radcliffe's IPM World Textbook*. University of Minnesota, St. Paul, Minnesota.
- Bogdanov, S. (2004). Quality and standards of pollen and beeswax. *Apiacta*, 38(2004), 334-341.
- Bonmatin, J. M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D.P., Krupke C., Liess, M., Long E., Marzaro, M., Mitchell, E. A. D., Noome, D. A., Simon-Delso N., Tapparo, A. (2015). Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 35-67.
- Bortolotti, L., Montanari, R., Marcelino, J., Medrzycki, P., Maini, S., & Porrini, C. (2003). Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. *Bulletin of Insectology*, 56(1), 63-67.
- Brodtschneider, R., Moosbeckhofer, R., & Crailsheim, K. (2010). Surveys as a tool to record winter losses of honey bee colonies: a two-year case study in Austria and South Tyrol. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 23-30.
- Byrne FJ, Visscher PK, Leimkuehler B, Fischer D, Grafton-Cardwell EE, Morse JG (2014) Determination of exposure levels of honey bees foraging on flowers of mature citrus trees previously treated with imidacloprid. *Pest Manag Sci* 70:470–482.
- Charlton, A. J., & Jones, A. (2007). Determination of imidazole and triazole fungicide residues in honeybees using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1141(1), 117-122.
- Chauzat M-P, Carpentier P, Martel A-C, Bougeard S, Cougoule N, Porta P, Lachaize J, Madec F, Aubert M, Faucon J-P (2009) Influence of pesticide residues on honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony health in France. *Environment Entomology* 38 :514–523.
- Chauzat, M. P., Faucon, J. P., Martel, A. C., Lachaize, J., Cougoule, N., & Aubert, M. (2006). A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *Journal of Economic Entomology*, 99(2), 253-262.
- Chauzat, M. P., Martel, A. C., Cougoule, N., Porta, P., Lachaize, J., Zeggane, S., ... & Faucon, J. P. (2011). An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(1), 103-111.

- Colin, M. E., Bonmatin, J. M., Moineau, I., Gaimon, C., Brun, S., & Vermandere, J. P. (2004). A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 47(3), 387-395.
- Cornman, R. S., Tarpy, D. R., Chen, Y., Jeffreys, L., Lopez, D., Pettis, J. S., & Evans, J. D. (2012). Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. *PLoS one*, 7(8), e43562.
- Cutler, G. C., & Scott-Dupree, C. D. (2007). Exposure to clothianidin seed-treated canola has no long-term impact on honey bees. *Journal of economic entomology*, 100(3), 765-772.
- Cutler, G. C., Purdy, J., Giesy, J. P., & Solomon, K. R. (2014). Risk to pollinators from the use of chlorpyrifos in the United States. In *Ecological Risk Assessment for Chlorpyrifos in Terrestrial and Aquatic Systems in the United States* (pp. 219-265). Springer International Publishing.
- Dainat, B., & Neumann, P. (2013). Clinical signs of deformed wing virus infection are predictive markers for honey bee colony losses. *Journal of invertebrate pathology*, 112(3), 278-280.
- Darko, G., Addai Tabi, J., Adjalo, M. K., & Borquaye, L. S. (2017). Pesticide Residues in Honey from the Major Honey Producing Forest Belts in Ghana. *Journal of environmental and public health*.
- Decourtye, A., & Devillers, J. (2010). Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. In *Insect nicotinic acetylcholine receptors* (pp. 85-95). Springer New York.
- Decourtye, A., Devillers, J., Genecque, E., Le Menach, K., Budzinski, H., Cluzeau, S., & Pham-Delegue, M. H. (2005). Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 48(2), 242-250.
- Decourtye, A., Lacassie, E., & Pham-Delègue, M. H. (2003). Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L) are differentially affected by imidacloprid according to the season. *Pest management science*, 59(3), 269-278.
- DeGrandi-Hoffman, G., Eckholm, B. J., & Huang, M. H. (2013). A comparison of bee bread made by Africanized and European honey bees (*Apis mellifera*) and its effects on hemolymph protein titers. *Apidologie*, 44(1), 52-63.
- Dekeyser, M. A. (2005). Acaricide mode of action. *Pest management science*, 61(2), 103-110.
- Démares, F. J., Crous, K. L., Pirk, C. W., Nicolson, S. W., & Human, H. (2016). Sucrose sensitivity of honey bees is differently affected by dietary protein and a neonicotinoid pesticide. *PloS one*, 11(6), e0156584.
- Di Prisco, G., Cavaliere, V., Annoscia, D., Varricchio, P., Caprio, E., Nazzi, F., ... & Pennacchio, F. (2013). Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(46), 18466-18471.
- Dornhaus, A., & Chittka, L. (2004). Why do honey bees dance? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 55(4), 395-401.
- Doublet, V., Labarussias, M., Miranda, J. R., Moritz, R. F., & Paxton, R. J. (2015). Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environmental Microbiology*, 17(4), 969-983.

- El Hassani, A. K., Dacher, M., Gary, V., Lambin, M., Gauthier, M., & Armengaud, C. (2008). Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Archives of environmental contamination and toxicology*, 54(4), 653-661.
- El Hassani, A. K., Dacher, M., Gauthier, M., & Armengaud, C. (2005). Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 82(1), 30-39.
- El Hassani, A. K., Dupuis, J. P., Gauthier, M., & Armengaud, C. (2009). Glutamatergic and GABAergic effects of fipronil on olfactory learning and memory in the honeybee. *Invertebrate Neuroscience*, 9(2), 91.
- Ellis, J. D., Evans, J. D., & Pettis, J. (2010). Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 134-136.
- Estay, P. (2013). Servicios de Polinización con Abejas (*Apis mellifera*) en Frutales: Parámetros Técnicos y de Calidad. *Tierra Adentro* 102, 11-14.
- Farooqui, T. (2013). A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: A unique hypothesis. *Neurochemistry international*, 62(1), 122-136.
- Faucon, J. P., Aurières, C., Drajnudel, P., Mathieu, L., Ribiere, M., Martel, A. C., ... & Aubert, M. F. (2005). Experimental study on the toxicity of imidacloprid given in syrup to honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Pest management science*, 61(2), 111-125.
- Fernandez, M., Padron, C., Marconi, L., Ghini, S., Colombo, R., Sabatini, A. G., & Girotti, S. (2001) b. Determination of organophosphorus pesticides in honeybees after solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 922(1), 257-265.
- Fernández, M., Picó, Y., & Manes, J. (2002). Rapid screening of organophosphorus pesticides in honey and bees by liquid chromatography—Mass spectrometry. *Chromatographia*, 56(9), 577-583.
- Fernandez, M., Pico, Y., Girotti, S., & Manes, J. (2001) a. Analysis of organophosphorus pesticides in honeybee by liquid chromatography— atmospheric pressure chemical ionization— mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(8), 3540-3547.
- Fletcher, M. A. R. K., & Barnett, L. (2003). Bee pesticide poisoning incidents in the United Kingdom. *Bulletin of insectology*, 56(1), 141-145.
- Gallai, N., Salles, J. M., Settele, J., & Vaissière, B. E. (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological economics*, 68(3), 810-821.
- García, M. A., Fernández, M. I., & Melgar, M. J. (1995). Contamination of honey with organophosphorus pesticides. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 54(6), 825-832.
- García, M. A., Fernández, M. I., Herrero, C., & Melgar, M. J. (1996). Acaricide residue determination in honey. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 56(6), 881-887.
- García, M. G., Duque, S. U., Fernández, A. L., Sosa, A., & Fernández-Alba, A. R. (2017). Multiresidue method for trace pesticide analysis in honeybee wax comb by GC-QqQ-MS. *Talanta*, 163, 54-64.
- Garibaldi, L. A., Steffan-Dewenter, I., Winfree, R., Aizen, M. A., Bommarco, R., Cunningham, S. A., ... & Bartomeus, I. (2013). Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *science*, 339(6127), 1608-1611.

