



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE QUÍMICA

Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales

**Desarrollo de metodologías de moni-
reo químico y biológico y de modelos imple-
mentables en un paquete informático con el fin
de evaluar riesgos producidos por pestici-
das sobre el ambiente y la agricultura.**

Trabajo para aspirar al título de Doctor en Química
presentado por

Silvina Niell

Directores: Dr. Horacio Heinzen, Dr. Héctor Cancela
Directora Académica: Dra. Verónica Cesio

Diciembre 2016, Montevideo, Uruguay

Índice

Agradecimientos	5
Índice de Tablas.....	7
Índice de Figuras	8
Abreviaturas y acrónimos	10
Resumen.....	13
Abstract	15
1 Introducción	17
1.1. Generalidades agricultura, agroecosistemas e impactos	17
1.2. <i>Apis mellifera</i> , su colonia y colmena	22
1.2.1. <i>Apis mellifera</i>	22
1.2.2. <i>Ciclo de vida de las abejas melíferas</i>	23
1.2.3. <i>Actividades de las abejas</i>	24
1.2.4. <i>Composición química de los materiales de la colmena</i>	26
1.3. Bioindicadores y biomonitores del ambiente	28
1.4. Las abejas melíferas y la colmena como bioindicador ambiental.....	29
1.4.1. <i>Experiencias de monitoreo ambiental utilizando colonias de abejas melíferas</i>	32
1.5. Familias especialmente relevantes de pesticidas	36
1.5.1. <i>Organofosforados</i>	36
1.5.2. <i>Piretroides</i>	38
1.5.3. <i>Estrobilurinas</i>	39
1.5.4. <i>Neonicotinoides</i>	41
1.6. Metodologías de análisis de residuos de pesticidas	45
1.6.1. <i>Preparación de la muestra</i>	46
1.6.2. <i>Análisis instrumental</i>	50
1.6.3. <i>Validación de las metodologías de análisis de residuos de pesticidas</i>	55

1.6.4.	<i>Metodologías de análisis de residuos de pesticidas en productos de la colmena...</i>	58
1.7.	Evaluación de riesgo.....	62
1.8.	Técnicas de Data Mining relevantes para la evaluación de la colmena como bioindicador.	66
2	Planteo del problema y objetivos del trabajo	74
3	Metodología para el análisis multiresiduo de pesticidas en cera de abejas basada en QuEChERS por LC-MS/MS y GCxGC-TOF (Artículo I)	75
3.1	Introducción	75
3.2	Resultados y discusión	76
4	Análisis multiresiduo de 41 pesticidas en miel por LC-MS/MS: evaluación de dos métodos de clean-up (Artículo II).....	91
4.1	Introducción	91
4.2	Resultados y discusión	92
5	Caso de estudio: pérdida de colmenas por paratión metil microencapsulado (Artículo III) 98	
5.1	Introducción	98
5.2	Resultados y discusión	99
6	Adaptabilidad de QuEChERS para el análisis de residuos de pesticidas en productos de la colmena buscando el desarrollo de un monitor de la sustentabilidad de los agroecosistemas (Artículo IV)	106
6.1	Introducción	106
6.2	Resultados y discusión	108
7	Transferencia de neonicotinoides del cultivo a la colmena por abejas melíferas: hacia un monitor de residuos de pesticidas (Artículo V).....	127
7.1	Introducción	127
7.2	Resultados y discusión	131
8	La colmena biomonitor de pesticidas en agroecosistemas: evaluación de indicadores simples químicos y biológicos utilizando <i>Support Vector Machines</i> (Artículo VI).....	138
8.1	Introducción	138
8.2	Resultados y discusión	140

9	Conclusiones y perspectivas.....	151
	Referencias bibliográficas	156

Agradecimientos

Agradezco por todas las muchas personas generosas y solidarias puestas en mi camino que de diversas formas y en distintos momentos me ayudaron a recorrerlo.

A mis directores Verónica, Horacio y Héctor por haber sido guías verdaderos, por dejarme equivocarme y ayudarme a aprender de los errores. Por enseñarme que los resultados son resultados, aunque no sean los esperados, que nuestro trabajo después de obtenerlos es interpretarlos y seguir trabajando porque siempre abren nuevas preguntas. Por nunca poner a mis hijos como excusa ni freno. Por apuntar alto. Gracias.

A los compañeros y profesores por los buenos deseos, el aliento, por compartir oficina, bibliografía y programas, a los que hicieron el esfuerzo generoso de suplir tareas docentes y/o de gestión. A los de Facultad de Química: Nacho, Pilar, Álvaro, Eduardo, Carlos, Daniel, Federico, Gabriel, Joaquín, Renzo, Isabel Dol, Marcelo Belluzzi. A los del CENUR Litoral Norte: Andrés, Carolina, Cecilia, Florencia, Gualberto, Viviana, Ileana, Katy, Macarena, Katerine, Hugo, Ileana, Mauricio, Paula, Lía, Guzman, German Christine, Marcelo, Cintya, Magui, Ariel, Juan, Guillermo Moyna, Ricardo Hladki, Grisel, Carlos, Inés, Cintia, Virginia, Daiana, Isabel, Susy, Sofía, Mónica, María José, Fernanda, Selene, Helena, Margarita, Leticia, Liber, Patricia, Nicolás y Jimena. A los del Grupo de Análisis de Compuestos Traza: Andrés Pérez Parada, Natalia Besil, Marcos Colazzo, Lucía Pareja, Beatriz Alonso, Rodrigo Souza, Noel Alonzo, Sofía Rezende, Fiamma Pequeño. Especialmente a cada uno, Gracias.

A las autoridades universitarias, a los cogobernantes docentes, estudiantes y egresados, a los funcionarios, a los comprometidos, a todos los que favorecieron y a los que no entorpecieron, a los que debido a su dedicación hoy puedo vivir y trabajar en el interior y en lo que me gusta. Gracias.

A todos los co-autores, especialmente Dani Doerk, Julia Hepperle, Michelangelo Anastassiades, Yamandú Mendoza, Nicolás Pérez, Silvana Abbate, Leonidas Carrasco Letelier, Sebastian Díaz Cetti, Jorge Franco, Gastón Notte, Rosana Díaz, Estela Santos Natalia Gérez y Florencia Jesús por haber sido reactivos limitantes de distintas partes de la tesis: por haberse consumido por completo y determinado la cantidad (y buena calidad) de los productos que obtuvimos juntos. Gracias.

A mamá por haberme enseñado con el ejemplo a dar lo mejor, lo máximo, a dar todo. Por la fe, el amor, la esperanza, los valores, la educación, el inglés, el francés, el portugués, computación, el diseño gráfico, el lenguaje de programación, el piano, el compromiso con lo importante y con las instituciones. Gracias.

A papá por escucharme siempre. Gracias.

A mis queridas hermanas por hacerme la vida liviana, más linda, acompañada, por sus múltiples y diferentes soluciones, las prácticas y las teóricas. Gracias.

A mi esposo por decidir amarme completa, por su paz interior y confianza en que lo mejor está por venir; por su capacidad de transformarse en mi barco, mi ancla, mi dirigible, mi jet, mi nube, mi cable a tierra, mi mar, mi suelo, mi aire, mi hielo o mi fuego según lo que necesite. Gracias amor.

A mis hijos por transferirme energía. Gracias.

A mi suegra por quererme, aceptarme, respetar mis decisiones, por dejarse mover por el amor. Gracias.

A las abuelas, las tías y los tíos, los padrinos y madrinas por querer tanto a mis hijos. Gracias.

A Geno por su buen genio y alegría durante toda la jornada, día tras día; y a Shirley por la buena disposición. Gracias.

A mi familia toda por incontables cualidades. Gracias.

A las amigas y los amigos por el ánimo, por la multiforme ayuda y la alegría de compartir. Gracias.

A Ani especialmente porque creyendo que la ayudaba y animaba salía yo ayudada y animada. Gracias.

A Huerto y a Pato por enseñarme el valor, el lugar que debe tener, el fin y la oportunidad que te da el trabajo. Gracias.

A la familia Vergnes (Jean, Laura, Domi, Joaco, Caty) por enseñarme desde niña sobre las maravillosas abejas. Gracias.

A Karina, Ciro y Gualberto por haber aceptado ser tribunal y aportar a la mejora de la tesis. Gracias.

A la Universidad de la República, al régimen de dedicación total, a CSIC, al Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA), CVUA Stuttgart, INIA, DIGEGRA-MGAP, FPTA, por las distintas financiaciones y apoyos. Gracias.

Índice de Tablas

Tabla 1.1 Parámetros y criterios de validación establecidos en el documento SANTE/11945/2015.....	58
Tabla 3.1 Residuo seco del extracto derivado de emplear distintos procedimientos de cleanup.....	82
Tabla 3.2 Recuperaciones, RSDs y LOQs de los pesticidas analizados por GCxGC-TOF (n=5 réplicas). * Pesticidas presentes en la muestra de cera usada para fortificar	84
Tabla 3.3 Porcentajes de recuperación, RSDs y LOQs de los pesticidas analizados por LC-MS/MS (n=5 réplicas)	86
Tabla 3.4 Porcentajes de recuperación y RSDs (n=5) de un grupo seleccionado de pesticidas a 0,1 mg kg ⁻¹ en distintas muestras ensayadas.....	89
Tabla 5.1 Lista de los pesticidas analizados por GC-MS con la metodología analítica descrita: porcentajes de recuperación, desviaciones estándar relativas (n=5) y LOQs obtenidos	101
Tabla 6.1 Porcentaje de recuperaciones, RSDs (Desviaciones Estándar Relativas) y LOQs (Límite de Cuantificación) y LD50 (Dosis Letal) de los pesticidas analizados en abejas (n=5 réplicas). nd=no detectado.....	109
Tabla 6.2 Porcentajes de recuperación, RSDs (Desviaciones Estándar Relativas) y LOQs (Límites de cuantificación) de los pesticidas analizados en polen (n=5 réplicas). nd=no detectado.....	113
Tabla 6.3 Hallazgos de residuos de pesticidas en matrices de la colmena ordenadas por apiario y estación. nd= no detectado.	119
Tabla 6.4 Comparación de apiarios ubicados en ambientes diferentes en dos estaciones de acuerdo a sus perfiles de residuos de pesticidas	122
Tabla 6.5 Distancias de Gower entre todos los pares de apiarios-estaciones muestreadas	123
Tabla 7.1 Condiciones biológicas iniciales de las colmenas del ensayo en cuanto a población, cría, reserva de miel y porcentaje infección por V. destructor.	131
Tabla 7.2 Abejas muertas colectadas en las trampas de mortalidad y rango de concentraciones de neonicotinoídes 24 hs luego de la aplicación.	132
Tabla 7.3 LOQ y parámetros instrumentales de cada compuesto estudiado.....	133
Tabla 8.1 Hallazgos de pesticidas, LD ₅₀ abejas oral y contacto, LD ₅₀ en mamíferos oral, EI _Q (consumidor y ecológico), dosis promedio recomendada a campo en g ha ⁻¹	142
Tabla 8.2 Variables y set de datos utilizados para la clasificación mediante SVM.....	144
Tabla 8.3 Mejores parámetros (C, γ) obtenidos, mejor performance y número de vectores soporte para las diferentes variables y kernels evaluados.....	147

Índice de Figuras

Figura 1.1 Destino ambiental de los pesticidas según sus propiedades fisicoquímicas.....	20
Figura 1.2 Agricultura, agroecosistemas e impactos.	21
Figura 1.3 Ciclo de vida de las abejas. Ilustración tomada de Encyclopædia Britannica Online, s. v. "honeybee", octubre 14, 2016, https://www.britannica.com/animal/honeybee	24
Figura 1.4 Estructuras de ejemplos de pesticidas organofosforados	38
Figura 1.5 Estructuras de ejemplos de insecticidas piretroides	39
Figura 1.6 Estructuras de ejemplos de fungicidas estrobilurinas	40
Figura 1.7 Imagen tomada de Edwards et al. <i>Chemosphere</i> (2016) 146: 450–457	41
Figura 1.8 Estructuras químicas de tiametoxan, imidacloprid, acetamiprid y tiacloprid.	42
Figura 1.9 Diagrama general de la estrategia de preparación de muestra QuEChERS.....	49
Figura 1.10 Esquema de funcionamiento de un cuadrupolo. Imagen tomada de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-57272007005500004	51
Figura 1.11 Esquema de un triple cuadrupolo y modo operación MRM. Imagen tomada de <i>Scientia Chromatographica</i> (2010) 2, 4:25-48	53
Figura 1.12 Esquema de GCxGC-TOF. Imagen tomada de https://www.biotech.wisc.edu/services/massspec/instrumentationoverview/GCxGC-TOFMS	54
Figura 1.13 Ejemplo de un GCxGC-TOF plot: extracto en acetonitrilo de cera de abejas.	55
Figura 1.14 Esquema general de evaluación de riesgo	63
Figura 1.15 Representación gráfica ejemplificando una clasificación con Support Vector Machine. Imagen tomada de http://www.elsevier.es/es-revista-ensayos-sobre-politica-economica-387-articulo-las-entidades-financieras-lo-largo-90369480	69
Figura 3.1 Influencia de la cantidad de muestra en las recuperaciones de pesticidas	77
Figura 3.2 Impacto del tamaño de partículas (fracciones: 125-250 μm , 250-500 μm y 500-1000 μm), temperatura (temperatura ambiente, 50°C y 80°C) y tiempo de agitación (1 min y 15 min) en los rendimientos de extracción de los pesticidas incorporados en la cera.....	79
Figura 3.3 GCxGC-TOF plots of a) primer extracto (sin cleanup); y b) extracto luego de dSPE con PSA.....	83
Figura 4.1 Recuperaciones de los pesticidas para las opciones de purificación y modos de ionización del estudio.	94
Figura 4.2 Estructuras químicas de pesticidas con diferencias entre las opciones de purificación del estudio.	95
Figura 4.3 Porcentajes de Desviación Estándar Relativa obtenidos de la validación del método.	96
Figura 5.1 Cromatograma por LC-MS/MS de una muestra de abejas conteniendo paratión metil. a) Cromatograma de paratión metil estandar en matriz. b) Cromatograma de paratión metil en la muestra analizada	102
Figura 5.2 Mapa con los apiarios afectados marcados y el sitio de la aplicación indicado con una estrella. Datos del mapa: Google, GeoEye, Cnes/Spot Image	103
Figura 6.1 Cromatograma obtenido por LC-MS/MS mostrando varios hallazgos positivos en muestras reales de cera de abejas	116
Figura 6.2 Frecuencia de hallazgos positivos en las cuatro matrices de la colmena analizadas.	117
Figura 6.3 Análisis Factorial Múltiple de los hallazgos de residuos de pesticidas en abejas, miel, polen y cera de abejas.....	121
Figura 6.4 Promedio de las concentraciones de los residuos encontrados en un apiario localizado en una plantación de soja muestreado en pre y post cosecha.	125
Figura 7.1 Evolución de los residuos de pesticidas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) con el tiempo (días).....	134

<i>Figura 7.2 Concentraciones de residuos de pesticidas en abejas y hojas muestreadas simultáneamente.</i>	135
<i>Figura 7.3 Transferencia de los pesticidas del cultivo de soja a las abejas graficada en función de cada Kow (tiametoxam=0,741; imidacloprid=3,72; acetamprid=6,31). Notar que los valores de transferencia fueron escalados (multiplicados por 10^3).</i>	136
<i>Figura 8.1 Clasificación obtenida con las variables TUtot(mam) y pestnum a) kernel lineal b) kernel RBF</i>	149

Abreviaturas y acrónimos

ANNs: Artificial Neuronal Networks: Redes neuronales

AOAC: Association of Official Analytical Chemists

CA: Concentration Addition

CCD: Collony Collapse Disorder

DDT: Dicloro difenil tricloroetano

DLLME: Dispersive Liquid Liquid Microextraction, Microextracción dispersive liquid-líquido

d-SPE: dispersive Solid Phase Extraction: Extracción en Fase Sólida dispersiva

DT₅₀: Degradación del 50%

EEUU: Estados Unidos

EFSA: European Food Safety Authority.

EIQ: Environmental Impact Quotient

EM: Efecto Matriz

EN: European Standard

EPA: Agencia de Protección del Medio Ambiente.

ESI: Electrospray Ionization: Ionización por electrospray

FAO: Food Agriculture Organization

GC: Gas Chromatography, Cromatografía Gaseosa

GCB: Graphitized Carbon Black: Carbon Grafitizado

GC-MS/MS: Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas en tándem

GC-MS: Gas Chromatography Mass Spectrometry, Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa

GC-NPD: Cromatografía gaseosa acoplada a detector de nitrógeno y fósforo

GCxGC-TOF: Cromatografía gaseosa bidimensional acoplada a detector de tiempo de vuelo

HCH: Hexaclorociclohexano

IA: Independent Action

ISO: International Standarization Organization

ISTD: Internal Standard: Estándar Interno

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

k-NN: k-nearest neighbours: k-vecinos más cercanos

Koc: Coeficiente de sorción al carbono orgánico
Kow: Coeficiente de partición octanol-agua
LC: Liquid Chromatography, Cromatografía Líquida
LC-DAD: Cromatografía Líquida acoplada a detector de arreglo de diodos
LC-MS/MS: (Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry): Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas Tándem.
LD o DL₅₀: Dosis Letal 50 (Dosis a la que mueren el 50% de los individuos del ensayo)
LLE: Liquid Liquid Extraction, Extracción Líquido Líquido
LMR: Límite Máximo de Residuos
LOC: Level of Concern
LOD: Límite de detección (LOD, en inglés)
LOQ: Límite de cuantificación (LOQ, en inglés)
ME: Matrix Effect: Efecto matriz
MFA: Multi Factorial Analysis
MGAP: Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca
MOA: Mode of Action
MRM: Métodos Multirresiduos
MRM: Multiple Reaction Monitoring
MRMs: Métodos multirresiduos.
MS/MS: Detector de masas en tándem
MS: Mass Spectrometry, Espectrometría de Masas
MSPD: Matrix Solid Phase Dispersion
NAS: National Academy of Sciences.
NIR: Near Infrared: Infrarrojo Cercano
NRC: National Research Council.
ODS: Octadecyl siloxane
PCA: Principal Component Analysis
PPP: Plant Protection Products
PSA: Primary and Secondary Amine: Amina Primaria y Secundaria
Pv: Presión de vapor
QTRAP: Cuadrupolo- Trampa de Iones
QuEChERS: Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe: Rápido, fácil, barato, efectivo, robust y seguro por sus siglas en inglés.

RBF: Radial Basis Function
RP-C18: Fase Reversa
RQ: Cociente de Riesgo
RSD: Relative Standard Deviation
RSD: Relative Standard Deviation, Desviación Estándar Relativa
SBSE: Stir Bar Sorptive Extraction
SFE: Supercritical Fluid Extraction Extracción con fluídos supercríticos
SIM: Monitoreo de iones simples
SPE: Extracción en fase sólida
SPME: Microextracción en fase sólida
SRM: Single Residue Methods
SVM: Support Vector Machine
TOF: Time of Flight
U.S.: Estados Unidos.
UE: Unión Europea
UHPLC-MS/MS: Cromatografía Líquida de ultra alta performance acoplada a espectrometría de masas en tándem

Resumen

La aplicación de agroquímicos impacta sobre todo el ecosistema. No solo se ven afectados los organismos blanco, sino también poblaciones no objetivo y el ambiente en general. Este impacto es evaluado habitualmente monitoreando por separado suelo, agua, aire y biota. Sin embargo esta información resulta parcial ya que no se tiene una herramienta que sea capaz de integrar y globalizar la información ambiental disponible a partir de la cual sea posible calificar la calidad del ambiente.

En este sentido integrador, el presente trabajo de tesis exploró el empleo de la abeja melífera y su colmena como bioindicador de la calidad ambiental de ecosistemas agrícolas, dada su fuerte interacción con el mismo necesaria para su supervivencia (alimentación y reproducción). Se buscó correlacionar los datos químico analíticos de residuos de pesticidas con las observaciones sobre la biología de la colmena para caracterizar la problemática de distintos sistemas productivos donde se emplean agroquímicos, con el objetivo general de contribuir a la evaluación en forma global del efecto que tienen los paquetes tecnológicos utilizados, tanto aisladamente como en conjunto, sobre los ecosistemas en estudio.

Se desarrollaron metodologías adecuadas para el análisis multirresiduo en los distintos componentes de la colmena (abejas, cera, miel y polen) de un conjunto de pesticidas que incluyen aquellos empleados en los diferentes sistemas productivos en las zonas donde se encuentren las colmenas.

Se realizaron experimentos y monitoreos que involucraron colmenas caracterizadas localizadas en medio de cultivos extensivos típicos de nuestro país, las que fueron luego evaluadas química y biológicamente.

Se demostró que los diversos agroecosistemas, los cambios en los mismos y las estaciones del año se pueden diferenciar a través de los perfiles de residuos de pesticidas de cada producto de la colmena.

Se mostró mediante un experimento a semi-campo que las abejas efectivamente transfieren residuos de neonicotinoides aplicados en soja al interior de la colmena detectándose los mismos en cera. Se relacionaron las concentraciones de insecticidas presentes en el ambiente con las trazas determinadas en las abejas y se encontró que esta transferencia tiene una relación lineal inversa con su propiedad fisicoquímica K_{ow} , se pudo observar que el pesticida que menos se transfirió (acetamiprid) tiene la presión de

vapor más alta. El encontrar relaciones entre la transferencia y las propiedades fisicoquímicas de tiametoxan, imidacloprid y acetamiprid, de cumplirse para un rango mayor de compuestos, permitiría calcular las concentraciones presentes en el ambiente a partir de lo determinado en la colmena.

Con los resultados analíticos y biológicos obtenidos se estudió la posibilidad de desarrollar modelos basados en técnicas de aprendizaje automático para la evaluación del riesgo y del impacto ambiental de la utilización de los distintos paquetes tecnológicos para cultivos de extensión como soja, arroz, sorgo, trigo o praderas. Específicamente, se desarrollaron modelos de tipo *Support Vector Machines* (SVM) utilizando algoritmos implementados en el software libre R para realizar aprendizaje supervisado sobre los datos mencionados explorando el desempeño de distintos subconjuntos de resultados químicos y biológicos como indicadores.

Los resultados tienen además relevancia para la actividad apícola, industria incipiente y cada vez más importante en nuestro país. Los insumos químicos, biológicos e informáticos generados en este trabajo de tesis son un aporte al conocimiento y una herramienta para la evaluación de la sustentabilidad de los agroecosistemas del país a través de la implementación de la colmena como un biomonitor.

Abstract

Agrochemicals application impacts ecosystems: not only target organisms but also other populations and the environment are affected. This impact is usually evaluated through separate monitoring of environmental compartments: soil, water, air and biota. This approach is always partial as currently there does not exist a tool that globalizes and integrates the available environmental information able to qualify different environments.

In this sense, the present thesis explored honey bees and their hives as bioindicators of environmental quality of agroecosystems due to their strong interaction necessary for their survival (feeding and reproduction). Correlations between chemical analytical data of pesticide residues and observations on hive biology were explored, seeking to characterize the problems of productive systems where agrochemicals are used. The general objective was to contribute to the global evaluation of the effect of the technological packages applied, isolated and as a group, over the studied ecosystems.

Adequate methodologies were specifically developed for the multiresidue pesticides analysis of the different hive components (bees, wax, honey and pollen). The selected pesticides include the ones most employed in the productive systems of the environments where hives are placed.

Monitorings and experiments were carried with characterized hives placed in extensive crops typical of our country, which were afterwards chemically and biologically evaluated.

The results showed that the different agroecosystems, their changes and the seasons can be differentiated through pesticide residues profiles of each hive matrix.

It was shown that honey bees effectively transferred neonicotinoid residues sprayed over soybean crop to the inside of the hive, as these residues were detected in wax through a semi-field study. Concentrations of the insecticides present in the leaves of the crop were related to their concentration in honey bees and it was found that this transference has a linear inverse trend with their physicochemical property K_{ow} . It was also observed that the pesticide that presented the lowest transference (acetamiprid) has the highest vapour pressure. If the relationships found between transference and physicochemical properties of thiamethoxam, imidacloprid, and acetamiprid, were

shown to apply to a wider range of compounds, they would allow calculating the concentrations present in the environment through the determinations made in the hive. Based on the analytical and biological results obtained, the possibility of developing models using machine learning for the risk assessment and environmental impact of the usage of different technological packages for extensive crops such as soybean, rice, sorghum, wheat or prairies was studied.

Specifically, models of the type *Support Vector Machines* (SVM) using algorithms implemented in the free software R were developed to perform supervised learning on the mentioned data exploring the performance of different subsets of variables including the different chemical and biological results as indicators.

The obtained results are also relevant for apiculture which is an incipient and increasingly important industry in our country. The chemical, biological and computational tools developed during this thesis are a contribution to knowledge and a platform for the evaluation of sustainability of agroecosystems in our country through the implementation of the hive as a biomonitor.

1 Introducción

1.1. Generalidades agricultura, agroecosistemas e impactos

La agricultura es la forma dominante de manejo del suelo actualmente en el mundo. Los ecosistemas agrícolas cubren casi el 40% de la superficie útil de la Tierra y aproximadamente el 80% de la que posee Uruguay [1].

En los últimos años en el país se han intensificado las actividades agrícolas productivas debido mayoritariamente a las condiciones favorables existentes en el mercado internacional. Estas actividades tanto extensivas como intensivas se sitúan en agroecosistemas, ecosistemas con manejo agrícola conectados con otros ecosistemas [2], que les proveen los insumos necesarios para poder desarrollarse (energía, agua, nutrientes, polinización, etc.), llamados servicios ecosistémicos [3].

La soja (*Glycine max* (L.) Merrill) es el cultivo oleaginoso más consumido en el mundo [4] y el quinto cultivo en términos de producción mundial [5]. En los últimos 50 años, la superficie sembrada con este cultivo aumentó 432% alcanzando en el 2011 aproximadamente 103 millones de hectáreas y una producción de 261 millones de toneladas y proporcionando la mitad de la demanda mundial de aceite vegetal y proteína [6].

América del sur es la región con el área plantada de soja que crece con mayor rapidez. Durante las pasadas cuatro décadas, ha incrementado su área productiva casi 30 veces (de 1,44 a 42,75 millones de hectáreas de 1970 a 2009). Como contiene la mayor área plantada de soja, también produce actualmente el mayor volumen de este cultivo [7]. En 2009, de las 222,94 millones de toneladas de soja cosechadas mundialmente, 43% (equivalente a 94,91 millones de toneladas) fueron producidas en la región. La gran mayoría de la producción se desarrolla en los países del Cono Sur: Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay y Uruguay. En particular en nuestro país a partir del año 2010 se vio aumentada la producción de soja pasando de 1.793.000 toneladas a 3.162.800 toneladas en 2014 [8].

Cuando las actividades agrícolas se vuelven más intensas, extensivas y continuas en el tiempo disminuyen la diversidad genética de la zona, y se hace indispensable suministrar insumos en cantidades crecientes. En particular estos insumos incluyen fertilizantes y pesticidas entre otros. Los pesticidas están incluidos en los agroquímicos, productos fitosanitarios, también llamados productos de protección vegetal. Un pesticida es cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos. El término incluye a las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o inhibidores de la germinación y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte según *Codex Alimentarius*. La definición no incluye normalmente los fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal, aditivos alimentarios ni medicamentos para animales [9]. Mientras que la Unión Europea (UE) define un producto fitosanitario como una sustancia activa o un preparado presentado en la forma en que se ofrecen para su distribución a los usuarios, destinados a:

- Proteger los vegetales contra todos los organismos nocivos o evitar la acción de los mismos.
- Influir en el proceso vital de los vegetales de forma distinta de cómo lo hacen las sustancias nutritivas (por ejemplo, los reguladores de crecimiento).
- Mejorar la conservación de los productos vegetales siempre y cuando dichas sustancias o productos no estén sujetos a disposiciones particulares sobre conservantes.
- Destruir los vegetales inconvenientes.
- Destruir partes de vegetales, o controlar o evitar un crecimiento inadecuado de los mismos [10].

Los agroquímicos son un grupo muy amplio de moléculas con actividad biológica, que tienen según su estructura química diversas propiedades fisicoquímicas y toxicidad. Esto significa que si bien están diseñadas para el control de poblaciones de malezas,

insectos, hongos, nemátodos y otras plagas [11] y buscan incrementar la productividad del cultivo, además de controlar los organismos blanco, en muchos casos afectan organismos no blanco como los benéficos, por ejemplo las abejas [12-17]. En Uruguay, en la reciente zafra 2014-15 hubo un incremento de siete veces en la importación de fitosanitarios, principalmente herbicidas [18].

Debido a las propiedades fisicoquímicas de los pesticidas, éstos se distribuyen en el ambiente de forma diversa, pueden moverse (por lixiviación, escorrentía o volatilización), bioacumularse o degradarse (física, química o biológicamente). Por ejemplo, las moléculas hidrofílicas, con mayor solubilidad en agua son más propensas a transportarse y llegar a los cursos de agua mientras que las que poseen un Koc (coeficiente de sorción carbono orgánico) alto tienden a quedar retenidas en las partículas de suelo y se mueven por erosión junto a ellas presentando un menor potencial de lixiviación. El Koc es una propiedad fisicoquímica que se define como el cociente entre la concentración de una determinada sustancia en el suelo y la concentración de la misma en la fase acuosa en equilibrio [19]. En el caso de los pesticidas constituye una medida de la distribución del compuesto entre el suelo y la fase líquida. Representa la capacidad del pesticida para ser retenido por la materia orgánica y la arcilla del suelo. El Kow es otra propiedad fisicoquímica que se define como el cociente entre la concentración de un pesticida en fase orgánica (octanol) y la concentración del mismo en fase acuosa, es una medida de cómo se distribuye en el equilibrio un soluto en las fases octanol y agua:

$$K_{ow} = C_{octanol}/C_{agua}$$

donde $C_{octanol}$ = concentración molar del soluto en la fase orgánica octanol,

C_{agua} = concentración molar del soluto en la fase acuosa.

Permite tener una referencia de la afinidad de las sustancias para penetrar las barreras lipídicas celulares. Por lo tanto un pesticida con Kow alto presenta peligro de acumulación en tejido adiposo y potencial bioacumulación. Otra propiedad fisicoquímica útil para predecir el destino ambiental de los pesticidas es la Presión de vapor (Pv) ya que cuando los mismos tienen una Pv alta tienen mayor riesgo de volatilizarse desde el cultivo en que fueron aplicados. En el caso de soluciones diluidas, se puede calcular valor de la constante de la Ley de Henry conociendo el peso

molecular, la presión de vapor del gas puro y la solubilidad del compuesto químico en agua a una determinada temperatura. Por lo tanto esta constante es útil para determinar si un pesticida tiene riesgo de volatilizarse y transportarse por aire una vez que se encuentra en un curso de agua. En la Figura 1.1 se encuentra esquematizado el destino ambiental de los pesticidas según sus propiedades fisicoquímicas.

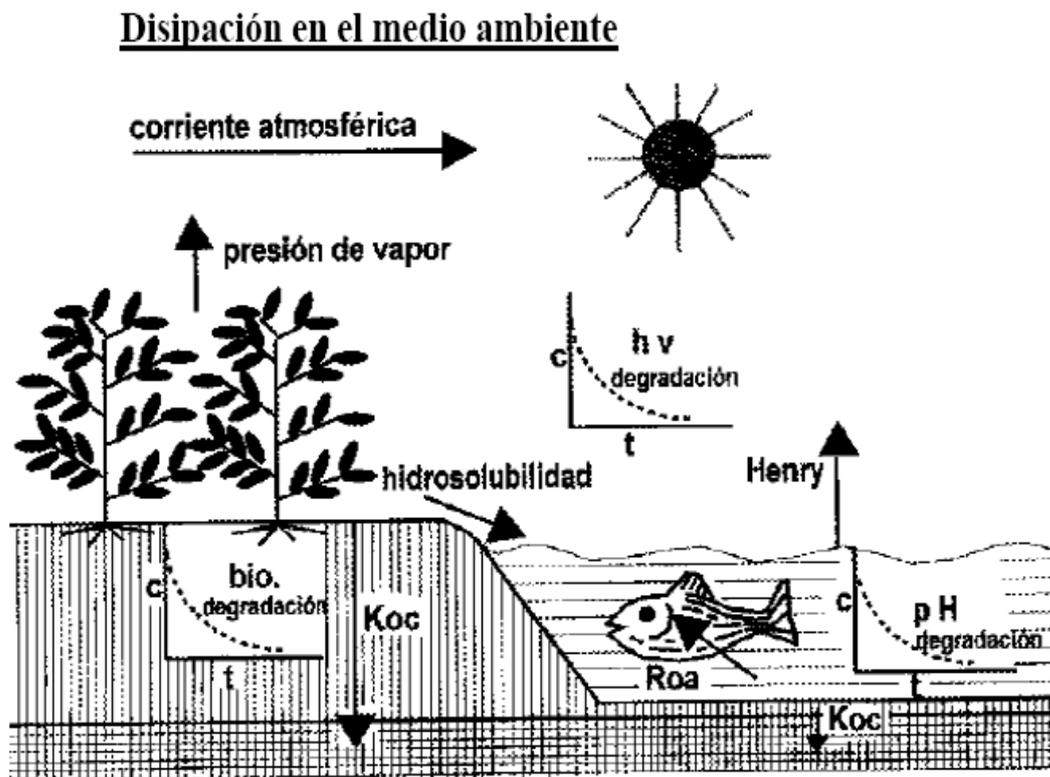
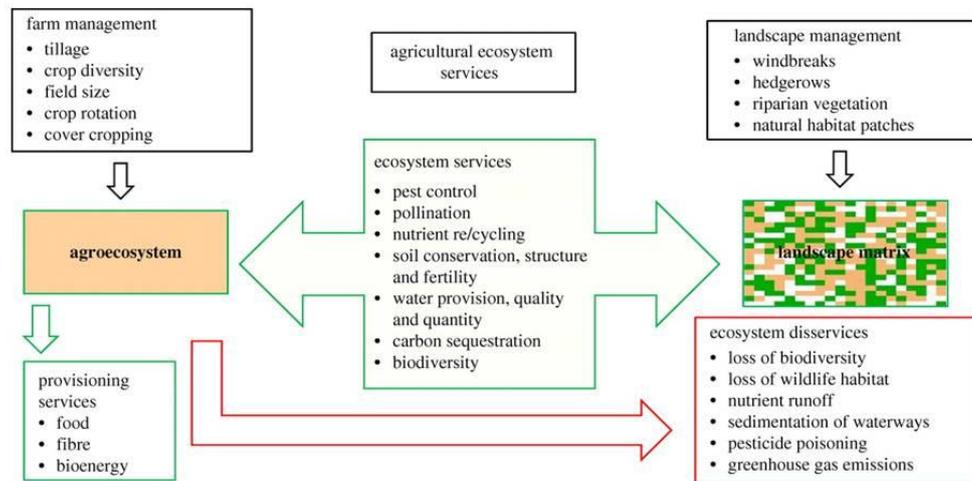


Figura 1.1 Destino ambiental de los pesticidas según sus propiedades fisicoquímicas.

Cambios en la vegetación de ribera, la morfología de los arroyos, incremento de la erosión e ingreso de sedimentos, así como el aumento de materia orgánica y la contaminación por pesticidas [20-23] son algunos impactos que han sido reportados de las actividades agrícolas extensivas. A diferencia de lo que ocurre con contaminantes puntuales, el origen difuso de la contaminación en la producción agrícola [24], llega a los cursos de agua en parte por la escorrentía superficial de aguas de lluvia [25], por lo tanto, es necesario comprender la dinámica de las sustancias, para plantear posibles soluciones.

Impacts of farm management and landscape management on the flow of ecosystem services and disservices to and from agroecosystems.



Alison G. Power Phil. Trans. R. Soc. B 2010;365:2959-2971

© 2010 The Royal Society



Figura 1.2 Agricultura, agroecosistemas e impactos.

En la Figura 1.2 se muestra como los agroecosistemas son a la vez proveedores y consumidores de servicios ecosistémicos. Los agroecosistemas son valorados por los servicios que proveen ya que están diseñados para abastecer alimentos, forraje, fibra, bioenergía y productos farmacéuticos. A su vez, éstos dependen fuertemente de los servicios ecosistémicos que les proveen los ecosistemas naturales, no-manejados. Los servicios de soporte incluyen biodiversidad genética para cultivos y cría de ganado, formación y estructura del suelo, fertilidad del suelo, ciclo de nutrientes y la provisión de agua. Otro servicio son los polinizadores y enemigos naturales que se mueven a los agroecosistemas desde la vegetación natural. Los ecosistemas naturales pueden además purificar el agua y regular su flujo a los sistemas agrícolas, y proveer así cantidades suficientes al tiempo adecuado para el crecimiento de las plantas. Influenciados por el manejo humano, los procesos de los ecosistemas dentro de los sistemas agrícolas pueden proveer servicios que den soporte al abastecimiento de servicios, incluyendo polinización, control de pestes, diversidad genética para futuro uso agrícola, retención de suelo, regulación de la fertilidad del suelo y el ciclo de nutrientes. Si un sistema agrícola determinado provee estos servicios que dan soporte al abastecimiento, depende

del manejo, y el manejo está influenciado por el balance entre los beneficios de corto y largo plazo. Las prácticas de manejo también influyen el potencial de deservicio de la agricultura, incluyendo la pérdida de hábitat para la conservación de la biodiversidad, la erosión de nutrientes, la sedimentación de canales navegables, y el envenenamiento con pesticidas de humanos y otras especies no objetivo. Como las prácticas agrícolas pueden dañar la biodiversidad de múltiples maneras, la agricultura se considera frecuentemente anatema para la conservación. Sin embargo, un manejo apropiado puede mejorar muchos de los impactos negativos de la agricultura, manteniendo a la vez los servicios de abastecimiento. Los agroecosistemas pueden proveer una amplia gama de otros servicios a las comunidades, entre ellos servicios culturales (e.g. belleza escénica, educación, recreación y turismo). La conservación de la biodiversidad también se puede considerar un servicio ecosistémico cultural influenciado por la agricultura, ya que la mayoría de las culturas reconocen la apreciación de la naturaleza como un valor humano explícito [3].

El aumento en el uso de agroquímicos y la intensificación de la actividad agrícola productiva del país vuelve necesario proteger los agroecosistemas para conservarlos sustentables. Por esto es prioritario monitorearlos para evaluar los impactos que la aplicación de pesticidas genera sobre el ambiente. Los monitoreos ambientales de residuos de pesticidas suelen ser muy costosos por el elevado número de sitios de toma de muestra, frecuencias de muestreo y diversidad de matrices (agua, suelo, sedimento, aire, biota) que se deben analizar para poder obtener un diagnóstico y seguimiento de una zona en estudio.

1.2. *Apis mellifera*, su colonia y colmena

1.2.1. Apis mellifera

Las abejas melíferas son insectos de la especie *Apis mellifera*, del género *Apis*, familia Apidae y orden Hymenoptera. Su carácter de especie eusocial se debe a que a nivel individual, la colonia de abejas melíferas posee tres tipos de miembros: reina, zánganos y obreras, cada uno con su especialización y lugar diferente en la sociedad de abejas [26].