- Geib, J. C., & Galen, C. (2012). Tracing impacts of partner abundance in facultative pollination mutualisms: from individuals to populations. *Ecology*, 93(7), 1581-1592.
- Ghini, S., Fernandez, M., Pico, Y., Marin, R., Fini, F., Manes, J., & Girotti, S. (2004). Occurrence and distribution of pesticides in the province of Bologna, Italy, using honeybees as bioindicators. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 47(4), 479-488.
- Gill, R. J., Ramos-Rodriguez, O., & Raine, N. E. (2012). Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature*, 491(7422), 105-108.
- Gillespie, A. M., & Walters, S. M. (1991). Rapid clean-up of fat extracts for organophosphorus pesticide residue determination using C18 solid-phase extraction cartridges. *Analytica chimica acta*, 245, 259-265.
- Gregorc, A., & Ellis, J. D. (2011). Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99(2), 200-207.
- Guez, D., Suchail, S., Gauthier, M., Maleszka, R., & Belzunces, L. P. (2001). Contrasting effects of imidacloprid on habituation in 7- and 8-day-old honeybees (*Apis mellifera*). *Neurobiology of learning and memory*, 76(2), 183-191.
- Gunasekara, A. S., Truong, T., Goh, K. S., Spurlock, F., & Tjeerdema, R. S. (2007). Environmental fate and toxicology of fipronil. *Journal of Pesticide Science*, 32(3), 189-199.
- Hassall, K. A. (1990). *Biochemistry and uses of pesticides*. Macmillan Press Ltd.
- Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J. F., Aupinel, P., ... & Decourtye, A. (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, 336(6079), 348-350.
- Iwasa, T., Motoyama, N., Ambrose, J. T., & Roe, R. M. (2004). Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection*, 23(5), 371-378.
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., & Elbert, A. (2010). Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(7), 2897-2908.
- Johnson, R. M., Dahlgren, L., Siegfried, B. D., & Ellis, M. D. (2013). Acaricide, fungicide and drug interactions in honey bees (*Apis mellifera*). *PloS one*, 8(1), e54092.
- Kamel, A. (2010). Refined methodology for the determination of neonicotinoid pesticides and their metabolites in honey bees and bee products by liquid chromatography– tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 5926-5931.
- Kamler, F., Titera, D., Piskulova, J., Hajslova, J., & Mastovska, K. (2003). Intoxication of honeybees on chemical treated winter rape: problem of its verification. *Bulletin of Insectology*, 56, 125-130.
- Kiers, T. E., Palmer, T. M., Ives, A. R., Bruno, J. F., & Bronstein, J. L. (2010). Mutualisms in a changing world: an evolutionary perspective. *Ecology letters*, 13(12), 1459-1474.
- Kiljanek, T., Niewiadowska, A., Gawel, M., Semeniuk, S., Borzęcka, M., Posyniak, A., & Pohorecka, K. (2017). Multiple pesticide residues in live and poisoned honeybees—Preliminary exposure assessment. *Chemosphere*, 175, 36-44.

- Klein, A. M., Steffan–Dewenter, I., & Tscharntke, T. (2003). Fruit set of highland coffee increases with the diversity of pollinating bees. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1518), 955-961.
- Klein, A. M., Vaissiere, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., & Tscharntke, T. (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 274(1608), 303-313.
- Ko, A. Y., Rahman, M. M., El-Aty, A. A., Jang, J., Park, J. H., Cho, S. K., & Shim, J. H. (2014). Development of a simple extraction and oxidation procedure for the residue analysis of imidacloprid and its metabolites in lettuce using gas chromatography. *Food chemistry*, 148, 402-409.
- Kremen, C., Williams, N. M., Aizen, M. A., Gemmill-Herren, B., LeBuhn, G., Minckley, R., ... & Winfree, R. (2007). Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of land-use change. *Ecology letters*, 10(4), 299-314.
- Lambin, M., Armengaud, C., Raymond, S., & Gauthier, M. (2001). Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 48(3), 129-134.
- Le Conte, Y., Ellis, M., & Ritter, W. (2010). Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses? *Apidologie*, 41(3), 353-363.
- Lee, K. V., Steinhauer, N., Rennich, K., Wilson, M. E., Tarpy, D. R., Caron, D. M., ... & Pettis, J. (2015). A national survey of managed honey bee 2013–2014 annual colony losses in the USA. *Apidologie*, 46(3), 292-305.
- Lehotay, S. J., Kok, A. D., Hiemstra, M., & Bodegraven, P. V. (2005) b. Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. *Journal of AOAC International*, 88(2), 595-614.
- Lehotay, S. J., Maštovská, K., & Yun, S. J. (2005) a. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. *Journal of AOAC International*, 88(2), 630-638.
- Lesser, R. (1998). *Manual de apicultura moderna*. Santiago Chile, Universitaria. 213 p.
- Li, L., Jiang, G., Liu, C., Liang, H., Sun, D., & Li, W. (2012). Clothianidin dissipation in tomato and soil, and distribution in tomato peel and flesh. *Food Control*, 25(1), 265-269.
- Li, Z., Li, M., Huang, J., Ma, C., Xiao, L., Huang, Q., ... & Su, S. (2017). Effects of Sublethal Concentrations of Chlorpyrifos on Olfactory Learning and Memory Performances in Two Bee Species, *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *Sociobiology*, 64(2), 174-181.
- Long EY, Krupke CH (2016) Non-cultivated plants present a season-long route of pesticide exposure for honey bees. *Nature Commun* 7:11629.
- Łozowicka, B. (2013). The development, validation and application of a GC-dual detector (NPD-ECD) multi-pesticide residue method for monitoring bee poisoning incidents. *Ecotoxicology and environmental safety*, 97, 210-222.

- Lu, C. A., Chang, C. H., Tao, L., & Chen, M. (2015). Distributions of neonicotinoid insecticides in the Commonwealth of Massachusetts: a temporal and spatial variation analysis for pollen and honey samples. *Environmental Chemistry*, 13(1), 4-11.
- Lu, C., Warchol, K. M., & Callahan, R. A. (2014). Sub-lethal exposure to neonicotinoids impaired honey bees winterization before proceeding to colony collapse disorder. *Bulletin of Insectology*, 67(1), 125-130.
- Lundgren, R., Lázaro, A., & Totland, Ø. (2015). Effects of experimentally simulated pollinator decline on recruitment in two European herbs. *Journal of Ecology*, 103(2), 328-337.
- Lundgren, R., Totland, Ø., & Lázaro, A. (2016). Experimental simulation of pollinator decline causes community-wide reductions in seedling diversity and abundance. *Ecology*, 97(6), 1420-1430.
- Martínez, J., Leal, G., & Conget, P. (2012). *Nosema ceranae* an emergent pathogen of *Apis mellifera* in Chile. *Parasitology research*, 111(2), 601-607.
- Medrzycki, P., Montanari, R., Bortolotti, L., Sabatini, A. G., Maini, S., & Porrini, C. (2003). Effects of imidacloprid administered in sub-lethal doses on honey bee behaviour. Laboratory tests. *Bulletin of Insectology*, 56(1), 59-62.
- Meixner, M. D. (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of invertebrate pathology*, 103, S80-S95.
- Menkissoglu-Spiroudi, U., Diamantidis, G. C., Georgiou, V. E., & Thrasyvoulou, A. T. (2000). Determination of malathion, coumaphos, and fluvalinate residues in honey by gas chromatography with nitrogen-phosphorus or electron capture detectors. *Journal of AOAC International*, 83(1), 178-182.
- Morrissey CA, Mineau P, Devries JH, Sanchez-Bayo F, Liess M, Cavallaro MC, Liber K (2015) Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: a review. *Environ Int* 74:291–303
- Morzycka, B. (2002). Simple method for the determination of trace levels of pesticides in honeybees using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 982(2), 267-273.
- Mullin, C. A., Frazier, M., Frazier, J. L., Ashcraft, S., Simonds, R., & Pettis, J. S. (2010). High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS one*, 5(3), e9754.
- Mutinelli, F., Costa, C., Lodesani, M., Baggio, A., Medrzycki, P., Formato, G., & Porrini, C. (2010). Honey bee colony losses in Italy. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 119-120.
- Namdar-Irani, M. (2006). Diagnóstico y Agenda Estratégica de la Cadena Apícola en Chile. *Qualitas Agroconsultores*. Agosto 2006.
- Narahashi, T., Zhao, X., Ikeda, T., Nagata, K., & Yeh, J. Z. (2007). Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. *Human & experimental toxicology*, 26(4), 361-366.
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., & Schmuck, R. (2001). Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Pest management science*, 57(7), 577-586.