La colmena es el nido de la colonia de abejas. Es una serie de panales verticales dispuestos en paralelo entre sí, compuestos por dos capas de celdas hexagonales hechas de cera producida y secretada por las abejas obreras. En las mismas la reina pone huevos y luego se desarrolla la cría, y es también donde se almacena el alimento: polen y miel [27].

Existen razas europeas e híbridos de abejas melíferas (*Apis mellifera* spp. *ligustica*, *caucasica*, y *carnica*). En África y Medio Oriente hay otras razas, en particular, la llamada “abeja asesina” es la abeja africanizada (un híbrido entre las razas europea y africana) que se ha esparcido desde Brasil por las regiones tropicales y subtropicales de América desde la introducción allí de su pariente africana *A. scutellata* en 1956. En Asia, existen otras especies, la más importante es *Apis Cerana* [28].

En particular en Uruguay, existen subespecies polihíbridas con distinto grado de africanización en las varias regiones del país. En un estudio morfométrico y genético con abejas de la región suroeste de Uruguay se demostró el origen polihíbrido de la colonia obteniéndose el haplotipo mediterráneo del norte y el análisis morfométrico mostró la probabilidad de origen africano. Se demostró además que tienen una respuesta toxicológica diferencial respecto a la abeja europea [29].

1.2.2. Ciclo de vida de las abejas melíferas

El ciclo de vida de la abeja melífera comienza con el huevo que pone la reina previamente fecundado por varios zánganos. De un huevo sin fertilizar sólo puede desarrollarse un zángano, de los huevos fertilizados se desarrolla una reina u obrera dependiendo de la alimentación que reciba la larva. Aproximadamente a los 8 días desde la postura del huevo, la larva en pleno crecimiento es sellada dentro de la celda (operculada). Culmina el desarrollo en la celda operculada pasando al estadio de pupa hasta que emerge en promedio a los 21 días el adulto de abeja obrera, 24 días el zángano, y 16 días la reina. Este proceso se encuentra ilustrado en la Figura 1.3. En promedio las abejas obreras tienen una vida de 4 a 6 semanas en verano y pueden llegar a vivir varios meses en lugares con invierno extendido. Las reinas viven entre 3 y 4 años

mientras que los zánganos generalmente mueren luego de la copulación o son expulsados antes del invierno.

Life cycle of honeybees

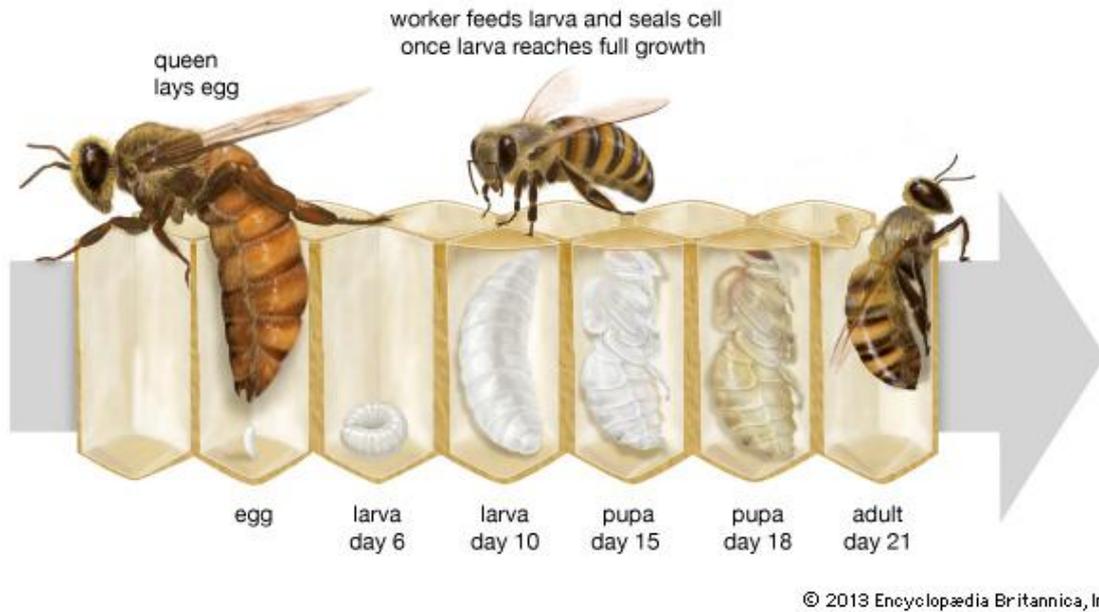


Figura 1.3 Ciclo de vida de las abejas. Ilustración tomada de Encyclopædia Britannica Online, s. v. "honeybee", octubre 14, 2016, <https://www.britannica.com/animal/honeybee>

1.2.3. Actividades de las abejas

La construcción del panal y el cuidado de la cría se deben a las necesidades biológicas fundamentales de almacenar alimentos y la reproducción. La cera de abejas es segregada por glándulas céricas ubicadas en el abdomen que sólo poseen las obreras. Estas están más desarrolladas y son más productivas en abejas de 12 a 18 días. La cera es secretada en forma de pequeñas escamas o copos de forma irregular, a temperaturas ambientales de 33 a 36 °C, luego de un alto consumo de miel o néctar. El polen o pan de abeja también tiene gran importancia en la producción de cera. Cientos de abejas participan en la construcción de una sola celda [30].

Las abejas obreras jóvenes normalmente comienzan a limpiar las celdas de las que han nacido recientemente y comienzan a alimentar la cría cuando tienen 1 día hasta

aproximadamente cuando tienen 13 días. A esta edad normalmente comienzan otras actividades como vuelos de orientación cerca de la entrada de la colmena, construcción del panal, limpieza de la cámara de cría, colocación de polen en celdas, operculación de celdas, maduración de néctar, aplicación de propóleo, recepción de néctar de las pecoreadoras que regresan del campo, ventilación de la colmena, cuidado de la reina y defensa de la colonia (hacia fines de la tercer semana). La recolección de alimento o pecoreo comienza cuando tienen aproximadamente 3 semanas, incluye la colecta de agua, néctar y polen. Las abejas de una misma edad cronológica cambian fisiológicamente con gran rapidez en respuesta a las necesidades de la colonia, por lo que según las circunstancias pueden encontrarse abejas realizando actividades que no son típicas de su edad [30].

El polen es prácticamente la única fuente de proteínas, sustancias grasas, minerales y vitaminas que son necesarias durante la producción de alimento larval y para el desarrollo de abejas recién nacidas. Después que la abeja se ha arrastrado sobre algunas flores comienza a cepillar el polen de su cabeza y las partes anteriores del cuerpo y lo transfiere al último par de patas. Finalmente el polen se transfiere al canasto de polen (corbícula) que está ubicado en la superficie exterior de la tibia trasera. Cuando la abeja está cargada vuelve a la colmena, allí mete la cabeza de celda en celda hasta elegir una celda determinada, muchas veces se encuentra en el área inmediata que circunda la cría, donde descarga el polen. Luego otra abeja empuja las pelotitas de polen hacia la base de la celda, las humedece con la saliva y le agrega miel y néctar. Las enzimas agregadas junto con la miel al empaquetar el polen en las celdas evitan el metabolismo anaerobio y fermentación. El polen almacenado de esta forma, se le conoce comúnmente como “pan de abejas” ya que está listo para ser ingerido y digerido por las abejas [26].

El néctar es un líquido dulce, secretado por los nectarios de las plantas que mayoritariamente están ubicados dentro de las flores. Se compone casi íntegramente de azúcares y agua. La abeja se posa sobre la flor, saca la probóscide hacia adelante y la inserta en la parte de la flor que acumula el néctar. La abeja necesita en general visitar más de 100 flores (dependiendo de la especie) para conseguir una carga de néctar. La pecoreadora, cargada de néctar entra en la colmena y se ubica entre otras obreras sobre el panal. En la mayoría de los casos distribuye la carga entre 3 o más abejas domésticas. A medida que es mayor el número de abejas involucradas en la transferencia del néctar

antes de ser almacenado en la celda, mayor es el grado de deshidratación o maduración que adquiere la miel y mayor es el contenido de enzimas secretadas o procedentes del néctar, entre las cuales se encuentran principalmente la catalasa, fosfatasa ácida, diastasa, invertasa y glucosa-oxidasa [31].

En la elaboración de la miel a partir del néctar, se incluyen dos procesos diferentes: uno químico y otro físico. El químico es debido a la acción de la enzima invertasa (secretada en las glándulas hipofaríngeas de las obreras que se agrega al néctar en el buche melario) la sacarosa se transforma en la colmena en glucosa y fructosa. El físico es el proceso mediante el cual las obreras eliminan el excedente de agua por evaporación. Una vez “madura” la miel es sellada dentro de las celdas con opérculos producidos con cera. El alto contenido total de azúcares en la miel no permite que se desarrollen levaduras, además junto con la glucosa oxidasa le da a la miel propiedades antimicrobianas por lo que la miel puede ser almacenada a salvo del deterioro. Por último la miel finalmente procesada ocupa menos espacio en la colonia [32].

El agua se recolecta y utiliza principalmente en la dilución de miel para alimento de larvas y enfriado y humidificación del interior de la colmena. Las abejas nodrizas necesitan agua siempre que tengan que aguar la miel al preparar el alimento larval. Cuando hay néctar fresco se usa sin diluir en la alimentación de la cría. La abeja aguatera distribuye su carga a varias abejas al llegar a la colmena. El agua la depositan en la colmena, en las celdas con huevos y larvas y sobre las de cría operculada. Esta agua al evaporarse tiene efecto refrescante y también provee la humedad necesaria a las larvas [30].

Las recolectoras de propóleo al encontrar una fuente lo raspan con las mandíbulas y lo transfieren al cesto de polen; al llegar a la colmena otra abeja se lo descarga. Mientras aplica propóleo, la abeja “cementadora” puede mezclarlo con cera [26].

1.2.4. *Composición química de los materiales de la colmena*

La fructosa y la glucosa son los carbohidratos predominantes en la miel, sin embargo, más de 20 di- y oligosacáridos han sido identificados, entre los más frecuentes la maltosa, seguida por la kojibiosa. La composición de disacáridos depende ampliamente del origen botánico de la miel, mientras que los efectos geográficos y estacionales son despreciables. El contenido de sacarosa varía apreciablemente con el estado de maduración de la miel [33]. En la miel los ácidos orgánicos representan menos de 0,5% de la composición total, sin embargo, se correlacionan con diferentes parámetros fisicoquímicos, sensoriales y melisopalinológicos que permiten referenciarlos como marcadores del origen botánico y geográfico [34].

El principal ácido orgánico en la miel es el ácido glucónico, el cual resulta de la actividad de la enzima glucosa oxidasa. Otros ácidos presentes en la miel solamente en pequeñas cantidades son: acético, butírico, láctico, cítrico, succínico, fórmico, maleico, málico y oxálico. La acidez es un indicador cuantitativo del contenido de ácidos orgánicos presentes en la miel que se encuentran en equilibrio con sus lactonas y con algunos iones inorgánicos (fosfatos, sulfatos, cloruros y nitratos). El origen de estos ácidos se debe principalmente a las reacciones enzimáticas que tienen lugar durante la maduración y almacenamiento del producto [34].

Se ha demostrado que los productos apícolas sirven como una fuente natural de antioxidantes: siendo los responsables de esta actividad flavonoides (crisina, pinocembrina, pinobanksina, quercetina, kampferol, luteolina, galangina, apigenina, hesperetina, miricetina), ácidos fenólicos (cafeíco, cumárico, ferúlico, elágico, clorogénico), entre otros. La cantidad de estos componentes varía ampliamente de acuerdo al origen floral y geográfico. Adicionalmente, el procesamiento, manejo y almacenamiento puede influenciar su composición [35].

El polen está compuesto principalmente por lípidos y proteínas [36,37]. El polen contiene lípidos en concentraciones variables, sobre todo dependiendo de si su origen son plantas anemófilas (polinizadas por el viento) o entomófilas (polinizadas por insectos): estas últimas son más ricas en contenido de lípidos. Los lípidos en el polen pueden variar entre el 1 y 20% del peso seco total [38]. Contiene los 7 complejos de vitaminas B (biotina, ácido fólico, niacina, ácido pantoténico, piridoxina, riboflavina y tiamina), que son esenciales para los insectos en general, además del inositol y el ácido ascórbico. Las proteínas simples y complejas del polen son cerca de 20 al 30%.

Contiene prolina e hidroxiprolina, así como todos los aminoácidos esenciales y semi-esenciales. La fracción proteica del polen contiene cantidades notables de enzimas, especialmente amilasa, invertasa, fosfatasas, tranferasas así como factores coenzimáticos, como biotina, glutatión y ciertos nucleótidos [37].

La cera de abeja es una mezcla muy compleja de compuestos lipofílicos. Aproximadamente el 65% está compuesto por mono-, di- y tri-esteres de alcoholes alifáticos de cadena larga con ácidos grasos o ácidos grasos hidroxilados. Los ácidos grasos libres, mayoritariamente C26 y C30, e hidrocarburos de cadena larga representan aproximadamente 12% cada uno. Otros componentes de la cera incluyen ácidos grasos hidroxilados, alcoholes alifáticos libres y carotenoides [39,40]. Se han identificado además 50 componentes del aroma [41]. En un estudio reciente se reportó por primera vez la presencia en cera de palmitato y oleato monoésteres esterificados con 1-octadecanol y 1-eicosanol [42].

1.3. Bioindicadores y biomonitores del ambiente

Un bioindicador es un organismo (o parte de un organismo o una comunidad de organismos) que contiene información sobre la calidad del ambiente (o una parte del ambiente). Un biomonitor, por otra parte, es un organismo (o una parte de un organismo o una comunidad de organismos) que contiene información sobre aspectos cuantitativos de la calidad del ambiente. Un biomonitor es siempre un bioindicador a la vez, pero un bioindicador no necesariamente cumple con los requisitos para ser biomonitor. El biomonitoreo activo se realiza cuando los bioindicadores (biomonitores) criados en laboratorio se exponen en una forma estandarizadas en el campo por período definido de tiempo. Al final de esta exposición se registran las reacciones provocadas o se analizan lo xenobióticos que incorporó el organismo. En el caso del biomonitoreo pasivo se examinan las reacciones de los organismos que se encuentran naturalmente en el ecosistema. Los efectos que muestran los organismos (o comunidades) incluyen cambios en su estructura morfológica, histológica o celular, en sus procesos metabólicos-bioquímicos, su comportamiento o dinámica poblacional [43].

Los biomarcadores son parámetros biológicos medibles a nivel genético, enzimático, fisiológico, morfológico en el cual cambios estructurales o funcionales indican influencias ambientales en general y la acción de contaminantes en particular, en términos cualitativos y a veces también cuantitativos [44].

Un bioindicador, biomonitor o biomarcador ambiental debe ser capaz de registrar aquellos cambios en un determinado ambiente que alteren su performance vital. Es una relación biunívoca entre el organismo y el ambiente y por lo tanto, se deben elegir bioindicadores que sean sensibles a los fenómenos y a los cambios en el ambiente que se quieren monitorear. El principio consiste en observar los efectos biológicos, individualmente o en las poblaciones de diferentes ecosistemas frente a estímulos externos que se introducen en su ambiente natural. Estos efectos deben ser medibles a través de la observación de diversos grados de alteraciones morfológicas, modificaciones del comportamiento, cambios en los tejidos particularmente en su fisiología (crecimiento y reproducción), en su composición química, lo que, en casos extremos, lleva a la muerte de estos individuos o a la desaparición de una población. Es decir, un bioindicador se considera la especie que responde a condiciones ambientales específicas, por lo que se puede utilizar como indicador del estado de salud del ambiente es decir, la sanidad/fitness del indicador, es la sanidad del ambiente. Como bioindicadores se pueden usar grupos de organismos, un organismo en particular, así como alguna de sus partes o procesos biológicos, por los que se puede obtener información sobre una parte o el conjunto del ambiente [43].

1.4. Las abejas melíferas y la colmena como bioindicador ambiental

Los polinizadores son bioindicadores como individuos y como poblaciones que pueden ser usados para monitorear el estrés ambiental causado por competidores introducidos, enfermedades, parásitos, predadores tanto como factores químicos y físicos, en particular, pesticidas y modificaciones de hábitat. Las abejas melíferas son útiles como muestreadoras del ambiente en el que son mantenidas y han sido usadas para evaluar contaminación atmosférica y de otros tipos [26].

El uso de abejas melíferas para monitoreo ambiental data de 1961 cuando Svoboda reportó las repercusiones negativas de los contaminantes industriales en abejas que pecoreaban en áreas densamente pobladas e industrializadas de Checoslovaquia [45].

Las abejas son buenos indicadores biológicos porque revelan la impronta química del ambiente en el que viven a través de 2 señales: una más evidente, que es la alta mortalidad, y otra no tan clara, que consiste en los residuos de contaminantes presentes en sus cuerpos o productos de la colmena que pueden ser detectados mediante análisis de laboratorio adecuados. La efectividad de las abejas melíferas como un detector ecológico se fundamenta en varias características etológicas y morfológicas:

- organismo fácil de reproducir, casi ubicuo con requerimientos alimentarios modestos;
- cuerpo cubierto de pelos, lo que lo hace apto para mantener los materiales y sustancias con las que se pone en contacto;
- alta sensibilidad a la mayoría de los productos fitofarmacológicos;
- muy alta tasa de reproducción y tiempo de vida relativamente corto, lo que hace que la colonia se regenere rápida y continuamente;
- gran movilidad y rango de vuelo que permite monitorear una vasta área;
- alta eficiencia en relevamiento del terreno (numerosas inspecciones por día);
- casi todos los compartimentos ambientales son muestreados (suelo, vegetación, agua y aire);
- provee numerosos indicadores (a través del pecoreo) para cada colmena;
- transporta una variedad de materiales a la colmena (néctar, polen, propóleo y agua) donde se almacenan

Una colmena de tamaño promedio puede consistir de unos 20.000 individuos y según la época del año puede hasta duplicarse. Cada abeja pecoreadora hace un promedio de 10 viajes por día, visitando un total de unas 1.000 flores de las que liba néctar y obtiene polen. Por lo tanto se puede estimar que una colonia colecta aproximadamente 10

millones de micro muestras de néctar y polen por día además de otras sustancias como propóleo y agua. Todo esto confluye a la colmena donde se almacena. El pecoreo incesante normalmente ocurre dentro de unos pocos cientos de metros de las colmenas. Sin embargo, si el alimento es escaso, las pecoreadoras son capaces de viajar hasta kilómetros buscando alimento de suficiente calidad. También puede percibir rápidamente cualquier tendencia o cambios que ocurran en el ambiente que habita y los muestra con igual apresto.

A pesar de estas buenas cualidades, las limitaciones para usar las abejas como bioindicadores ambientales son:

- La temperatura que debe ser mayor a 10 °C para que vuelen, consecuentemente a ciertas latitudes no pueden ser usadas en invierno;
- Las pecoreadoras pueden no regresar todas a la colmena: algunas pueden desorientarse y terminar en otras colmenas, morir naturalmente o morir por pesticidas u otros xenobióticos;
- Es difícil de censar en tiempo real una colonia entera en términos de estado de desarrollo y edad de sus miembros;
- Las colonias tienen una tendencia incontrolable de elegir sus fuentes de alimentos de manera autónoma [46].

Las abejas interactúan fuertemente con el ambiente que las rodea colectan agua y productos vegetales que contienen distintos compuestos químicos que luego depositan y concentran en la colmena. La sensibilidad del sistema nervioso de la abeja hace que dosis subletales de agroquímicos lo afecten y con esto, se afectan los parámetros biológicos de funcionamiento general de la colmena [47-49].

Por lo tanto, el monitoreo cuidadoso de estos parámetros podría constituir un bioindicador valioso sobre el estado de contaminación de una región. La colmena es sensible a gran cantidad de factores, como la época del año, el clima, la disponibilidad de recursos nutricionales, las enfermedades y los agroquímicos. Es por eso que para poder establecer a la colmena como indicador, debe controlarse su estado basal de manera estricta. Se ha evaluado el uso de la inhibición de la actividad de esterasas en abejas melíferas como bioindicadores de residuo del insecticida tiametoxan [50].

1.4.1. Experiencias de monitoreo ambiental utilizando colonias de abejas melíferas

Las abejas melíferas y los productos de la colmena han sido estudiados como indicadores de calidad ambiental en varios estudios. En Italia, se han utilizado estaciones de monitoreo que consisten en sets de dos colmenas con trampas de mortalidad ubicadas en distintos agroecosistemas, cuando se excede un límite establecido de mortalidad ahí se realiza análisis químico en las abejas muertas para identificar el ingrediente activo responsable [46,51]. Esta interesante estrategia de biomonitoreo usando abejas da información sobre los compuestos tóxicos, principalmente insecticidas con baja DL_{50} , pero excluye información sobre los pesticidas presentes en concentraciones subletales. En un estudio reciente se incorporaron estimaciones de fortaleza de la colmena a la investigación [52].

Un estudio realizado en áreas agrícolas de Grecia, indica que se puede derivar información útil sobre la ocurrencia y distribución de residuos de pesticidas debido a tratamientos de protección de cultivos, del análisis de muestras de miel aleatoriamente colectadas, usadas como bioindicadores. Además muestra que muy a menudo los compuestos químicos usados por los apicultores dentro de las colmenas para controlar las enfermedades de las abejas son los principales contaminantes de la miel producida [53].

Por otra parte, en una evaluación de matrices de colonias de abejas, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) para monitorear presencia de pesticidas en Francia continental se concluye que dado los resultados (máxima frecuencia de presencia) y aspectos prácticos (fácil de coleccionar, perdura en el tiempo, a diferencia de las abejas que se renuevan naturalmente), las cargas de polen fueron la mejor matriz para evaluar la presencia de residuos de pesticidas en el ambiente dadas sus condiciones [54]. En un estudio posterior se realiza una evaluación utilizando cargas de polen coleccionado usando trampas colocadas a la entrada de la colmena durante una semana, cuatro veces al año, los resultados obtenidos en este estudio fueron los que se detallan a continuación. Se encontraron residuos de 19 compuestos hasta en un 50% de las muestras. Cumafos y tau-fluvalinato fueron los más concentrados (promedio 925,0 y 487,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente). Así mismo residuos de fipronil y sus metabolitos fueron encontrados en 16 muestras. También se detectaron residuos de imidacloprid y ácido 6-cloronicotínico en 69% de las muestras a

concentraciones de 1,1 a 5,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y 0,6 a 9,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ [55]. Es de destacar que una semana es el máximo período que se recomienda que estas trampas permanezcan instaladas ya que impiden la provisión de polen a la colonia dado que solo pasan las abejas dejando la carga de polen colectado en la trampa en la entrada de la colmena. Por lo tanto, la información obtenida proviene exclusivamente de las especies que las abejas pudieron visitar durante esa semana.

En otro estudio realizado también en Francia en distintas condiciones que el anterior, durante 2008-2009, se pudo concluir que las abejas melíferas, mieles y polen son centinelas apropiados para monitorear contaminación ambiental por pesticidas y drogas veterinarias. Este reporte revela la presencia ampliamente distribuida de múltiples residuos en matrices de la colmena y sugiere un potencial problema con los efectos de estos residuos por separado o combinados sobre la salud de las abejas. En particular, el 95,7% de las muestras de miel, el 72,3% de abejas y el 58,6% de polen estaban contaminadas con al menos un compuesto. La frecuencia de detección fue mayor en las muestras de miel (n=28) que en las de polen (n=23) o abejas (n=20), pero las concentraciones más altas se encontraron en polen. A pesar de que la mayoría de los compuestos rara vez se encontraban, algunos de los contaminantes alcanzaron concentraciones altas que podrían llevar a efectos adversos en la salud de las abejas. Los tres residuos más frecuentes fueron los ampliamente utilizados, el fungicida carbendazim y los dos acaricidas amitraz y cumafos, que se usan por los apicultores para controlar *Varroa destructor*. Los apiarios en ambientes rurales de cultivos estaban más contaminados que los de otros ambientes, pero las diferencias no fueron significativas. La contaminación de las distintas matrices fue mayor en el principio de la primavera que en los demás períodos [56].

Recientemente en un monitoreo en Egipto, se informaron hallazgos de residuos de pesticidas organoclorados y piretroides sintéticos en miel y fueron evaluados como indicadores de contaminación ambiental [57].

Se han realizado, especialmente en Europa y Estados Unidos, varios estudios y monitoreos de apiarios donde se han hallado diversos pesticidas, fundamentalmente insecticidas [14,58].

En Francia Chauzat *et al.* en 2009 reportaron que en un monitoreo a campo de 3 años entre 2002 y 2005, utilizando un método multiresiduo de más de 30 pesticidas, por

apiario, por período de muestreo (cuatro períodos por año) se encontraron residuos de hasta 9 pesticidas, encontrándose la mayoría en la cera. Las concentraciones halladas estuvieron en el rango 1-300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ [58,59].

De la misma manera en un estudio realizado en Estados Unidos se comprobó que entre el 80 y el 100% de las muestras de cera, polen y abeja monitoreadas y analizadas durante 2007 y 2008 contenían pesticidas [60,61].

Se ha reportado ampliamente la ocurrencia de residuos de pesticidas en abejas o productos de la colmena [62-76]. En un estudio en Grecia se analizaron residuos de pesticidas en muestras de abejas, polen y miel con el objetivo de investigar casos reportados de incidentes de mortalidad de abejas con respecto a la potencial interrelación con la exposición a pesticidas. Se buscaron residuos de neonicotinoides, organofosforados, triazoles, carbamatos, dicarboximidias y dinitroanilinas. Se encontraron 14 sustancias activas en total con concentraciones en el rango 0,3 a 81,5 ng g^{-1} en abejas, 6,1 a 1273 ng g^{-1} en polen y una muestra positiva de carbendazim a 1,6 ng g^{-1} [66].

En un artículo de revisión de Bogdanov, 2006 se reportan distintos contaminantes provenientes del ambiente y de los agroecosistemas en productos de la colmena: miel, polen, cera, propóleo y jalea real. De los contaminantes de origen ambiental se recopiló información sobre metales pesados: Pb, Cd y Hg, isótopos radioactivos, contaminantes orgánicos, pesticidas (insecticidas, fungicidas, herbicidas y bactericidas), bacterias patógenas y organismos genéticamente modificados. Los contaminantes de origen apícola son principalmente acaricidas: compuestos sintéticos lipofílicos y sustancias no tóxicas como ácidos orgánicos y componentes de aceites esenciales, así como antibióticos usados para el control de enfermedades de la cría, principalmente tetraciclinas, estreptomicina, sulfonamidas y cloranfenicol. Otras sustancias usadas en apicultura tienen un rol menos importante como por ejemplo el *p*-diclorobenceno y los repelentes químicos. De este relevamiento bibliográfico realizado se puede concluir que en todos los estudios reportados se encontraron residuos de pesticidas, muchas veces en el 50% o más de las muestras analizadas y más de un compuesto por muestra. Los residuos de organoclorados y organofosforados en muestras de miel reportados estuvieron en el rango 0,001 y 6 mg kg^{-1} . Residuos de imidacloprid en miel, néctar o polen se encontraban en el rango 0,001 a 0,005 mg kg^{-1} . Residuos de insecticidas microencapsulados como paratión metil fueron reportados en miel y polen y de fungicidas en miel en rangos desde trazas a 0,11 mg kg^{-1} .

En varios estudios de los revisados se encontraban residuos a mayor concentración en polen que en miel. Los residuos de herbicidas se encontraron más en abejas y polen y solo raramente en miel [77].

En un estudio realizado en Colombia en mieles se reportaron residuos de clorpirifos, profenofos, dicloro difenil tricloroetano (DDT), hexaclorobenceno (HCB), hexaclorociclohexano (HCH) y fenitrotion donde sólo el 4,9% de las muestras excedieron los Límites Máximos de Residuos (LMRs) establecidos en la Regulación (EC) No. 396/2005 del parlamento europeo. Los autores establecen que de acuerdo con los resultados es muy probable que la contaminación de miel producida en las regiones de Colombia del estudio sea causada por las prácticas agrícolas que se desarrollan en los ambientes en los que están instalados los apiarios [71].

En Polonia en 2013 se realizó un monitoreo donde se midieron los niveles de concentración de 30 residuos de pesticidas en muestras de miel recogidas de las colmenas en el norte de Polonia (Pomerania), utilizando el método QuEChERS seguido por espectrometría de masas en tandem con cromatografía líquida con ionización por electrospray (LC-MS/MS). En 29% de las muestras analizadas se encontraron positivos para al menos algunos de los compuestos diana. La concentración de bifentrina, fenpiroximato, metidatión, espinosad, tiametoxam, y triazofos superó los LMRs en cinco muestras (11%). El tipo de los residuos encontrados se correlaciona con las prácticas agrícolas en la región. Los valores máximos de estos pesticidas fueron 14,5, 16,3, 25,7, 20,6, 20,2 y 20,3 ng g⁻¹, respectivamente. Profenofos fue el pesticida más abundante a concentraciones que variaron desde niveles menores al límite de cuantificación hasta 17,2 ng g⁻¹[78].

Blasco *et al.* 2004 realizaron un estudio donde analizaron muestras de miel comerciales provenientes de España y Portugal. Catorce muestras de Valencia, España estaban contaminadas, con restos de HCB y/o isómeros de HCH. La frecuencia de detección fue de 56% para estas muestras. De las muestras de origen portugués se comprobó que 23 de ellas estaban contaminadas, lo que significa un 95,8% del total. En las muestras españolas, las concentraciones variaron desde niveles menores al límite de detección (LOD) a 0,03 mg kg⁻¹ para el HCB, y desde niveles menores al LOD a 2,24 mg kg⁻¹ para HCH-total. La concentración media y la desviación estándar fueron 0,017 ± 0,011 mg kg⁻¹ para el HCB, y 0,579 ± 0,747 mg kg⁻¹ de HCH-totales, con la mayor contribución del isómero γ . Las

muestras de Portugal mostraron niveles más altos. Los niveles de HCB variaron de <LOD a $0,39 \text{ mg kg}^{-1}$. La suma de -HCH totales varió de $4,86 \text{ mg kg}^{-1}$ a <LOD, mientras que el DDT total registró variaciones desde niveles <LOD a $0,658 \text{ mg kg}^{-1}$. La concentración y la desviación estándar promedio fueron de $0,09 \pm 0,116 \text{ mg kg}^{-1}$ para el HCB, $1,357 \pm 1,30 \text{ mg kg}^{-1}$ para el HCH-total y $0,143 \pm 0,193 \text{ mg kg}^{-1}$ para el DDT total respectivamente [79].

Hasta el momento del desarrollo del presente trabajo los estudios realizados en nuestro país habían sido muy escasos, se contaba con dos estudios publicados. Uno de ellos es un reporte en el que se encontraron residuos de pesticidas (fipronil, imidacloprid, endosulfan, cumafos, cipermetrina, etion y clorpirifos) en apiarios uruguayos [80]. El otro estudio fue realizado en esteros de farrapos y encontraron residuos de endosulfan en cera y abejas y de cipermetrina y cialotrina en abejas muertas [81].

1.5. Familias especialmente relevantes de pesticidas

Existen más de 900 sustancias activas que son comercializadas como pesticidas en diversos tipos de formulaciones. Estas sustancias se clasifican de diversas maneras, por ejemplo, según la plaga a la que están dirigidas se clasifican como herbicidas, fungicidas e insecticidas. Otra clasificación es según su estructura química, se dividen en más de 100 clases químicas, encontrándose las benzoilureas, triazoles, estrobilurinas, neonicotinoides, carbamatos, organofosforados, organoclorados, piretroides, sulfonilureas y triazinas, entre las familias más importantes [82,83].

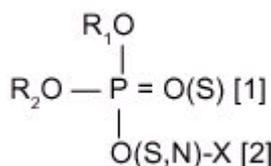
De acuerdo a los hallazgos reportados en la literatura se describen a continuación las principales familias de pesticidas de relevancia para las abejas.

1.5.1. Organofosforados

Los organofosforados son los pesticidas que más se reportan como hallazgos en productos de la colmena, por ejemplo clorpirifos, dimetoato y cumafos. En particular, cumafós es una acaricida organofosforado ampliamente utilizado en nuestro país y el mundo para el control de varroasis y es comúnmente reportado en la literatura;

clorpirifos es el insecticida más detectado en colmenas en EEUU [84] y está dentro de los más detectados en abejas en Italia [85], y España [86]. Los organofosforados son sustancias orgánicas derivadas de la molécula del ácido fosfórico.

Sustituyentes R1 o R2:
alquílica,



radicales alquilo. X: cadena
aromático o heterociclo.

Son inhibidores de la
fosforilada no

acetilcolinesterasa, la enzima
hidroliza a la acetilcolina, ésta se

acumula en el espacio sináptico, el impulso nervioso continúa más tiempo, quebrantando así el control motor, el insecto se hiperexcita y muere.

El paratión metil es un insecticida organofosforado utilizado en Uruguay para proteger una variedad de cultivos como la producción hortofrutícola, (manzanas, peras y ciruelas) de diferentes insectos. Sólo está autorizado para ser utilizado como microcápsulas [87]. Las microcápsulas se preparan por recubrimiento del pesticida con un polímero que se disipa fácilmente con el tiempo, liberando el pesticida para el ambiente. Las estructuras de los pesticidas organofosforados mencionados anteriormente se muestran en la Figura 1.4.

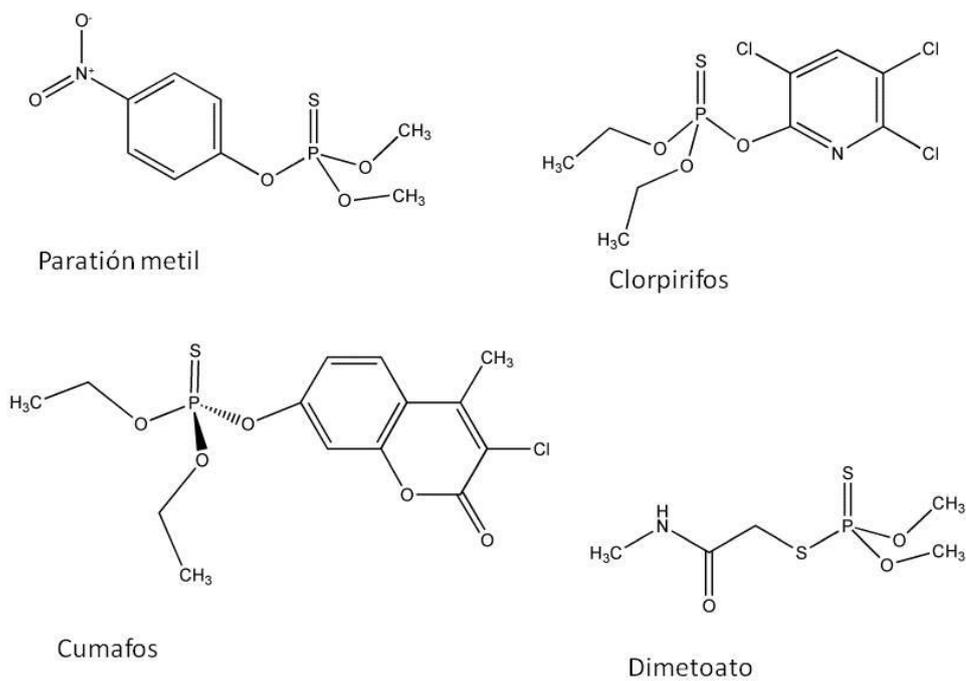


Figura 1.4 Estructuras de ejemplos de pesticidas organofosforados

1.5.2. Piretroides

La mayoría son ésteres de ácidos carboxílicos. Los ciclopropanos deben tener la configuración 1R. El grupo gem dimetilo o un espiro son importantes mientras que la configuración en C3 no es crítica. Los más comúnmente utilizados para el control de insectos plaga del cultivo de soja son cipermetrina, cihalotrina y ciflutrina, cuyas estructuras se muestran en la Figura 1.5.

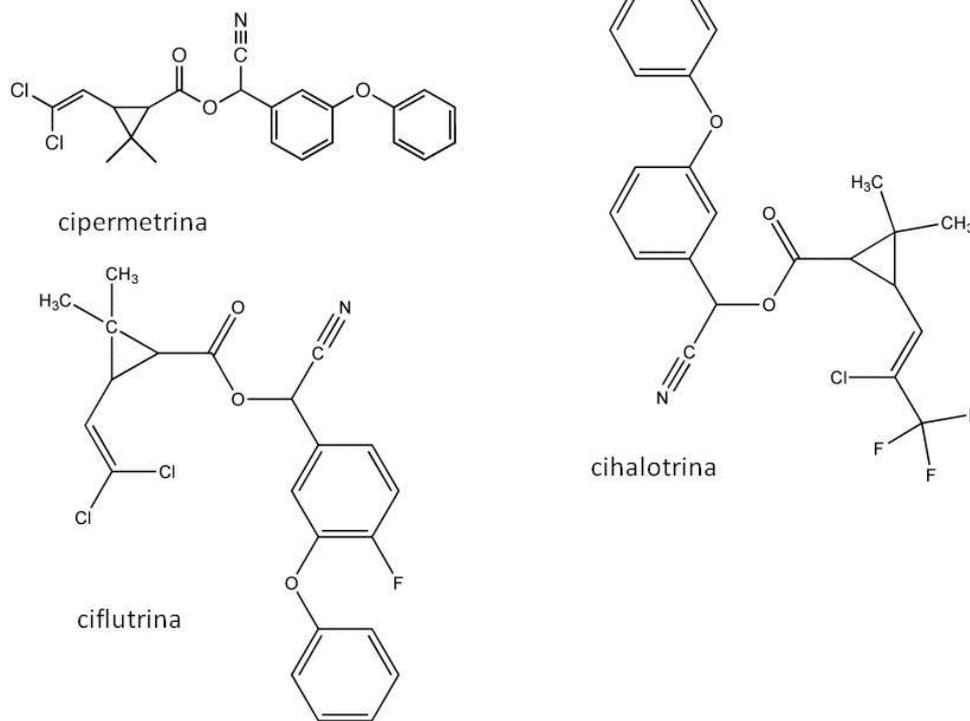


Figura 1.5 Estructuras de ejemplos de insecticidas piretroides

Modifican el canal de Na^+ de la membrana nerviosa produciendo una alteración en la transmisión del impulso nervioso. Prolongan la corriente que fluye por los canales de Na^+ haciendo más lento o impidiendo el cierre de los canales, generando una transmisión continua del impulso nervioso. Tienen un importante efecto *knockdown* rápido en los insectos. Los piretroides son metabolizados por enzimas (esterasas, oxidasas, hidroxilasas) del citocromo P450 [57].

1.5.3. Estrobilurinas

Las estrobilurinas son una de las clases más importantes de fungicidas agrícolas. Su invención fue inspirada por un grupo de productos naturales con actividad fungicida, son derivados de mucidina. El producto natural, estrobilurina A fue aislado del *Strobilium tenaceus*. Se lanzaron al mercado en 1996, incluyen el fungicida de mayor

Se lanzaron al mercado en 1996, incluyen el fungicida de mayor venta en el mundo: azoxistrobin [88].

Los ejemplos de estrobilurinas azoxistrobin, trifloxistrobin y piraclostrobin se muestran en la Figura 1.6.

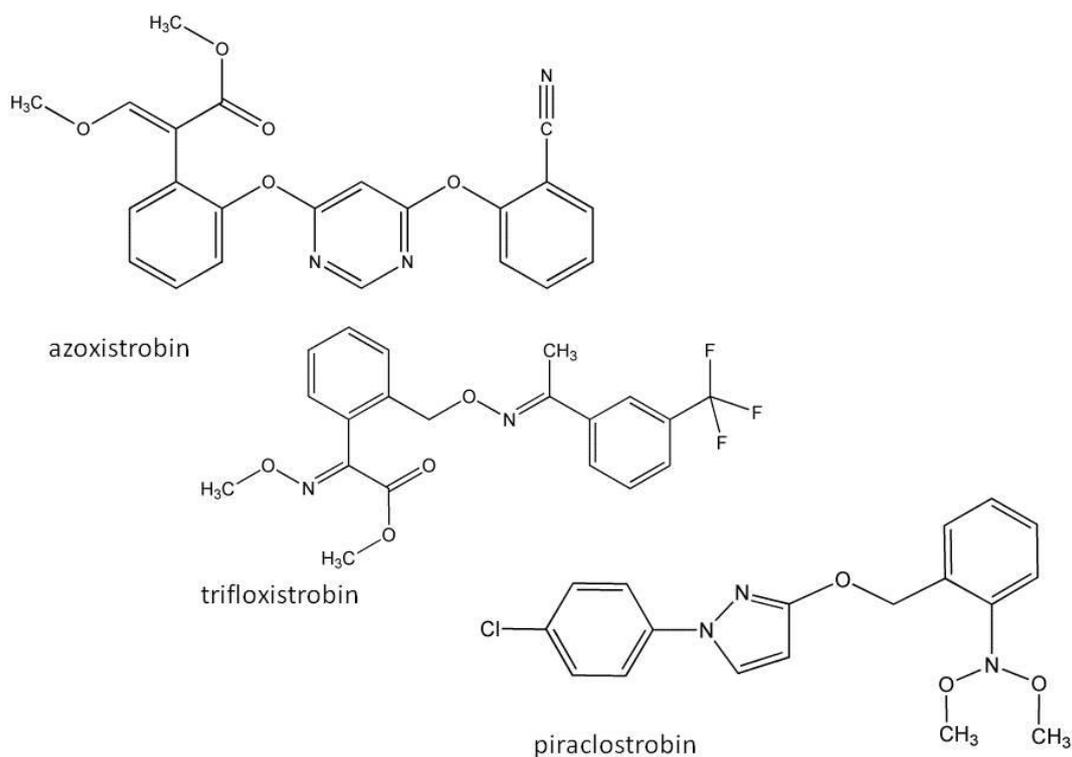


Figura 1.6 Estructuras de ejemplos de fungidas estrobilurinas

Se utilizan en cereales, soja, viñedos, papa, durazno, arándanos, citrus, nueces, morrón, zanahoria, tomate, ajo entre otros.

Afectan la función mitocondrial uniéndose al sitio específico de citocromo *c* reductasa, inhiben la respiración celular (transferencia de electrones). Pertenecen al grupo de los inhibidores QoI o inhibidores de la quinona.

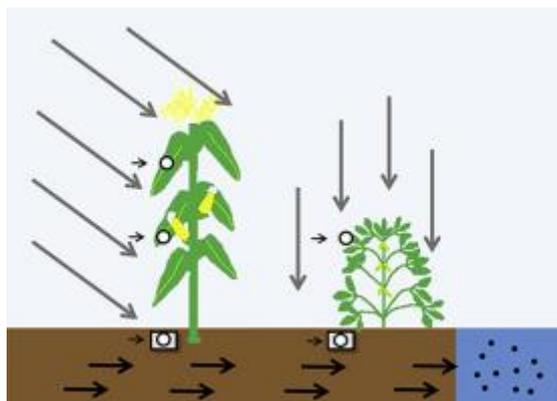


Figura 1.7 Imagen tomada de Edwards et al. *Chemosphere* (2016) 146: 450–457

En la Figura 1.7 se esquematiza un estudio reciente del destino ambiental y transporte de azoxistrobin y propiconazol. Este estudio se realizó debido a su presencia en aguas superficiales en Estados Unidos. Se encontró que tuvieron una persistencia en suelo de hasta 301 días con el pico de máxima concentración aproximadamente 30 días después de la aplicación. El modo de transporte predominante para estos compuestos fue por escorrentía, con la mayoría de los principios activos con actividad fungicida dejando el área objetivo en el primer evento de lluvia luego de su aplicación [89].

1.5.4. Neonicotinoides

Durante los últimos años se le ha prestado gran atención al riesgo que tienen los pesticidas para las abejas, particularmente los neonicotinoides [90]. Estos químicos imitan el neurotransmisor acetilcolina y son altamente neurotóxicos para los insectos. En la Figura 1.8 se muestran las estructuras químicas de los compuestos más utilizados de esta familia.

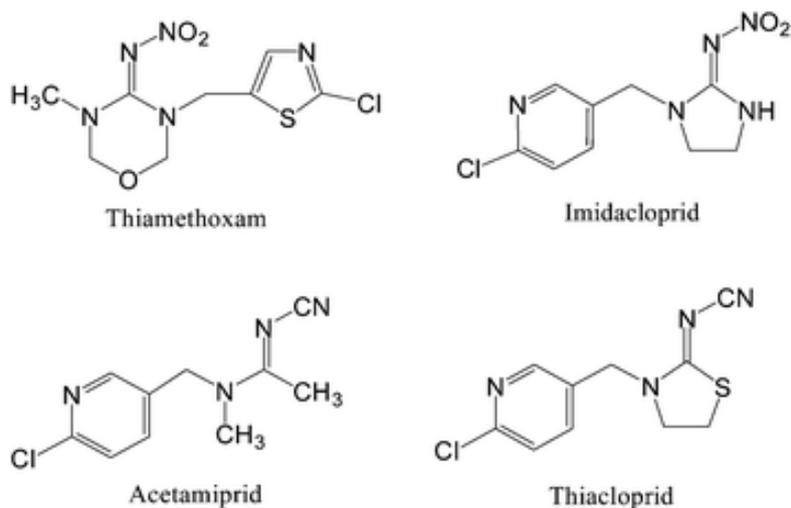


Figura 1.8 Estructuras químicas de tiametoxan, imidacloprid, acetamiprid y tiacloprid.

Su modo de acción sistémico (son transportados por el xilema) los hacen translocarse al polen y néctar. Su amplia aplicación, la persistencia en el suelo y el agua y el potencial de ser absorbidos por los siguientes cultivos y plantas silvestres hacen que los neonicotinoides estén biodisponibles a los polinizadores en concentraciones subletales durante la mayor parte del año [91]. Los insecticidas neonicotinoides afectan la movilidad de las abejas induciendo síntomas como, temblores, movimientos descoordinados e hiperactividad. Su efecto *knockdown* no es tan pronunciado y por eso es común su formulación con piretroides [92-95]. Estos síntomas son fáciles de observar a niveles de exposición altos, siendo más complejo de observar el efecto de dosis menores.

A dosis reales de campo, los neonicotinoides causan un amplio rango de efectos subletales adversos en colonias de abejas y abejorros, afectando la performance de la colonia al afectar la habilidad para pecorear exitosamente, la cría, el desarrollo larvario, la memoria y aprendizaje, daño en el sistema nervioso central, susceptibilidad a enfermedades, higiene de la colmena y la afectación del reflejo de la extensión de la probóscide luego de la percepción de sacarosa o agua [49,96-100].

Sin embargo, los distintos estudios de semi campo dan una paleta de resultados mixtos. Cutler y Scott-Dupree (2007) [101] reportaron que no había efectos secundarios en abejas pecoreando cuando las colmenas fueron expuestas a un cultivo de canola en flor cultivado a partir de semillas tratadas con clotianidin. Se llegó a la misma conclusión para imidacloprid [102-104], pero para tiacloprid el pecoreo solo se redujo hasta las 48 hs luego

del tratamiento [105].

Claramente existe una discrepancia entre las evaluaciones a campo y en el laboratorio de efectos subletales. Decourtye y Devillers (2010) documentaron que esto se debe a la habilidad de las abejas para cambiar su comportamiento en respuesta a la percepción del pesticida [97]. Las abejas rechazaron una solución de sacarosa contaminada con 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de imidacloprid, lo que resultó en una reducción significativa de la actividad de pecoreo [106]. Este comportamiento puede reducir el riesgo de exposición a pesticidas y sus efectos pero por otra parte contribuyó a la disminución en la aptitud general de las abejas en un 6-20%, como se dedujo de datos de performance ajustados estadísticamente [107].

Los neonicotinoides exhiben una toxicidad que puede ser amplificada por varios otros agroquímicos y sinérgicamente refuerzan agentes infecciosos como *Nosema ceranae* que en conjunto pueden producir el colapso de la colonia. Los limitados datos disponibles sugieren que probablemente exhiban una toxicidad similar a virtualmente todas las demás clases de insectos polinizadores [91, 108-112].

Las aplicaciones foliares de combinaciones de neonicotinoides con piretroides son comúnmente usadas para controlar chinches (Hemiptera: Pentatomidae) en soja (*Glycine max*) [113]. Esta plaga es considerada una de las principales del cultivo de soja en varias partes del mundo [114]. Las altas dosis requeridas debido a la baja susceptibilidad de las chinches y el amplio espectro de acción de los productos comúnmente usados, causan impacto en especies no objetivo como abejas y polinizadores naturales, los cuales, si no hubiesen sido afectados podrían aumentar la productividad de la soja [115, 116].

Los efectos de dosis subletales de acetamiprid y tiametoxan en el comportamiento de las abejas fueron investigados encontrando que tiametoxan no tiene efecto en las condiciones del experimento y que acetamiprid presentaba una cierta vulnerabilidad [49]. Recientemente, la toxicidad aguda de pesticidas a escalas de semi-campo y campo sobre las especies *A. cerana* y *A. mellifera* fue estudiada. Se encontró que acetamiprid y endosulfan eran más seguros que los demás insecticidas ensayados y no causaban ningún efecto repelente en abejas en pruebas a campo, mientras que tiametoxam (entre otros) fue muy tóxico [117].

En un estudio realizado durante 2012-2013 para estudiar la exposición subletal de neonicotinoides a las abejas se observó que cuando eran expuestas tanto a imidacloprid

como a clotianidin a la dosis de 0,73 ng por abeja por día durante 13 semanas consecutivas de julio a setiembre 2012, seis de las doce colonias tratadas con neonicotinoides previamente saludables, murieron y todas exhibieron síntomas del síndrome del colapso de las colonias (Colony Collapse Disorder, CCD, por sus siglas en inglés) durante los meses de invierno [118]. Adicionalmente, es importante considerar que los neonicotinoides pueden presentar efectos sinérgicos en combinación con fungicidas del grupo de los triazoles porque modifican el metabolismo del citocromo P450 aumentando la toxicidad de los mismos [105,119,120]. También ha sido reportado que aumentan el impacto de patógenos, en particular, se ha estudiado el mecanismo molecular por el cual clotianidin afecta adversamente la respuesta inmune y promueve la replicación de un patógeno viral en abejas dando infecciones encubiertas [121].

Aunque los niveles de residuos ambientales de neonicotinoides encontrados han sido menores que los niveles de toxicidad aguda y crónica, aún existe una falta de datos confiables porque la mayoría de los análisis fueron realizados cerca del límite de detección y sólo para algunos cultivos [106]. Luego de un tratamiento tópico en abejas, los neonicotinoides que contienen un grupo nitro tales como imidacloprid, clotianidin, tiametoxan, nitenpiram y dinotefuran fueron más tóxicos que los que contienen un grupo ciano como acetamiprid y tiacloprid [15]. Esta menor toxicidad se puede atribuir a su rápida biotransformación [122,123] y a la existencia de distintos subtipos de receptores nicotínicos de la acetilcolina [124].

Los pesticidas que tienen el objetivo molecular de la neurotransmisión colinérgica son altamente efectivos pero su uso ha sido implicado en la disminución de la población de insectos polinizadores. Las abejas están expuestas a dos clases ampliamente usadas de pesticidas colinérgicos: neonicotinoides (agonistas del receptor nicotínico) y organofosforados (inhibidores de la acetilcolinesterasa). Las bases neurofisiológicas de los efectos que tienen los neonicotinoides sobre el aprendizaje y comportamiento de las abejas fueron descritas por Palmer *et al.* 2013 [125]. A través de grabaciones de las células Kenyon de los cuerpos pedunculados en cerebros recién aislados de abejas melíferas pudieron mostrar que imidacloprid, clotianidin y cumafos oxon causan un block de depolarización en el disparo neuronal e inhiben la respuesta nicotínica. Estos efectos se observan a concentraciones a las que las abejas pecoreadoras se encuentran expuestas en el ambiente y dentro de la colmena, y predicen que la exposición a múltiples pesticidas con

este objetivo molecular causará una toxicidad aumentada a los polinizadores. Los autores comprobaron efectos neuronales significativos a concentraciones de 10 nM que equivale a 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de clotianidin, 2,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ imidacloprid y 3,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ cumafos oxon. Así como los autores plantean que los efectos aditivos observados para imidacloprid y cumafos oxon indican que los pesticidas colinérgicos con distintos mecanismos de acción pueden interactuar al nivel neuronal. Este tipo de interacción puede ser relevante para todas las clases de pesticidas que apuntan a la función neuronal; por ejemplo, la activación de los canales de Na^+ por fluvalinato, un piretroide acaricida, también se espera que aumente el efecto depolarizador de los neonicotinoides. El trabajo reportado postula además que la comprensión de las bases neuronales de los efectos de los pesticidas es un prerrequisito para desarrollar estrategias de control de plagas con mayor selectividad hacia las especies objetivo [125]. Existe amplia evidencia que en Europa y América del Norte muchas especies de polinizadores han ido disminuyendo, tanto en abundancia como en distribución [126]. Recientemente se publicó un estudio que muestra que América del Sur no es la excepción [127]. Aunque hay una larga lista de causas potenciales, hay una preocupación acerca de que los insecticidas neonicotinoides, particularmente a través de su uso como curasemillas, sean al menos en parte, responsables [126].

1.6. Metodologías de análisis de residuos de pesticidas

Un residuo de pesticida es cualquier sustancia presente en alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales como consecuencia del uso de un pesticida según el *Codex Alimentarius* [9]. El término incluye cualquier derivado de pesticida, como productos de conversión, metabolitos y productos de reacción y las impurezas consideradas de importancia toxicológica. De forma similar, la UE define un residuo de producto fitosanitario como una o varias sustancias que se encuentren en o sobre vegetales o productos de origen vegetal, productos animales comestibles, o componentes del medio ambiente, que constituyan los restos de la utilización de un producto fitosanitario, incluidos sus metabolitos y los productos resultantes de su degradación o reacción [10].

La química analítica de residuos de pesticidas es la disciplina centrada en el estudio, desarrollo y optimización de los procedimientos que aseguran la veracidad de las mediciones necesarias para cualquier evaluación posterior acerca de la concentración de estos residuos en alimentos y el ambiente. Los residuos de pesticidas pueden encontrarse a niveles de hasta ng o $\mu\text{g kg}^{-1}$ por lo que se consideran trazas. La determinación analítica de estas bajas concentraciones de múltiples pesticidas en simultáneo, inmersos en una matriz que naturalmente presenta otros compuestos químicos que se encuentran a concentraciones mucho mayores es un verdadero desafío.

Como en todo análisis, las etapas del proceso analítico de análisis de residuos son: el muestreo representativo del universo a estudiar, la homogeneización de la muestra en submuestras representativas de donde tomar una alícuota para el análisis, la preparación de la muestra, el análisis instrumental, la expresión y el análisis de resultados y su reporte. A continuación se detallan dos etapas críticas de este proceso: la preparación de la muestra y el análisis instrumental.

1.6.1. Preparación de la muestra

La preparación de la muestra es el proceso preliminar de separación con el objetivo de aislar los analitos (pesticidas) de una matriz compleja. La primera etapa es la extracción de los analitos, generalmente empleando un solvente orgánico. Luego se realiza un *clean up* que es la purificación posterior del extracto primario sin tener pérdidas de los analitos en estudio con el fin de eliminar la mayor cantidad posible de coextractivos que puedan interferir con la medición. Finalmente en algunos casos se realiza la concentración de los analitos de interés por evaporación del solvente con el fin de obtener menores límites de detección. La combinación de estrategias de extracción y *clean up* permite diseñar o elegir la preparación de muestra más adecuada al fin buscado.

Como se explicó más arriba, cada muestra puede contener un número variable de posibles residuos de pesticidas, los que deben ser preferentemente analizados simultáneamente para economizar tiempo de análisis evitando acumular pasos de extracción y utilizar al máximo las posibilidades que ofrecen los instrumentos de

medida modernos. Para este propósito se han diseñado métodos analíticos denominados métodos multiresiduo (Multi Residue Methods: MRMs por sus siglas en inglés), cuyo objetivo es analizar la máxima cantidad de pesticidas posible empleando un único protocolo de preparación de muestra. Cuanto mayor sea el espectro de analitos cubiertos por el MRM, menos métodos monoresiduo (Single Residue Methods: SRMs por sus siglas en inglés) adicionales serán necesarios. Los MRMs buscan mejorar la eficiencia económica del análisis (tiempo, personal y materiales) pero cumpliendo con los parámetros de validación; ser precisos y exactos para asegurar los resultados obtenidos.

Un MRM idealmente debe abarcar muchas clases de pesticidas, ser selectivo, es decir producir un extracto con la mínima cantidad de coextractivos posible, ser amigable con el ambiente: es por esto que se tiende a la miniaturización del método partiendo de la mínima cantidad de muestra posible y solventes, sorbentes y reactivos de extracción y *clean up* tener un bajo límite de detección, ser veraz, robusto, rápido, seguro, fácil y de bajo costo. Los MRMs son los métodos más utilizados actualmente en el análisis de trazas de compuestos orgánicos [128] ya que permiten el análisis de un elevado número de contaminantes en una única determinación, particularmente cuando se utiliza el acoplamiento de técnicas instrumentales de cromatografía con detectores de masas en tándem [129].

Existen actualmente tres grandes MRM universales para el análisis de residuos de pesticidas que difieren básicamente en el solvente utilizado y la estrategia de extracción:

- ✓ Método de Luke y modificación (miniaturización) [130,131]
- ✓ Método del Acetato de Etilo (SweEt)[132,133]
- ✓ Método QuEChERS y modificaciones [128,134,135]

El método de Luke consistía resumidamente en una extracción con acetona en la que se parte de 100 g de muestra y posteriores repartos con éter de petróleo y diclorometano, secado de las fases orgánicas obtenidas con Na_2SO_4 y evaporación de solvente para obtener finalmente el extracto que se purificaba por GPC o florisil para finalmente realizar el análisis cromatográfico [130]. Posteriormente se modificó miniaturizándolo, se bajó la cantidad de muestra a 15 g y consiguientemente la cantidad de solventes, de

esta forma se puede extraer y realizar el reparto en tubo y centrifugar evitando así el material de vidrio [131].

El método del Acetato de Etilo original consiste en una extracción con acetato de etilo en la que se parte de 75 g de muestra y se agrega Na_2SO_4 y NaHCO_3 y no se realiza *clean up* [132]. Este método también se miniaturizó, ajustándolo a las características del nuevo instrumental disponible. Como el desarrollo fue realizado en Suecia de lo conoce como el método SweEt. Existen también variantes de este método donde el extracto es sometido a un *clean up* dispersivo [133].

En los últimos años se ha extendido para el análisis multiresiduo de pesticidas de protocolos basados en la estrategia que sigue el método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) por su rapidez, simplicidad y buen desempeño para un amplio espectro de analitos con propiedades fisicoquímicas diversas provenientes de distintas familias químicas. Originalmente esta técnica fue desarrollada por Michelangelo Anastassiades y colaboradores en el año 2001-2002, para el análisis de drogas veterinarias en tejidos animales, pero debido a su gran potencial de extracción de compuestos polares, se adaptó para el análisis de diferentes clases de residuos de pesticidas en muestras de frutas y vegetales [128]. Consiste en una extracción con acetonitrilo de 10 g de muestra con simultáneo agregado de una mezcla sales (MgSO_4 y NaCl) que permite realizar en un solo paso el *salting out* de las proteínas, la inducción de separación de fases (acetonitrilo y agua) y el secado de la fase orgánica. Luego, introduce una forma de purificación del extracto muy práctica, que consiste en realizar una extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE por sus siglas en inglés) con distintos sorbentes (amina primaria y secundaria (PSA), carbón grafitizado (GCB), C18, entre otros) según sea la naturaleza de los coextractivos que se necesita remover (compuestos ácidos, pigmentos o compuestos lipofílicos respectivamente). La forma en la que se realiza la d-SPE es agregando una alícuota del extracto a los sorbentes en un tubo que se agita y luego se centrifuga. Finalmente se toma una alícuota, que generalmente está pronta para su análisis instrumental.

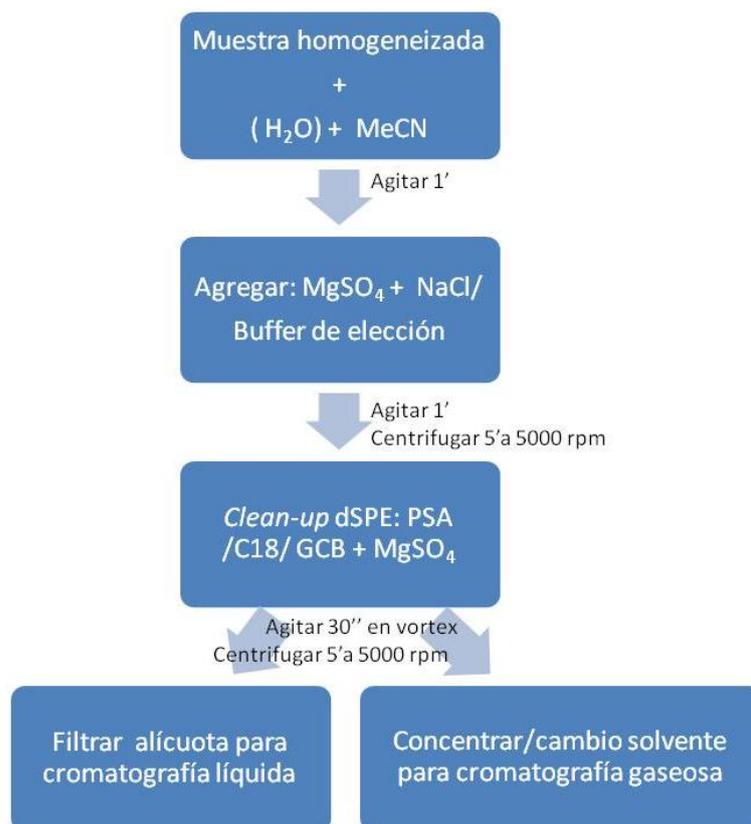


Figura 1.9 Diagrama general de la estrategia de preparación de muestra QuEChERS

Le siguieron a este primer desarrollo otras adaptaciones que buscaban expandir el alcance del método principalmente a compuestos ácidos, por lo que la modificación principal consistió en que la extracción se realice en solución amortiguadora de pH utilizando buffer acético/acetato [135] y luego buffer cítrico/citrato [134]. En el método del buffer citrato se parte de 10 g de muestra y se agrega en la etapa de extracción junto con el acetonitrilo las sales MgSO_4 , NaCl , $\text{Na}_3\text{Citr}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Na}_2\text{HCitr}\cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$. En la Figura 1.9 se muestra un esquema general que resume la estrategia de esta metodología.

El método que utiliza el buffer acético/acetato se convirtió luego en el método oficial para FDA AOAC 2007.01 y el método del buffer citrato en el método oficial para la UE EN 15662.

Existen en la actualidad numerosas variaciones de este método, adaptándolo a diversas matrices, de diversa procedencia, ya sean alimentos de origen animal, vegetal o

ambiental, todas de composición química muy variada sobre las que sin embargo, el método ha demostrado su versatilidad

1.6.2. Análisis instrumental

Una vez finalizada la fase de preparación de la muestra continúa el análisis instrumental. Existen diversos equipamientos de cromatografía acoplada a diferentes detectores que se utilizan en la actualidad desde detectores clásicos hasta muy modernos. Las ventajas de los detectores de masas comparados con los detectores clásicos son su elevada selectividad, su alto grado de confianza en la determinación del compuesto [136] y su capacidad para detectar concentraciones de pesticidas mucho más bajas especialmente los detectores de masas en tándem [75,137]. Para cubrir el mayor número de pesticidas, debido a la amplia gama de propiedades fisicoquímicas de los mismos, se utiliza tanto cromatografía líquida (para los pesticidas más polares) como cromatografía gaseosa (para los compuestos volátiles).

Los detectores de masas con simple cuadrupolo se usan mayoritariamente acoplados a cromatografía gaseosa (GC-MS).

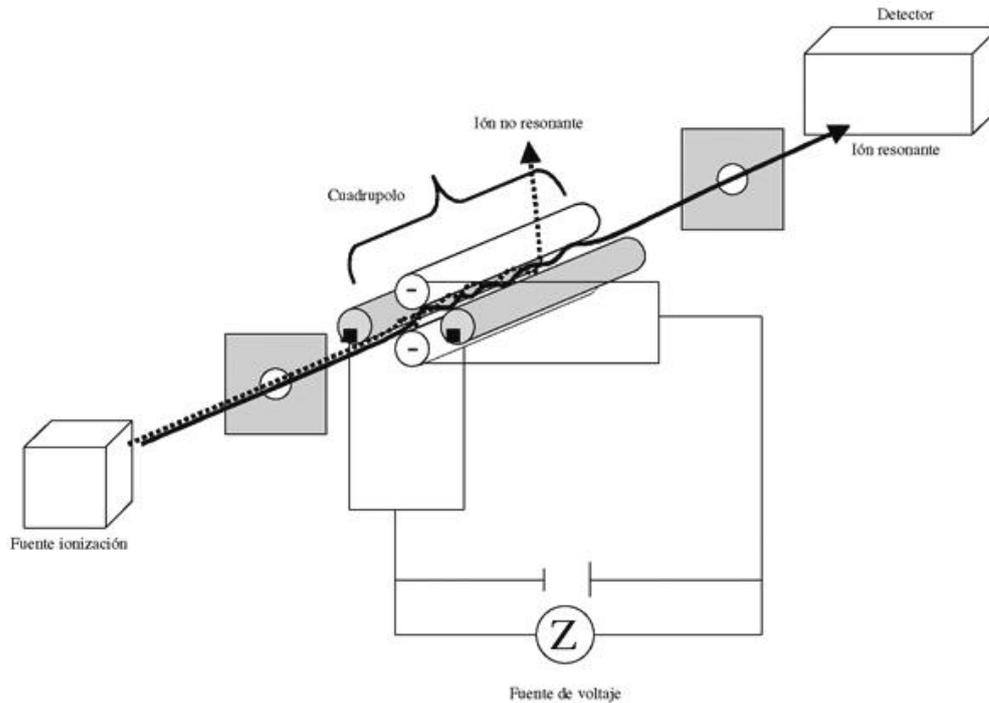


Figura 1.10 Esquema de funcionamiento de un cuadrupolo. Imagen tomada de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-57272007005500004

En la Figura 1.10 se muestra el funcionamiento de un cuadrupolo, se trata de un filtro de masas que consiste en cuatro barras paralelas. Las opuestas tienen la misma polaridad mientras que las barras adyacentes tienen polaridad opuesta. A cada barra se le aplica un voltaje continuo y uno de radiofrecuencia generando una diferencia de potencial que permite la “filtración” de los iones de m/z seleccionada. Modificando los campos eléctricos, las masas de todos los iones pueden ser “escaneadas” secuencialmente, para generar un espectro de masas. En modo SIM (Monitoreo de Ion Simple), la selectividad viene dada porque sólo los iones de masa seleccionados, conforme a las condiciones de operación del método analítico, van a atravesar el analizador para llegar al detector. El uso de este analizador está muy extendido debido a su relativa sencillez y relativo bajo costo. El cuadrupolo no es muy sensible en modo *full scan*, por lo que para el análisis de residuos de pesticidas se suele utilizar en modo SIM. Este modo presenta una mayor sensibilidad, pero requiere el conocimiento previo de los compuestos que se van a analizar, ya que sólo se utilizan los iones seleccionados y no el barrido completo de iones de la muestra.

De los detectores de masas en tándem (MS/MS), los que tienen mayor aplicación al análisis cuantitativo de residuos de pesticidas son los de triple de cuadrupolo, éstos existen tanto acoplados a cromatografía gaseosa como líquida. Su funcionamiento se puede describir en tres pasos:

- ✓ Q1 escanea en un rango de masas establecido y selecciona el ión de interés.
- ✓ Q2 o Celda de Colisión enfoca y transmite los iones a medida que se introducen en la celda e introduce el gas de colisión (N_2) que genera colisiones entre moléculas.
- ✓ Q3 analiza los fragmentos generados en la celda de colisión.

Se destaca el modo operativo MRM (Multiple Reaction Monitoring), en este modo Q1 selecciona $[M+H]^+$, el ión precursor o también llamado padre, Q2 fragmenta el ión seleccionado en Q1 y Q3 monitorea solamente un ión hijo. Se esquematiza un triple cuadrupolo y el modo operacional MRM en la Figura 1.11.

En este modo se alcanzan los menores límites de detección posibles ya que solamente los iones hijos alcanzan el detector, la sensibilidad de MRM es función de la cantidad de ion hijo producido y se disminuye el ruido aumentando así la relación señal-ruido.. La fragmentación de un ion “padre” a un ión hijo es conocido comunmente como “transición”.

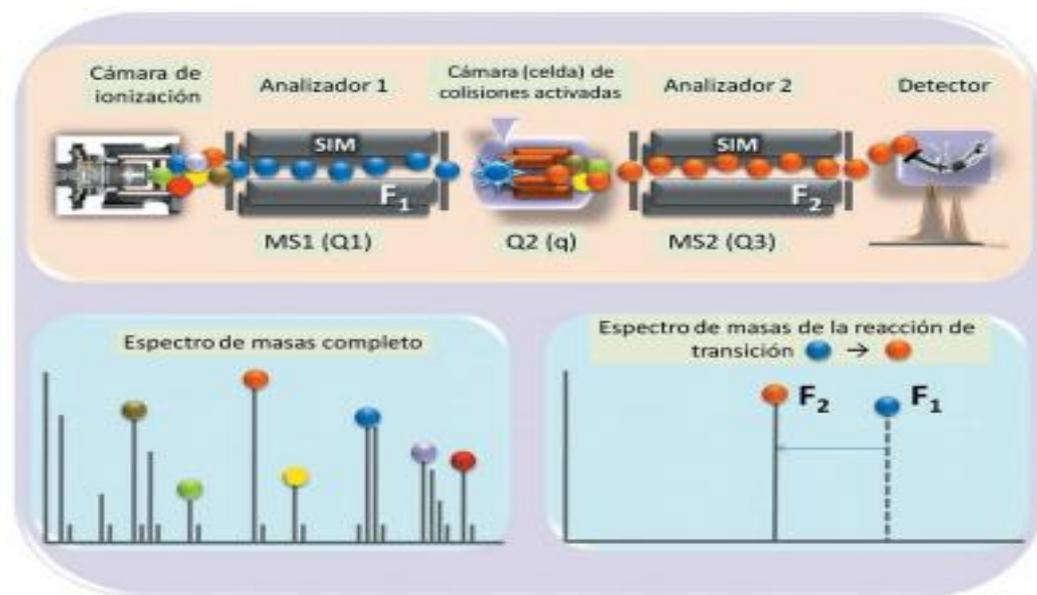


Figura 1.11 Esquema de un triple cuadrupolo y modo operación MRM. Imagen tomada de *Scintia Chromatographica* (2010) 2, 4:25-48

Este tipo de análisis se le llama *targeted* u objetivo, porque los analitos que se buscan deben ser fijados previamente y sus características espectrales conocidas, al igual que en el caso del SIM.

En menor medida se ha empleado la técnica GCxGC-TOF vectorial en el análisis de residuos de pesticidas [138]. Mientras las anteriores hacen hincapié en la selectividad de masas, esta técnica ofrece la posibilidad de explotar al máximo las posibilidades de la separación cromatográfica, obteniendo una excelente resolución entre los compuestos de la matriz y los analitos traza de interés. Esta técnica consiste en una doble separación cromatográfica: la muestra inyectada atraviesa primero por una columna, generalmente apolar, de longitud y diámetro estándar (llamada primera dimensión), la que está conectada a una segunda columna mucho más corta y de menor diámetro, de fase generalmente de polaridad opuesta a la primera, llamada segunda dimensión. Entre ambas columnas, hay un modulador criogénico, el que enfría instantáneamente la muestra en la columna. Por la temperatura del horno, la muestra se calienta rápidamente y entra en la segunda columna, a un flujo más alto debido al cambio de diámetro y se dirige a un detector de masas de tiempo de vuelo (TOF) que es lo suficientemente rápido para coleccionar toda la información que recibe.

En la Figura 1.12 se presenta un esquema del cromatógrafo y del detector GCxGC-TOF.

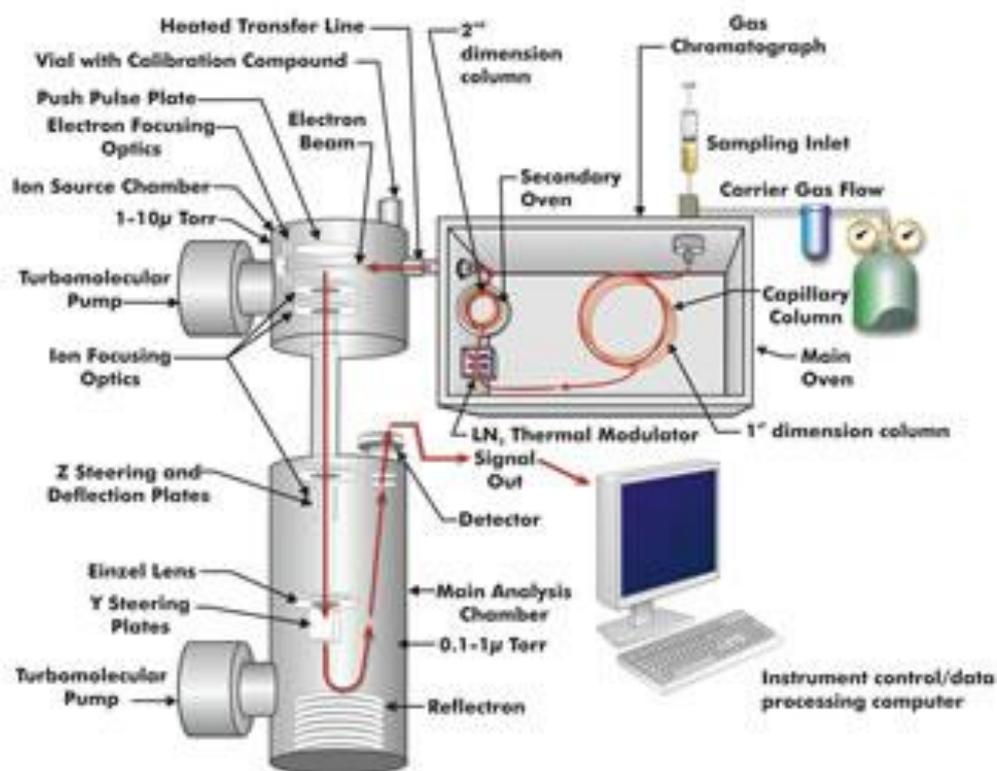


Figura 1.12 Esquema de GCxGC-TOF. Imagen tomada de <https://www.biotech.wisc.edu/services/massspec/instrumentationoverview/GCxGC-TOFMS>

Este proceso separativo bidimensional puede representarse en un “*contour plot*” donde es posible observar la eficiencia del proceso cromatográfico con relación a la cromatografía de gases monodimensional tradicional (Figura 1.13).

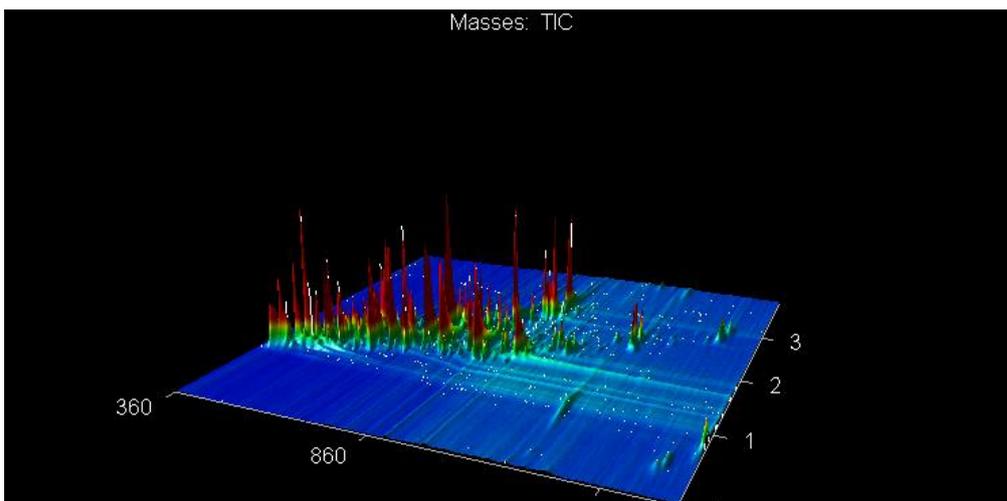


Figura 1.13 Ejemplo de un GCxGC-TOF plot: extracto en acetonitrilo de cera de abejas.

1.6.3. Validación de las metodologías de análisis de residuos de pesticidas

La validación de un método analítico se debe realizar para demostrar que éste es apto para el propósito analítico para el cual se va a utilizar, es decir, la validación asegura que los resultados analíticos arrojados por el método sean confiables. Existen guías para la validación de métodos analíticos establecidas por organismos internacionales tales como la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), *International Standardization Organisation (ISO)*, *Codex Alimentarius* y *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*.

La Unión Europea tiene una guía específica para la validación y aseguramiento de la calidad de metodologías de análisis de residuos de pesticidas en alimentos y piensos donde se establecen los criterios a seguir actualmente en el documento SANTE/11945/2015 [139]. Esta guía se actualiza cada dos años y es la de referencia para los laboratorios de la Comunidad Europea, tiene criterios exigentes pero a la vez adaptados a las particularidades del análisis de residuos de pesticidas. Dichos criterios son consensuados por un comité de expertos con amplia experiencia en el tema y se van adaptando a la evolución de las metodologías no solo a nivel de los avances instrumentales sino también en lo que a los nuevos ajustes en lo que a preparación de muestra respecta. Por ejemplo en la última versión se cambió la evaluación de la linealidad de una simple inspección visual y el valor de R^2 a un análisis de residuales para poder definir este parámetro.