- Navalon, A., Gonzalez-Casado, A., El-Khattabi, R., Vilchez, J. L., & Fernández-Alba, A. R. (1997). Determination of imidacloprid in vegetable samples by gas chromatography–mass spectrometry. *Analyst*, 122(6), 579-581.
- Neumann, P., & Carreck, N. L. (2010). Honey bee colony losses.
- Nguyen, B. K., Saegerman, C., Pirard, C., Mignon, J., Widart, J., Thirionet, B., ... & Haubruge, E. (2009). Does imidacloprid seed-treated maize have an impact on honey bee mortality?. *Journal of Economic Entomology*, 102(2), 616-623.
- ODEPA. (2017). Catastros de superficie frutícola regional - ODEPA. [online] Available at: <http://www.odepa.cl/catastros-de-superficie-fruticola-regional/> [Accessed 27 Nov. 2017].
- Ollerton, J., Winfree, R., & Tarrant, S. (2011). How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos*, 120(3321-326)
- Orso, D., Floriano, L., Ribeiro, L. C., Bandeira, N. M., Prestes, O. D., & Zanella, R. (2016). Simultaneous determination of multiclass pesticides and antibiotics in honey samples based on ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Analytical Methods*, 9(6), 1638-1653.
- Pettis, J. S., Johnson, J., & Dively, G. (2012). Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften*, 99(2), 153-158.
- Pettis, J. S., Lichtenberg, E. M., Andree, M., Stitzinger, J., & Rose, R. (2013). Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. *PloS one*, 8(7), e70182.
- Pilling, E. D., & Jepson, P. C. (1993). Synergism between EBI fungicides and a pyrethroid insecticide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Pest Management Science*, 39(4), 293-297.
- Pimentel, D. (1995). Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and environmental Ethics*, 8(1), 17-29.
- Pirk, C. W., Human, H., Crewe, R. M., & vanEngelsdorp, D. (2014). A survey of managed honey bee colony losses in the Republic of South Africa–2009 to 2011. *Journal of Apicultural Research*, 53(1), 35-42.
- Pisa, L. W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Downs, C. A., Goulson, D., ... & Morrissey, C. A. (2015). Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 68-102.
- Potts, S. G., Roberts, S. P., Dean, R., Marris, G., Brown, M. A., Jones, R., ... & Settele, J. (2010). Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 15-22.
- Ramirez-Romero, R., Chaufaux, J., & Pham-Delègue, M. H. (2005). Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. *Apidologie*, 36(4), 601-611.
- Rathi, A., Kumari, B., Gahlawat, S. K., Sihag, R. C., & Kathpal, T. S. (1997). Multiresidue analysis of market honey samples for pesticidal contamination. *Pesticide Research Journal*, 9(2), 226-230.

- Roat, T. C., Carvalho, S. M., Nocelli, R. C., Silva-Zacarin, E. C., Palma, M. S., & Malaspina, O. (2013). Effects of sublethal dose of fipronil on neuron metabolic activity of Africanized honeybees. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 64(3), 456-466.
- Robinson GE, Underwood BA, Henderson CE (1984) A highly specialized water-collecting honey bee. *Apidologie* 15:355–358
- Rossi, S., Dalperio, A. P., Ghini, S., Colombo, R., Sabatini, A. G., & Girotti, S. (2001). Multiresidual method for the gas chromatographic analysis of pesticides in honeybees cleaned by gel permeation chromatography. *Journal of Chromatography A*, 905(1), 223-232.
- Sag.gob.cl. (2012). Declaraciones | SAG. [online] Available at: [http://www.sag.gob.cl/ambitos-de-accion/declaraciones/1380/publicaciones?field\\_tema\\_otros\\_documentos\\_tid=All&field\\_tipo\\_de\\_publicacion\\_tid=All&field\\_fecha\\_otros\\_value\[value\]=&title=&items\\_per\\_page=15&order=field\\_fecha\\_otros&sort=desc](http://www.sag.gob.cl/ambitos-de-accion/declaraciones/1380/publicaciones?field_tema_otros_documentos_tid=All&field_tipo_de_publicacion_tid=All&field_fecha_otros_value[value]=&title=&items_per_page=15&order=field_fecha_otros&sort=desc) [Accessed 27 Nov. 2017].
- Sanchez-Bayo, F., & Goka, K. (2014). Pesticide residues and bees—a risk assessment. *PloS one*, 9(4), e94482
- SANCO/12571/2013, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed (SANTE/11945/2015). European Commission Directorate-General for Health and Food Safety (Implemented by 01/01/2016).
- Sanford, M. T. (1983). Protecting honey bees from pesticides. Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Schäfer, S., & Bicker, G. (1986). Distribution of GABA-like immunoreactivity in the brain of the honeybee. *Journal of Comparative Neurology*, 246(3), 287-300.
- Schmuck, R., Schöning, R., Stork, A., & Schramel, O. (2001). Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pest management science*, 57(3), 225-238.
- Schmuck, R., Stadler, T., & Schmidt, H. W. (2003). Field relevance of a synergistic effect observed in the laboratory between an EBI fungicide and a chloronicotinyl insecticide in the honeybee (*Apis mellifera* L, Hymenoptera). *Pest management science*, 59(3), 279-286.
- Schwartz, B. J., Sparrow, F. K., Heard, N. E., & Thede, B. M. (2000). Simultaneous derivatization and trapping of volatile products from aqueous photolysis of thiamethoxam insecticide. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(10), 4671-4675.
- Soroker, V., Hetzroni, A., Yakobson, B., David, D., David, A., Voet, H., ... & Klinberg, E. (2010). Evaluation of colony losses in Israel in relation to the incidence of pathogens and pests. *Apidologie*.
- Spleen, A. M., Lengerich, E. J., Rennich, K., Caron, D., Rose, R., Pettis, J. S., ... & Lee, K. (2013). A national survey of managed honey bee 2011–12 winter colony losses in the United States: results from the Bee Informed Partnership. *Journal of Apicultural Research*, 52(2), 44-53.
- Staveley, J. P., Law, S. A., Fairbrother, A., & Menzie, C. A. (2014). A causal analysis of observed declines in managed honey bees (*Apis mellifera*). *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 20(2), 566-591.

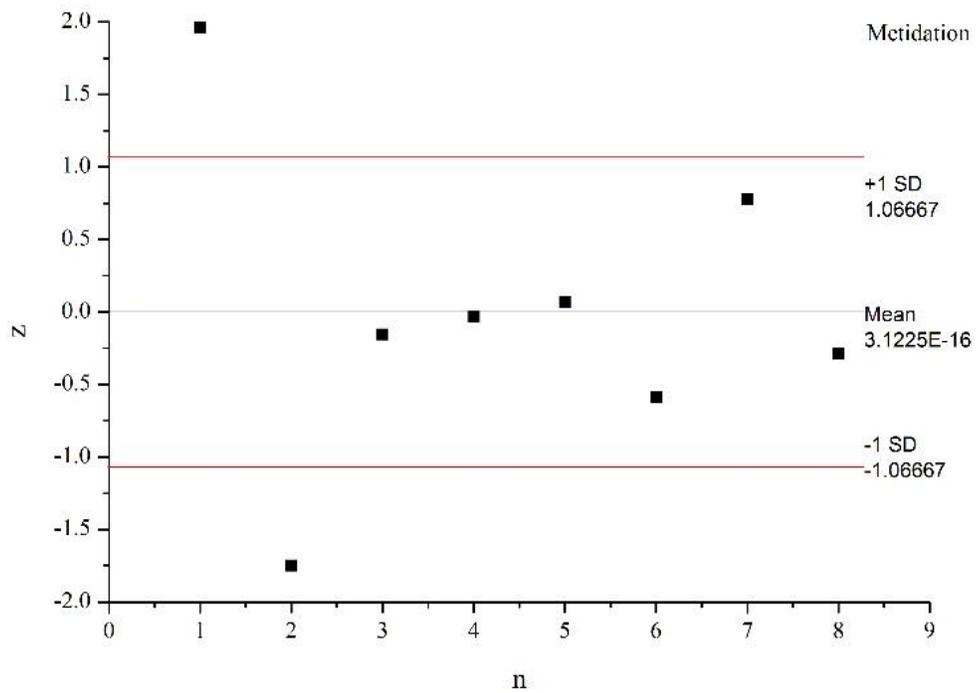
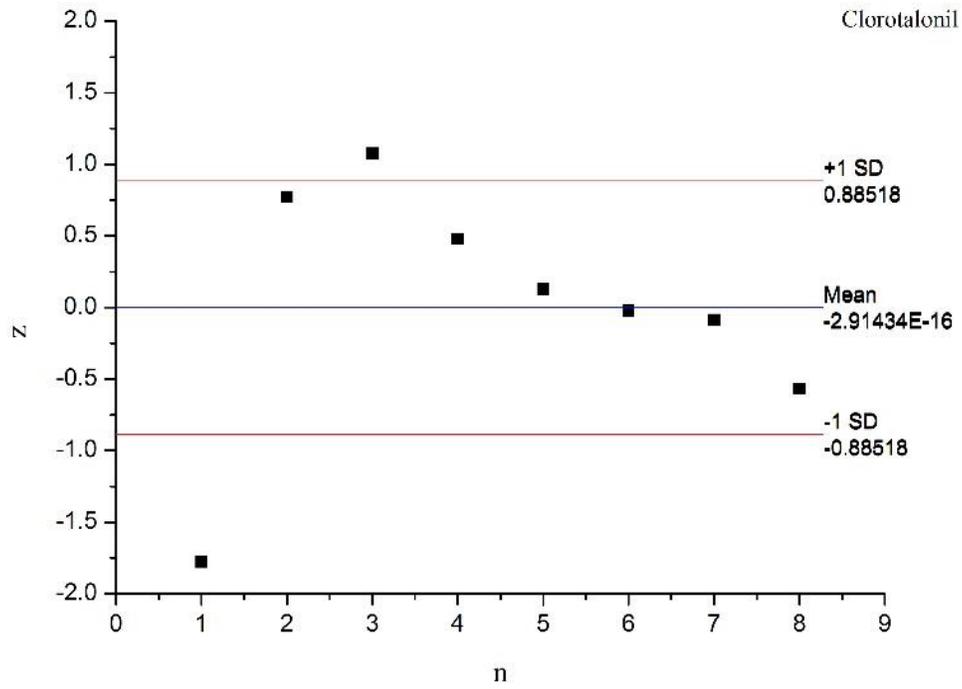
- Steinhauer, N. A., Rennich, K., Wilson, M. E., Caron, D. M., Lengerich, E. J., Pettis, J. S., ... & Vanengelsdorp, D. (2014). A national survey of managed honey bee 2012–2013 annual colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership. *Journal of Apicultural Research*, 53(1), 1-18.
- Stokstad, E. (2012). Field research on bees raises concern about low-dose pesticides. *Science*, 335(6076), 1555-1555.
- Sur, R., & Stork, A. (2003). Uptake, translocation and metabolism of imidacloprid in plants. *Bulletin of Insectology*, 56, 35-40.
- Tapparo A, Marton D, Giorio C, Zanella A, Soldá L, Marzaro M, Vivan L, Girolami V (2012) Assessment of the environmental exposure of honeybees to particulate matter containing neonicotinoid insecticides coming from corn coated seeds. *Environ Sci Technol* 46:2592–2599.
- Tapparo, A., Giorio, C., Soldà, L., Bogialli, S., Marton, D., Marzaro, M., & Girolami, V. (2013). UHPLC-DAD method for the determination of neonicotinoid insecticides in single bees and its relevance in honeybee colony loss investigations. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(2-3), 1007-1014.
- Tasei, J. N. (2001). Effects of insect growth regulators on honey bees and non-Apis bees. A review. *Apidologie*, 32(6), 527-545.
- Tasei, J. N., Lerin, J., & Ripault, G. (2000). Sub-lethal effects of imidacloprid on bumblebees, *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae), during a laboratory feeding test. *Pest management science*, 56(9), 784-788.
- Tong, Z., Wu, Y. C., Liu, Q. Q., Shi, Y. H., Zhou, L. J., Liu, Z. Y., ... & Cao, H. Q. (2016). Multi-Residue Analysis of Pesticide Residues in Crude Pollens by UPLC-MS/MS. *Molecules*, 21(12), 1652.
- Totti, S., Fernández, M., Ghini, S., Picó, Y., Fini, F., Mañes, J., & Girotti, S. (2006). Application of matrix solid phase dispersion to the determination of imidacloprid, carbaryl, aldicarb, and their main metabolites in honeybees by liquid chromatography–mass spectrometry detection. *Talanta*, 69(3), 724-729.
- Unsworth, J. (2017). HISTORY OF PESTICIDE USE. [online] [Agrochemicals.iupac.org](http://agrochemicals.iupac.org). Available at: [http://agrochemicals.iupac.org/index.php?option=com\\_sobi2&sobi2Task=sobi2Details&catid=3&sobi2Id=31](http://agrochemicals.iupac.org/index.php?option=com_sobi2&sobi2Task=sobi2Details&catid=3&sobi2Id=31). [Accessed 24 Nov. 2017].
- Van der Zee, R., Pisa, L., Andonov, S., Brodschneider, R., Charrière, J. D., Chlebo, R., ... & Gray, A. (2012). Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the winters of 2008–9 and 2009–10. *Journal of Apicultural Research*, 51(1), 100-114.
- Vandame, R., & Palacio, M. A. (2010). Preserved honey bee health in Latin America: a fragile equilibrium due to low-intensity agriculture and beekeeping? *Apidologie*, 41(3), 243-255.
- vanEngelsdorp, D., Caron, D., Hayes, J., Underwood, R., Henson, M., Rennich, K., ... & Roccasecca, K. (2012). A national survey of managed honey bee 2010–11 winter colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership. *Journal of Apicultural Research*, 51(1), 115-124.
- vanEngelsdorp, D., Hayes Jr, J., Underwood, R. M., & Pettis, J. S. (2010). A survey of honey bee colony losses in the United States, fall 2008 to spring 2009. *Journal of apicultural research*, 49(1), 7-14.
- vanEngelsdorp, D., Hayes Jr, J., Underwood, R. M., Caron, D., & Pettis, J. (2011). A survey of managed honey bee colony losses in the USA, fall 2009 to winter 2010. *Journal of Apicultural Research*, 50(1), 1-10.