Los parámetros a ser evaluados para la validación de una metodología, se presentan a continuación.

Exactitud: se define como el grado de concordancia entre el resultado experimental y el valor de referencia aceptado (valor real).

Precisión: se define como el grado de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos en condiciones establecidas.

Repetitividad: se define como la precisión (desviación estándar) de medición de un analito (por lo general obtenido de la recuperación o análisis de materiales de referencia), obtenidos utilizando el mismo método, en la misma muestra en un solo laboratorio en un corto período de tiempo durante el cual no existen diferencias en los métodos, analistas, materiales y/o equipos involucrados.

Reproducibilidad: se define como la precisión (desviación estándar) de medición de un analito (por lo general obtenido de la recuperación o análisis de materiales de referencia), obtenidos utilizando el mismo método, en diferentes laboratorios, con diferentes analistas, ó durante un período de tiempo en el cual existan variaciones en los materiales y equipos. En el caso de que se evalúe en un mismo laboratorio se denomina reproducibilidad intra-laboratorio y se representa (WR).

Precisión intermedia: es la precisión en condiciones donde los resultados de un ensayo se obtienen con el mismo método, en pruebas idénticas, en el mismo laboratorio, realizado por diferentes analistas utilizando diferentes equipos durante un periodo de tiempo prolongado.

Selectividad: Se define como la habilidad de la extracción, el sistema de separación y especialmente la capacidad de discriminar entre un analito y otro.

Especificidad: Se define como la habilidad del detector de dar señales que identifiquen el analito de forma efectiva.

Recuperación: se define como la proporción de un analito remanente en el punto final de su determinación, luego de su adición, generalmente a una matriz blanco, inmediatamente antes de su extracción. Generalmente expresado como porcentaje.

Matriz blanco se define como una porción de muestra que se sabe que no contiene niveles detectables del analito en estudio. Para llevar a cabo ensayos de recuperación generalmente se adiciona (fortifica) a la matriz blanco los analitos de interés en al menos 2 niveles de concentración, el límite de reporte (o límite de detección, para

comprobar la sensibilidad del método), y a un nivel más alto, tal vez un nivel de acción, por ejemplo, los LMR.

□ Límite de cuantificación: se define como la mínima concentración o masa del analito que puede ser cuantificada con una exactitud y precisión adecuada (media de recuperación para cada producto representativo en el rango de 70 a 120%, con una RSD $\leq 20\%$).

□ Veracidad: se define como el grado de concordancia entre el valor promedio esperado y el valor de referencia aceptado (valor real). En el caso de existir materiales de referencia se expresa como el z-score, en ausencia de materiales de referencia se expresa como el porcentaje de recuperación.

□ Linealidad: se define como la habilidad del método de obtener resultados experimentales (en un determinado rango) proporcionales a la concentración del analito.

□ Robustez: es la medida de la capacidad de un procedimiento analítico de permanecer inalterado por pequeñas y deliberadas variaciones en los parámetros operacionales del método y que provee la seguridad de obtención de resultados confiables durante su normal ejecución.

□ Efecto Matriz (EM): Se destaca la introducción del concepto de “efecto matriz” que es cómo la presencia de compuestos de la matriz en el extracto final (coextractivos) puede influir en la respuesta de los analitos en el detector (aumentar o disminuir la señal) respecto a que si los analitos estuvieran disueltos en solvente. Este fenómeno hay que medirlo, se prepara una curva de calibración de los analitos en solvente y otra donde se agregan los analitos a un extracto preparado a partir de un blanco analítico (una muestra de la matriz que no contenga los analitos de interés) este procedimiento se llama ensamblaje con matriz (*matrix matched*), obteniendo finalmente los mismos niveles de concentración en ambas curvas y luego se comparan:

$$EM = \frac{\text{pendiente curva calibración en matriz} - \text{pendiente curva calibración en solvente}}{\text{pendiente curva calibración en solvente}}$$

Estos efectos de la matriz derivan de procesos físicos y químicos originados durante el análisis instrumental, generalmente difíciles o imposibles de eliminar. Se observan como un aumento o disminución para un analito de la respuesta del detector, en comparación con la producida por soluciones de estándar de la sustancia analizada, en disolvente. Se puede obtener una calibración más confiable cuando se utiliza una curva

de calibración en matriz. De esta forma, se pueden compensar los efectos de la matriz pero no se elimina la causa, por lo tanto la intensidad del efecto puede diferir de una matriz o muestra a otra, y también variar con la “concentración” de matriz. En los casos en que depende de la muestra se puede usar dilución isotópica o adiciones estándar.

Los parámetros de validación con sus criterios de aceptabilidad establecidos en la guía europea se resumen en la Tabla 1.1:

Tabla 1.1 Parámetros y criterios de validación establecidos en el documento SANTE/11945/2015

Parameter	What/how	Criterion	Cross reference to AQC document
Sensitivity/linearity	Linearity check from five levels	Residuals < ±20%	C14-C19
Matrix effect	Comparison of response from solvent standards and matrix-matched standards	(±20 %)	C22-C24
LOQ	Lowest spike level meeting the method performance criteria for trueness and precision	≤ MRL	G6
Specificity	Response in reagent blank and blank control samples Identification criteria	< 30% of RL	C42 Section D, Table 4
Trueness (bias)	Average recovery for spike levels tested	70-120%	G4,G6
Precision (RSD _r)	Repeatability RSD _r for spike levels tested	≤ 20%	G6
Precision (RSD _{wr})	Within-laboratory reproducibility, derived from on-going method validation / verification	≤ 20%	G6
Robustness	Average recovery and RSD _{wr} , derived from on-going method validation / verification	See above	G2, G6

1.6.4. Metodologías de análisis de residuos de pesticidas en productos de la colmena

La preparación de la muestra previa al análisis instrumental se torna un paso fundamental ya que la naturaleza fisicoquímica de las moléculas a investigar es muy variada, desde una marcada lipofilia como los insecticidas piretroides hasta compuestos relativamente hidrofílicos como los neonicotinoides. La distribución de estos compuestos en los productos de la colmena será diferencial de acuerdo a la matriz que

se considere y por lo tanto los métodos de tratamiento de muestra son particulares para cada matriz y a su vez la técnica cromatográfica a utilizar depende de cada compuesto (ej. cromatografía gaseosa para compuestos más volátiles como los piretroides y cromatografía líquida para los más polares como los neonicotinoides).

Se encuentran reportadas distintas metodologías de preparación de muestras para el análisis de residuos de pesticidas en productos de la colmena en las que se emplean tanto detectores clásicos como de masas en tándem. En miel se han utilizado estrategias tipo dispersivas como QuEChERS, extracción en fase sólida SPE (Solid Phase Extraction), extracción líquido-líquido LLE (liquid-liquid extraction), microextracción dispersiva líquido-líquido DLLME (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction) [70,75,140-150]. En un artículo de revisión publicado recientemente sobre los métodos de análisis de residuos de pesticidas en miel durante el período 2008-2015 se observa que en estos últimos años la metodología de preparación de muestra predilecta ha sido QuEChERS seguida por DLLME, LLE y SPE [151]. En otros artículos de revisión de años anteriores (2010 y 2007) [62,152] se observa que anteriormente se usaban mayoritariamente métodos de extracción con solventes, SPE, SPME (Solid Phase Micro Extraction), SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction), SFE (Supercritical Fluid Extraction), MSPD (Matrix Solid Phase Dispersion) y se analizaban un número menor de compuestos muchas veces una única clase química como por ejemplo organofosforados [153]. Se observa también que se solían obtener porcentajes de recuperación más bajos y límites de detección y cuantificación más altos excepto para SPE.

En abejas se han reportado mayoritariamente metodologías utilizando MSPD [67,72,154] y QuEChERS [74,75,155]. En particular, en el trabajo desarrollado por Kristenson *et al.* 2004, se reporta el uso de MSPD para analizar insectos individualmente determinando organofosforados y piretroides por GC-MS. En el caso de organofosforados y permetrina las mejores condiciones fueron el uso de C8 y 100 μL de acetato de etilo, obteniendo LODs entre 5-80 ng g^{-1} para la mayoría de los organofosforados y trans-permetrina (cis-permetrina 0,3 ng g^{-1}), mientras que para los piretroides menos polares se trabajó con silica y 3,5 mL de hexano, obteniendo LODs entre 5-35 ng g^{-1} . Se obtuvieron recuperaciones entre 52-94 % [67]. Morzycka *et al.* 2002, describen un método de análisis multiresiduo de 12 insecticidas (azinfos-metil, buprofezin, clorpirifos, clorpirifos-metil, diazinon, etion, fenitroton, fipronil,

metidation, fosalone, pirimicarb, propoxur) en abejas utilizando MSPD por GC-NPD (cromatografo gaseoso acoplado a detector de nitrógeno y fósforo). Utilizan florisil y silica como agentes dispersantes, y alumina y silica como sorbentes para el *clean up*. En este trabajo se obtuvieron recuperaciones entre 70-110%, RSDs entre 2-8% y LODs entre 0,005-0,05 mg kg⁻¹ para todos los pesticidas estudiados [154]. En otro estudio en el que se analizan organofosforados y carbamatos por GC, las abejas son mezcladas con tierra de diatomeas y luego se eluye con cloruro de metileno, posteriormente utilizan como *clean up* cromatografía de gel permeación con una columna Bio Beads SX 3 que se eluye con una mezcla ciclohexano-acetato de etilo (1:1) según Rossi *et al.* 2001 [72]. Por otro lado Tapparo *et al.* 2012 reportan el análisis de neonicotinoides en abejas individualmente por UHPLC-DAD utilizando una metodología miniaturizada de QuEChERS en la que extraen con 500 µL de acetonitrilo [155]. En un estudio reportado por Walorczyk y Gnusowski en 2009, se presenta el análisis de 150 pesticidas en abejas por GC-MS/MS utilizando el método QuEChERS buffer citrato y *clean up* utilizando *freeze out* y d-SPE con PSA, C18 y GCB. En este trabajo se evaluaron los niveles de fortificación 10, 50 y 500 ng g⁻¹ recuperando el 47, 77 y 92% de los analitos respectivamente, obteniendo entre 70 y 120% de recuperación [74]. Wiest *et al.* 2011 también utilizan una metodología QuEChERS con *clean up* d-SPE. Se realizó el análisis multiresiduo de 80 contaminantes ambientales, pesticidas y drogas veterinarias en abejas por GC-TOF. Incorporaron como una novedad la modificación de realizar una partición con hexano para eliminar lípidos que interfieren en la determinación instrumental. Obtuvieron LOQs de 10 ng g⁻¹ con porcentajes de recuperación entre 60 y 120% para todos los contaminantes del estudio [75].

En cera se han reportado mayoritariamente metodologías utilizando SPE, extracción líquido-líquido, MSPD [59,64,76,156,157]. Adamczyk *et al.* 2007, desarrollaron un método para el análisis de los acaricidas fluvalinato, cumafos, bromopropilato y su metabolito 4,4'-dibromobenzofenona en cera de abejas por LC-DAD. El método se basa en una extracción líquido-líquido de la muestra seguida de una purificación en fase sólida (Florisil) del extracto obtenido. Obtuvieron LODs comprendidos entre 0,1 y 0,2 µg g⁻¹ cera. Los valores de RSDs estuvieron entre 9,2 y 15,3% para la repetibilidad e inferiores al 21% para la reproducibilidad. El estudio de recuperación proporcionó porcentajes entre 70 y 110% [156]. En Jiménez *et al.* 2004, se reporta el análisis

simultáneo de lindano, clorpirifos, clorfenvinfos, endosulfan, 4,4'-DDE, 4,4'-TDE, acrinatrina, bromopropilato, tetradifon, cumafos y fluvalinato en cera pura de abejas. En este método utilizaron una extracción líquido-líquido con acetonitrilo seguida de un *clean up* en cartuchos poliméricos para cera blanqueadas y para las no blanqueadas utilizaron un cartucho de ODS previo al polimérico. Obtuvieron alrededor de 100% de recuperaciones con RSDs entre 10-20% a concentraciones de 0,5 y 5 mg kg⁻¹ [64].

En polen se han reportado mayoritariamente metodologías utilizando extracciones sólido-líquido y adaptaciones de QuEChERS [55,75,158-162]. En particular, Chauzat et al. 2006 emplearon distintas metodologías según los pesticidas a evaluar en cargas de polen colectado por abejas utilizando LC-MS/MS. Para el análisis de imidacloprid y ácido 6-cloronicotínico se realizó una extracción con metanol y ácido sulfúrico diluido en agua. Luego de concentrar una alícuota, el residuo acuoso se lavó con hexano y se realizó *clean up* en un cartucho Amberlite XAD-4. Este extracto se dividió en dos porciones, la porción para el análisis de imidacloprid se llevó a sequedad, redisolvió en agua y se realizó *clean up* con diclorometano en una columna Chem-Elut. La segunda porción se usó para hidrolizar imidacloprid y sus metabolitos a ácido 6-cloronicotínico. los residuos se extrajeron con tertiobutilmetil-éter, la fase éter se secó y redisolvió en metanol acidificado y agua para realizar *clean up* en cartucho HLB. El LOD fue 0,2 g kg⁻¹ y el LOQ 1 g kg⁻¹. Fipronil y sus metabolitos se analizaron mediante extracción con acetona, evaporación a sequedad, redisolución en metanol, purificación en cartucho de alúmina seguido de cartucho inmunológico, el extracto resultante fue disuelto en n-dodecano y evaporado, redisoluto en metanol y agua. Los LODs obtenidos fueron de 0,3 µg kg⁻¹ para fipronil y sus metabolitos. Se realizaron además dos análisis multiresiduo, uno para analizar carbamatos y fungicidas y el otro para organofosforados, organoclorados y piretroides. Para el primero se extrajo con acetato de etilo mientras que el segundo consistió en una extracción con acetona, reparto líquido-líquido con diclorometano y *clean up* con sílica. Los LODs estuvieron en el rango 0,1 a 57,0 µg kg⁻¹ y LOQs entre 4,0 a 196,7 µg kg⁻¹ [55]. La metodología de QuEChERS reportada por Wiest et al. 2011 descrita anteriormente también fue utilizada para el análisis de polen [75]. Otra metodología de QuEChERS modificado fue reportada por David et al. 2015 para el análisis de neonicotinoides (tiametoxam, clotianidin, imidacloprid y tiacloprid) y fungicidas (carbendazim, espiroxamina, boscalid, tebuconazol, procloraz, metconazol, fluoxastrobin, piraclostrobin y

trifloxistrobin) y el sinergista butóxido de piperonilo mediante UHPLC-MS/MS partiendo de 100 mg de polen. Obtuvieron recuperaciones entre 71 a 102% para la mayoría de los compuestos con una repetibilidad < 20% a 5 y 40 ng g⁻¹ y los LODs estuvieron entre 0,01 y 0,96 ng g⁻¹ [160].

1.7. Evaluación de riesgo

La evaluación de riesgo en alimentos y piensos tiene el objetivo de proteger la salud humana y animal y el ambiente. Existen distintas definiciones de riesgo. En Europa la definición utilizada por EFSA (*European Food Safety Authority*) establecida en la Regulación EC 178/2002 es:

- “Una función de la probabilidad de un efecto adverso para la salud y la severidad del mismo, consecuente a un peligro.”

En Estados Unidos se utilizan las definiciones del NRC (*National Research Council*) y NAS (*National Academy of Sciences*):

- NRC: “Caracterización sistemática y científica de los potenciales efectos adversos para la salud que resulten de la exposición a agentes peligrosos, o a situaciones de riesgo.”
- NAS: “Determinación de la probabilidad de que tras una exposición definida se produzca un efecto adverso.”

La evaluación de riesgo se divide en distintas fases:

- Fase preliminar, definición del objetivo de la evaluación: escenario y población diana, subgrupos de especial susceptibilidad.
- Fase de Identificación del Peligro: búsqueda y selección de los peligros presentes en el escenario de estudio.

- Fase de Caracterización del Peligro: en especial mediante el estudio de la relación dosis-respuesta en humanos si es posible, o experimentales, y de entre ellos, los más extrapolables.
- Fase de Evaluación de la Exposición: medida o estimación de la intensidad, frecuencia y duración de la exposición humana.
- Fase de Caracterización del Riesgo: estimación de la probabilidad de aparición de efectos adversos en la población humana expuesta. Subgrupos de especial susceptibilidad.

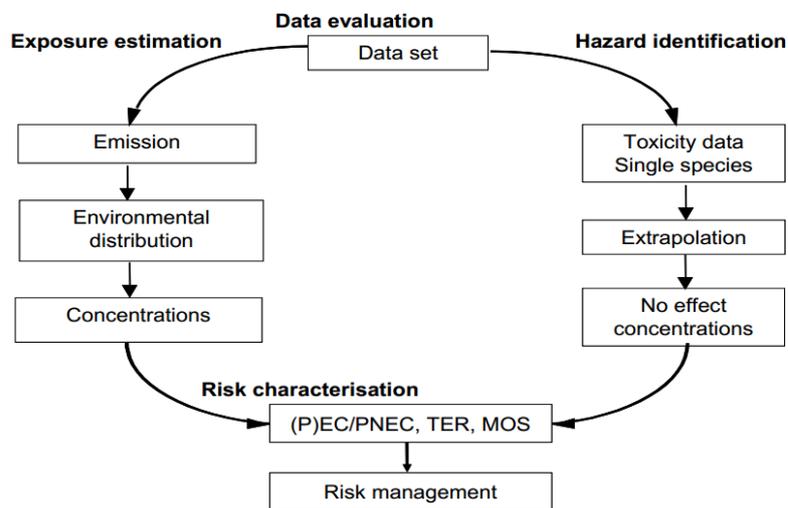


Figura 1.14 Esquema general de evaluación de riesgo

En la Figura 1.14 se esquematiza el proceso general de evaluación de riesgo el cual consiste resumidamente en, por un lado identificar el peligro y por otro estimar la exposición para poder caracterizar el riesgo, basándose en la evaluación de datos experimentales. Esto da insumos para su manejo (eliminación, tomar medidas de mitigación, entre otras).

En este sentido, la evaluación de riesgo en abejas tiene la misión de proteger las abejas y los servicios ecosistémicos que brindan. Estos servicios incluyen la producción de miel de buena calidad y la polinización de cultivos usados para consumo humano.

Además de los cultivos, las abejas también juegan un rol esencial en la polinización de plantas silvestres. Las distintas especies de abejas difieren en las características de polinización, polinizan distintas especies de plantas, en distintos momentos, en distintos lugares y a distintas escalas. Por lo tanto, la protección de abejas no debería estar limitada a los agroecosistemas y a las abejas melíferas. En Europa la autoridad que tiene el mandato de hacer evaluaciones de riesgo es la EFSA. Debido a la complejidad del ambiente en el que operan las abejas y la creciente literatura científica que muestra el potencial origen multifactorial de las pérdidas de abejas y debilitamiento de sus colonias, se hizo evidente la necesidad de hacer una transición hacia una evaluación de riesgo ambiental integrada para las abejas según EFSA 2014 [163]. Por lo tanto se ha propuesto redefinir el proceso de evaluación de riesgo para abejas en Europa por lo que hicieron recomendaciones en cuanto a:

- Formulación del problema y objetivos de protección para las abejas y los servicios de polinización (ej. armonización de las estrategias de evaluación de riesgo para establecer objetivos de protección, evaluación de los cambios en los servicios de polinización con la diversidad de abejas).
- Monitoreo y exposición de abejas (ej. monitoreo a largo plazo en toda Europa para todas las clases de abejas; investigación aplicada para el desarrollo de herramientas calibradas y métodos validados para evaluar la mortalidad de abejas, desarrollo de la colonia y efectos subletales en abejas en condiciones de campo; datos de ocurrencia de residuos de varias clases de compuestos incluyendo productos para la protección de los cultivos (PPP por sus siglas en inglés), drogas veterinarias y contaminantes en varias matrices relevantes para las abejas como polen, pan de abeja, néctar, cera, agua, gotas de gutación (etc.); datos de pecoreo y consumo de alimento por abejas melíferas, abejorros y abejas solitarias; datos sobre el valor nutritivo de los distintos tipos de polen y sobre el contenido de azúcar en el néctar; metabolismo de xenobióticos; desarrollo de análisis mono y multi-residuo con límites de detección y cuantificación bajos).
- Identificación de peligros para las distintas clases de compuestos (y sus metabolitos), incluyendo PPP y contaminantes (ej. relaciones dosis-respuesta y sensibilidad de distribución de especies para abejas; toxicocinética y

toxicodinámica para las distintas sustancias y especies de abejas; datos de toxicidad para abejas bajo distintos rangos de temperatura y tipos de dieta; tests de laboratorio estandarizados para toxicidad aguda y crónica de final letal/subletal para sustancias múltiples y contaminantes; tests de laboratorio estandarizados para toxicocinética de dosis única y múltiple; revisión crítica de protocolos comportamentales y fisiológicos para evaluar efectos subletales y crónicos en abejas; modelos basados en dinámicas poblacionales para predecir efectos a nivel de la colonia; técnicas de modelado para extrapolar observaciones de nivel individual a poblacional y para testear múltiples factores estresantes y co-exposición; marcadores moleculares para abejas con técnicas ómicas).

- Evaluación de riesgo (ej. casos de estudio para caracterización de riesgo, análisis de incertidumbre usando modelos determinísticos y probabilísticos para factores estresantes únicos y múltiples; estrategia de peso cuantitativo de la evidencia) [163].

Según la agencia de protección ambiental de Estados Unidos (U.S. EPA por sus siglas en inglés) la evidencia científica disponible aún no amerita hacer las distinciones entre especies y se puede tomar *Apis mellifera* como modelo tanto para abejas *Apis* y non-*Apis*. La evaluación de riesgos de EPA sigue una estrategia por niveles donde se colectan datos sobre abejas individuales que sean representativas de distintas fases de vida (larva/pupa versus adultos) y castas (ej. obreras). En los niveles de semi-campo y campo, estudios de la colonia se pueden usar para representar efectos sobre abejas melíferas y otras abejas sociales. En la medida que la ciencia evolucione se podrán considerar e incorporar métodos y estudios usando abejas non-*Apis* a la evaluación de riesgo. El proceso de evaluación de riesgo para abejas es coherente con el usado para otras taxa, en que consiste en tres fases (formulación del problema, análisis y caracterización del riesgo) y es por niveles. El primer nivel consiste en un primer filtro que busca ser suficientemente conservador en el sentido de que los compuestos que pasan el filtro se considera que representan un riesgo relativamente bajo de causar efectos adversos a las abejas. Para los que no pasan el filtro, una disminución en el error de la estimación de exposición y/o medidas de mitigación pueden reducir los cocientes de riesgo (RQs) por debajo de los niveles de preocupación (LOCs por sus siglas en

inglés) por lo que no es necesario continuar. En cambio, para los valores RQ que continúan excediendo los LOCs y, dependiendo de las necesidades del manejo del riesgo, disminuciones adicionales en el error de la estimación de exposición y/o de efectos se pueden realizar basados en estudios con crecientes niveles de realismo [164].

1.8. Técnicas de Data Mining relevantes para la evaluación de la colmena como bioindicador.

Para poder utilizar la colmena como bioindicador del estado del ambiente en cuanto a residuos de pesticidas es necesario poder extraer información e interpretar los datos obtenidos en los distintos experimentos y monitoreos.

Una forma de evaluar grupos a los que se les ha medido las mismas variables e mediante análisis múltiple factorial (*Multiple Factorial Analysis* MFA por sus siglas en inglés). Este se realiza en dos pasos: primero se realiza un análisis de componentes principales (*Principal Components Analysis* PCA por sus siglas en inglés) por grupo de variables (por ejemplo residuos de pesticidas en cada producto de la colmena: abejas, cera, polen, miel) y los valores originales se estandarizan por la raíz cuadrada del primer eigenvalue de cada grupo de análisis, segundo se realiza un nuevo PCA global utilizando los valores estandarizados. Este tipo de análisis permite mostrar la relación entre las variables por grupo en una figura de dos dimensiones de forma tal que los grupos que se encuentran próximos son los más similares [165].

Otra forma de evaluar diferencias o similitudes entre muestras estadísticas es mediante el cálculo de distancias. La distancia de Gower se basa en calcular la distancia entre valores absolutos de diferencias entre muestras estadísticas (por ejemplo comparar perfiles de residuos de pesticidas obtenidos en apiarios en distintas estaciones).

El cálculo se realiza de la siguiente manera: $(\text{valor} - \text{mínimo}) / \text{rango}$.

Esta distancia permite la presencia de valores faltantes en alguna comparaciones y los resultados se encuentran en el intervalo (0-1) lo que permite una interpretación fácil [166].

Los métodos de clasificación supervisada como kNN (*k-nearest neighbour*), redes neuronales o SVM (*support vector machines*) difieren de los de clasificación no supervisada (o técnicas de *clustering*) en que necesitan un set de datos para el entrenamiento ya que necesitan “aprender” a partir de los mismos cómo clasificar los datos para luego generalizar la experiencia y encontrar la solución a un nuevo problema. Las técnicas de *clustering* se emplean en los casos en que no se dispone del par de datos de entrada y salida para cada muestra, para buscar si hay un patrón interno en las muestras que permita su partición en grupos.

Por ejemplo, la técnica de *clustering k-means* es uno de los algoritmos más usados para data mining. En este caso no se dispone de conocimiento *a priori* sobre los datos por lo que no hay set de entrenamiento y no se pueden utilizar técnicas de clasificación. El algoritmo *k-means* lo que hace es partir el set de datos en *k* grupos según el patrón interno que encuentra en los mismos. El parámetro *k* es en general de dimensión mucho menor que el set de datos y necesita tener un valor predeterminado antes de usar el algoritmo. Al comienzo cada muestra se asigna a uno de los *k* grupos aleatoriamente y se calcula el centro de cada grupo, luego el algoritmo comienza a considerar cada muestra calculando su distancia al centro de cada grupo y es asignada al grupo que tiene el centro más próximo. Cada vez que una muestra es reasignada se recalcula el centro de los dos grupos el que estaba y el nuevo. Los grupos se consideran estables cuando no hay movimiento de muestras en una iteración.

El método de *k-nearest neighbours* (*k-NN*) trata de clasificar una muestra desconocida basándose en la clasificación conocida de sus vecinos más cercanos. Calcula las distancias entre la muestra desconocida y todas las muestras de entrenamiento y utiliza la regla de clasificación de asignarle la clase a la que pertenecen la mayoría de sus *k* vecinos más cercanos.

Las redes neuronales (*ANNs* por sus siglas en inglés *Artificial Neural Networks*) son una herramienta de aprendizaje automático que se usa para la clasificación de muestras. Se inspira en el funcionamiento del cerebro y trata de “aprender” como clasificar los datos usando el conocimiento contenido en el set de entrenamiento. Una red neuronal es un set de neuronas virtuales conectadas por links ponderados. Cada neurona realiza tareas muy simples pero la red puede realizar tareas complicadas cuando todas las

neuronas trabajan en conjunto. Comúnmente, las neuronas en las redes se organizan en capas, y se las conoce como *multilayer perceptrons*. Estas redes se componen por capas de neuronas: la capa de entrada, una o más capas “escondidas” y finalmente la capa de salida. Cada señal que entra a la red se propaga a través de la misma desde la capa de entrada hasta la de salida. El set de entrenamiento se utiliza para establecer los parámetros para que una determinada salida se obtenga cuando se le provee determinada entrada. Lo que se espera es que la red sea capaz de generalizar a partir de las muestras de entrenamiento y obtenga una buena exactitud en la clasificación. Es necesario primero definir la estructura de la red, luego entrenarla y por último realizar el *pruning* “podado” que consiste en eliminar los links y neuronas que no sean útiles [167].

Support vector machines (SVM por sus siglas en inglés) es otra herramienta de aprendizaje automático utilizada para clasificación de muestras [168]. Básicamente, trata de clasificar en dos clases disjuntas utilizando un clasificador lineal, un hiperplano definido en un espacio adecuado, que se determina con la información contenida en el set de entrenamiento. Sin embargo, el método se puede extender y ser usado para clasificar muestras en más de dos clases. Esto se logra usando más de un SVM organizados en una estructura tipo árbol, ya que cada uno es capaz de distinguir sólo entre dos clases. También se puede aplicar para los casos en que los datos no son linealmente separables, para esto, se utilizan funciones Kernel que permiten transformar el espacio original en otro donde las clases sean linealmente separables [167].

Es conveniente encontrar un clasificador que tenga la máxima distancia de las muestras más próximas de cada clase. Cuanto más amplio sea este margen, mayor debería ser la capacidad de generalizar del clasificador. Las muestras sobre las que se apoya el margen se llama “vectores soporte” y es lo que le da el nombre al método. Una representación gráfica del mismo se observa en la Figura 1.15.

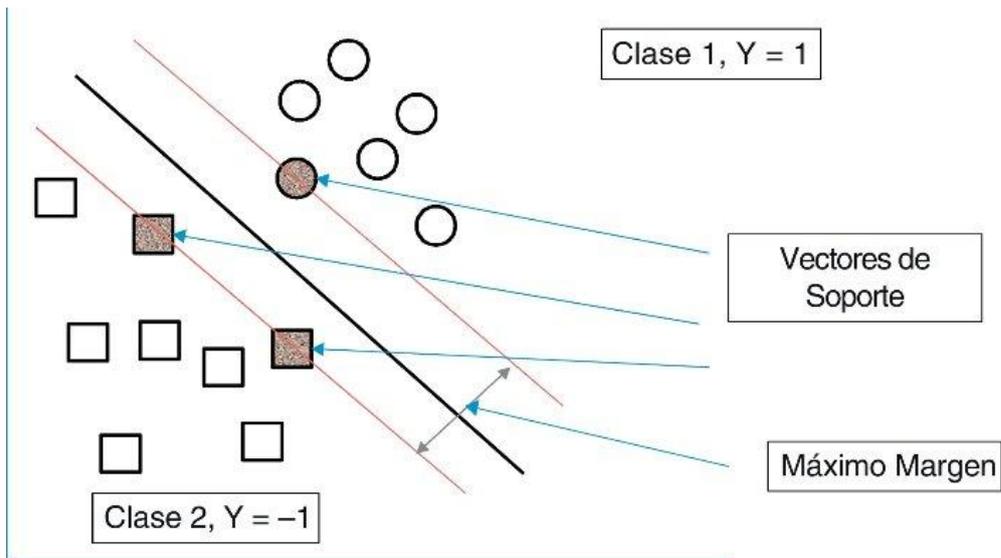


Figura 1.15 Representación gráfica ejemplificando una clasificación con Support Vector Machine. Imagen tomada de <http://www.elsevier.es/es-revista-enayos-sobre-politica-economica-387-articulo-las-entidades-financieras-lo-largo-90369480>.

Formulación del modelo y funciones Kernel:

Los datos tienen que ser clasificados en dos clases disjuntas. Si las clases son linealmente separables, se puede considerar un hiperplano como un buen clasificador:

$$w^T x + b = 0$$

Los parámetros w y b se pueden normalizar de forma que $w^T x + b = +1$ es el hiperplano que pasa por los vectores soporte de la clase C^+ ; y $w^T x + b = -1$ es el hiperplano que pasa por los vectores soporte de la clase C^- . De esta forma todas las muestras desconocidas x que cumplan con la ecuación $w^T x + b \geq 1$ se clasifican como pertenecientes a la clase C^+ y todas las muestras x que cumplan $w^T x + b \leq -1$ se clasifican como pertenecientes a la clase C^- . El proceso de entrenamiento de una SVM se puede formular como un problema de optimización: si x^+ es una muestra de la clase C^+ y x^- la muestra más cercana a x^+ perteneciente a la clase C^- , el margen M se puede expresar como la distancia entre x^+ y x^- :

$$M = |x^+ - x^-|$$

También puede ser expresado en términos de w :

$$M = \frac{2}{\sqrt{w^T w}}$$

Se busca un hiperplano que tenga un margen M lo más grande posible como clasificador para las clases C^+ y C^- , maximizar el margen M es equivalente a minimizar $\sqrt{w^T w}$. Por lo tanto el problema de encontrar el mejor clasificador se puede formular como un problema de optimización, donde la función objetivo a ser minimizada es:

$$\min_{w,b} \frac{1}{2} w^T w$$

Sujeto a:

$$w^T x^i + b \geq +1 \quad \forall i \in C^+$$

$$w^T x^i + b \leq -1 \quad \forall i \in C^-$$

Este es un problema de optimización convexo cuadrático que puede ser resuelto eficientemente. Se puede transformar en un problema equivalente por su formulación dual.

La formulación dual del problema de optimización para casos no lineales es:

$$\max_{\alpha} \sum_i \alpha_i - \frac{1}{2} \sum_{i,j} c_i c_j \Phi(x^i)^T \Phi(x^j) \alpha_i \alpha_j$$

Sujeto a:

$$\sum_i c_i \alpha_i = 0$$

$$\alpha \geq 0$$

Donde α es el vector que contiene las variables duales, y c es el vector cuya componente c_i es igual a 1 si el correspondiente x_i pertenece a la clase C^+ , y es igual a -1 si x_i pertenece a la clase C^- . A las variables duales también se le llama *multiplicadores de Lagrange*, y son números reales no-negativos. Éstas son las variables que SVM usa para aprender de los datos. Una vez que una SVM ha sido entrenada resolviendo este problema de optimización, se encuentra el hiperplano óptimo y se localizan los vectores soporte.

La función Φ es la que transforma los datos para que puedan ser separados por un hiperplano, sin embargo, como sólo participa en el producto interno, éste puede ser reemplazado por una función adecuada:

$$K(x^i, x^j) = \Phi(x^i)^T \Phi(x^j)$$

que es la función kernel, por lo que el problema de optimización es entonces:

$$\max_{\alpha} \sum_i \alpha_i - \frac{1}{2} \sum_{i,j} c_i c_j K(x^i, x^j) \alpha_i \alpha_j$$

En la práctica, se usan funciones kernel pre-definidas y se pueden usar distintas SVM con distintas kernel para seleccionar la que funciona mejor para el problema en estudio. Las funciones más usadas son kernel polinomial, kernel Gaussiana, y neural-net-style. La kernel Gaussiana:

$$K(x^i, x^j) = \exp\left(-\frac{(x^i - x^j)^2}{2\sigma^2}\right)$$

es la opción más razonable por su simplicidad y habilidad para modelar datos de complejidad arbitraria. La explicación es que el espacio obtenido tiene dimensión infinita y dos set de datos disjuntos cualquiera pueden ser separados por un hiperplano en un espacio de dimensión infinita.

Aplicaciones

Existen muchos cientos de aplicaciones de SVM reportadas en la literatura; solamente como ejemplo, para mostrar la amplia diversidad de las mismas, destacamos en [167]; el uso de SVMs para construir un sistema para reconocer chino escrito a mano [169], para el reconocimiento automático de especies de pájaros por sus sonidos [170] y para la detección de carne y harina de hueso en piensos mediante espectrometría de imagen de infrarrojo cercano (NIR, Near Infrared) [171].

Aplicaciones recientes de SVM en agricultura

En [172] se utiliza SVM para clasificar plantas de espinaca bien irrigadas y plantas que sufren stress por falta de agua, utilizando imágenes térmicas y visibles. En [173] se utiliza la selección de bandas hiperespectrales para detectar distintos estadios de madurez en arándanos para esto compara SVM con otros clasificadores (kNN y AdaBoost). También en [174] utiliza la selección de bandas hiperespectrales y SVMs buscando un sistema de control de calidad de piensos automático. Se han utilizado SVM también para predecir el peso que alcanzará el ganado utilizando datos históricos del rodeo [175] y para discriminar entre distintas especies de *Brachiaria* utilizando imágenes [176]. Otra aplicación en agricultura reportada consiste en el desarrollo de un sistema de alerta de aparición de *Bactrocera dorsalis* en plantaciones de frutales [177]. No se encontraron reportes de la aplicación de SVM para la evaluación de monitores ambientales ni de residuos de pesticidas en la literatura.

Validación de los métodos de clasificación

En general, las técnicas de clasificación que usan un set de datos de entrenamiento son capaces de estimar la exactitud de la clasificación sólo de las muestras conocidas y no de las desconocidas. Por lo tanto es importante validar los clasificadores usados en el proceso de clasificación para lo cual se utilizan técnicas de validación. Generalmente, el set de entrenamiento se divide al menos en dos partes. La primer parte se usa como set de entrenamiento y la segunda parte para validar.

Método de validación *Test Set*

Se basa en dividir el set de muestras de entrenamiento en dos partes: una parte se usa para el entrenamiento, y la otra parte se usa para la validación. En general, 70% de los datos se usan para entrenamiento y el resto (30%) se usa para evaluar la exactitud de la clasificación. Por lo tanto, es necesario decidir cuales datos se utilizarán para entrenamiento y cuales para validación, esto se puede realizar completamente al azar, pero puede haber casos en los que esto sea un problema porque el set de validación puede no ser representativo. Otra desventaja es que una parte consistente del set de entrenamiento no se usa realmente para entrenamiento, sino como set de validación, lo que es especialmente complicado cuando no hay muchos datos disponibles. Por otra parte, puede suceder que quede sólo una muestra de alguna clase en el set de validación por lo que la exactitud de clasificación estará siendo evaluada en esta única muestra lo que es estadísticamente irrelevante.

Método *leave-one-out*

En este método, la validación se realiza dejando sólo una muestra fuera del set de entrenamiento: las demás muestras se usan para el entrenamiento y la clasificación se valida con la muestra que ha quedado fuera. Este procedimiento se realiza tantas veces como muestras haya en el set de entrenamiento para que cada una sea sacada una vez. La exactitud de las clasificaciones en conjunto de las muestras que han sido sacadas es lo que da la evaluación del método. De esta manera se evita el problema de la representatividad y de la reducción del set de entrenamiento que tiene el método *test set*. La desventaja está en el costo computacional de este método. Si el set de entrenamiento contiene n muestras, entonces es necesario entrenar y aplicar el método de clasificación n veces. Si n es suficientemente grande, esto puede ser demandante computacionalmente.

Método *k-fold*

La opción óptima entre la velocidad del método *test set* y la confiabilidad de *leave-one-out* es el método *k-fold*. En este método las muestras del set de entrenamiento se dividen en k grupos, luego para cada grupo se realiza el método de clasificación usando el set de entrenamiento sin el mismo y el grupo se usa para validación. La elección del valor del parámetro k es muy importante porque es lo que da el compromiso entre exactitud y velocidad computacional.

2 Planteo del problema y objetivos del trabajo

La evaluación simple de la calidad ambiental de agroecosistemas no es posible con las herramientas disponibles hoy. Todas son miradas parciales de compartimentos que se estudian como estancos y no es directa su interrelación. No se dispone de una herramienta que sea capaz de resumir la información ambiental disponible a partir de la cual sea posible calificar la calidad del ambiente. El presente proyecto de tesis tiene como hipótesis que esa herramienta capaz de condensar información ambiental que pueda luego interpretarse para evaluar la calidad del agroecosistema es la colmena. Esta idea ha sido planteada por diversos investigadores, pero sin resultados concluyentes. En su viaje por comida, las abejas entran en contacto directo con el ambiente que rodea la colmena en un radio promedio de 2000 a 3000 metros. Colectan alimento que está, según su origen, potencialmente contaminado. Este alimento y sus contaminantes son almacenados en la colmena y por lo tanto del análisis directo de sus diversas matrices, se tiene, una visión de los agroquímicos aplicados en la región. Por otro lado la presencia de estos pesticidas afecta la biología general de la colmena. La hipótesis de trabajo es que de la interrelación de datos biológicos y químicos de la colmena, surge la ductilidad y plasticidad de la misma como biomonitor. Para que sirva como bioindicador de calidad ambiental de un agroecosistema, es necesario adaptar todo el conocimiento disponible para desarrollar formas de extraer información de ella. En particular, debemos definir parámetros que se ajusten a las características de los sistemas productivos en Uruguay. Para esto se deben seleccionar cuidadosamente los pesticidas a evaluar y desarrollar metodologías de análisis multiresiduo para cada producto de la colmena (abeja, cera, miel, polen). Estas herramientas analíticas son las necesarias para evaluar experimentos y monitoreos que muestren la aplicabilidad de la colmena como bioindicador de calidad ambiental de una región. Por último, para completar la idea y volverla una herramienta útil para el estudio del ambiente agrícola y ganadero se plantea como un objetivo de este trabajo de tesis el estudiar la posibilidad de desarrollar modelos implementables en paquetes informáticos que permitan, a partir de los datos biológicos y químicos colectados, una evaluación a prima facie del impacto ambiental de la utilización de agroquímicos en agroecosistemas.

3 Metodología para el análisis multiresiduo de pesticidas en cera de abejas basada en QuEChERS por LC-MS/MS y GCxGC-TOF (Artículo I)

3.1 Introducción

La cera de abejas es un producto farmacéutico y cosmético que figura en las farmacopeas de EEUU y de la Unión Europea. También es ampliamente usada como aditivo alimentario (E 901), para el recubrimiento de frutas frescas, frutas secas, dulces y quesos, así como un componente de diferentes ceras de pulido. La cera de abejas es una mezcla muy compleja de compuestos lipofílicos como mono-, di- y tri-ésteres de alcoholes alifáticos de cadena larga, con ácidos grasos o hidroxiácidos (con un contenido de aproximadamente un 65%); ácidos grasos libres, principalmente C26 y C30 (ca. 12%), hidrocarburos de cadena larga (aproximadamente 12%) y otros compuestos tales como hidroxiácidos libres; alcoholes alifáticos libres y carotenoides entre otros. En la antigüedad se creía que la cera de abejas se recogía de las flores o era hecha con el polen, pero no fue hasta 1744 que H. C. Hornbostel descubrió que es sintetizada por cuatro pares de glándulas epidérmicas secretoras de cera en el lado ventral del abdomen de las abejas obreras. Las abejas utilizan la cera principalmente para la construcción de los panales que eliminan, remodelan y la utilizan una y otra vez. Los panales son, literalmente, la guardería, las paredes, la despensa de almacenamiento, el hogar, la farmacia y la pista de baile para la colonia [178].

Los pesticidas pueden entrar en la colmena, ya sea directa o indirectamente [62,80]. Varios acaricidas, como el cumafos, el amitraz y el fluvalinato, se aplican a la apicultura para el control del ácaro *Varroa*, pero otros contaminantes ambientales también encuentran su camino a la colmena cuando las abejas vuelan alrededor de ella en busca de néctar y polen. Por esta razón, las abejas melíferas y los productos de las abejas han sido sugeridos como bioindicadores o monitores de contaminación del ambiente en varios países [46,51,53,179-181]. Un problema emergente para la apicultura es el causado por el reciclaje de la cera de abejas para establecer una nueva colmena, lo que conduce a una acumulación progresiva de los pesticidas en el mismo. En varios estudios realizados en diferentes países, los residuos de numerosos plaguicidas se han encontrado en la cera de abejas [59,60,80,156,157,182-184].

Existen unos pocos métodos descritos en la literatura para el análisis de residuos de plaguicidas en la cera de abejas, fundamentalmente para el análisis de pesticidas individuales [157], o un grupo de pesticidas, tales como los acaricidas [156,183], o pesticidas lipofílicos [64]. En todos los casos, se realiza la determinación cuantitativa empleando técnicas de cromatografía líquida o gaseosa acoplada [62,63,80]. Mullin *et al.* identificaron un total de 87 pesticidas y metabolitos diferentes utilizando el enfoque QuEChERS seguido de determinación por LC-MS/MS en un estudio en el que se analizaron 259 muestras de cera. Sin embargo, la evaluación y validación del método analítico empleado, no fue publicado [61]. Las metodologías empleadas en los estudios mencionados anteriormente involucran fundamentalmente la disolución de la cera de abejas, seguido de extracción líquido-líquido y una posterior extracción en fase sólida como procedimiento de *clean up*.

En este trabajo, se presenta una sencilla variación del método QuEChERS [134] que permite la determinación de 51 residuos de plaguicidas en la cera de abejas por LC y GC. Los trece pesticidas analizables por GC y los treinta y ocho analizables por LC-empleados en este estudio fueron seleccionados en base a su relevancia para la cera de abejas como se refleja en la frecuencia de los hallazgos de residuos en la cera de abeja y otros productos apícolas de acuerdo con la literatura y la base de datos “*Pesticides Online*” [185], así como los datos recientes sobre el uso y la importación de plaguicidas en Uruguay. Lamentablemente, sólo se tuvo conocimiento del estudio de Mullin *et al.* [61] después de completar nuestros experimentos y como consecuencia de ello, varios pesticidas que fueron detectados con frecuencia en ese trabajo, no se incluyeron en el presente trabajo.

3.2 Resultados y discusión

Impacto del tamaño de muestra sobre las recuperaciones de residuos de pesticidas

La distribución de pesticidas entre la fase de acetonitrilo y la fase de cera de abejas fundida, depende de la relación de volumen de las fases y la lipofilicidad de los plaguicidas como se refleja por sus valores de log Kow. El aumento del volumen de la fase de cera de abejas afectará el reparto en el equilibrio de los pesticidas y en consecuencia, las recuperaciones de pesticidas, siendo los lipofílicos los más afectados.

La influencia del tamaño de la muestra de cera en las recuperaciones se estudió de la siguiente forma: Diferentes cantidades de muestra de cera (0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; y 5 g) se envenenaron con 200 μL de una solución de plaguicida que contiene $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada pesticida disuelto en acetonitrilo ($0,2 \mu\text{g}$ de cada uno de ellos) e inmediatamente se extrajo de acuerdo con el procedimiento descrito.

La Figura 3.1 muestra cómo la variación del tamaño de la muestra afecta las recuperaciones para algunos de los pesticidas más lipófilos.

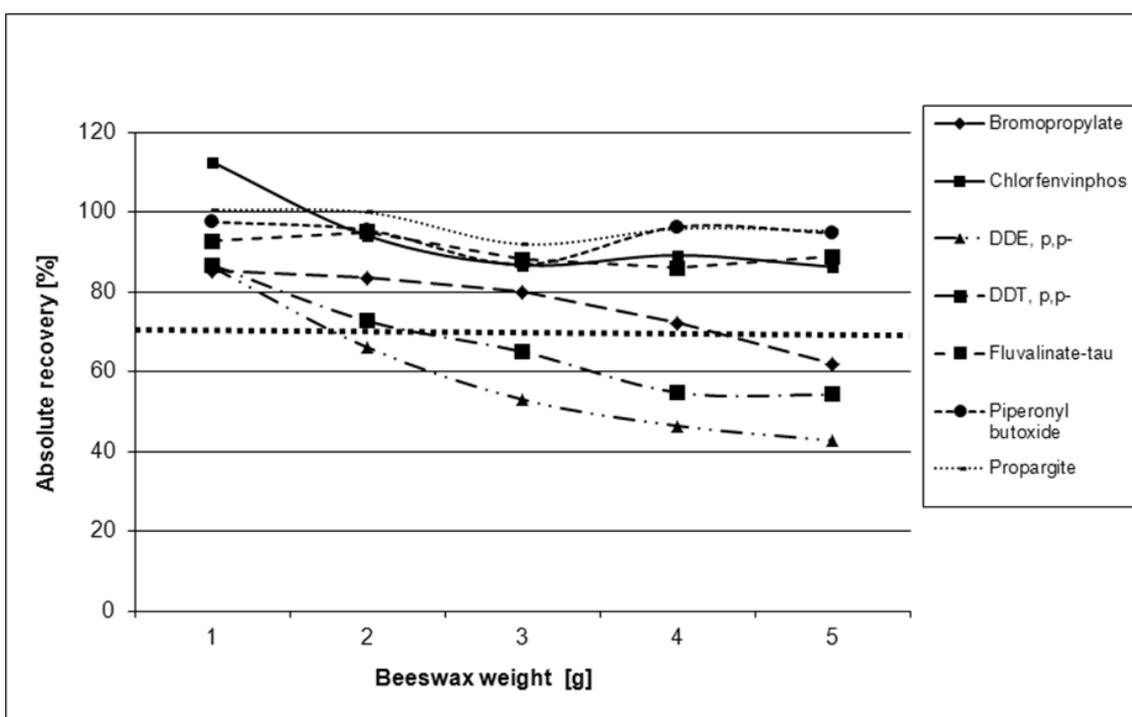


Figura 3.1 Influencia de la cantidad de muestra en las recuperaciones de pesticidas

Como era de esperar, las recuperaciones de pesticidas disminuyeron a medida que el volumen de la fase de cera se incrementó. La caída en las recuperaciones fue más pronunciada para los plaguicidas con un fuerte carácter lipófilico como el DDT, DDE y el bromopropilato (valores $\log K_{ow}$ de 6,91; 6,36 y 5,4 respectivamente) que más bien permanecen en la cera líquida en lugar de particionarse hacia la fase de acetonitrilo. A partir de los resultados de este experimento se consideró que una proporción de 2 g de la muestra de cera a 10 mL de acetonitrilo es un buen compromiso con casi todos los pesticidas relevantes para su determinación en cera, además se obtuvieron

recuperaciones aceptables (> 70%) con una concentración en matriz final de $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ y un nivel tolerable de carga de coextractivos en el extracto final. La misma proporción muestra a acetonitrilo también fue empleada anteriormente en la extracción de aceites vegetales [134]. Debe tenerse en cuenta que cuando la relación entre la cera y el acetonitrilo se mantiene constante, las recuperaciones obtenidas deben ser, en principio, altamente reproducibles incluso permitiendo la corrección por recuperación, aplicando un factor de recuperación determinado a través de experimentos de validación.

Influencia del tamaño de partícula en la capacidad de extracción de los residuos presentes en muestras blanco

La escasa capacidad de acetonitrilo para disolver ceras y lípidos es por un lado beneficioso, ya que excluye posibles coextractivos de la matriz en los extractos de residuos de pesticidas. Por otro lado, el pobre poder de disolución de acetonitrilo hacia compuestos de baja polaridad limita considerablemente su idoneidad para la extracción de pesticidas apolares incorporadas en lípidos o en la cera. Asegurar una buena accesibilidad a los pesticidas incorporados en la cera del disolvente de extracción es clave para lograr buenas recuperaciones y un amplio alcance del método (Figura 3.2).

Para demostrar la importancia de fundir la cera para obtener la óptima accesibilidad de los residuos ocluidos en la misma y para chequear como el tamaño de partícula afecta la extractabilidad, se fundió una cierta cantidad de cera y se fortificó con una mezcla de pesticidas cubriendo una amplia gama de polaridades al nivel de $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$. De esta forma se aseguró una distribución homogénea de los residuos. Luego se llevó a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$, se molió con cuchillas en un molino agregando hielo seco y finalmente se tamizó obteniendo las fracciones 125-250, 250-500, 500-1000 μm . Luego 2 g de cada fracción se extrajeron con acetonitrilo durante 1 o 15 min por triplicado y a dos temperaturas: ambiente y $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Se realizó el promedio de los resultados obtenidos para cada pesticidas. Se tomó como 100% los resultados obtenidos para la extracción a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ con la cera fundida. La Figura 3.2 muestra los resultados de este experimento lo que simultáneamente demuestra el efecto positivo de una buena disminución de tamaño de partícula (mayor superficie de contacto) y el de las mayores temperaturas en los porcentajes de recuperación. Se demuestra que el fundir la cera asegura la óptima accesibilidad a los residuos via partición líquido-líquido.

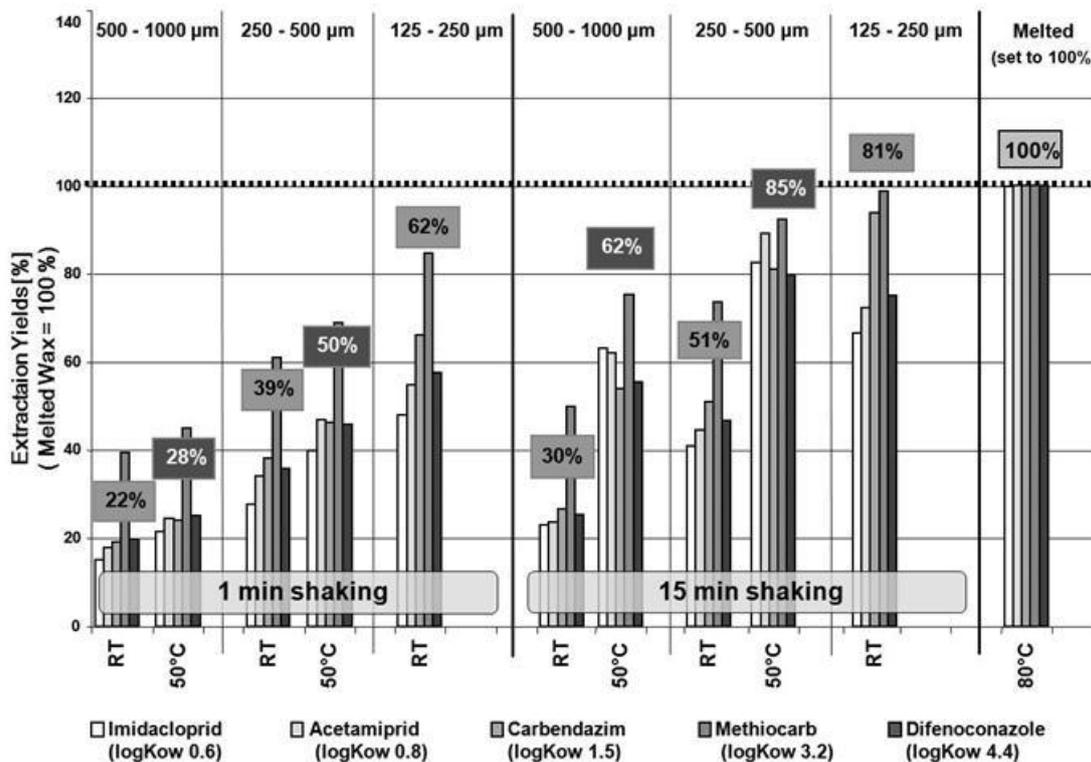


Figura 3.2 Impacto del tamaño de partículas (fracciones: 125-250 µm, 250-500 µm y 500-1000 µm), temperatura (temperatura ambiente, 50°C y 80°C) y tiempo de agitación (1 min y 15 min) en los rendimientos de extracción de los pesticidas incorporados en la cera.

Notar que en la Figura 3.2 los resultados obtenidos al extraer la cera a 80°C (usando el procedimiento descrito en este artículo) se fijaron como 100%, $n=3$ en cada caso. Los valores de porcentajes en los recuadros indican los rendimientos de extracción relativos promedio de cinco pesticidas incorporados a la cera (imidacloprid, acetamiprid, carbendazim, metiocarb y difenoconazol).

Comparación de diferentes métodos de *clean up*

La cera de abejas se compone de compuestos altamente lipofílicos tales como ésteres de alcoholes alifáticos de cadena larga, con ácidos grasos e hidroxiácidos grasos que son responsables de dos terceras partes de la composición total, mientras que los hidrocarburos de cadena larga representan ca. 12% de la misma y niveles de trazas de carotenoides. En base a su baja solubilidad en acetonitrilo, no se espera que tales

compuestos altamente lipofílicos estén presentes en niveles notables en los extractos finales. También se espera que se puedan eliminar fácilmente, ya sea mediante el *freeze out* de los extractos, para reducir aún más su solubilidad y causar la precipitación de lípidos, o por medio de d-SPE usando sorbentes tipo RP-C18. La cera de abejas también contiene compuestos más polares como ácidos grasos libres de cadena larga (que marca ca. 12% de la cera de abeja), hidroxiácidos grasos libres y alcoholes grasos alifáticos libres. A pesar de que poseen restos polares, estas moléculas son también altamente lipofílicas lo que también limita su solubilidad en acetonitrilo. En menor grado tales compuestos también se pueden eliminar a través del *freeze out* o del uso de sorbentes como C18 pero para los ácidos grasos la d-SPE con PSA es el enfoque de *clean up* de elección. Algunos de los pigmentos polares procedentes de las flores visitadas por las abejas (por ejemplo antocianidinas) también se pueden eliminar a través de d-SPE.

Se llevaron a cabo varios experimentos para estudiar la medida en que los coextractivos de la cera de abejas se pueden eliminar a través del *freeze out* y / o el uso de d-SPE C18 y / o PSA. La eficiencia del *clean up* se evaluó no sólo en base al residuo seco remanente después de la evaporación del extracto sino también mediante la observación de cromatogramas utilizando un equipo GCxGC-TOF (Figura 3.3). Aspectos prácticos como la sencillez del procedimiento de *cleanup*, también fueron tenidos en cuenta.

A continuación del primer paso de extracción (2g de cera + 10mL MeCN a 80 °C en baño de agua) se tomaron alícuotas del extracto inicial y fueron sometidas a los siguientes procedimientos de *cleanup*: a) *freeze out* (dejando la alícuota por 1h, 2h y 4h en el freezer (-20°C)); b) d-SPE con PSA (25 y 50 mg mL⁻¹); c) d-SPE con C18 (25 y 50 mg mL⁻¹), d) *freeze out* con d-SPE con PSA (25 mg mL⁻¹) y e) d-SPE con PSA (25 mg mL⁻¹) mas C18 (25 mg mL⁻¹).

También se evaluó cómo la adición de agua a los extractos crudos puede afectar la eliminación de coextractivos durante el *clean up*. Se esperaba un efecto positivo en la eliminación de los compuestos lipofílicos, debido a un aumento de la polaridad del disolvente y un efecto negativo sobre la eficiencia de d-SPE utilizando PSA debido a la interferencia de agua con la formación de enlaces de hidrógeno. Se realizaron los siguientes experimentos adicionales que implican la adición de agua al extracto inicial: f) la adición de agua (3; 6 y 10%) seguido de un paso de *freeze out* durante (1 y 2 h); g)

adición de agua (3; 6, y 10%) seguido de d-SPE con C18 (25 y 50 mg mL⁻¹); y h) la adición de agua (3 y 6%), seguido de d-SPE con PSA (25 mg mL⁻¹).

Como puede verse en la Tabla 3.1, la extracción d-SPE utilizando PSA demostró ser la más adecuada para eliminar la mayor fracción de coextractivos a partir de los extractos iniciales (se eliminó el ca. 70-75% del residuo seco). Como puede verse en la Figura 3.3, el PSA también elimina de manera efectiva ácidos grasos que presentaban grandes picos en el cromatograma. La extracción dispersiva utilizando C18 y posterior *freeze out* tuvo un efecto similar eliminando ca. 15 a 20% de residuo seco cuando no se añadió agua, y entre 25 y 30% cuando se añadió agua. Sin embargo, los cromatogramas observados GC-MS / MS parecían similares para ambos tratamientos. Cuando se realizó el *cleanup* empleando una combinación de PSA con C18 (o *freeze out*) es muy recomendable para reducir los coextractivos de la matriz que se introducen en el sistema cromatográfico ya sea de GC y LC. Por otra parte, la combinación de *freeze out* seguido de d-SPE con C18 y PSA rindió los mejores resultados, ya que garantiza la eliminación de los lípidos que se redisuelven debido al aumento de la temperatura durante la filtración del extracto. La introducción de extractos sin limpiar al sistema cromatográfico requeriría intervalos de mantenimiento más cortos y reducir la productividad general, especialmente para sistemas de cromatografía gaseosos.

La adición de agua fue ligeramente beneficiosa en todos los experimentos para contribuir a eliminar los lípidos pero se consideró que en general no es útil, ya que implica la adición de otros dos pasos en la preparación de la muestra (agua y MgSO₄). Dentro de este contexto, el mejor procedimiento y las condiciones para el análisis de residuos de pesticidas en cera de abejas utilizando un enfoque QuEChERS fueron las descritas. Dos gramos de cera se fundieron a 80 °C en baño de agua y se extrajo con acetonitrilo. La solución de extracción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se congeló durante la noche. De la solución obtenida se toma una alícuota y se trata después con RP-C18 y PSA y se inyecta en el GC o LC-MS/MS.

Tabla 3.1 Residuo seco del extracto derivado de emplear distintos procedimientos de cleanup

	Residuo seco por mL de extracto [mg]	Comparado al residuo seco en el extracto crudo (=100%)	Comparado a la cantidad inicial de muestra (200 mg/mL=1000‰)
Sin clean-up (Extracto crudo)	3,12	100%	15,6
freeze out 1 h	2,80	90	14,0
freeze out 2 h	2,72	87	13,6
freeze out 4 h	2,60	83	13,0
+3 % H ₂ O freeze out 1 h	2,75	88	13,7
+3 % H ₂ O freeze out 2 h	2,78	89	13,9
+6 % H ₂ O freeze out 2 h	2,60	83	13,0
+10 % H ₂ O freeze out 2 h	2,40	77	12,0
PSA (25 mg/mL)	1,16	37	4,3
PSA (50 mg/mL)	1,15	37	4,1
+ 3 % H ₂ O PSA/MgSO ₄ (25/150 mg/mL)	1,00	32	5,0
+ 6 % H ₂ O PSA/MgSO ₄ (25/150 mg/mL)	0,97	31	4,9
C18 (25 mg/mL)	2,65	85	13,3
C18 (50 mg/mL)	2,55	82	12,7
+ 3 % H ₂ O C18/MgSO ₄ (25/150 mg/mL)	2,40	77	12,0
+ 6 % H ₂ O C18/MgSO ₄ (25/150 mg/mL)	2,32	74	11,6
+ 10 % H ₂ O C18/MgSO ₄ (25/150 mg/mL)	2,17	70	10,9
+ 3 % H ₂ O freeze out 2 h/filtración/PSA/MgSO ₄ (25/150 mg/mL)	0,80	26	4,0
PSA/C18 (25/25 mg/mL)	0,85	27	4,3
Freeze out/PSA (25 mg/mL)	0,77	25	3,8
Freeze out/PSA/C18 (25/25 mg/mL)	0,71	23	3,5

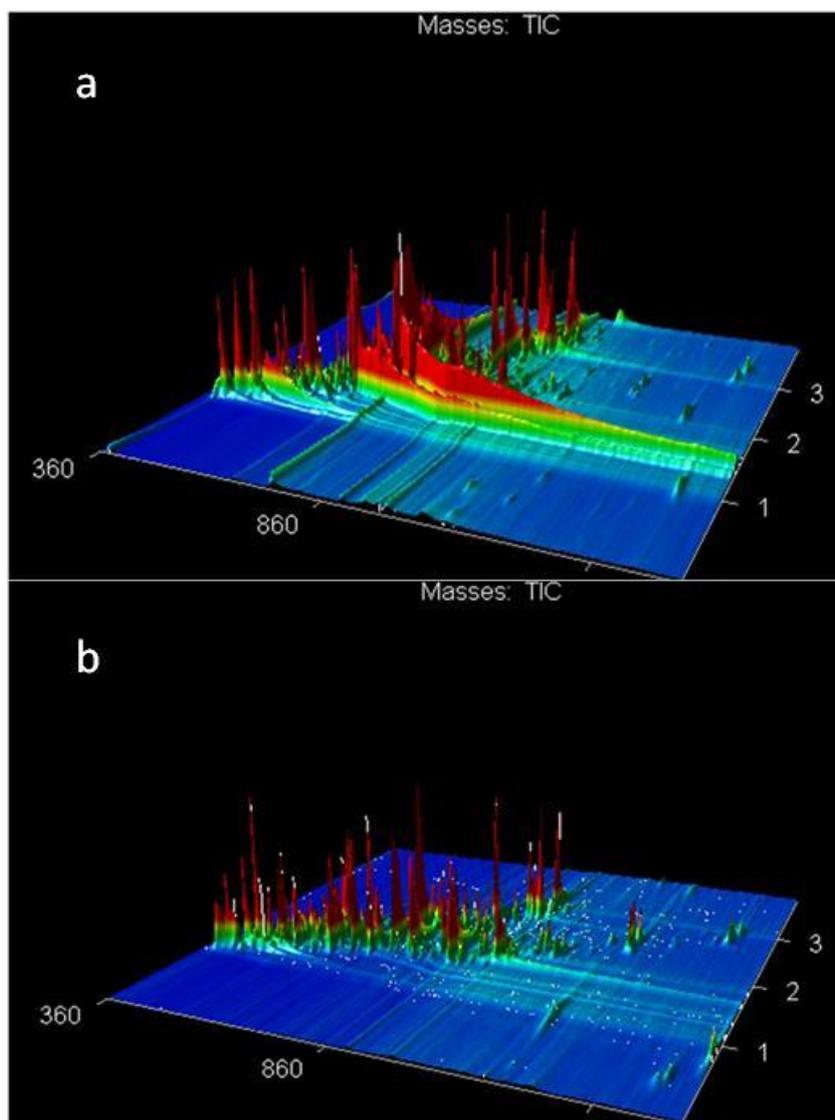


Figura 3.3 GCxGC-TOF plots of a) primer extracto (sin cleanup); y b) extracto luego de dSPE con PSA

Tabla 3.2 Recuperaciones, RSDs y LOQs de los pesticidas analizados por GCxGC-TOF (n=5 réplicas). * Pesticidas presentes en la muestra de cera usada para fortificar

	0,2 mg kg ⁻¹		0,1 mg kg ⁻¹		LOQ (mg kg ⁻¹)	Rango lineal (mg kg ⁻¹)	Coeficiente de correlación lineal (r ²)	Efecto matriz %
	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)				
Bromopropilato*	83	4	102	9	0,1	0,025-1	0,992	139
Clorfenvinfos	91	10	80	6	0,1	0,25-1	0,998	15
DDE, p,p	61	21	73	4	0,1	0,025-1	0,98	144
DDT, p,p	103	3	108	17	0,1	0,025-1	0,995	127
Diazinon	81	4	94	12	0,1	0,25-1	0,999	155
Endosulfan alfa	120	10	158	18	0,2	0,25-1	0,999	245
Endosulfan beta	88	12	104	40	0,2	0,25-1	0,997	89
Endosulfan sulfato	71	11	84	8	0,1	0,25-1	0,997	61
Lindano	93	5	101	7	0,1	0,05-1	0,999	185
Forato	106	5	112	9	0,1	0,25-1	0,999	283
Piperonil butóxido*	95	1	102	10	0,1	0,025-1	0,999	79
Propargite*	76	13	284	28	0,2	0,25-1	0,998	-32
Trifluralin	79	13	85	16	0,1	0,25-1	0,999	188
Tau-Fluvalinato*	-	-	-	-	-	0,25-1	0,999	23

Validación del método

Después de seleccionar la cantidad de muestra óptima, el tamaño de partícula y el mejor enfoque de *clean up*, cinco réplicas de piezas en bruto de cera de abejas en diferentes niveles de concentraciones (0,1; 0,2 mg kg⁻¹ se utilizaron para el análisis por GCxGC-TOF y 0,01; 0,1; 0,2 mg kg⁻¹ para el análisis por LC-QTrap). Todas las muestras se analizaron por quintuplicado para evaluar la exactitud (% de recuperación) y la repetibilidad (% RSD) del procedimiento.

De acuerdo con las directrices de la DG-SANCO [139], hemos considerado nuestros límites de reporte (RL, por sus siglas en inglés) como los más bajos niveles validados con éxito, es decir, los niveles que se alcanzaron recuperaciones aceptables (70-120%) y RSD<20%. Los límites de reporte habrían sido sin duda diferentes si se hubieran elegido otros niveles así como el tipo de la instrumentación utilizada y las condiciones utilizadas.

Para GCxGC-TOF se utilizó la calibración con ajuste por matriz, mientras que para las curvas de calibración utilizando LC-MS/MS fueron construidas utilizando tanto en solvente y ajustadas a la matriz en cinco niveles 0,001; 0,002; 0,01; 0,02 y 0,05 g mL⁻¹ que corresponde a 0,005; 0,01; 0,05; 0,1 y 0,25 mg kg⁻¹ de cera de abejas. El análisis GCxGC-TOF se llevó a cabo utilizando un ISTD mientras que no se utilizó ISTD utilizando LC-MS/MS.

Se utilizaron los estándares de calibración en un disolvente puro para evaluar los efectos de la matriz (EM) en LC-MS/MS. El porcentaje de los EM se calcularon como la diferencia de % con el mejor ajuste de las curvas de calibración con ajuste matricial contra las pendientes respectivas de mejor ajuste de las curvas de calibración en disolvente. Las áreas de los picos en lugar de las áreas relativas de los picos contra la ISTD fueron utilizados para evitar que los efectos de la matriz sobre la ISTD potencialmente afectar el cálculo. Para GCxGC-TOF los EM fueron altos y positivos (Tabla 3.2) excepto propargite, que tuvo un EM negativo.

En LC-MS/MS los EM fueron pronunciados y variables entre analitos como se muestra en la Tabla 3.3. Esto se explica porque el efecto de la matriz se debe a si un analito coeluyen con coextractivos de la matriz, afectando el rendimiento de iones libres generados en la fuente ESI y por lo tanto en las señales en el detector. Cuanto mayor sea

la concentración de los componentes de la matriz que eluyen, más afectada se verá la liberación de iones libres de las microgotas dentro de la fuente ESI. El clean up d-SPE con PSA contribuyó a reducir el EM (boscalid -10 a -1; imidacloprid -50 a 3; tebuconazol de -33 a 9, dimetoato de 20 a -2; carbaril de -20 a 3; tiacloprid de -25 a 1). Observaciones similares se habían realizado previamente en matrices complejas como naranja [129]. Cuando el EM es alto se recomienda el uso de calibración en matriz (preparado a partir de extractos de matriz blanco si se encuentra disponible) o el método de adiciones estándar para obtener una cuantificación confiable. Los coextractivos de la matriz en LC-MS/MS causan principalmente supresión de la señal, mientras que un aumento de la señal es típicamente observado en las aplicaciones en GC. Esto se debe a los diferentes mecanismos detrás del EM en cada caso [186,187]. Los coextractivos de la cera se comportaron como protectores de analitos en GC impidiendo la degradación de los pesticidas en el inyector y en la columna cromatográfica, resultando en un aumento de la señal.

Las recuperaciones de las determinaciones por GC y LC de los pesticidas estuvieron en casi todos los casos entre 70 y 120% con RSDs debajo de 20% por lo menos en uno de los niveles ensayados (Tablas 3.2 y 3.3). La excepción fue hexitiazox que no mostró recuperaciones y / o RSD aceptables en ninguno de los niveles estudiados. La razón de esto es que la cera de abejas que se utilizó para llevar a cabo los experimentos de recuperación contenía este residuo. Este problema también se observó durante el análisis de cumafós y tau-fluvalinato: las muestras de cera de abeja disponibles en el mercado contienen cantidades muy altas de estos compuestos y hacen imposible el ensayo de recuperación. El problema se resolvió utilizando como blanco una muestra de cera de abejas de la colección de la Cátedra de Farmacognosia (de fecha 1932) de la Facultad de Química, de la Universidad de la República, que no contenía residuos.

Tabla 3.3 Porcentajes de recuperación, RSDs y LOQs de los pesticidas analizados por LC-MS/MS (n=5 réplicas).

	0,2 mg kg ⁻¹		0,1 mg kg ⁻¹		0,01 mg kg ⁻¹		LOQ (mg kg ⁻¹)	Rango lineal (mg kg ⁻¹)	Coeficiente de correlación lineal (r ²)	Efecto matriz %
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec(%)	RSD (%)				
Amitraz	73	2	77	4	85	13	0,01	0,005-0,25	0,999	-2
Atrazina	89	4	94	4	97	13	0,01	0,006-0,24	0,999	-
Azoxistrobin	110	3	111	4	112	14	0,01	0,005-0,25	0,997	24
Boscalid	98	6	103	8	105	24	0,1	0,005-0,25	0,999	5
Carbaril*	104	4	111	5	165	6	0,1	0,005-0,25	0,995	4
Carbaril [#]					112	2				
Carbendazim	72	4	78	6	100	15	0,01	0,005-0,25	0,999	32
Carboxin	104	4	108	6	107	9	0,01	0,005-0,25	0,999	-6
Clorpirifos-etil*	92	6	105	6	218	15	0,1	0,005-0,25	0,999	-13
Clodinafop-propargil	104	1	105	5	104	14	0,01	0,005-0,25	0,999	88
Cumafos*	144	3	229	4	1679	8	-	0,005-0,25	0,999	24
Cihalotrina-lambda	92	16	100	9	<i>no detectado</i>		0,1	0,005-0,25	0,999	-23
Dimetoato	102	6	106	6	107	7	0,01	0,005-0,25	0,997	2
Epoxiconazol	94	4	106	7	<i>no detectado</i>		0,1	0,005-0,25	0,999	-33
Fenpropatrina	95	7	102	11	159	15	0,1	0,006-0,24	0,997	-
Flutriafol	101	11	114	15	<i>no detectado</i>		0,1	0,005-0,25	0,998	-55
Hexitiazox*	182	4	323	5	2800	3	-	0,005-0,25	0,999	-41
Hexitiazox [#]					87	8				
Imidacloprid	108	7	106	8	100	9	0,01	0,005-0,25	0,996	-0,1
Iprodiona	108	27	123	24	<i>no detectado</i>		0,2	0,005-0,25	0,997	-7
Linuron	96	6	99	5	107	15	0,01	0,005-0,25	0,999	-41
Metalaxil	107	3	109	5	113	15	0,01	0,005-0,25	0,997	-20
Metomilo	111	8	127	4	113	12	0,01	0,005-0,25	0,999	-21

Metoxifenozyd*	107	4	111	5	146	7	0,1	0,005-0,25	0,999	-15
Metoxifenozyd [#]					116	18				
Metolacloz	96	3	103	2	120	17	0,01	0,005-0,25	0,999	-20
Metribuzin	102	7	111	7	<i>no detectado</i>		0,1	0,005-0,25	0,999	-3
Miclobutanil	106	5	102	10	123	14	0,1	0,005-0,25	0,998	-7
Ometoate	96	11	104	8	111	6	0,01	0,005-0,25	0,992	-33
Pendimetalin	81	19	83	19	<i>no detectado</i>		0,1	0,06-0,24	0,995	-
Pirimicarb	108	3	114	4	111	11	0,01	0,005-0,25	0,999	-10
Profenofos	89	6	94	6	92	18	0,01	0,005-0,1	0,999	-32
Piraclostrobin	102	4	106	5	112	14	0,01	0,005-0,25	0,999	-33
Tebuconazol	98	11	99	5	103	27	0,1	0,005-0,25	0,999	2
Tebufenozide	96	4	99	5	104	15	0,01	0,005-0,25	0,998	-25
Tetraconazol	103	7	104	6	111	23	0,1	0,005-0,25	0,996	-22
Tiacloprid	113	7	120	5	108	18	0,01	0,005-0,25	0,999	-7
Tiametoxan	103	14	103	7	106	15	0,01	0,005-0,25	0,999	13
Tiodicarb	90	5	85	7	107	12	0,01	0,005-0,25	0,999	-25
Tiofanato-metil	94	5	91	7	97	15	0,01	0,005-0,25	0,997	-22
Triflumuron	91	5	98	10	104	12	0,01	0,005-0,25	0,999	-46

* Pesticidas presentes originalmente en la muestras de cera usada para fortificar. [#] Experimento de recuperación a 0,01 en extracto blanco de cera

(Colección de Farmacognosia)

Algunos ensayos de recuperación se repitieron usando como material blanco la cera del año 1932 de la colección de Farmacognosia, la cual no contenía residuos de pesticidas. Entonces se pudieron evaluar adecuadamente las recuperaciones de carbaril, hexitiazox, y metoxifenozone a $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ encontrándose en el rango 87 a 116% y las RSDs por debajo de 18%, mientras que clorpirifos no se pudo cuantificar a este nivel bajo. Cumafos y tau-fluvalinato se re estudiaron a niveles más altos ($0,2$ y $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$) porque se usan directamente en la colmena para proteger las abejas de los ácaros. Se obtuvieron buenos resultados para tau-fluvalinato al nivel $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ (102% recuperación y 5% RSD) y para cumafos en ambos niveles (103 y 109% de recuperación; 4 y 10% RSDs respectivamente). Al ser la cera un producto natural, es frecuente que haya diferencias en la composición entre distintas muestras. En la Tabla 3.4 se observan los datos de validación para un grupo de pesticidas seleccionados fortificados en tres muestras diferentes (una de Alemania, una de Uruguay y otra de la colección de Farmacognosia). Estos datos muestran la adecuación y robustez del método para esta matriz compleja. El uso de distintas muestras de cera con distintos pesticidas presentes en las mismas para la validación analítica es una herramienta útil para verificar los resultados y para aumentar el alcance de los compuestos que se pueden validar con éxito.

Tabla 3.4 Porcentajes de recuperación y RSDs (n=5) de un grupo seleccionado de pesticidas a $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ en distintas muestras ensayadas

	Cera comercial de Alemania		Cera comercial de Uruguay		Cera de la colección de Farmacognosia	
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)
Azoxistrobin	111	4	88	4	99	7
Boscalid	103	8	76	6	107	7
Carbaril	111	5	84	3	93	4
Clorpirifos-etil	105	6	77	6	94	11
Dimetoate	106	6	86	3	94	10
Imidacloprid	106	8	86	3	93	3
Tebuconazol	99	5	77	1	78	10
Tiacloprid	120	5	82	2	99	12
Tiametoxan	103	7	86	3	98	20

Una simple variación del método QuEChERS, que implica la extracción de la cera fundida a altas temperaturas (~ 80 ° C) para permitir la partición líquido-líquido entre la cera en estado líquido y el acetonitrilo y un posterior *freeze out* seguida de un paso SPE dispersiva, resultó ser eficaz para el análisis multiresiduo de 50 pesticidas en cera de abejas. El paso de precipitación en frío sumado a la dispersión en fase sólida usando PSA y C18 es capaz de eliminar ca. 75% de los coextractivos de la primera extracción. El análisis por LC-MS/MS y por GCxGC-TOF, permitió determinar 50 de los 51 pesticidas evaluados, mostrando la utilidad de la metodología desarrollada. La metodología puede ser expandida a otros residuos de pesticidas de interés. La cera de abejas es un reservorio de largo plazo de contaminantes por sus propiedades fisicoquímicas, almacena residuos de pesticidas a los que la colmena ha estado expuesta. Por lo tanto, el análisis de esta matriz compleja dará información relevante sobre la sustentabilidad de agroecosistemas específicos.