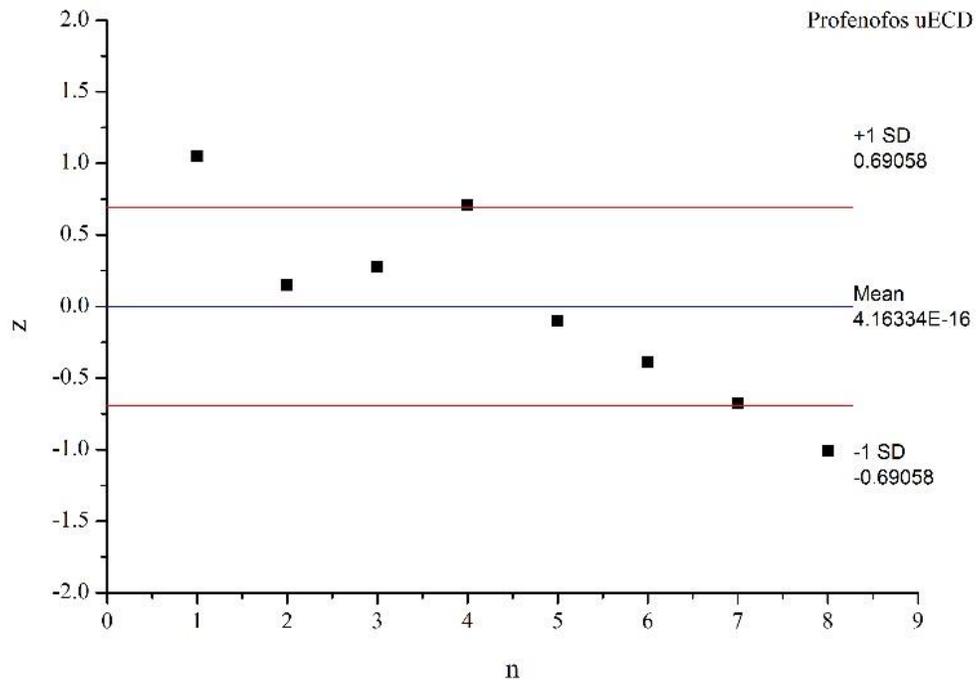
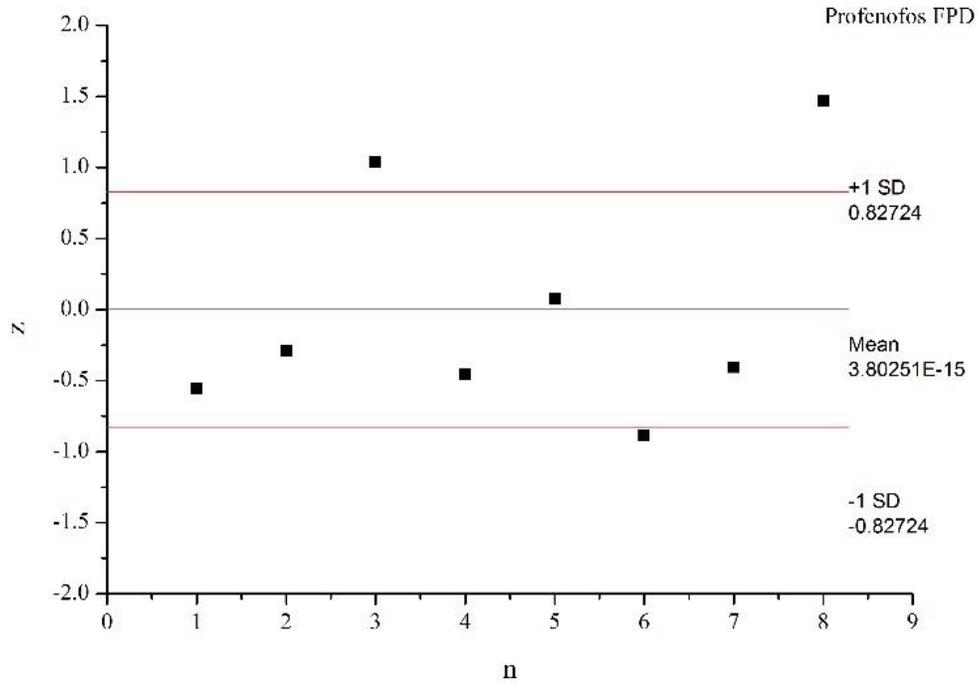
- vanEngelsdorp, D., Underwood, R., Caron, D., & Hayes Jr, J. (2007). Estimate of managed colony losses in the winter of 2006-2007: A report commissioned by the Apiary Inspectors of America. *American Bee Journal*.
- Vejsnæs, F., Nielsen, S. L., & Kryger, P. (2010). Factors involved in the recent increase in colony losses in Denmark. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 109-110.
- Vincent, P. G., & Sisler, H. D. (1968). Mechanism of Antifungal Action of 2, 4, 5, 6-Tetrachloroisophthalonitrile. *Physiologia Plantarum*, 21(6), 1249-1264.
- Waller GD, Erickson BJ, Harvey J, Martin JH (1984) Effects of dimethoate on honey bees (Hymenoptera: Apidae) when applied to flowering lemons. *J Econ Entomol* 77:70–74.
- Walorczyk, S., & Gnusowski, B. (2009). Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in honeybees using acetonitrile-based extraction and gas chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography a*, 1216(37), 6522-6531.
- Wiest, L., Buleté, A., Giroud, B., Fratta, C., Amic, S., Lambert, O., ... & Arnaudguilhem, C. (2011). Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1218(34), 5743-5756.
- Williams, G. R., Tarpy, D. R., Vanengelsdorp, D., Chauzat, M. P., Cox-Foster, D. L., Delaplane, K. S., ... & Shutler, D. (2010). Colony collapse disorder in context. *Bioessays*, 32(10), 845-846.
- Williams, I. H. (1994). The dependence of crop production within the European Union on pollination by honey bees. *Agricultural Zoology Reviews (United Kingdom)*.
- Williamson, S. M., Baker, D. D., & Wright, G. A. (2013) a. Acute exposure to a sublethal dose of imidacloprid and coumaphos enhances olfactory learning and memory in the honeybee *Apis mellifera*. *Invertebrate Neuroscience*, 13(1), 63-70.
- Williamson, S. M., Moffat, C., Gomersall, M. A., Saranzewa, N., Connolly, C. N., & Wright, G. A. (2013) b. Exposure to acetylcholinesterase inhibitors alters the physiology and motor function of honeybees. *Frontiers in physiology*, 4.
- Wilson, W. T., Sonnet, P. E., & Stoner, A. (1980). Pesticides and honey bee mortality. *Beekeeping in the United States*, (335), 129.
- Wu, J. Y., Anelli, C. M., & Sheppard, W. S. (2011). Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PloS one*, 6(2), e14720.
- Wu, J. Y., Smart, M. D., Anelli, C. M., & Sheppard, W. S. (2012). Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema* (*Microsporidia*) infection. *Journal of invertebrate pathology*, 109(3), 326-329.
- Yang, E. C., Chuang, Y. C., Chen, Y. L., & Chang, L. H. (2008). Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of economic entomology*, 101(6), 1743-1748.

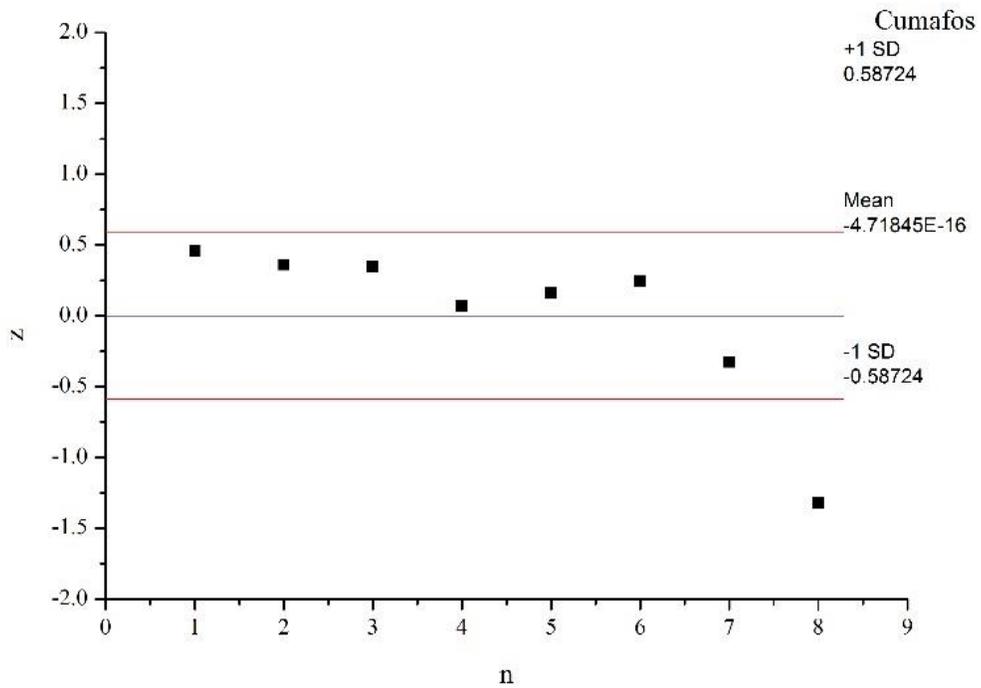
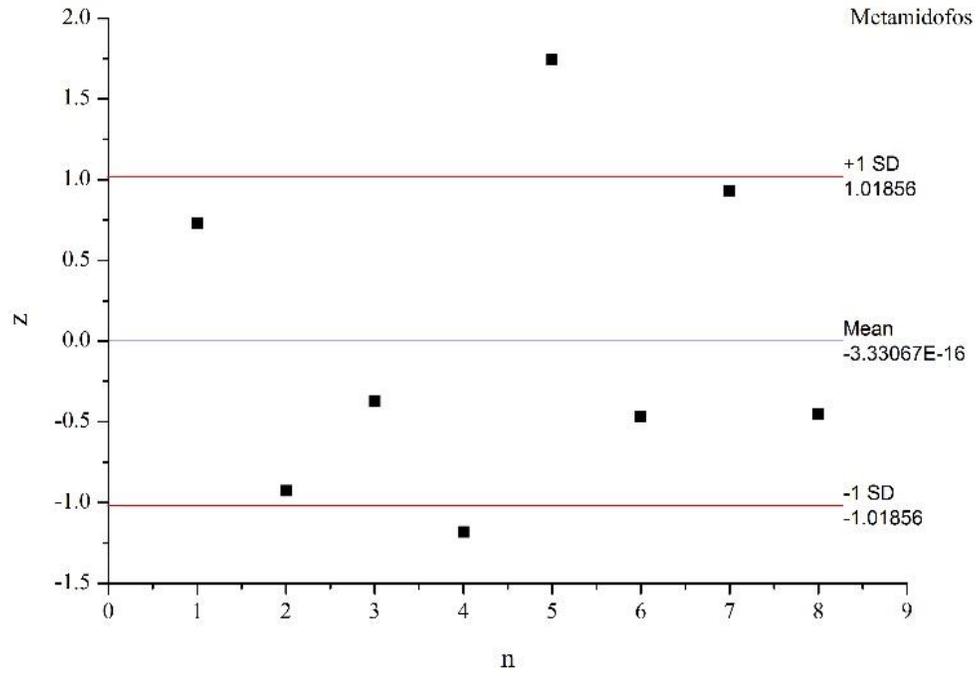
Zhu, W., Schmehl, D. R., Mullin, C. A., & Frazier, J. L. (2014). Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. *PloS one*, 9(1), e77547.