4 Análisis multiresiduo de 41 pesticidas en miel por LC-MS/MS: evaluación de dos métodos de clean-up (Artículo II)

4.1 Introducción

Del monitoreo de residuos de pesticidas en miel es posible coleccionar datos relevantes con relación al riesgo potencial que representan para la salud de los consumidores, pero además se obtiene información de los pesticidas que han sido usados en los cultivos alrededor de las colmenas de donde ésta proviene [46,51,53,70]. Recientemente se han realizado distintos monitoreos y estudios en Europa y Estados Unidos encontrándose residuos de pesticidas en productos de la colmena [51,60,61,142], lo que ha motivado el establecimiento de medidas rígidas de control para-arancelario que regula la entrada de productos apícolas en esos mercados. La determinación de residuos de pesticidas en miel se realiza empleando métodos multiresiduo, donde un número elevado de pesticidas es monitoreado en una sola determinación analítica. El problema que se presenta muchas veces en un método multiresiduo es cuáles pesticidas pueden o no ser analizados para que los resultados tengan relevancia real. Esta selección define el alcance del método y su aplicabilidad y generalmente se hace en base a la disponibilidad instrumental para realizar estas determinaciones. Existen distintos métodos analíticos para el análisis de residuos en miel donde se utiliza, para la determinación instrumental de los pesticidas, tanto cromatografía líquida como gaseosa acoplada a detectores clásicos como arreglo de diodos, detector fotométrico de llama, de nitrógeno y fósforo así como detectores de última generación como masas en tándem [62,63,70,75,143,144,146,148,188]. Las ventajas de los detectores de masa en tándem comparados con los detectores clásicos son su exactitud en la determinación del compuesto, y su capacidad para detectar concentraciones de pesticidas mucho más bajas [75,137].

Se presenta un método para la determinación de los residuos de pesticidas en miel que se evaluaron como más relevantes por ser los empleados en Uruguay, que cumple con el triple propósito de asegurar la salud de los consumidores, de controlar la calidad de la miel para exportación y de realizar las determinaciones para encaminar los intentos de

utilizar la colmena y sus productos como bioindicadores de calidad ambiental de una región.

4.2 Resultados y discusión

Para el presente estudio, la selección de los 41 pesticidas evaluados se realizó en base a la probabilidad de ser encontrados en miel y productos de la colmena, determinada mediante la frecuencia de aparición de muestras positivas en la bibliografía y en la base de datos “*Pesticides Online*” [185]. Se consideraron además datos recientes de la importación de pesticidas en Uruguay [189].

El método desarrollado es una simple variación del método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) [134] para la determinación de residuos de pesticidas en miel. Se evaluaron dos métodos de clean-up: freeze-out (extracto a -20°C durante 15 h) y d-SPE (Extracción en Fase Sólida dispersiva) utilizando como sorbente PSA (Primary and Secondary Amine). Los pesticidas fueron determinados por LC-MS/MS cromatografía líquida acoplada a masas en tándem (QTrap) en modo positivo y negativo.

La comparación entre las dos opciones de purificación se realizó evaluando cual de los dos procedimientos permite alcanzar un valor más cercano al valor teórico que se debería obtener cuando se adiciona una cantidad preestablecida del pesticida a monitorear a la muestra blanco (previamente analizada para verificar que no contenga los pesticidas a estudiar). Este valor llamado recuperación es uno de los parámetros establecidos por las guías europeas para la validación de una metodología para análisis de residuos de pesticidas en alimentos de la Dirección General de Sanidad y de los Consumidores (DG-SANCO) [136]. El parámetro “recuperación” se obtiene calculando el porcentaje para cada pesticida que es posible determinar efectivamente luego de haber realizado todos los pasos del método analítico en una muestra blanco a la que se le adicionó previamente una cantidad exactamente conocida de pesticida. Éstos resultados se resumen en la Figura 4.1. Se tomó para la evaluación y comparación el criterio establecido en la DG-SANCO que define como aceptables las recuperaciones

que se encuentran entre 70 y 120%. Las recuperaciones para el clean-up dispersivo fueron aceptables para un método multiresiduo (81-111%) con excepción de los cinco pesticidas ácidos de los cuales Haloxifop e Imazapir fueron analizados con ionización positiva y Dicamba, Picloram e Imazetapir con ionización negativa (Figura 4.2).

Para el clean-up con freeze-out las recuperaciones también fueron aceptables, estuvieron entre 80-114% con excepción de Tiametoxam, Metsulfuron-metil y Ometoato.

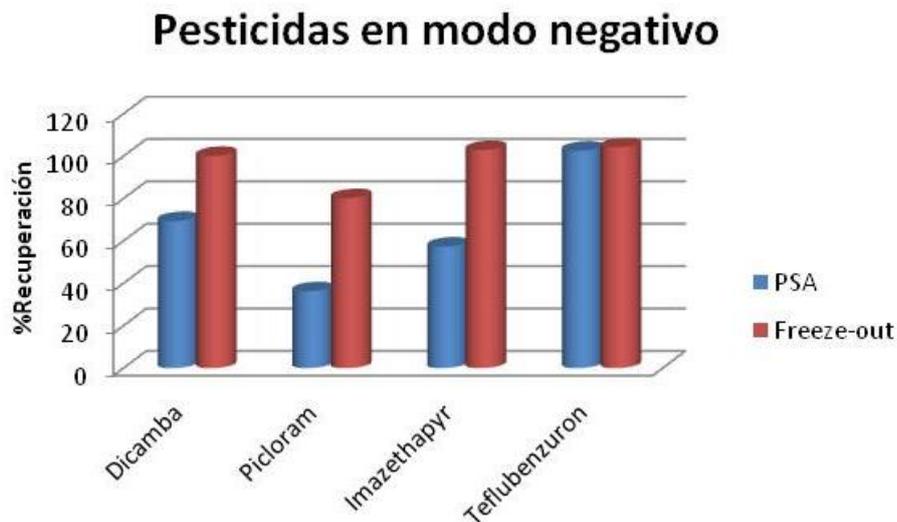


Figura 4.1 Recuperaciones de los pesticidas para las opciones de purificación y modos de ionización del estudio.

Ambos métodos de clean-up dieron resultados igualmente buenos para 36 pesticidas con recuperaciones aceptables de acuerdo a la reglamentación citada anteriormente.

Se observaron diferencias entre ambos clean-up para los pesticidas ácidos marcados en la Figura 4.2. Estos quedan retenidos al realizar el clean-up con PSA pero sí se obtienen buenas recuperaciones con el freeze-out.

En el caso de encontrarse un residuo de estos pesticidas ácidos en una muestra real se debe realizar freeze-out como purificación del extracto en la repetición del análisis con fines confirmatorios y cuantitativos y con PSA para el caso de tiametoxam, metsulfuron-metil y ometoato.

Estos métodos han sido desarrollados en un equipo LC-MS/MS (Qtrap) similar al disponible en el Polo Agroalimentario y Agroindustrial de Paysandú de la Universidad de la República donde ya han sido reevaluados y validados los métodos. De ahí su importancia, ya que se ajustan al triple objetivo de evaluar la calidad de las mieles uruguayas, cumpliendo con conceptos de seguridad alimentaria y como facilitador de comercio internacional, y de comenzar los estudios para utilizar la colmena y sus productos como bioindicadores de la calidad ambiental de agroecosistemas uruguayos.

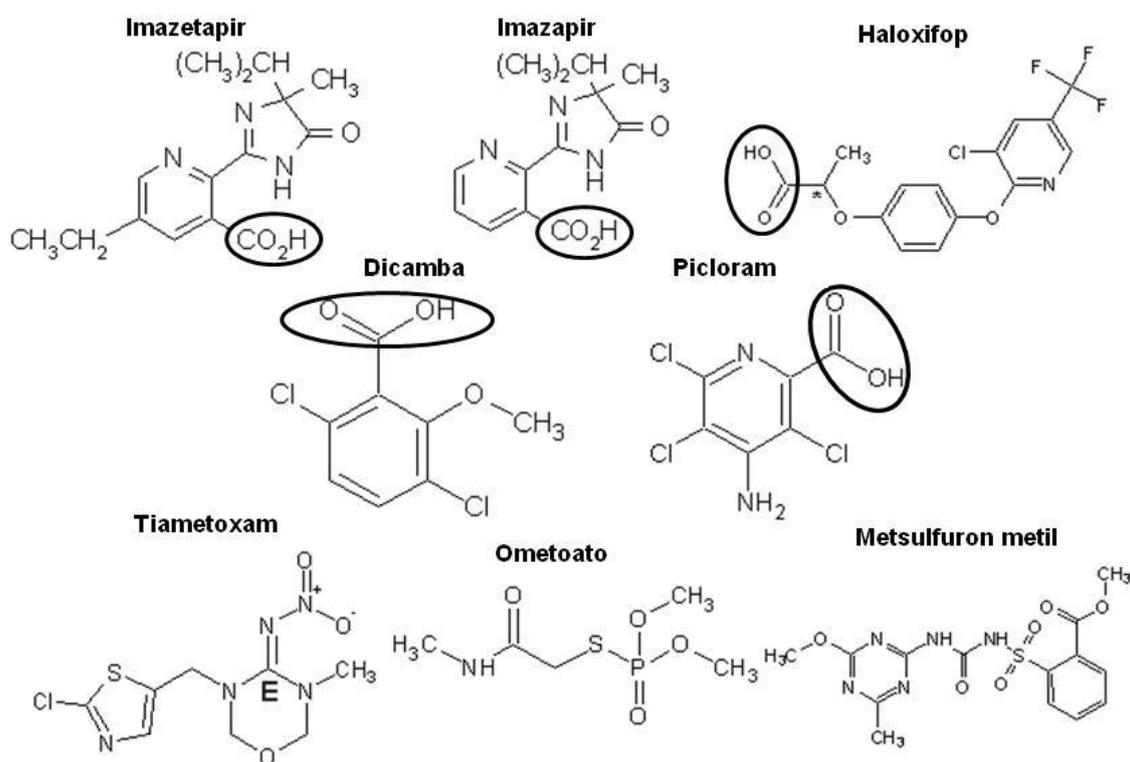


Figura 4.2 Estructuras químicas de pesticidas con diferencias entre las opciones de purificación del estudio.

Validación del método

Para realizar la validación del método se estudiaron los niveles $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ y $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ que son los niveles que la Unión Europea establece como límites máximos de residuos tolerables en miel. La exactitud del método fue estudiada mediante los porcentajes de recuperación de 5 réplicas obtenidos como se detalló anteriormente. La precisión fue estudiada mediante el porcentaje de Desviación Estándar Relativa (% DER) de las mismas 5 réplicas y se muestra en la Figura 4.3. Éstas se encontraron por debajo de 16 % lo cual es aceptable según la guía SANCO que establece un 20% como máximo permitido, con excepción de Imazapir que presentó un 26% DER. La reproducibilidad intermedia o también llamada precisión entre-días evaluada mediante el % DER de estudios realizados distintos días también fue aceptable ($<20\%$) con excepción de Imazapir.

Se obtuvieron límites de cuantificación o límites de reporte como se denominan en la guía SANCO de $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ para la mayoría de los pesticidas en estudio con excepción de Boscalid ($0,05 \text{ mg kg}^{-1}$), Metsulfuron metil, Imazapir y Amitraz ($0,2 \text{ mg kg}^{-1}$).

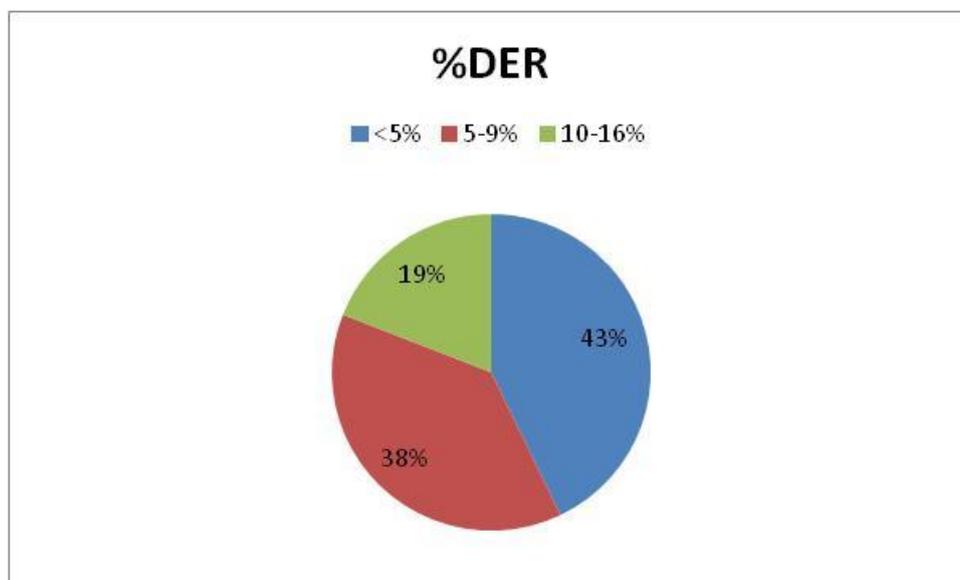


Figura 4.3 Porcentajes de Desviación Estándar Relativa obtenidos de la validación del método.

Se realizaron curvas de calibración en solvente y en matriz que consiste en adicionar los pesticidas en cantidades conocidas a un extracto de miel blanco. Todos los pesticidas estudiados presentan buena linealidad, $R^2 > 0,99$ en el rango $0,01$ a $0,4 \text{ mg/L}$. Se calculó

además el efecto matriz como el porcentaje de la diferencia entre las pendientes de las curvas de calibración en matriz y en solvente respecto a la pendiente de la curva de calibración en solvente, $(\text{pendiente curva calibración en matriz} - \text{pendiente curva calibración en solvente}) / \text{pendiente curva calibración en solvente} * 100$. Los pesticidas estudiados presentaron un efecto matriz moderado (<11%) excepto amitraz (-48%), clorpirifos (17%) e imazapir (43%) por lo que se utilizaron las curvas de calibración preparadas en matriz para la cuantificación de todos los experimentos. Este parámetro es importante porque se debe al aumento o supresión de la señal del analito que pueda ocasionar la matriz y su subestimación al emplear curvas de calibración en solvente lleva a errores en la cuantificación.

5 Caso de estudio: pérdida de colmenas por paratión metil microencapsulado (Artículo III)

5.1 Introducción

Las poblaciones de abejas están disminuyendo en todo el mundo, debido una gran variedad de posibles razones, entre las que, la exposición de abejas a residuos de pesticidas se ha señalado en repetidas ocasiones como una de las principales causas de este fenómeno. La magnitud de la situación obligó a las agencias reguladoras como la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) a reunir un grupo de trabajo multidisciplinario buscando identificar los temas transversales y los huecos en las necesidades de conocimiento y de investigación y proporcionar recomendaciones a los gestores de riesgos de la UE y los responsables de las decisiones políticas al respecto. Estas recomendaciones se han basadas en los recientes desarrollos en el área de la salud de las abejas, incluidos los objetivos de protección (por ejemplo, la diversidad de abejas y la polinización por las abejas) y también en el seguimiento y la evaluación del riesgo [190].

Durante la primavera de 2012 se observó una mortalidad inusual de abejas, *Apis mellifera*, que afectó a alrededor de 2.000 colmenas dentro de un radio de 2,5 km, en el suroeste de Uruguay. Las abejas murieron masivamente dentro y alrededor de la colmena, lo que indica una intoxicación aguda repentina de las abejas. Se sospechó que los pesticidas fueron la causa de este desastre. Sin embargo, no hubo una aplicación de pesticidas directa registrada en las granjas en un entorno de un radio de 300 m o más de las colmenas. Con el objetivo de dilucidar las causas de este fenómeno se tomaron muestras de las abejas de las colmenas afectadas y se analizaron para comprobar si se encontraban residuos de pesticidas.

Para el análisis multiresiduo de pesticidas en abejas hay varias metodologías reportadas en la literatura [72,74,75,137,154,191]. Recientemente nuestro grupo desarrolló un método basado en el esquema de QuEChERS [134], seguido por su determinación por LC-MS / MS para 19 residuos de pesticidas en abejas que fue estandarizado y validado. Sin embargo, para cubrir adecuadamente los pesticidas utilizados en Uruguay, el alcance del método debió ser ampliado.

De los pesticidas registrados en el país, sólo el fipronil y el paratión metil son transportados a la colmena, envenenándola, ya sea debido a su modo de acción o del tipo de formulación en la que se aplica [192]. El paratión metil por lo general no se incluye como un compuesto objetivo en estos estudios, a excepción de Walorczyk et al. [74], Rossi et al. [72] y Ghini et al. [191] donde se analizó mediante GC-MS/MS, GC-NPD y LC-MS, respectivamente.

El paratión metil es un insecticida organofosforado utilizado en Uruguay para proteger una variedad de cultivos como la producción hortofrutícola, (manzanas, peras y ciruelas) de diferentes insectos. Sólo está autorizado para ser utilizado como microcápsulas [87]. Las microcápsulas se preparan por recubrimiento del pesticida con un polímero que se disipa fácilmente con el tiempo, liberando el pesticida para el ambiente. El diámetro de las microcápsulas oscila entre 80 a 100 micras, dimensiones que están en el mismo orden de magnitud de los granos de polen de muchas especies de plantas. Las abejas recogen el polen de las flores y lo transportan en sus extremidades traseras en la colmena, donde lo almacenan como su principal fuente de proteínas. Cuando el paratión metil microencapsulado se ha aplicado recientemente sobre un cultivo donde las abejas buscan alimento los insectos podrían recoger las microcápsulas en el lugar o junto con el polen y transportarlo a la colmena. El pesticida podría entonces ser liberado dentro de la colmena, devastando toda la colonia. Esta hipótesis ha sido tratado en la literatura que resulta en conclusiones contradictorias acerca de si las colonias son capaces o no de recuperarse de la intoxicación por paratión metil [193]. La evidencia presentada en este trabajo sugiere que las microcápsulas de paratión metil son transportadas y el pesticida es liberado dentro de la colmena expandiendo el daño a las abejas causado por su aplicación. La presente comunicación pretende llevar a una mejor comprensión de la vulnerabilidad de las abejas.

5.2 Resultados y discusión

Se amplió el método desarrollado por nuestro grupo [194] para buscar la causa del incidente. El método incluye 39 pesticidas analizables por LC y GC que se encuentran entre los más empleados en Uruguay. Paratión metil se incluyó en el método por

cromatografía líquida, obteniéndose 110-112% de recuperación en los niveles de 0,2 y 0,5 mg kg⁻¹ con una desviación estándar relativa <20%, con un límite de reporte de 0,2 mg kg⁻¹. Los porcentajes de recuperación (%) y los LOQs del método aplicado a los pesticidas no informados previamente por LC-MS/MS así como GC-MS se presentan en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1 Lista de los pesticidas analizados por GC-MS con la metodología analítica descrita: porcentajes de recuperación, desviaciones estándar relativas (n=5) y LOQs obtenidos

Pesticida	Iones seleccionados (m/z)	Ion de Confirmación (m/z)	Ion de Cuantificación ion (m/z)	0,1 mg kg ⁻¹		0,05 mg kg ⁻¹		LOQ (mg kg ⁻¹)	LOD (mg kg ⁻¹)
				%rec	%RSD	%rec	%RSD		
Atrazina	200, 215,217	215	200	107	14	88	9	0,05	0,02
Azinfos-metil	160, 132,125	125	160	103	10	ND	ND	0,10	0,03
Bromopropilato	341, 343, 183	343	183	78	19	96	12	0,05	0,02
Clorfenvinfos	267, 269, 323	323	267	75	16	103	11	0,05	0,02
Clorotalonil	264, 266, 268	264	266	84	40	ND	ND	0,10	0,03
Clorpirifos	197, 199, 314	199	197	111	18	72	15	0,05	0,02
Clorpirifos-metil	286, 288, 125	125	286	105	10	72	9	0,05	0,02
Ciflutrina	163, 206, 226	226	163	90	8	ND	ND	0,10	0,10
Cihalotrina-lambda	181, 197, 208	208	181	80	12	91	6	0,05	0,05
Cipermetrina	163, 181, 209	181	163	101	17	ND	ND	0,10	0,10
Deltametrina	181, 253, 251	251	181	94	17	ND	ND	0,10	0,10
Diazinon	179, 137, 304	304	179	66	16	76	10	0,05	0,02
Etion	231, 153, 384	384	231	74	9	75	4	0,05	0,02
Fipronil	367, 369, 213	213	367	74	17	81	11	0,05	0,02
Fluvalinato-tau	250, 252, 181	181	250	92	10	86	13	0,05	0,02
Malation	173, 125, 127, 93	127	173	106	9	107	8	0,05	0,02
Metidation	145, 85, 125, 302	302	145	71	18	93	15	0,05	0,02
p,p-DDE	246, 248, 318	318	246	101	13	79	10	0,05	0,02
p,p-DDT	235, 237, 165	165	235	86	16	71	4	0,05	0,02
Trifluralin	306, 290, 335	335	306	76	12	73	12	0,05	0,02

El paratión metil fue el único producto agroquímico detectado en la muestra analizada, que se identificó por LC-MS/MS siguiendo las directrices de la Unión Europea [139] empleando los criterios de identificación de espectrometría de masas. Se encontró una intensidad relativa de iones de 92% en la muestra y 100% en el patrón de calibración que cumple los requisitos de la norma 30% (Figura 5.1). La concentración del tóxico en las abejas muertas fue de $4,8 \text{ mg kg}^{-1}$.

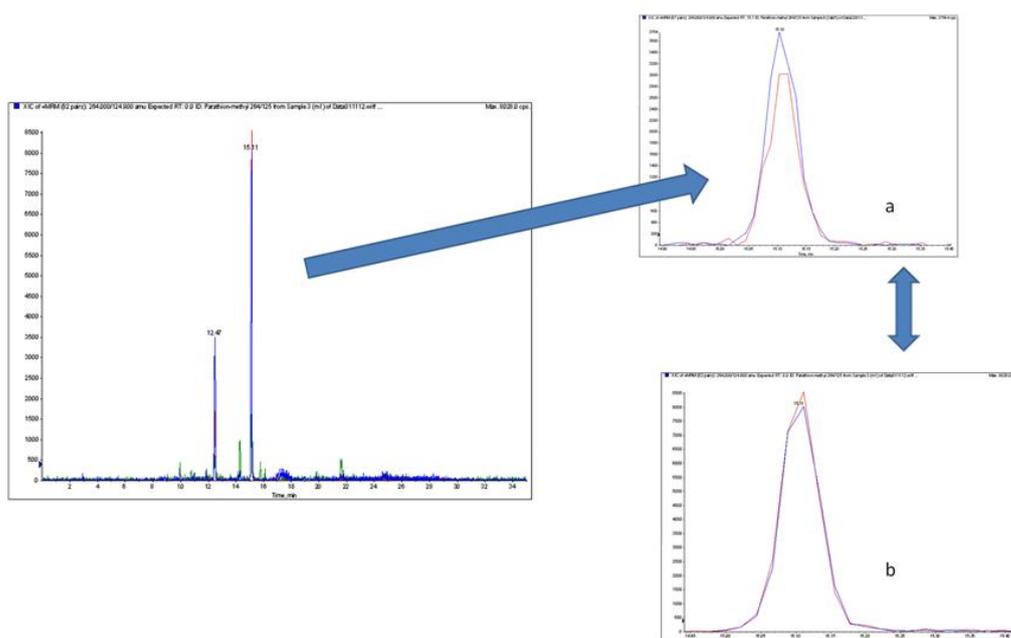


Figura 5.1 Cromatograma por LC-MS/MS de una muestra de abejas conteniendo paratión metil. a) Cromatograma de paratión metil estandar en matriz. b) Cromatograma de paratión metil en la muestra analizada

Después de la determinación analítica la búsqueda de la aplicación de pesticidas se amplió a las granjas dentro de un radio de 3000 m de las colmenas afectadas, mediante el registro de aplicaciones de pesticidas del Ministerio de Agricultura (MGAP). Una aplicación de paratión metil microencapsulado pudo ser rastreada en árboles frutales en floración una semana antes de que comenzaran a notarse muertes de las abejas, a principios de octubre de 2012. Otras especies que florecen salvajes en ese momento del

año en el paisaje circundante son el trébol blanco (*Trifolium repens*), crucíferas, el rábano, (*Raphanus sativus*) y la mostaza (*Sinapis alba*). El paisaje circundante con el huerto infractor resaltados y todos los apiarios afectados se muestran en la Figura 5.2. Se puede confirmar las enormes distancias cubiertas por las abejas para llevar la comida y el tóxico a la colmena. Los datos meteorológicos de octubre de 2012 fueron la velocidad media del viento de 6 m / s, la temperatura media de 15,7 °C y la humedad relativa promedio de 73%, sin lluvias, hecho que ayudó a que la microcápsula del plaguicida persista intacta.

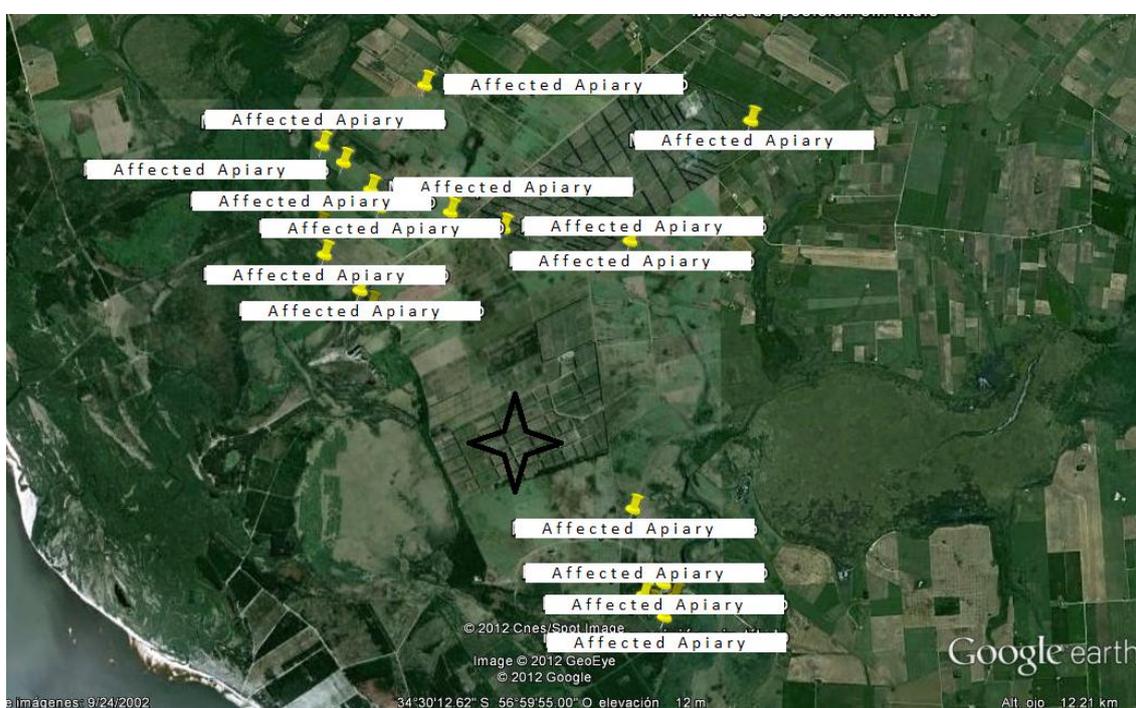


Figura 5.2 Mapa con los apiarios afectados marcados y el sitio de la aplicación indicado con una estrella. Datos del mapa: Google, GeoEye, Cnes/Spot Image

Las abejas son matrices biológicas complejas para la determinación de residuos de pesticidas y se han ensayado diferentes enfoques analíticos. La metodología empleada para el análisis de residuos de pesticidas en las abejas demostró ser suficientemente versátil ya que se utilizó el mismo procedimiento de preparación de la muestra para la determinación por GC y LC. La utilidad del método se demuestra por el hecho de que el paratión metil se determinó por LC-MS/MS, que no es la técnica instrumental tradicionalmente empleada para su cuantificación. En la base de datos “Pesticides

Online” elaborada por los laboratorios de referencia de la UE para el análisis de residuos de pesticidas sugiere el uso de GC-MS [185]. El alcance del método se está ampliando continuamente en nuestro laboratorio debido a su versatilidad.

La concentración del tóxico que se encontró en abejas muertas fue de $4,8 \text{ mg kg}^{-1}$, que es diez veces mayor que el LD_{50} del paratión-metil para las abejas ($0,3 \text{ mg kg}^{-1}$) [195]. Tan alta relación de pesticida encontrada en las abejas, así como la gran cantidad de abejas muertas dentro y alrededor de las colmenas sugirió un efecto tóxico retardado en lugar de una exposición inmediata de las abejas después de una aplicación. El tiempo entre la aplicación de pesticidas y de los primeros indicadores de la intoxicación de abeja fue de una semana. Este hecho también señala el efecto de una forma dispensación de liberación lenta de pesticidas. Cuando el paratión metil microencapsulado se ha aplicado recientemente sobre un cultivo donde las abejas visitan en busca de alimentos, como las flores de árboles frutales, los insectos o bien podrían recoger las microcápsulas con el polen y transportarlos a la colmena, o llevarlas unidas electrostáticamente a su cabello. El pesticida se libera entonces dentro de la colmena, devastando toda la colonia. Este hecho puede deducirse por la estrecha correspondencia entre las observaciones biológicas y los datos químicos. Otros investigadores hacen hincapié en el peligro mayor que significa la forma microencapsulada del paratión metil para las abejas cuando se compara con otros tipos de formulaciones tales como los concentrados emulsionables. La distancia entre las colmenas y los árboles de la huerta de frutas, donde los agricultores confirmaron que el pesticida se pulverizó que se encuentra dentro del radio de vuelo de las abejas, el período entre la aplicación del pesticida y la devastación de la colmena, y el hallazgo concluyente de un único pesticida en las abejas muertas en la muestra (que era aplicado en forma de microcápsulas lejos de las abejas afectadas), definitivamente apuntan a las microcápsulas de paratión metil como el responsable del desafortunado evento. Las microcápsulas como un sistema de dispensación del pesticida tienen la ventaja de ser ambientalmente más seguras que las formulaciones convencionales porque minimizan la deriva durante la aplicación. Sin embargo, el efecto residual amenaza la supervivencia de las abejas. La mayor parte de las regulaciones no consideran distancias tan grandes entre los apiarios y los cultivos que se aplican pesticidas. De acuerdo con estos resultados debe tenerse la precaución de disparar las alertas correspondientes cuando una fuente de alimentación altamente preferida por las abejas como las flores de

árboles frutales son tratados con formas de los pesticidas de liberación lenta, que se podrían llevar a la colmena.

- 6 Adaptabilidad de QuEChERS para el análisis de residuos de pesticidas en productos de la colmena buscando el desarrollo de un monitor de la sustentabilidad de los agroecosistemas (Artículo IV)

6.1 Introducción

Recientemente, productores apícolas franceses emplazados a 4000 m de una planta de biogas que estaban procesando desechos provenientes de una fábrica productora de M&M'S® encontraron que sus abejas producían miel azul, debido al color utilizado en la cubierta del confeti [196]. Este ejemplo tan sorprendente muestra el potencial de las abejas para comunicar la información ambiental en su búsqueda de polen y néctar. En su recorrido ellas toman los diferentes contaminantes y agroquímicos que fueron aplicados en el campo, los llevan consigo y los almacenan en la colmena. El punto final de almacenamiento en la colmena de estos xenobióticos depende fundamentalmente de sus propiedades fisicoquímicas y de su modo de acción. Los productos de la colmena pueden ser herramientas poderosas para monitorear residuos de pesticidas originados durante los distintos ciclos de producción de los agroecosistemas.

Existen varios reportes en la bibliografía que muestran la ocurrencia de pesticidas en productos de la colmena y tratan de buscar una relación entre los agroquímicos aplicados en las zonas que se observaron colmenas devastadas [54,56,58,61,80,162,197]. La disminución de abejas en las colmenas es un problema muy importante no solo para los apicultores sino también para los granjeros y productores que dependen de la polinización para tener éxito en sus actividades agrícolas. Hasta ahora los hallazgos se han focalizado en la salud de las abejas y se le ha prestado muy poca atención al comportamiento de las abejas como centinelas del estatus del ambiente en un determinado agroecosistema.

La disponibilidad de abejas y de los derivados de la colmena provee suficientes muestras para realizar la determinación, pero la complejidad química de estas matrices hace que la determinación de los residuos de pesticidas sea un desafío analítico importante. De manera de analizar sistemáticamente las abejas y los productos de la colmena se necesitan desarrollar protocolos analíticos sencillos para la determinación multiresiduos de pesticidas en estas matrices. Entre los métodos modernos para el análisis de residuos de pesticidas, el método de QuEChERS, el acrónimo por sus siglas

en inglés de Rápido, Fácil, Barato, Eficiente, Robusto y Seguro se presenta con un elevado potencial para cumplir este cometido.

El método de QuEChERS fue desarrollado en principio para la determinación de residuos de pesticidas en frutas y hortalizas [128] y posteriormente fue aplicado a un sin número de matrices diferentes probando que es un esquema con gran plasticidad y que puede ser adaptado dependiendo de las propiedades químicas de cada matriz. Esta plasticidad se ha visto reflejada en los dos métodos más utilizados en la actualidad para el análisis de residuos oficiales; el método AOAC 2007.1 y el método European Standard EN 15662, donde el uso de sorbentes como C18 y GCB son recomendados dependiendo del tipo de matriz y el tipo de pesticida a analizar. Particularmente, variaciones de QuEChERS ya han sido reportadas para el análisis de residuos de pesticidas en abejas, polen, cera y miel [56,61,73-75,134]. Estas metodologías abarcan el uso de diferentes estrategias para la eliminación de coextractivos, como por ejemplo en el caso de las abejas se describe una partición entre hexano y acetonitrilo para remover los lípidos del extracto [75]. Recientemente, nuestro grupo de trabajo reportó una metodología que optimizaba una combinación de cantidades exactas de sales, temperatura de extracción, cantidad de muestra y un paso extra de clean up utilizando congelamiento durante la noche (*freeze out*), PSA, C18 y GCB como sorbentes para el análisis de residuos de pesticidas en cera de abejas [198]. Este encare para la preparación de muestra se mostro más eficiente que el tratamiento por Dispersión de la Matriz en Fase Sólida (MSPD, por sus siglas en inglés), tratamiento que presentó mayor cantidad de coextractivos que deterioraron el sistema cromatográfico luego de algunas inyecciones. Los residuos de pesticidas en abejas fueron analizados utilizando una extracción con acetonitrilo seguido de un clean up con diferentes combinaciones de sorbentes logrando optimizar la performance del método para los analitos del estudio [74,198]. Si comparamos polen, abejas y cera con miel, esta última es una matriz más simple en su composición química. Sumado a esto por ser una matriz de importancia como alimento la miel ha sido ampliamente estudiada por lo que existen diferentes protocolos de análisis. QuEChERS EN 15662 ha sido aplicado sin problemas a la determinación de residuos de pesticidas en miel [194]. Como se ha señalado anteriormente, en búsqueda de una explicación para el decaimiento de colmeneas se realizaron de estudios extensos sobre residuos de pesticidas en abejas y colmenas en Norte América y otras partes del mundo y se pudo demostrar la presencia de cantidades

importantes de residuos de pesticidas en las colmenas. De las diferentes clases de pesticidas las más encontradas fueron los insecticidas y los fungicidas, siendo estos últimos los más ubicuos en los apiarios de Norte América. Clorotalonil, estrobilurinas así como algunos azoles fueron los más frecuentemente determinados. La relación entre estos paquetes de pesticidas utilizados y la salud de las abejas es una pregunta abierta que merece una aproximación múltiple para resolver esta problemática. Al mismo tiempo, la amplia gama de residuos encontrados sustenta la idea de que las abejas colectan lo que está en el ambiente, lo que les imprime una característica ideal como monitoras del mismo [46,51-54,180,181,191,199,200].

El presente trabajo presenta, en una primera etapa, el desarrollo y aplicación sistemática de protocolos con el esquema de QuEChERS para analizar residuos de pesticidas en abejas y productos de la colmena. Después de estudiar los datos recopilados como una primera aproximación para poder evaluar si las variaciones observadas durante las diferentes estaciones en los perfiles de residuos de pesticidas en las distintas matrices de la colmena dentro de un agroecosistema son significativas, se realizaron evaluaciones estadísticas para confirmar la viabilidad de las colmenas como monitores ambientales.

6.2 Resultados y discusión

Los extractos obtenidos luego de realizar la preparación de muestra validada para este fin presentaron una cantidad importante de coextractivos. Para solucionar esta dificultad y poder obtener bajos límites de detección se utilizó como sistema instrumental un LC-MS/MS en modo scheduled con modo de Monitoreo de iones Múltiples (MRM) con transiciones, energías de colisión y potenciales de declustering optimizadas para 19 pesticidas compatibles con LC entre los más comúnmente utilizados en los agroecosistemas de Uruguay. El modo scheduled permite monitorear durante un corto tiempo a un número de iones de masas determinadas, aumentando enormemente la sensibilidad. En el trabajo se ensayó primero un escaneo continuo de todo el rango de masas (100-500 Da) que dió LODs y LOQs más altos.