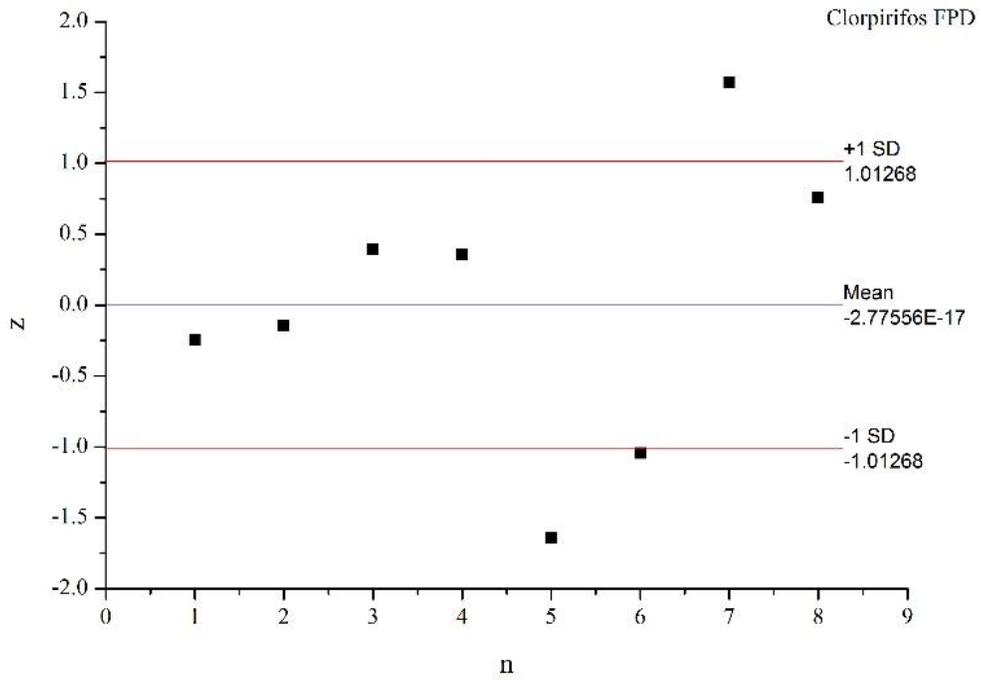
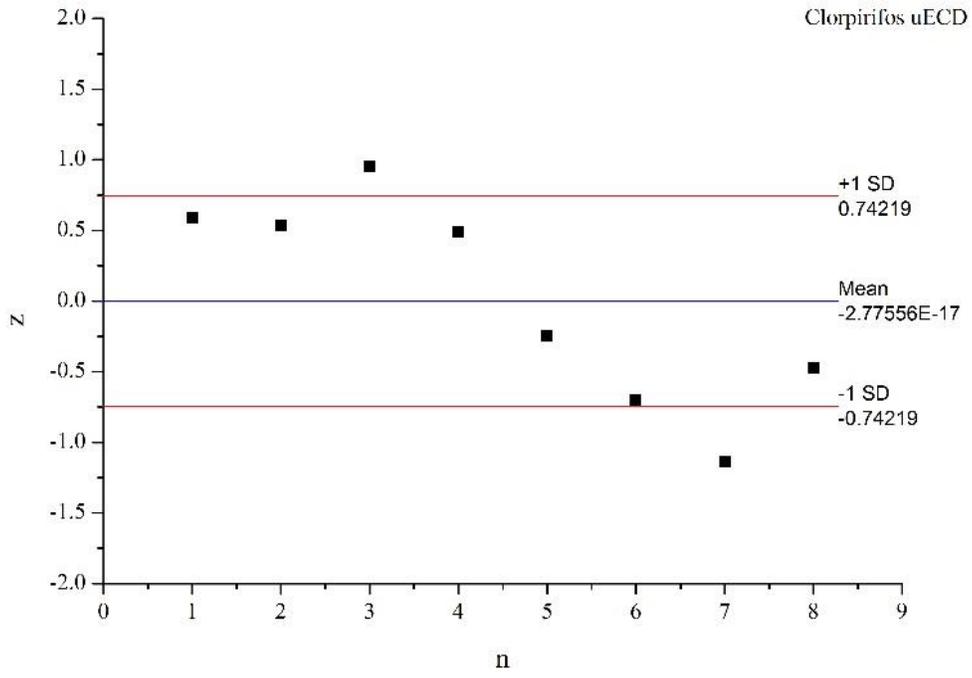
# ANEXO

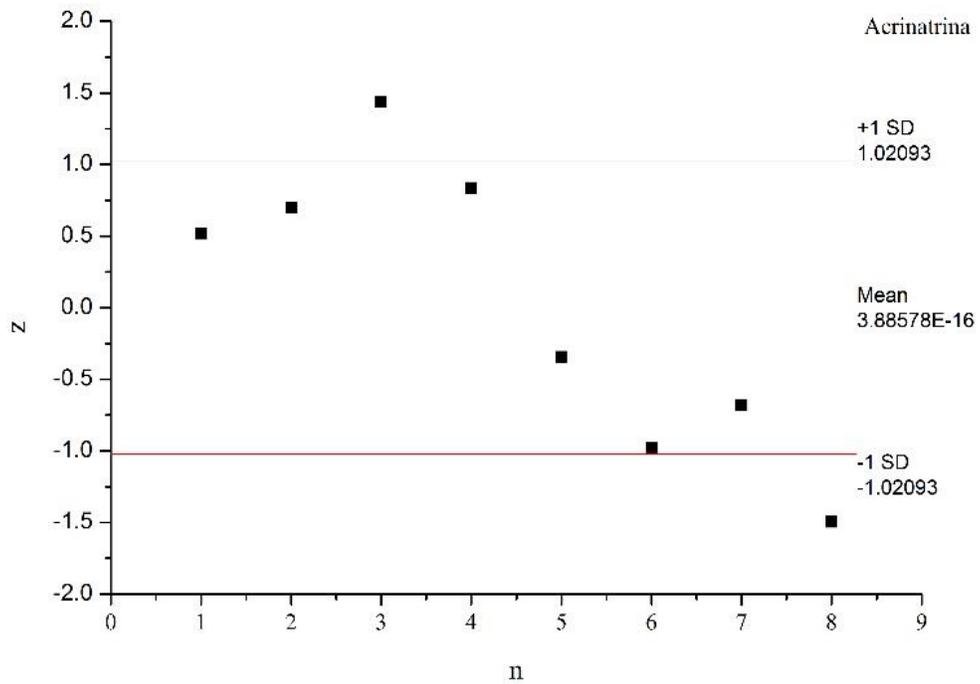
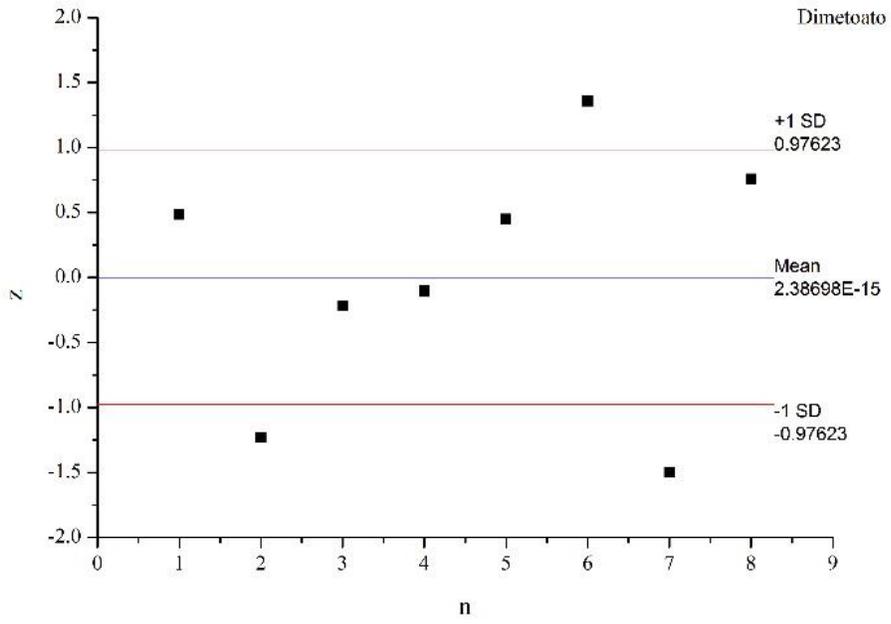
## 1. Gráficos control de blancos fortificados