Tabla 6.1 Porcentaje de recuperaciones, RSDs (Desviaciones Estándar Relativas) y LOQs (Límite de Cuantificación) y LD50 (Dosis Letal) de los pesticidas analizados en abejas (n=5 réplicas). nd=no detectado

Pesticida	0,2 mg kg ⁻¹		0,1 mg kg ⁻¹		0,05 mg kg ⁻¹		0,01 mg kg ⁻¹		0,001 mg kg ⁻¹		0,0001 mg kg ⁻¹		LOQ mg kg ⁻¹	LD ₅₀ µg abeja ⁻¹	Rango Lineal (mg L ⁻¹)	Coeficiente Correlación Lineal (R ²)	Efecto matriz (%)
	% rec	RSD (%)	% rec	RSD (%)	% rec	RSD (%)	% rec	RSD (%)	% rec	RSD (%)	% rec	RSD (%)					
Acetamiprid	93	7	96	4	92	3	102	6	87	14	nd	nd	0,0010	8	0,002-0,1	0,999	-1
Azoxistrobin	104	14	109	4	95	6	102	2	102	6	118	16	0,0001	25	0,002-0,1	0,999	-3
Boscalid	80	5	85	5	92	2	99	2	119	11	nd	nd	0,0010	100	0,002-0,1	0,998	-6
Carbaril	94	5	98	4	92	4	94	4	96	0	nd	nd	0,0010	0,14	0,002-0,1	0,999	28
Carbendazim	73	4	73	6	46	7	69	19	80	8	nd	nd	0,0010	50	0,002-0,1	0,999	3
Clorpirifos etil	104	1	111	10	93	10	90	14	94	28	75	32	0,0100	0,024	0,002-0,1	0,999	-12
Clotianidin	92	6	94	4	99	6	118	24	92	20	nd	nd	0,0010	0,004	0,002-0,1	0,999	6

Cumafos	98	3	102	8	77	7	71	4	128	31	nd	nd	0,0100	-	0,002-0,1	0,998	-12
Dimetoate	95	6	99	4	97	3	97	3	94	3	84	12	0,0001	0,12	0,002-0,1	0,999	7
Haloxifop metil	102	6	106	5	94	8	97	7	103	5	113	9	0,0001	-	0,002-0,1	0,999	-2
Hexitiazox	114	10	119	8	90	5	104	12	103	12	nd	nd	0,0010	112	0,002-0,1	0,998	-26
Imazalil	101	6	111	5	92	6	94	30	nd	nd	nd	nd	0,0500	35,1	0,002-0,1	0,999	1
Imidacloprid	94	5	103	4	88	5	105	14	nd	nd	nd	nd	0,0100	0,0037	0,002-0,1	0,999	2
Iprodiona	71	2	74	6	84	5	102	10	nd	nd	nd	nd	0,0100	25	0,002-0,1	0,998	-4
Metomil	96	6	96	4	94	3	98	7	102	3	89	14	0,0001	0,16	0,002-0,1	0,999	-3
Piraclostrobin	103	4	107	5	90	11	97	3	74	3	nd	nd	0,0010	73,1	0,002-0,1	0,999	1
Tebuconazol	92	4	94	6	87	2	96	6	99	8	nd	nd	0,0010	83	0,002-0,1	0,999	-6

Tiaclopid	92	5	96	5	97	5	101	7	75	8	nd	nd	0,0010	17,3	0,002- 0,1	0,999	-2
Tiametoxan	97	8	106	7	91	10	106	10	114	22	nd	nd	0,0010	0,005	0,002- 0,1	0,999	2

Validación de los métodos

Dado que los métodos para determinación de residuos en miel y cera ya habían sido publicados, se validaron los métodos para abejas y polen, las otras matrices de la colmena. De acuerdo con el documento de la DG-SANCO sobre el control de la calidad de los procedimientos analíticos se analizaron diferentes niveles de concentración por quintuplicado en matrices blanco de abejas (0,2; 0,1; 0,05; 0,01; 0,001 y 0,0001 mg kg⁻¹) y de polen (0,05; 0,01; 0,001; 0,0001 mg kg⁻¹) para evaluar la exactitud (% de recuperación) y repetibilidad (% RSD) del procedimiento (Tablas 6.1 y 6.2).

Tabla 6.2 Porcentajes de recuperación, RSDs (Desviaciones Estándar Relativas) y LOQs (Límites de cuantificación) de los pesticidas analizados en polen (n=5 réplicas). nd=no detectado

Pesticida	0,05 mg kg ⁻¹		0,01 mg kg ⁻¹		0,001 mg kg ⁻¹		0,0001 mg kg ⁻¹		LOQ (mg kg ⁻¹)	Rango Lineal (mg L ⁻¹)	Coeficiente de Correlación Lineal (r ²)	Efecto matriz (%)
	% Rec	% RSD	% Rec	% RSD	% Rec	% RSD	% Rec	% RSD				
Acetamiprid	86	3	88	4	119	8	nd	nd	0,0010	0,005 - 0,1	0,999	-44
Azoxistrobin	84	5	98	5	198	19	85	17	0,0001	0,005 - 0,1	0,999	43
Boscalid	89	7	82	19	127	13	nd	nd	0,0100	0,005 - 0,1	0,991	-1
Carbarilo	87	4	87	7	138	3	92	12	0,0001	0,005 - 0,1	0,999	-45
Carbendazim	80	2	86	5	126	16	121	7	0,0001	0,005 - 0,1	0,998	29
Clotianidin	90	5	82	6	104	14	nd	nd	0,0010	0,005 - 0,1	0,997	-26
Cumafos	94	3	96	3	175	8	100	10	0,0001	0,005 - 0,1	0,998	-41
Dimetoato	84	3	87	5	115	7	84	8	0,0001	0,005 - 0,1	0,998	-44
Haloxifop metil	87	2	95	4	163	3	78	24	0,0100	0,005 - 0,1	0,999	-14
Hexitiazox	98	11	116	4	373	19	nd	nd	0,0100	0,005 - 0,1	0,994	-58
Imazalil	87	5	72	12	nd	Nd	nd	nd	0,0100	0,005 - 0,1	0,998	-44

Imidacloprid	84	6	73	7	97	17	nd	nd	0,0010	0,005 - 0,1	0,997	-50
Iprodiona	92	7	104	6	139	8	92	20	0,0001	0,005 - 0,1	0,995	-36
Metomilo	87	3	83	6	111	6	66	11	0,0010	0,005 - 0,1	0,999	-23
Metsulfuron metil	79	3	84	3	125	2	105	7	0,0001	0,005 - 0,1	0,998	11
Piraclostrobin	86	11	95	1	193	5	95	27	0,0100	0,005 - 0,1	0,999	-38
Tebuconazol	86	4	89	6	160	20	124	24	0,0100	0,005 - 0,1	0,998	13
Tiacloprid	87	2	91	3	131	14	nd	Nd	0,0100	0,005 - 0,1	0,999	-46
Tiametoxam	96	4	90	7	nd	Nd	nd	Nd	0,0100	0,005 - 0,1	0,998	-15

Los límites de cuantificación (LOQ) fueron considerados como los niveles más bajos validados con éxito, es decir, los niveles que alcanzaron recuperaciones entre 70 y 120% y una desviación estándar relativa (<20%) aceptables. Para cada pesticida, el límite de cuantificación encontrado es menor que el correspondiente LD₅₀ reportado. Si se considera que el peso de una abeja es de aproximadamente 100 mg, se necesita un factor de 10 para convertir µg/abeja a mg kg⁻¹. Se obtuvieron LOQs muy bajos (0,0001 mg kg⁻¹) para varios pesticidas, en particular azoxistrobina y dimetoato en ambas matrices, lo cual es importante considerando que las concentraciones encontradas en las muestras reales eran cercanas a este nivel.

Las curvas de calibración se construyeron utilizando solventes y ajustadas a la matriz en cinco niveles de concentración de 0,002; 0,01; 0,02; 0,05 y 0,1 mg L⁻¹ para las abejas y 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 mg L⁻¹ para el polen. Los coeficientes de correlación lineal estaban por encima de 0,999 para las abejas y por encima de 0,991 en el polen para todos los analitos estudiados. Los rangos lineales eran aptos para evaluar las concentraciones encontradas en muestras reales. Los efectos de la matriz fueron calculados como la diferencia porcentual entre las curvas de mayor ajuste contra las correspondientes curvas de calibración en solvente.

Los efectos de la matriz eran muy pronunciados y variables de un analito a otro (Tablas 6.1 y 6.2), particularmente en el caso del análisis de polen. Esto se explica por el hecho de que los efectos de la matriz dependen de si el analito de interés coeluye con coextractivos de la matriz, influyendo en el rendimiento de los iones de analitos que se generan dentro de la fuente de ESI y por lo tanto, en su señal de detección. Si los efectos de la matriz son muy importantes se recomienda, para obtener cuantificaciones confiables, ya sea el uso de estándares ajustados por la matriz, preparado a partir de extractos de matrices no contaminadas o bien el empleo del método de adiciones estándares. En este trabajo se utilizó para la cuantificación el método de calibración por matriz.

Análisis de muestras de colmenas

El análisis de residuos de pesticidas de las diferentes muestras de abejas, polen, cera y miel arrojó resultados similares a los obtenidos en Norte América y Europa. Hallazgos

múltiples en una sola muestra fueron frecuentes, tal como lo muestra la Figura 6.1, particularmente en cera y polen.

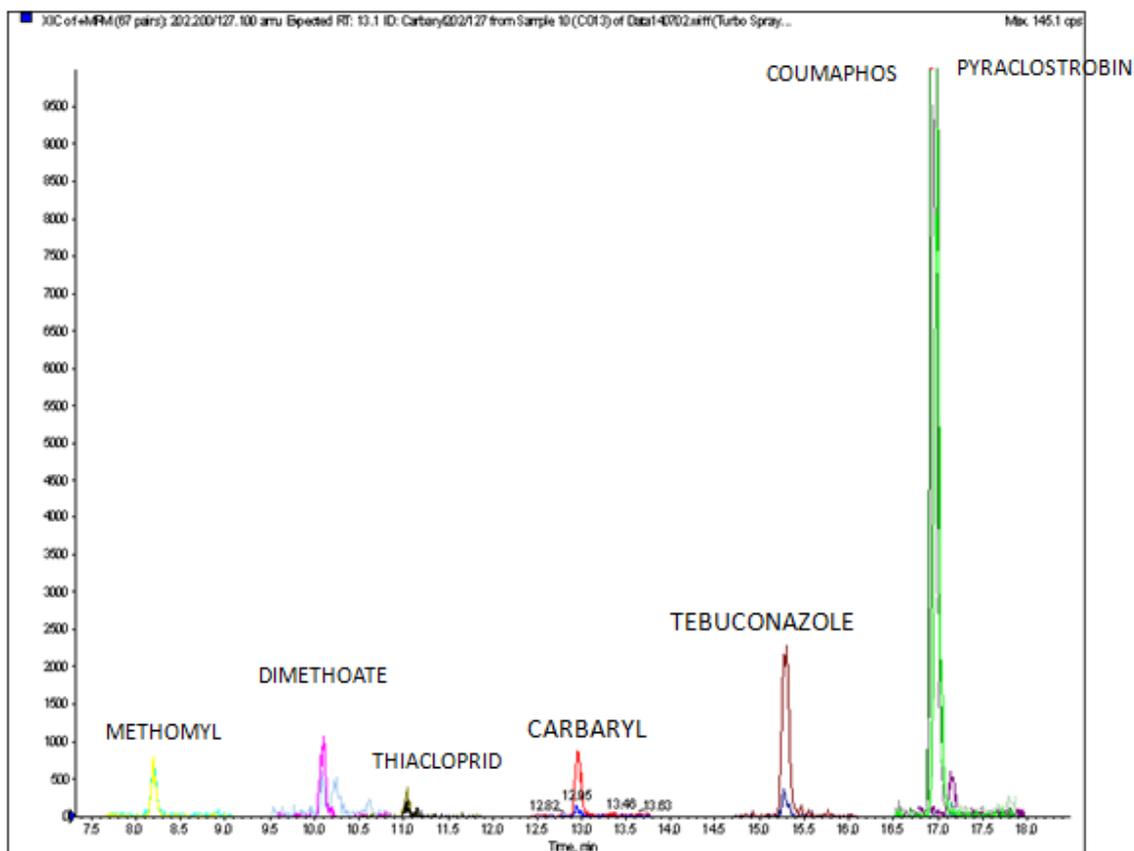


Figura 6.1 Cromatograma obtenido por LC-MS/MS mostrando varios hallazgos positivos en muestras reales de cera de abejas

En la Figura 6.2 se presenta una gráfica detallada de la frecuencia de hallazgos positivos para cada matriz, donde la prevalencia de fungicidas es clara. No obstante las concentraciones encontradas fueron bajas dentro del rango de concentraciones, 0,0001-0,01 mg kg⁻¹. Mullin et al. [61] encontraron una alta ocurrencia de clorotalonil en apiarios norteamericanos. En nuestro caso, todas las muestras contenían estrobilurinas como azoxistrobin y piraclostrobin.

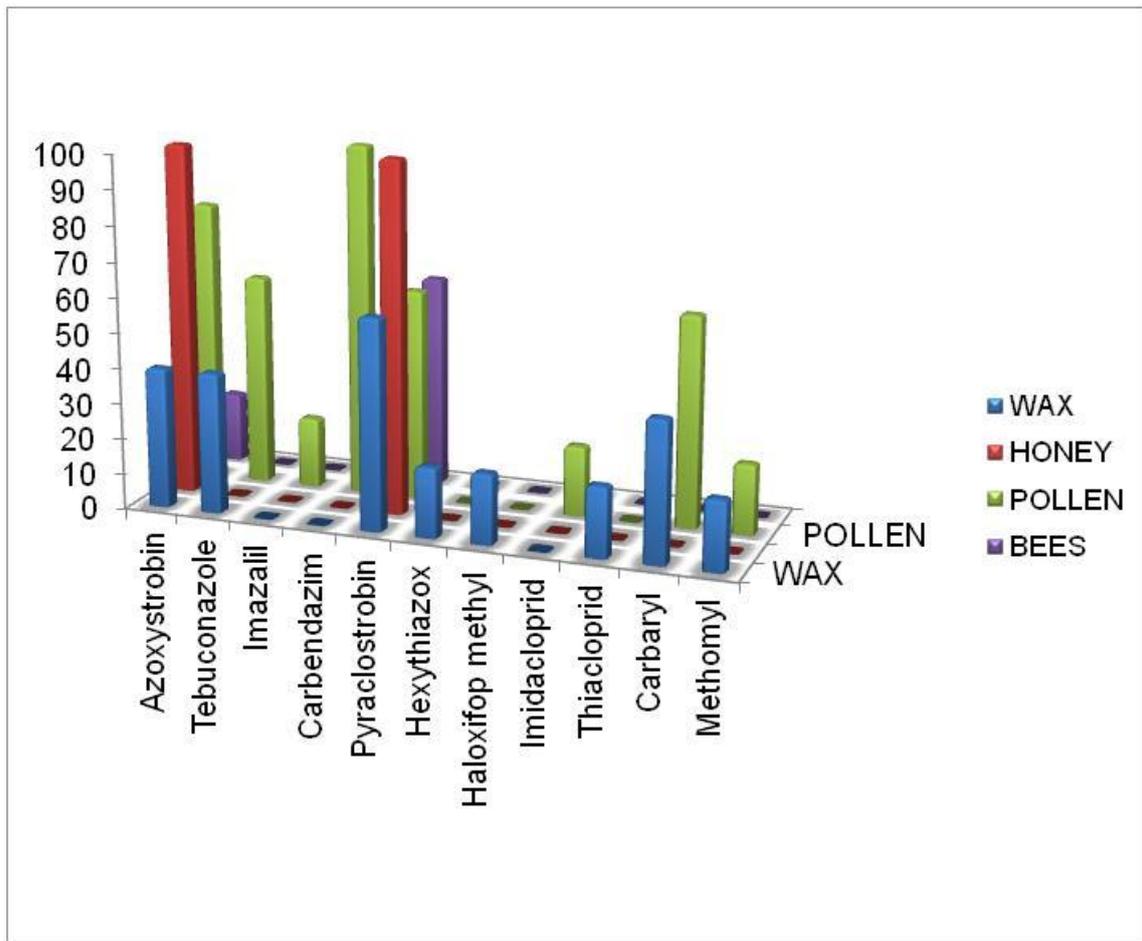


Figura 6.2 Frecuencia de hallazgos positivos en las cuatro matrices de la colmena analizadas.

La peculiaridad de la alta ocurrencia de fungicidas en productos de la colmena no ha sido explicada aún. Los fungicidas poseen un pKa y un pKow intermedio, de donde puede inferirse la causa de su ubicuidad en las diferentes matrices relacionadas con la colmena; ceras, polen y abejas. La presencia de pesticidas en el polen se origina directamente de lo aplicado sobre los cultivos. Dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas los residuos pueden difundir hacia otros compartimentos de la colmena, fundamentalmente hacia la cera y la miel. Ya sea debido a un efecto de dilución o a su baja solubilidad en ellos, su detección se ve dificultada. Los residuos de pesticidas en miel son menos frecuentes probablemente porque ésta es hidrofílica, mientras que la mayoría de los pesticidas son lipofílicos y por lo tanto, la difusión desde matrices más lipofílicas como el polen y la cera hacia la miel no se ve favorecida. Los pesticidas

encontrados en las abejas son aquellos a los que ellas estuvieron directamente expuestas, y por lo tanto, pueden variar con el tiempo.

Aprovechando las ventajas que ofrece el esquema de trabajo de QuEChERS acoplado a la moderna instrumentación analítica, los métodos validados descritos, que fueron específicamente desarrollados para abejas, miel, ceras y polen, se aplicaron al análisis de muestras reales provenientes de apiarios colocados en distintos agroecosistemas. Se han encontrado insecticidas: por ejemplo tiacloprid, imidacloprid, metomilo, carbaryl, fungicidas como azoxistrobin, piraclostrobin, tebuconazol, hexitiazox y herbicidas como por ejemplo haloxifop-metil a niveles entre 0,0001 y 0,01 mg kg⁻¹ (Tabla 6.3).

Tabla 6.3 Hallazgos de residuos de pesticidas en matrices de la colmena ordenadas por apiario y estación. nd= no detectado.

Matriz	Estación	Azoxistrobin (mg kg ⁻¹)	Carbendazim (mg kg ⁻¹)	Carbaril (mg kg ⁻¹)	Piraclostrobin (mg kg ⁻¹)	Imidacloprid (mg kg ⁻¹)	Tebuconazol (mg kg ⁻¹)	Metomil (mg kg ⁻¹)	Tiacloprid (mg kg ⁻¹)	Boscalid (mg kg ⁻¹)	Dimetoato (mg kg ⁻¹)	Hexitiazox (mg kg ⁻¹)	Haloxifop metil (mg kg ⁻¹)
A p i a r i o	cera	Otoño	0,0002	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	miel	Otoño	0,0012	nd	nd	0,0015	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	nd
	polen	Otoño	0,0006	0,0014	0,0008	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	abejas	Otoño	nd	nd	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
A	cera	Primavera	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	miel	Primavera	0,0007	nd	nd	0,0034	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	polen	Primavera	0,0011	0,0013	0,0004	nd	nd	<LOQ	nd	<LOQ	nd	nd	nd
	abejas	Primavera	nd	nd	nd	0,003	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
A p i a r i o	cera	Otoño	nd	nd	0,0004	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	miel	Otoño	0,0008	nd	nd	0,0021	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	polen	Otoño	0,0003	0,0008	0,0003	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	abejas	Otoño	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B	cera	Primavera	nd	nd	0,0004	0,001	nd	nd	<LOQ	nd	nd	nd	0,001
	miel	Primavera	0,0007	nd	nd	0,0011	nd	nd	nd	0,001	nd	nd	nd
	polen	Primavera	0,0010	0,0038	0,0003	<LOQ	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd
	abejas	Primavera	0,0001	nd	nd	0,004	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
A p i a r i o	cera	Otoño	0,0100	nd	0,0009	0,002	nd	0,0031	0,001	<LOQ	nd	<LOQ	nd
	miel	Otoño	0,0010	nd	nd	0,0013	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	polen	Otoño	0,0009	0,0009	0,0002	<LOQ	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd
	abejas	Otoño	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C	cera	Invierno	0,0062	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	miel	Invierno	0,0009	nd	nd	0,0015	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	polen	Invierno	0,0003	nd	0,0003	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

A p i a r i o	abejas	Invierno	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	cera	Invierno	0,0025	0,002	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	miel	Invierno	0,0008	nd	nd	0,0010	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	polen	Invierno	0,0030	0,0024	nd	<LOQ	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd
D	abejas	Invierno	0,0001	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	cera	Primavera	0,0002	nd	0,0007	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	miel	Primavera	0,0007	nd	nd	0,0010	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	polen	Primavera	0,0110	0,0029	0,0005	<LOQ	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd
A p i a r i o	abejas	Primavera	0,0032	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	cera	Otoño	nd	nd	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,01	nd
	miel	Otoño	0,0009	nd	nd	0,0013	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	polen	Otoño	0,0007	0,0023	nd	Nd	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd
E	abejas	Otoño	nd	nd	nd	0,002	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	cera	Primavera	0,0002	nd	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	miel	Primavera	0,0007	nd	nd	0,0010	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	polen	Primavera	0,0020	0,0020	0,0003	<LOQ	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd
A p i a r i o	abejas	Primavera	0,0003	nd	nd	0,001	nd	0,001	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	cera	Otoño	0,0003	nd	nd	0,001	nd	0,0017	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	miel	Otoño	0,0010	nd	nd	0,0012	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
F	polen	Otoño	0,0055	0,0090	nd	<LOQ	0,003	<LOQ	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd
	abejas	Otoño	0,0005	nd	nd	0,001	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
A p i a r i o	cera	Primavera	nd	nd	0,0003	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	miel	Primavera	0,0007	nd	nd	0,0010	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	polen	Primavera	0,0003	0,0014	0,0004	Nd	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	nd
G	abejas	Primavera	nd	nd	nd	0,001	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Las colmenas como monitores ambientales de la aplicación de pesticidas en agroecosistemas

El tipo de residuo encontrado puede ser similar si consideramos el tipo de matriz (abejas, miel y polen) independientemente del agroecosistema debido a su composición química. Como consecuencia de esta observación se espera encontrar diferentes perfiles de residuos de pesticidas en las distintas matrices. Para confirmar esta hipótesis, se realizó un Análisis Factorial Múltiple o de los hallazgos de residuos de pesticidas de todas las muestras analizadas en abejas, miel, polen y ceras. Ninguna de las cuatro matrices aparece como muy cercana (Figura 6.3).

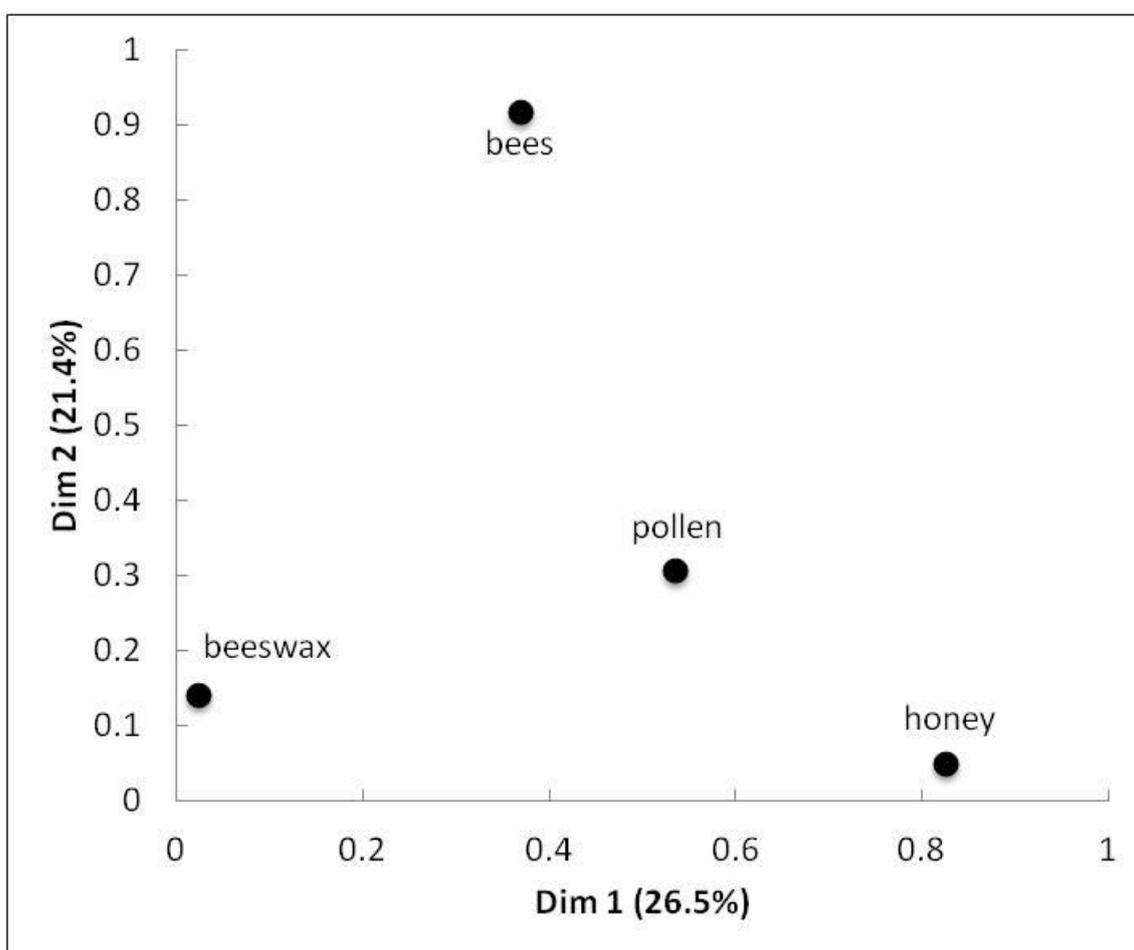


Figura 6.3 Análisis Factorial Múltiple de los hallazgos de residuos de pesticidas en abejas, miel, polen y cera de abejas.

Esto indica que cada matriz nos da diferente información. Si consideramos la forma en que los residuos llegan a la colmena, una información más valiosa puede conseguirse analizando cada matriz por separado. Mientras la cera es un reservorio histórico de los pesticidas que se colectaron, los residuos en el polen son mucho más diversos y representan lo que se aplicó directamente sobre los cultivos. Un alto número de insecticidas fueron detectados en él como por ejemplo, imidacloprid, carbarilo, dimetoato. Por otro lado, los residuos de pesticidas en las abejas corresponden a las últimas aplicaciones a las cuales las abejas han estado expuestas. En las muestras de los apiarios en estudio, las abejas transportaban principalmente fungicidas y el único herbicida detectado, haloxifop metil. Por su parte la miel es una matriz hidrofílica y es de esperar bajas concentraciones de pesticidas lipofílicos y los más hidrofílicos deberían de estar presentes. Sin embargo, solo estribulurinas fueron detectadas en esta matriz. Un monitor de agroecosistemas debe ser estable pero a su vez, ser capaz de registrar las variaciones en la línea de base que ocurren en un ecosistema definido. Para ensayar la utilidad de la colmena como monitor se debe chequear el rango de variabilidad en la carga de residuos dentro de la colmena y si las diferencias observadas tienen algún significado. La Tabla 6.4 muestra la evaluación de las distancias de Gower (G-distancia) para cinco de los apiarios entre dos estaciones de muestreo.

Tabla 6.4 Comparación de apiarios ubicados en ambientes diferentes en dos estaciones de acuerdo a sus perfiles de residuos de pesticidas

Apiario	Estación comparada	Ambiente	G-distancia
A	Otoño& Primavera	Cuenca lechera	0,24
B	Otoño& Primavera	Forestación	0,24
C	Otoño &Invierno	Ganadería & arroz	0,35
D	Invierno& Primavera	Cuenca lechera, pradera natural	0,18
E	Otoño& Primavera	Forestación & monte nativo	0,15

Tabla 6.5 Distancias de Gower entre todos los pares de apiarios-estaciones muestreadas

	A-Otoño	F-Otoño	B-Otoño	E-Otoño	C-Otoño	C- Invierno	D- Invierno	G- Primavera	B- Primavera	E- Primavera	A- Primavera
F-Otoño	0.38										
B-Otoño	0.18	0.34									
E-Otoño	0.23	0.30	0.14								
C-Otoño	0.41	0.48	0.31	0.36							
C-Invierno	0.18	0.34	0.09	0.15	0.35						
D- Invierno	0.24	0.26	0.15	0.14	0.37	0.13					
G- Primavera	0.20	0.29	0.09	0.12	0.33	0.12	0.10				
B- Primavera	0.35	0.41	0.24	0.26	0.34	0.29	0.26	0.19			
E- Primavera	0.23	0.30	0.15	0.15	0.37	0.16	0.13	0.09	0.23		
A- Primavera	0.24	0.36	0.17	0.15	0.40	0.17	0.17	0.10	0.23	0.14	
D- Primavera	0.28	0.35	0.17	0.23	0.37	0.22	0.18	0.14	0.27	0.18	0.21

Para los otros dos, sólo una estación fue registrada por lo que no fue posible establecer comparaciones. Del examen de los resultados, la primera conclusión a extraer, es que las comparaciones deben establecerse entre los mismos apiarios. A partir de esta constatación se puede afirmar que el menor valor de distancias G es el del apiario E, localizado en las cercanías de una zona de forestación y bosque nativo, lo que significa que el cambio entre estaciones en ese ambiente fue bajo. Esto puede interpretarse como que la contribución en la carga de residuos de pesticidas en la colmena en este ambiente es debida a las aplicaciones en la zona de forestación mientras que en principio no se registrarían aplicaciones de pesticidas en el monte nativo. Subiendo en los valores de distancias G, el siguiente menor valor corresponde al apiario D, cercano a una pradera natural, donde los pesticidas que se encuentran corresponden a actividades pecuarias ya que no se realizan aplicaciones en el campo natural. Por otro lado en lo que respecta al apiario A localizado también en una cuenca lechera donde se encuentran plantadas praderas de lotus y trébol, dos especies muy visitadas por las abejas pecoreadoras, se obtuvo una distancia G muy grande, mostrando que el monitor es también capaz de distinguir entre diferentes prácticas agrícolas a pesar de que la misma actividad productiva esté siendo desarrollada en los alrededores de la colmena. La distancia G encontrada entre los apiarios A y D alimentados en diferentes cuencas con ambientes distintos en primavera es de 0,21, (Tabla 6.5) Estos resultados prueban que la colmena es capaz de detectar diferentes manejos dentro de un ambiente agrícola. El apiario B que estaba localizado en el medio de una plantación de forestación de *Eucaliptus* presentó la misma distancia G que el apiario A, resultados que indican que ambos apiarios fueron capaces de registrar los mismos cambios en el perfil de sus pesticidas en otoño y primavera. Estos hallazgos confirman también las observaciones reportadas por los apicultores de que las abejas prefieren visitar áreas forestadas naturales debido a su diversidad frente a las áreas cultivadas, usualmente áreas de monocultivos como eucaliptus o pinos. La distancia de Gower más alta registrada se obtuvo en un ambiente complejo donde diferentes actividades productivas eran desarrolladas. La rotación entre los cultivos de arroz y la producción ganadera es característica en la producción de arroz en Uruguay. Particularmente el apiario C estaba establecido en un ambiente como el anteriormente descrito y fue el que registró esa variación. Las diferencias en las cargas de pesticidas observadas entre las dos estaciones en los apiarios localizados en todos los

ambientes estudiados sustentan la idea de que la colmena puede ser un monitor del estado del ambiente. Estas aseveraciones son las primeras observaciones objetivas de que la incorporación de los residuos de pesticidas, a pesar de serlo a bajas concentraciones, son características de cada ecosistema y de las distintas prácticas de cultivo desarrolladas en ellos. Los apiarios en los diferentes ambientes evaluados mostraron variaciones estacionales significativas en la cantidad de residuos de pesticidas, los que además fueron característicos para cada ambiente. La Figura 6.4 muestra el cambio en el perfil de los residuos de pesticidas de un apiario localizado ceca de una plantación de soja antes y después de una estación de cultivo. La cantidad y el tipo de residuos encontrados fueron los más altos al final del periodo agrícola, mostrando nuevamente que la colmena es sensible a los cambios estacionales que ocurren en un mismo ambiente.

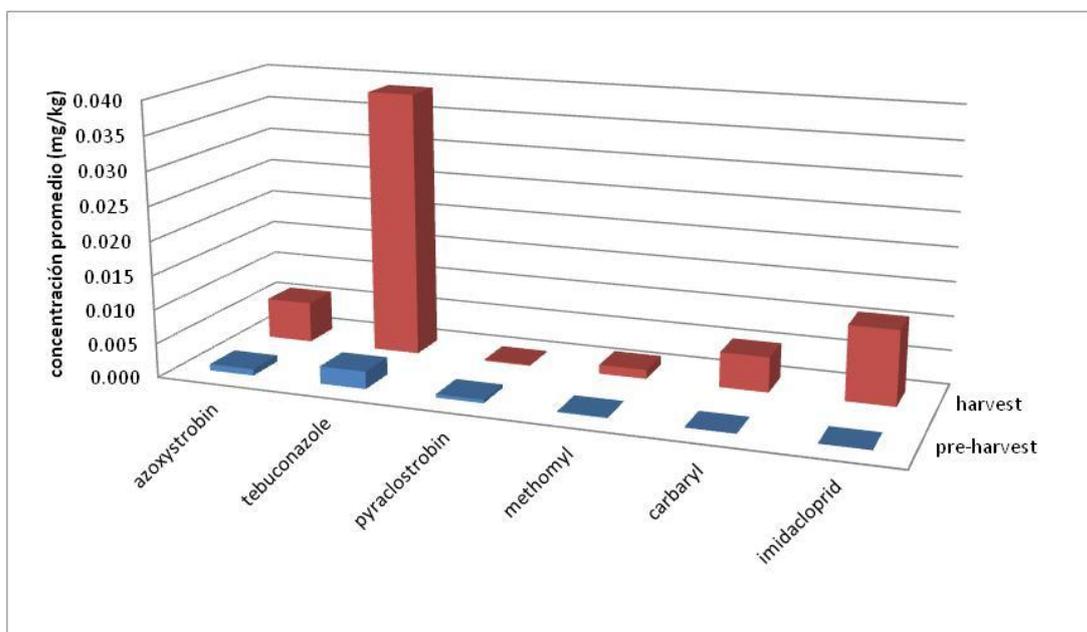


Figura 6.4 Promedio de las concentraciones de los residuos encontrados en un apiario localizado en una plantación de soja muestreado en pre y post cosecha.

Los datos presentados mostraron que la hipótesis de trabajo es válida. Así mismo más trabajo es necesario para poder comprender la dinámica de la recolección de los pesticidas por las abejas y el almacenamiento en los diferentes compartimentos de la colmena para poder evaluar apropiadamente y utilizar la colmena como un biomonitor de los agro-ecosistemas. El estudio separado de las diferentes matrices da una visión

enriquecedora al problema. La información obtenida a través del perfil de residuos de pesticidas contribuye a tener una fotografía más amplia de la situación. Las metodologías analíticas descritas permiten reunir una enorme cantidad de información de una manera rápida y efectiva lo que hace factible la idea de monitorear agroecosistemas a través del análisis de los productos de la colmena.

7 Transferencia de neonicotinoides del cultivo a la colmena por abejas melíferas: hacia un monitor de residuos de pesticidas (Artículo V)

7.1 Introducción

América del sur es la región con el área plantada de soja que crece con mayor rapidez. Durante las pasadas cuatro décadas, ha incrementado su área productiva casi 30 veces (de 1,44 a 42,75 millones de hectáreas de 1970 a 2009). Como contiene la mayor área plantada de soja, también produce actualmente el mayor volumen de este cultivo [7]. En 2009, de las 222,94 millones de toneladas de soja cosechadas mundialmente, 43% (equivalente a 94,91 millones de toneladas) fueron producidas en la región. La gran mayoría de la producción se desarrolla en los países del cono sur: Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay y Uruguay.

Las abejas melíferas y los productos de la colmena han sido estudiados como indicadores de calidad ambiental en varios estudios. En Italia se han utilizado estaciones de monitoreo que consisten en sets de dos colmenas con trampas de mortalidad ubicadas en distintos agroecosistemas; cuando se excede un límite establecido de mortalidad ahí se realiza análisis químico en las abejas muertas para identificar el ingrediente activo responsable [46,51]. Esta interesante estrategia de biomonitoreo usando abejas da información sobre los compuestos tóxicos, principalmente insecticidas con baja DL_{50} , pero excluye información sobre los pesticidas presentes en concentraciones subletales. En un estudio reciente se incorporaron estimaciones de fortaleza de la colmena a la investigación [52].

Un estudio realizado en áreas agrícolas de Grecia, indica que se puede derivar información útil sobre la ocurrencia y distribución de residuos de pesticidas debido a tratamientos de protección de cultivos, del análisis de muestras de miel aleatoriamente colectadas, usadas como bioindicadores [53].

Por otra parte, en una evaluación de matrices de colonias de abejas, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) para monitorear presencia de pesticidas en Francia continental se concluye que dado los resultados (máxima frecuencia de presencia) y aspectos prácticos (fácil de coleccionar, perdura en el tiempo, a diferencia de las abejas que se renuevan naturalmente), las cargas de polen fueron la mejor matriz para evaluar la presencia de

residuos de pesticidas en el ambiente dadas sus condiciones [54]. La principal desventaja de esta matriz (cargas de polen) es que se colecta usando trampas para polen colocadas a la entrada de la colmena durante una semana, cuatro veces al año [55], este es el máximo período que estas trampas se recomienda que permanezcan instaladas (una semana) ya que impiden la provisión de polen a la colonia dado que solo pasan las abejas dejando la carga de polen colectado en la trampa en la entrada de la colmena. Por lo tanto, los contaminantes colectados junto con el polen provienen exclusivamente de las especies que las abejas pudieron visitar durante esa semana. En un estudio distinto realizado en Francia durante 2008-2009 se concluye que las abejas melíferas, mieles y polen son centinelas apropiados para monitorear contaminación ambiental por pesticidas y drogas veterinarias. Este estudio revela la ocurrencia ampliamente distribuida de múltiples residuos en matrices de la colmena y sugiere un potencial problema con los efectos de estos residuos por separado o combinados sobre la salud de las abejas [56]. En un estudio realizado recientemente en Egipto, los residuos de pesticidas organoclorados y piretroides sintéticos en miel fueron evaluados como indicadores de contaminación ambiental [57].

Se ha reportado ampliamente el análisis y la ocurrencia de residuos de pesticidas en abejas o productos de la colmena sin la intención de estudiarlos como biomonitores [62-76].

El ácaro ectoparásito *Varroa destructor* originalmente estaba confinado a la abeja asiática *Apis cerana*. Luego del cambio a un nuevo hospedero *Apis mellifera* durante la primera mitad del siglo pasado, el parásito se dispersó mundialmente y se considera actualmente como la mayor amenaza para la salud de las abejas [201]. Entre los varios organismos que son plaga de las abejas *V. destructor* es el que más daño causa [202]. Los apicultores necesitan realizar prácticas de manejo regularmente para controlar el ácaro *Varroa* para evitar la muerte de la colonia. Los métodos de control sin embargo, pueden tener efectos adversos en las abejas frecuentemente [203], dejar residuos en la miel y son costosos. Uruguay sufre los efectos devastadores de *Varroa*, y su presencia ha sido asociada con pérdidas de colonias [204].

Las aplicaciones foliares de combinaciones de neonicotinoides con piretroides son comúnmente usadas para controlar chinches (Hemiptera: Pentatomidae) en soja (*Glycine max*) [113], que es considerada de las plagas principales de este cultivo en varias partes del mundo [114]. Las altas dosis requeridas debido a la baja susceptibilidad de las chinches [115] y el amplio espectro de acción de los productos comúnmente usados, causan impacto

en especies no objetivo como abejas y polinizadores naturales, que podrían si no fuera así aumentar la productividad del cultivo [116].

La ocurrencia de piretroides de uso agrícola en abejas o productos de la colmena no ha sido tan reportada como la de otras clases químicas. Se ha encontrado frecuentemente permetrina en un estudio de calidad de miel [57], y como responsable de incidentes de mortandad de abejas mientras que otros piretroides como fenpropathrin, esfenvalerato y bifentrin se encontraron con menor frecuencia [61].