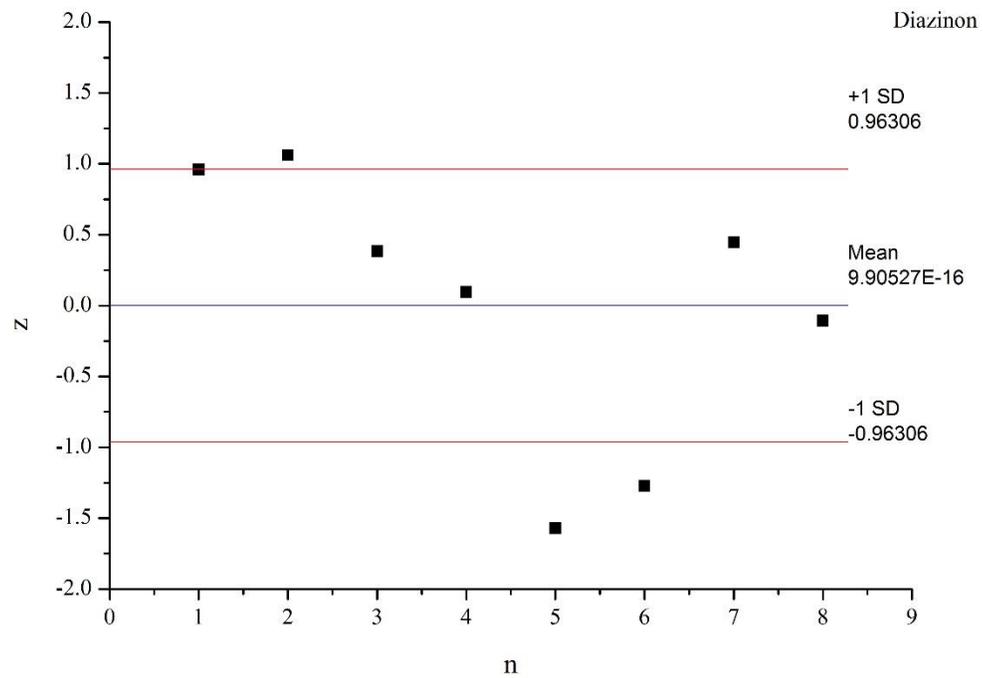
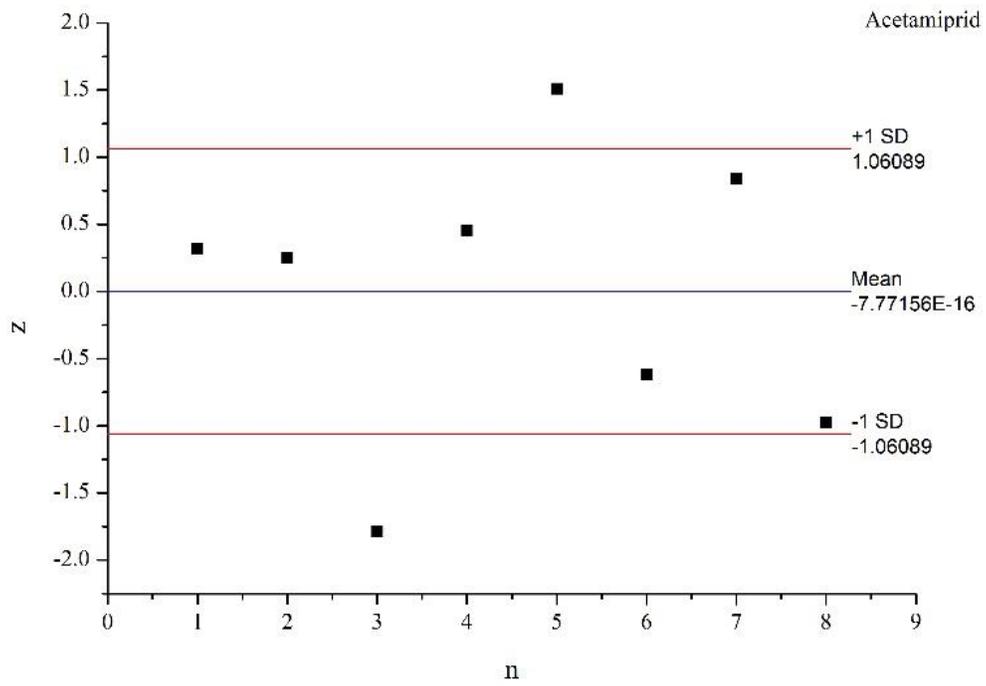


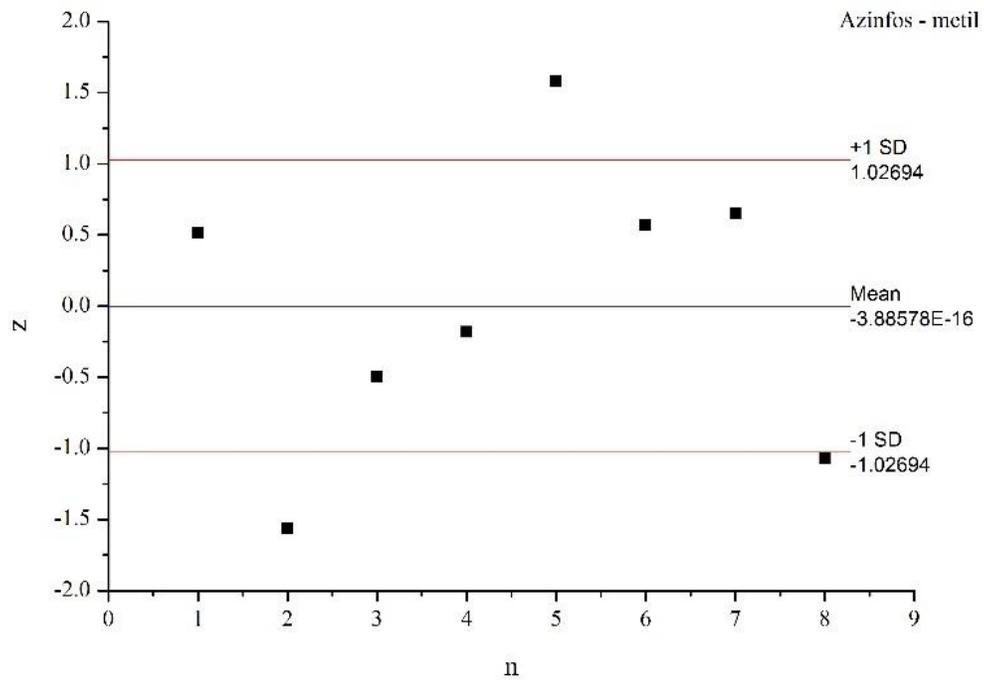
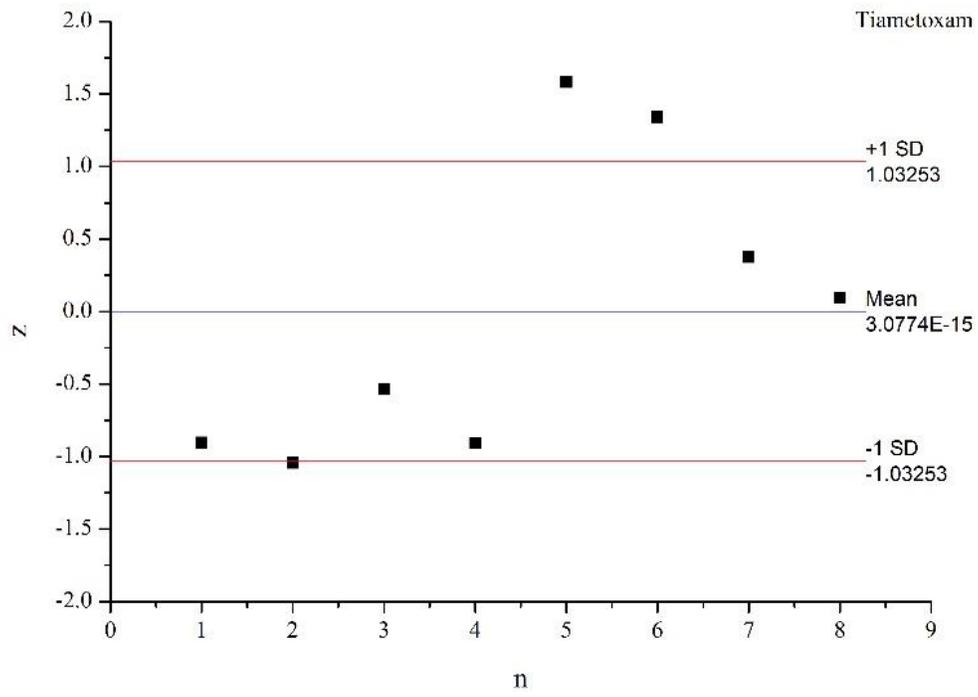


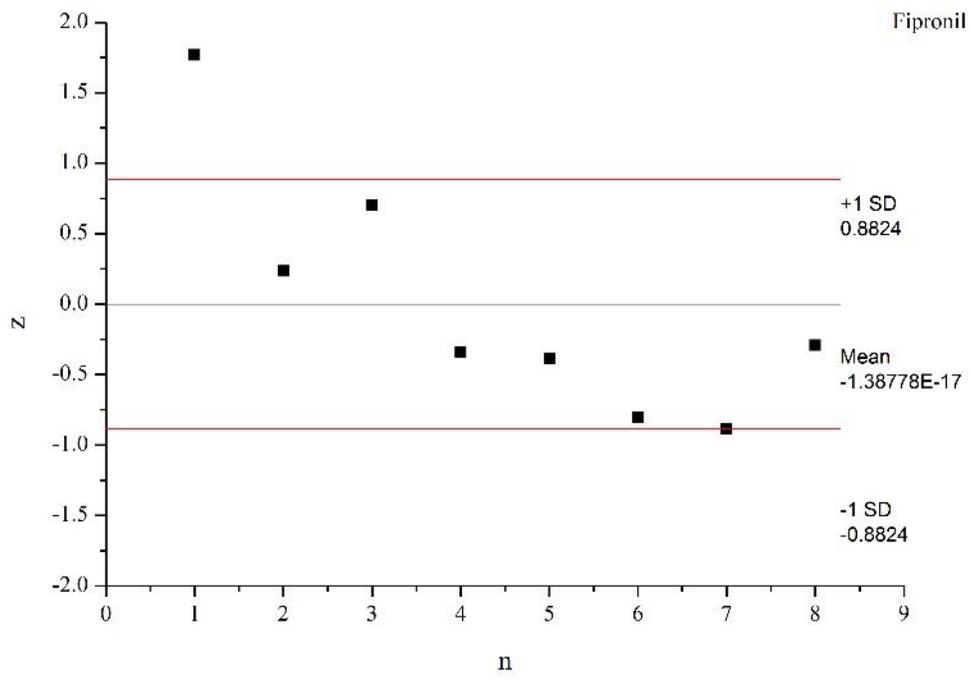




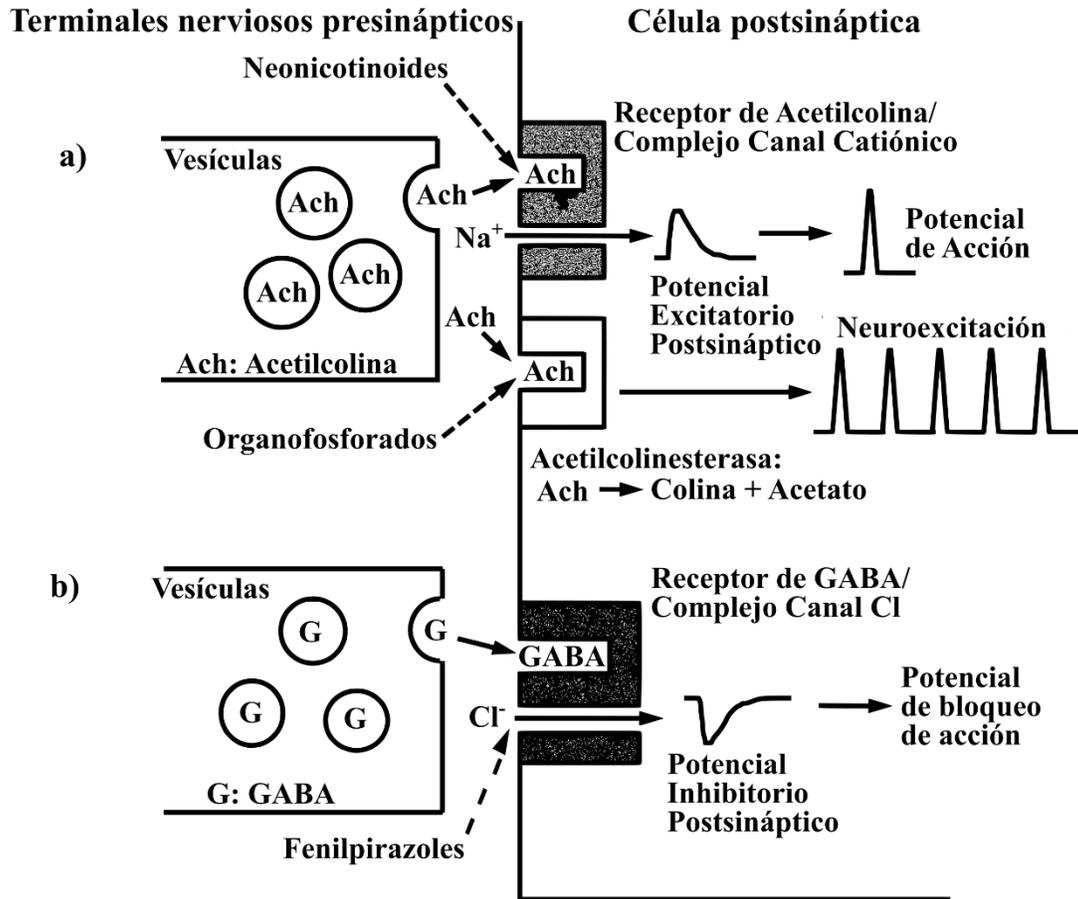






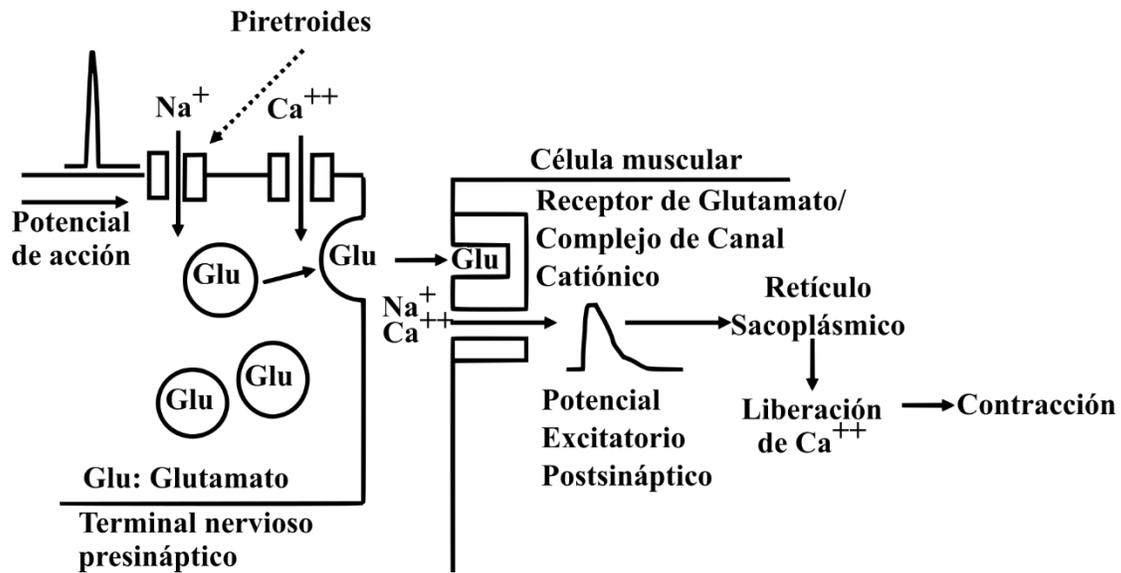


## 2. Modo de acción de Neonicotinoides, Organofosforados y Fenilpirazoles



**Figura 1.** Modos de acción de neonicotinoides, fipronil y organofosforados. En **a** un esquema que resume el modo de acción de NO y OPP. La unión de los NO a los AchR permite la entrada persistente de iones  $Na^+$ , causando un potencial excitatorio postsináptico persistente que se traduce en la hiperexcitación de la célula postsináptica. Por su parte los OPP actúan a través del bloqueo de la acción de la enzima AchE impidiendo la degradación de la Ach generando una acumulación de este neurotransmisor excitatorio. En **b** un esquema del modo de acción de fenilpirazoles como el fipronil. La unión de fipronil a los canales de  $Cl^-$  provoca un bloqueo convulsante que se traduce en neuroexcitación. Imagen adaptada de (Bloomquist, 2009).

### 3. Modo de acción de Piretroides



**Figura 2.** *Modo de acción de la acrinatrina.* La acrinatrina bloquea la inhibición de los canales de  $\text{Na}^+$  permitiendo que siga entrando lo que resulta en un potencial excitatorio postsináptico. La sinapsis neuromuscular de los insectos, que usa glutamato (Glu) como neurotransmisor, es un blanco especialmente importante para los PIR. Imagen adaptada de (Bloomquist, 2009).

(Página en blanco)