Durante los últimos años se le ha prestado gran atención al riesgo que tienen los pesticidas para las abejas, particularmente los neonicotinoides [90]. Estos químicos imitan el neurotransmisor acetilcolina y son altamente neurotóxicos para los insectos. Su modo de acción sistémico dentro de las plantas por transporte por el xilema y el floema termina en la translocación al polen y néctar. Su amplia aplicación, persistencia en el suelo y el agua y potencial de ser tomados por los siguientes cultivos y plantas silvestres hacen que los neonicotinoides estén biodisponibles a los polinizadores en concentraciones subletales durante la mayor parte del año [91].

A dosis reales de campo, los neonicotinoides causan un amplio rango de efectos subletales adversos en colonias de abejas y abejorros, afectando la performance de la colonia a través de la incapacidad para pecorear exitosamente, cría y desarrollo larvario, memoria y aprendizaje, daño en el sistema nervioso central, susceptibilidad a enfermedades, higiene de la colmena, etc. Los neonicotinoides exhiben una toxicidad que puede ser amplificada por varios otros agroquímicos y sinérgicamente refuerzan agentes infecciosos como *Nosema ceranae* que en conjunto pueden producir el colapso de la colonia. Los limitados datos disponibles sugieren que probablemente exhiban una toxicidad similar a virtualmente todas las demás clases de insectos polinizadores [91, 108-112]. Adicionalmente, es importante considerar que los neonicotinoides pueden presentar efectos sinérgicos en combinación con fungicidas triazoles que modifican el metabolismo del citocromo P450 aumentando la toxicidad de los neonicotinoides [105,119,120]. También ha sido reportado que aumentan el impacto de patógenos, en particular, el mecanismo molecular por el cual clotianidin afecta adversamente la respuesta inmune y promueve la replicación de un patógeno viral en abejas dando infecciones encubiertas [121].

Los efectos de dosis subletales de acetamiprid y tiametoxan en el comprometimiento de las abejas fue investigado encontrando que tiametoxan no tiene efecto en las condiciones del experimento y que acetamiprid presentaba una cierta vulnerabilidad [49]. La evaluación de la toxicidad aguda de pesticidas a escalas de semi-campo y campo sobre las especies *Apis cerana* y *A. mellifera* fue reportada en 2015: se encontró que acetamiprid y endosulfan eran más seguros que los demás insecticidas ensayados y no causaban ningún efecto repelente en abejas en pruebas a campo, mientras tiametoxam (entre otros) fue muy tóxico [117].

En un estudio realizado durante 2012-2013 para estudiar la exposición subletal de neonicotinoides a las abejas se observó que cuando eran expuestas tanto a imidacloprid o clotianidin a la dosis de 0,73 ng/abeja/día para las 13 semanas consecutivas de Julio a setiembre 2012, seis de las doce colonias tratadas con neonicotinoides previamente saludables murieron y todas exhibieron síntomas del síndrome del colapso de las colonias (CCD) durante los meses de invierno [118].

Recientemente en España la influencia del uso de pesticidas en frutales en floración sobre la mortalidad de abejas en 4 apiarios experimentales fue estudiada. Entre otros pesticidas (cumafos, clorpirifos, dimetoato, ometoato, fluvalinato y carbendazim), se detectaron los neonicotinoides imidacloprid y acetamiprid. Imidacloprid fue el 4to residuo detectado con mayor frecuencia en los extractos de abejas. Las concentraciones halladas (media 53 ng/g y máximo 223 ng/g) están por encima de las consideradas subletales y que podrían ser responsables de pérdidas de abejas o incluso de intoxicaciones agudas de abejas obreras [86].

A pesar de la cantidad de información sobre la ocurrencia de pesticidas en la colmena, se sabe poco de los procesos y mecanismos que gobiernan el transporte del campo a la colmena de los agroquímicos. Se han utilizado las propiedades fisicoquímicas de los pesticidas para modelar la distribución dentro de la colmena o para entender los mecanismos de toxicidad para las abejas [205-207]. Sin embargo, no se han reportado datos que vinculen las concentraciones que se encuentran en el campo con lo que se detecta en la colmena.

Se presenta el estudio de la transferencia de neonicotinoides del campo a la colmena por abejas pecoreadoras y su distribución dentro de las matrices de la colmena: polen, cera,

miel y abejas. Los datos generados durante este estudio sobre exposición real a campo de abejas son útiles para análisis de riesgo y modelado.

7.2 Resultados y discusión

Las colmenas presentaron condiciones biológicas iniciales similares (Tabla 7.1) con respecto a población, cría y reserva de miel. Todas las colmenas estaban saludables, como se puede observar presentaban un pequeño porcentaje de infección por *Varroa destructor*: <4% en todos los casos y <1% para 92% de las colmenas. Ningun pesticida en las matrices del estudio fue detectado previo a la exposición.

Tabla 7.1 Condiciones biológicas iniciales de las colmenas del ensayo en cuanto a población, cría, reserva de miel y porcentaje infección por V. destructor.

Número de colmena	Población	Cría	Reserva de miel	<i>V. destructor</i> infección (%)
1	7	48	2,5	0,9
2	7	10	3,5	0
3	8	52	3	0,9
4	7	39	3,5	0,4
5	8	46	3	0,4
6	7	34	4	0
7	8	53	3	0,8
8	6	27	4,5	0
9	6	40	4	0,8
10	6	43	3,5	0

11	7	52	2	4
12	7	38	4	0

Las concentraciones de pesticidas encontradas en las abejas muertas colectadas en las trampas de mortalidad 24 hs después de la aplicación estuvieron entre 0,001 y 0,072 μg abeja⁻¹ (Tabla 7.2) las cuales están por debajo de la LD₅₀ de contacto de los tres neonicotinoides. Las abejas muertas colectadas en las trampas de mortalidad 24 hs luego de la aplicación correspondieron a un 4% de la población total (basado en la estimación inicial) en el caso de la mayor mortalidad observada (632 abejas).

Tabla 7.2 Abejas muertas colectadas en las trampas de mortalidad y rango de concentraciones de neonicotinoides 24 hs luego de la aplicación.

Pesticida	Rango de abejas muertas	Rango de Concentración ($\mu\text{g}/\text{abeja}$)	LD ₅₀ contacto ($\mu\text{g}/\text{bee}$) [208]
Control	(3, 25, 31)	nd	-
Imidacloprid	(31, 80, 174)	(0,010-0,072)	0,081
Acetamiprid	(8, 15, 46)	(0,012-0,041)	8,09
Tiametoxan	(61, 343, 632)	(0,001-0,003)	0,024

Se detectaron residuos de neonicotinoides mientras que no se detectaron residuos de piretroides. Probablemente las abejas expuestas a concentraciones mayores (que podrían haber sido detectados) permanecieron muertas en el campo y no pudieron regresar a la colmena debido al efecto *knock down* de los piretroides. En las que se muestrearon vivas las concentraciones estuvieron por debajo de límite de detección del instrumento GC-MS que es mayor que el de los neonicotinoides que se analizan por LC-MS/MS (Tabla 7.3). Cada abeja pecoreando en el cultivo dentro del macro tunel, 24 hs luego de la aplicación de los pesticidas, colectó en promedio 0,05 ng de acetamiprid, 0,3 ng de imidacloprid y 0,3 ng de tiametoxan, de los 130, 192, y 74 mg aplicados sobre cada porción de cultivo respectivamente. Estos valores se encuentran por debajo de cada LD₅₀ (oral aguda en 48 hs), representan 1/10 de la de tiametoxan e imidacloprid [208].

Tabla 7.3 LOQ y parámetros instrumentales de cada compuesto estudiado

LC-MS/MS			
	Acetamiprid	Imidacloprid	Tiametoxam
LOQ (mg kg ⁻¹) abeja	0,0001	0,0001	0,0001
LOQ (mg kg ⁻¹) cera	0,001	0,010	0,010
LOQ (mg kg ⁻¹) polen	0,001	0,001	0,010
LOQ (mg kg ⁻¹) miel	0,001	0,001	0,001
LOQ (mg kg ⁻¹) hojas	0,010	0,010	0,010
LOD (mg kg ⁻¹) abejas	0,0001	0,0001	0,0001
LOD (mg kg ⁻¹) cera	0,001	0,001	0,001
LOD (mg kg ⁻¹) polen	0,001	0,001	0,001
LOD (mg kg ⁻¹) abejas	0,001	0,001	0,001
LOD (mg kg ⁻¹) hojas	0,002	0,002	0,002
Primera transición m/z>m/z	223>126	256,1>175	292>211
Primera transición DP,CE,CXP	55,25,10	85,23,10	88,15,10
Segunda transición m/z>m/z	223>90	256,1>209	292>181,2
Segunda transición DP,CE,CXP	55,48,10	85,22,10	88,24,10
GC-MS			
	Cihalotrina- lambda	Cipermetrina	Ciflutrina
LOQ (mg kg ⁻¹) abejas	0,05	0,10	0,10
LOQ (mg kg ⁻¹) cera	0,10	0,10	0,10
LOQ (mg kg ⁻¹) polen	0,05	0,10	0,10
LOQ (mg kg ⁻¹) miel	0,10	0,10	0,10
LOD (mg kg ⁻¹) abejas	0,01	0,03	0,03
LOD (mg kg ⁻¹) cera	0,03	0,03	0,03
LOD (mg kg ⁻¹) polen	0,01	0,1	0,1
LOD (mg kg ⁻¹) miel	0,03	0,03	0,03
Iones seleccionados (m/z)	181, 197, 208	163, 181, 209	163, 206, 226
Ion confirmación (m/z)	208	181	226
Ion cuantificación (m/z)	181	163	163

En cera recientemente producida (cortada de las capas externas del panal), muestreada al día 6 del experimento, se detectaron los tres residuos de neonicotinoides a su límite de detección (1 µgkg⁻¹). Estos resultados indican que las abejas expuestas a neonicotinoides efectivamente transfirieron los tres residuos que habían colectado. Los residuos de pesticidas no fueron detectados ni en la miel ni en el polen presentes en la

porción de panal muestreado; las concentraciones en estas matrices podrían haber estado por debajo de $0,001 \text{ mgkg}^{-1}$ que es el LOQ del método que se muestra en la Tabla 7.3. En una publicación reciente se encontraron LOQs semejantes para el análisis de residuos en miel y abejas usando QuEChERS [209]. En un review reciente sobre el efecto de los neonicotinoides en abejas y en la salud de la colmena, Sanchez Bayo et al. recopilaron información sobre los efectos negativos de la exposición crónica de estos insecticidas en abejas y como consecuencia sobre su performance. La discapacidad para realizar algunas funciones básicas del trabajo de las abejas así como la degradación de su sistema inmune, que pueden tener consecuencias sobre toda la colonia, amenazando su supervivencia [210,211].

En la Figura 7.1 se muestra la evolución con el tiempo del promedio de concentraciones de residuos de pesticidas en abejas muestreadas dentro de la colmena para cada tratamiento. Se observa el decaimiento en las concentraciones de pesticidas, no siendo detectable a partir del día 12 para ninguno de los compuestos investigados.

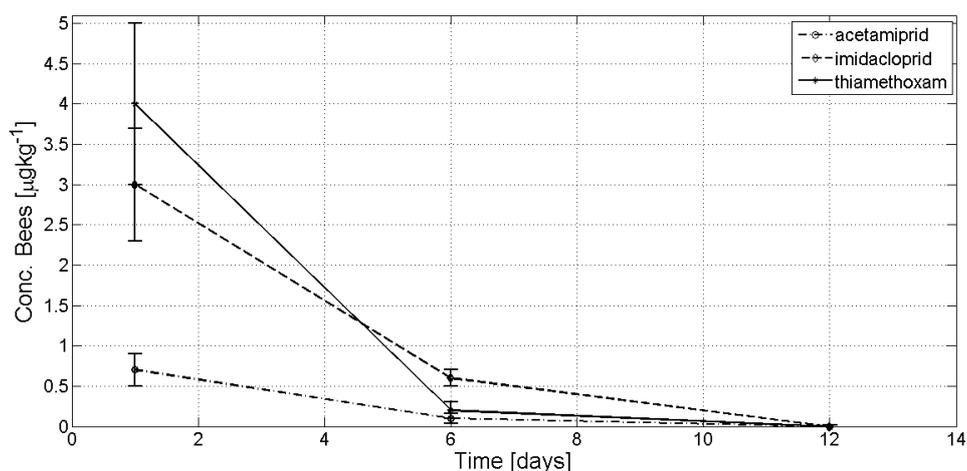


Figura 7.1 Evolución de los residuos de pesticidas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) con el tiempo (días).

A partir de los resultados obtenidos de los análisis multiresiduo de pesticidas, en la Figura 7.2 se presenta una mirada a la relación entre las variables concentración de residuos de pesticidas en el cultivo y concentración de residuos de pesticidas en las abejas muestreadas simultáneamente en la Figura 7.2.

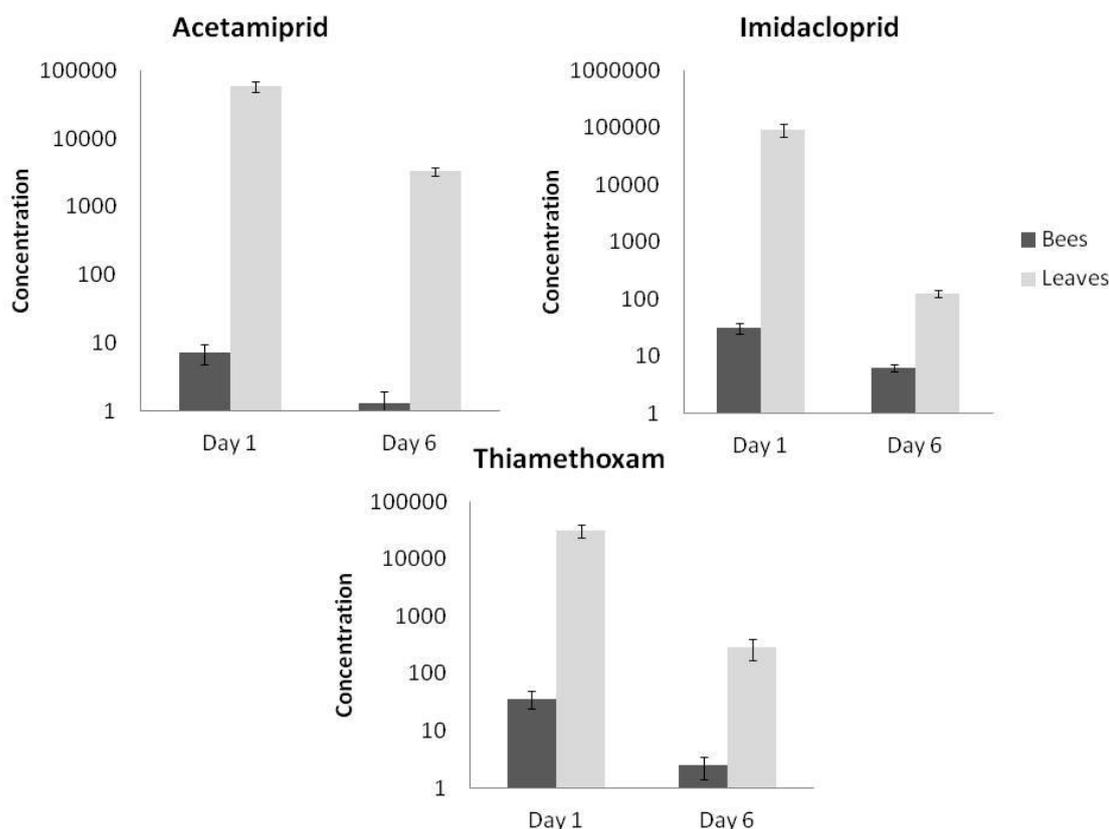


Figura 7.2 Concentraciones de residuos de pesticidas en abejas y hojas muestreadas simultáneamente.

Es de notar que en la Figura 7.2 las concentraciones de pesticidas fueron transformadas (multiplicadas por 10^4 y presentadas en escala logarítmica) para poder mostrar comparativamente las abejas y las hojas en ambos días.

Se observó que la DT_{50} para cada compuesto en la matriz planta para el experimento es < 6 días lo que está dentro del rango reportado en la base de datos *Pesticides Properties DataBase* [208].

Estos datos permiten calcular el cociente de transferencia del cultivo a las abejas = concentración de pesticidas en abejas/ concentración de pesticidas en hojas de soja al día 1. Esta relación es particularmente importante porque permite relacionar cuantitativamente la cantidad de pesticida aplicado en el campo (concentración de pesticida en hojas) con la cantidad que las abejas muestrean (concentración de pesticidas en abejas) y por lo tanto entrarán a la colmena.

Acetamiprid fue encontrado en abejas tanto a las 24 hs como a los 6 días a niveles diez

veces por debajo que los otros dos neonicotinoides, por lo tanto su transferencia a la colmena es menor. Una explicación posible puede deberse a las diferencias en la presión de vapor (P_v) entre ellos: tiametoxam= $6,60 \times 10^{-6}$; imidacloprid= $4,0 \times 10^{-7}$; acetamiprid = $1,73 \times 10^{-4}$ mPa [208]. La P_v del acetamiprid es de dos a tres órdenes mayor que tiametoxan e imidacloprid respectivamente. Debido a la volatilidad mayor del insecticida, probablemente las abejas lo detecten y eviten visitar flores de soja contaminadas con acetamiprid. Aunque la transferencia de pesticidas no mostró una tendencia general con la solubilidad en agua, el pesticida más soluble tiametoxam presentó la mayor transferencia.

Es interesante que las transferencias de los pesticidas calculadas muestren una tendencia lineal inversa con el K_{ow} de cada molécula (Figure 7.3).

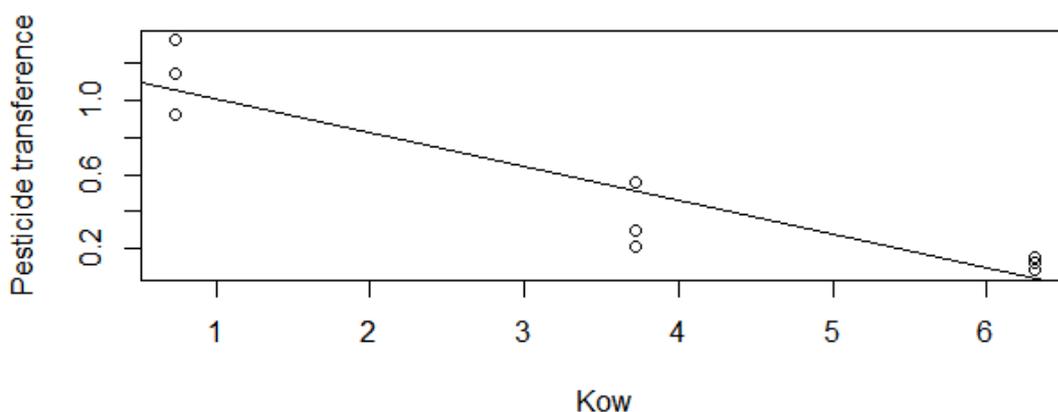


Figura 7.3 Transferencia de los pesticidas del cultivo de soja a las abejas graficada en función de cada K_{ow} (tiametoxam=0,741; imidacloprid=3,72; acetamiprid=6,31). Notar que los valores de transferencia fueron escalados (multiplicados por 10^3).

Al intentar ajustar un modelo lineal ($n = 9$) se obtuvo: R^2 ajustado = 0,84; Intercepto = 1,192; Pendiente = -0,183; P valor: 0,00031; lo que indica que se puede rechazar la hipótesis de que la pendiente es 0 y que 84% de la variabilidad en la transferencia se puede explicar por el K_{ow} . La mayor transferencia de pesticidas se observa para el pesticida que presenta el K_{ow} más bajo: tiametoxam=0,741; imidacloprid=3,72; acetamiprid=6,31 [208]. La importancia de esta relación entre la propiedad fisicoquímica K_{ow} y la transferencia de pesticidas es que permite predecir el comportamiento de otros compuestos. Por ejemplo, para los piretroides que tienen un K_{ow} mucho mayor que los neonicotinoides, se espera

una transferencia mucho menor, por lo tanto, sus concentraciones en abejas serán bajas, lo que es concordante con el hecho de que no se detectaron en el presente ensayo. Aunque tres pesticidas no son suficientes para hacer una afirmación general, al observarse una tendencia, evidencia que sería valioso expandir esta investigación a otras moléculas relevantes.

8 La colmena biomonitor de pesticidas en agroecosistemas: evaluación de indicadores simples químicos y biológicos utilizando *Support Vector Machines* (Artículo VI)

8.1 Introducción

La salud de las colmenas ha estado intuitivamente relacionada al estado de contaminación del ecosistema donde viven las abejas. En las últimas décadas, luego de la llegada de la era de la agricultura basada en aplicaciones de agroquímicos, esta contaminación se está conectando con los residuos de pesticidas encontrados en cera, polen, miel y abejas. Los pesticidas son sustancias bioactivas potentes y su presencia se reconoce que impactan en la vida negativamente, sin importar el tipo de organismo al que apuntan. Las abejas no son la excepción y, como son reconocidas como contribuidoras vitales para la polinización y por lo tanto para el éxito de la mayoría de las actividades agrícolas, la toxicidad de los pesticidas a las abejas se controla estrictamente. No menos importante, las abejas llevan a la colmena no solo los alimentos sino que además colectan contaminantes en su jornada laboral. La forma en que estas mezclas de pesticidas en cantidades subletales afectan la productividad de la colmena no se conoce precisamente aún, pero se puede asumir que el efecto global en este sistema muy organizado puede estar vinculado a los efectos observados en el ambiente en el que viven.

En reportes previos de nuestro grupo se mostró que los pesticidas encontrados en las estaciones pre y post-cosecha variaban de acuerdo al tipo de pesticidas aplicados en la región donde las abejas se alimentaron. Este hecho está claramente en correspondencia con el tipo de actividad (ganadería, cultivos extensivos, producción lechera) realizada en la región que las abejas cubrían. Además, el cálculo de las distancias de Gower mostraron la sensibilidad de la colmena a los cambios estacionales en el tipo de producción en esa región, tanto como la habilidad de la colmena para monitorear esos cambios. También se mostró que los distintos compartimientos de la colmena (abejas, cera, polen y miel) brindaban información específica sobre la historia de las aplicaciones de pesticidas en un determinado agroecosistema [194].

Como se observa en los escenarios típicos ambientales, se ha reportado que los productos de la colmena frecuentemente contienen muchos contaminantes a bajas concentraciones [54,61,162]. Para entender los efectos e interacciones de estas moléculas bioactivas se debe abordar el problema de la toxicidad de las mezclas. Los modelos actualmente aceptados: Adición de Concentración (CA) [212], Y Acción Independiente (IA) [213] sufren las obvias limitaciones de asumir modos de acción (MOA) similares y disímiles para todos los compuestos presentes en la mezcla respectivamente. Sin embargo, se ha probado que ambos son aceptables y se han aplicado obteniendo resultados similares. CA es un modelo conservador (protector) y ampliamente aplicable que requiere sólo datos de toxicidad estándar para los pesticidas individuales, y es adecuado como una herramienta de *screening* para la aplicación a mezclas ambientales complejas de pesticidas con MOA similar, disímil o desconocido. Recientemente, se ha aplicado por ejemplo para la evaluación de contaminación por múltiples sustancias químicas en ecosistemas acuáticos [214], de ecotoxicidad de sedimentos en ríos [215] y de PAHs en sedimentos de estuarios [216]. Se han propuesto índices de pesticidas también basados en el concepto de unidades de toxicidad [217] y el modelo CA [218,219]. Siguiendo el mismo concepto se han propuesto cocientes de riesgo para polen y néctar que consisten en el cociente entre las concentraciones de pesticidas en polen o néctar sobre la LD₅₀ para abejas [73].

Support Vector Machines (SVMs) fueron desarrollados en 1995 para clasificación binaria [220]. La complejidad del modelo de un SVM no se afecta por el número de atributos que se encuentren en los datos de entrenamiento (el número de vectores soporte seleccionados por el algoritmo de aprendizaje de SVM es generalmente pequeño). Por este motivo, las SVMs están bien equipadas para manejar tareas de aprendizaje donde el número de atributos es grande con respecto al número de muestras de entrenamiento [221]. El objetivo de SVM es producir un modelo (basado en los datos de entrenamiento) el cual predice los valores de salida del set de prueba dado únicamente los atributos. Se han reportado distintas aplicaciones de SVM en agricultura [167]. Por ejemplo, se ha usado esta técnica para detectar automáticamente regiones en espinaca que responden al déficit de humedad de suelo usando imágenes visibles y térmicas [172]. También se ha utilizado para la selección de bandas hiperespectrales para detectar distintos estados de madurez de arándanos [173] y para el monitoreo automático de calidad de piensos [174]. Otras aplicaciones son la mejora en la

estimación de la trayectoria del peso de bovinos [175], y la identificación de especies de *Brachiaria* usando técnicas de imágenes basadas en descriptores fractales [176].

Esta es la primera vez a nuestro conocimiento, que se usa SVMs como herramienta para dar soporte a la evaluación y para predecir el estado ambiental de un agroecosistema usando la colmena como biomonitor partiendo de datos químicos (hallazgos de residuos de pesticidas) y datos biológicos de colmenas periódicamente evaluadas y ubicadas fijas en ambientes agrícolas específicos.

8.2 Resultados y discusión

Descripción de las variables incluidas en el modelo

Estaciones: como se esperaba ya que fue demostrado en un trabajo anterior [194], las estaciones tienen un rol importante en la colmena, por lo tanto fueron incluidas en el modelo; la mejor manera encontrada fue como un vector (verano, otoño, invierno, primavera), por ejemplo la representación de la primavera es el vector (0,0,0,1).

Indicadores biológicos: el promedio de las estimaciones de población y área de cría de las cinco colonias elegidas por apiario, que se indican como μ_{pop} y μ_{brood} .

Indicadores químicos:

La simple suma de la cantidad de pesticidas encontrados por ambiente por estación (contando cada pesticida encontrado en cada producto de la colmena: abejas, miel, polen y cera) se indica como $pestnum$.

Para combinar con sentido los múltiples hallazgos de pesticidas por ambiente por estación se utilizó la estrategia de Unidades Tóxicas (TU_i Toxic Units) [217] que se definen como el cociente entre la concentración c_i de un determinado compuesto i y su toxicidad aguda LD_{50} :

$$TU_i = \frac{c_i}{LD_{50i}}$$

Estos datos se calcularon para cada pesticida detectado utilizando los datos disponibles de toxicidad aguda por contacto en abejas 48 horas LD_{50} ($\mu\text{g abeja}^{-1}$) para los hallazgos en abejas y cera, y la toxicidad oral aguda 48 horas LD_{50} ($\mu\text{g abeja}^{-1}$) para miel y polen, tomados de “*The University of Hertfordshire Pesticide Properties DataBase*” [208].

Bajo los supuestos del modelo de Adición de Concentraciones [212] las unidades tóxicas fueron sumadas por adición simple de todos los distintos compuestos encontrados en cada matriz por ambiente por estación. El total de unidades tóxicas para la mezcla completa por muestra es entonces:

$$TU_{tot} = \sum_i^n TU_i$$

La suma de TUs respecto a las abejas se indica como *colmenaTU_{tot}*

La misma estrategia de suma de unidades tóxicas se usó combinando en este caso el cociente entre los g ha^{-1} calculados para cada hallazgo de pesticida a su dosis recomendada a campo (considerando el porcentaje de ingrediente activo en un producto formulado y la dosis requerida para proveer control para la producción mayoritaria de cada ambiente) y su toxicidad aguda oral para mamíferos LD_{50} (g kg^{-1}), ya que este parámetro se considera representativo de la toxicidad en humanos. La suma de TUs correspondiente a dosis de campo y toxicidad en mamíferos se indica como *TU_{tot}(mam)*.

La última variable química se indica como *sumEIQ_p*. Se construyó sumando los g ha^{-1} calculados para cada hallazgo de pesticida a su dosis recomendada a campo (considerando el porcentaje de ingrediente activo en un producto formulado y la dosis requerida para proveer control para la producción mayoritaria de cada ambiente) multiplicados por su Cociente de Impacto Ambiental (EIQ *Environmental Impact Quotient*) [222,223]. Del valor EIQ se tomó solo el promedio entre los componentes del consumidor y los ecológicos, dejando fuera los efectos para el aplicador y cosechador.

Clasificación y comparación de ecosistemas

El primer paso para evaluar los distintos indicadores químicos y biológicos para la evaluación ambiental fue clasificar los ecosistemas, identificando los afectados por la

presencia de pesticidas y los no afectados (o mínimamente afectados). La clasificación de ambientes se realizó de acuerdo a las observaciones a campo y a la historia de residuos de pesticidas distinguiendo las estaciones en los cuatro años. Todos los ambientes listados en el grupo 1 de la sección 2.1 (artículo VI) se clasificaron como afectados mientras que el grupo 2 se clasificaron como no afectados previamente chequeando que para la estación invierno las muestras en cuenca lechera, ganadería&arroz, y horticultura se pudieran clasificar en esta categoría ya que rara vez se encontraban residuos de pesticidas.

Tabla 8.1 Hallazgos de pesticidas, LD₅₀ abejas oral y contacto, LD₅₀ en mamíferos oral, EIQ (consumidor y ecológico), dosis promedio recomendada a campo en g ha⁻¹.

Pesticida	LD₅₀ oral µg abeja⁻¹	LD₅₀ contacto µg abeja⁻¹	LD₅₀ oral mamífero mg kg⁻¹	EIQ (consumidor +ecológico)	Dosis recomendada promedio g pesticida ha⁻¹
Acetamiprid	14.53	8.09	146	39.6	69
Atrazina	100	100*	1869	30.3	1110
Azoxistrobin	25	200	5000	36.3	100
Boscalid	100	200	5000	33.6	250
Carbaril	0.21	0.14	614	26.6	898
Carbendazim	756	50	10000	63.2	292
Cipermetrina	0.035	0.02	287	47.6	28
Clorpirifos-etil	0.25	0.059	64	37.3	516
Clorpirifos-metil	0.11	0.15	2814	-	280
Ciflutrina	0.05	0.001	16.2	55.9	6
Diazinon	0.09	0.13	1139	62.6	625
Dimetoato	0.12	0.12	245	45.1	375
Etion	20.55	20.55	208	44.8	7
Fipronil	0.00417	0.0059	92	102.4	6
Hexitiazox	112	200	5000	42	45
Imazalil	35.1	39	227	29.4	4
Imidacloprid	0.0037	0.081	131	51.6	110
Iprodiona	25	200	2000	28.3	275
Metomilo	0.28	0.16	30	30	200
Metsulfuron metil	44.3	50	5000	21	4
Piraclostrobin	73.1	50	5000	36.5	331
Tebuconazol	83	100	1700	50.5	110
Tiacloprid	17.3	14.6	444	39	72

Tiametoxam	0.005	0.024	1563	44.8	51
Trifluralin	100	100	5000	23.8	744

La mayoría de los hallazgos positivos corresponden a fungicidas. Las estrobilurinas fueron los tipos de compuestos más frecuentemente hallados. Las moléculas y concentraciones detectadas eran similares a las encontradas en productos de Europa y USA como se reporta en la literatura y en la base de datos “Pesticides Online” [185].

Modelado

Una vez que se realizó y verificó la clasificación con los hallazgos de residuos de pesticidas de varias campañas de muestreo se construyó el set de datos y las variables o atributos (Tabla 8.2) para aplicar un modelo de aprendizaje automático supervisado. Los valores reales para las diferentes variables fueron escalados antes de aplicar los modelos de aprendizaje para evitar problemas debido a diferencias en los órdenes de magnitud de los datos. Los factores utilizados para el escalado se muestran en el encabezado de la Tabla 8.2. El conjunto de datos se dividió en uno de entrenamiento y otro para validación, reservando así los casos 39 a 45 para la validación final.

Las evaluaciones de enfermedades como infección por varroa y nosema no dieron buenos ajustes del modelo, lo cual era esperable ya que no se podía vincular las enfermedades al estado del ambiente porque eran tratadas con acaricidas.

Tabla 8.2 Variables y set de datos utilizados para la clasificación mediante SVM.

Caso	Clase	μ_{pop}	μ_{brood}	Verano	Otoño	Invierno	Primavera	<i>Pestnum</i>	<i>hiveTUtot</i> (<i>bee</i>)	<i>TUtot(mam)</i> [*10 ³]	<i>sumEIQp</i> [*10 ⁴]
1	si	5,2	0,95	0	0	1	0	15	4,1	2,8	21,3
2	no	2,8	0,76	0	0	1	0	9	0,2	0,6	12,7
3	si	6,8	0,65	0	0	1	0	16	165,4	16,9	11,6
4	no	5,0	2,25	0	1	0	0	9	3,9	1,3	4,3
5	si	5,2	2,7	0	1	0	0	13	39,0	11,9	20,6
6	no	8,8	4,8	0	1	0	0	7	4,5	3,3	8,2
7	no	8,8	4,2	0	1	0	0	8	0,2	0,3	5,1
8	no	9,6	3,4	0	1	0	0	9	0,1	0,2	3,7
9	no	19,0	5,7	0	1	0	0	8	1,8	7,0	4,0
10	no	9,6	3,5	0	1	0	0	9	1,1	7,0	4,4
11	si	6,8	2,0	0	1	0	0	10	7,5	14,9	6,2
12	no	11,4	2,0	0	1	0	0	5	0,0	0,2	3,1
13	no	7,4	4,2	0	1	0	0	13	3,7	0,7	5,6
14	no	5,6	1,4	0	0	0	1	14	6,8	10,2	13,0
15	no	5,6	1,2	0	0	0	1	12	1,7	2,0	9,9
16	si	6,6	6,0	0	0	0	1	10	8,0	3,7	16,2
17	no	14,8	7,2	0	0	0	1	8	3,8	3,4	8,8
18	si	7,0	4,4	0	0	0	1	8	33,5	2,1	4,1
19	si	9,0	4,6	1	0	0	0	16	2765,2	18,7	19,4
20	si	17,0	9,4	1	0	0	0	6	133,8	15,7	9,0
21	si	4,2	1,7	1	0	0	0	10	1984,9	1,4	6,3

22	no	7,6	3,2	0	0	1	0	4	0,0	1,2	7,4
23	no	6,8	2,2	0	0	1	0	7	3,1	1,3	8,7
24	si	5,6	1,2	0	0	1	0	13	8,3	4,7	22,5
25	si	4,8	1,0	0	0	1	0	10	0,6	2,0	21,4
26	si	5,6	1,6	0	0	1	0	9	6,3	4,0	16,8
27	si	4,8	2,2	0	0	1	0	8	3,2	2,0	15,3
28	si	5,75	2,0	0	0	1	0	9	5,9	2,5	16,5
29	no	3,0	7,0	0	0	1	0	6	0,2	0,6	5,2
30	no	3,0	5,4	0	0	1	0	8	0,1	1,0	7,4
31	no	5,6	1,5	0	0	1	0	8	0,1	2,1	16,8
32	si	8,0	3,5	0	0	0	1	6	565,1	6,9	8,9
33	si	9,2	5,6	0	0	0	1	2	1129,9	30,0	7,2
34	si	8,2	6,8	0	0	0	1	2	565,0	6,2	4,7
35	si	10,0	9,2	1	0	0	0	8	100,0	1,3	8,9
36	si	6,6	7,8	1	0	0	0	7	565,0	7,7	11,4
37	no	10,8	6,8	1	0	0	0	6	0,0	2,4	8,2
38	si	10,0	8,2	1	0	0	0	7	227,4	1,1	10,1
39	si	9,0	6,8	1	0	0	0	12	790,6	8,2	10,2
40	si	11,2	10,2	0	0	0	1	7	787,3	9,5	10,6
41	si	5,0	6,5	1	0	0	0	12	114,1	14,1	12,8
42	si	5,8	3,1	0	1	0	0	15	15,1	11,7	13,9
43	no	5,2	1,9	0	1	0	0	5	0,1	0,1	1,2
44	no	10,8	10,4	1	0	0	0	2	2,4	1,9	4,7
45	no	7,8	4,6	0	0	1	0	5	2,6	1,6	4,7

Ajuste de parámetros de SVM y validación

Los SVMs requieren un paso de ajuste (*tuning*) de parámetros para encontrar la mejor configuración posible. Las funciones kernel evaluadas fueron la función lineal y la de base radial (RBF), este último kernel hace un mapa no-lineal de las muestras en un espacio de dimensión superior para que pueda manejar los casos en los que las relaciones entre las clases y los atributos es no-lineal [224]. Para el kernel lineal hay un solo parámetro que necesita ajuste, usualmente denotado en la literatura como costo (C). Los parámetros que deben ajustarse para RBF son dos, usualmente denotados en la literatura como costo y gamma (C , γ). Se realizó una búsqueda en grilla para la optimización de los parámetros (en el caso del kernel lineal, una búsqueda simple en el eje del parámetro costo). Para ambos kernels, la búsqueda se realizó usando valores espaciados regularmente en una escala logarítmica. Dado que el dataset disponible, que llevó 4 años y fue complejo de obtener, es pequeño desde el punto de vista del aprendizaje automático, el método de validación elegido fue validación cruzada con 19 cruzamientos. Para poder probar y validar el modelo fue primero entrenado con el set de entrenamiento (casos 1-38 de la Tabla 8.2) y luego validado usando el set de validación (casos 39-45 de la Tabla 8.2).

Tabla 8.3 Mejores parámetros (C , γ) obtenidos, mejor performance y número de vectores soporte para las diferentes variables y kernels evaluados.

Variables	kernel lineal				kernel RBF				
	Mejor parámetro C	Mejor performance	Numero de vectores soporte	Porcentaje de clasificaciones acertadas	Mejores parámetros		Mejor performance	Numero de vectores soporte	Porcentaje de clasificaciones acertadas
					γ	C			
Todas	128	0,11	15	100	0,25	8	0,14	33	85,7
Estaciones&Biológicas	1	0,35	29	57,1	0,5	8	0,23	24	57,1
Estaciones&Químicas	256	0,13	11	100	0,00195	256	0,18	20	85,7
Estaciones&pestnum&colmenaTUtot	128	0,23	19	100	0,5	4	0,25	26	85,7
Químicas	256	0,1	11	100	0,00781	512	0,13	15	100
TUtot(mam)&sumaEIQp	1	0,21	22	100	0,0039	256	0,19	22	100
TUtot(mam)	2	0,41	28	100	0,25	4	0,33	31	100
sumaEIQp	1	0,31	28	85,7	0,00312	8	0,3	28	85,7
TUtot(mam)&pestnum	4	0,39	28	100	0,5	256	0,38	26	85,7

El valor de “Mejor performance” se computa como la tasa de error de clasificación observada durante el paso de tuning (siendo 0 el mejor valor que se puede obtener). Este valor de performance es el criterio con el que se eligieron los mejores parámetros, y también se puede interpretar como la tasa de clasificación que se espera que se mantenga cuando se use el modelo para clasificar nuevos datos. El hecho de que los valores fueron similares entre las distintas variables evaluadas (Tabla 8.3) es una característica útil para poder cambiar el modelo de acuerdo a la disponibilidad de datos y finalidad de uso.

El número de vectores soporte muestra importantes variaciones. Para ambos kernel, en la mayoría de las combinaciones de variables este número es aproximadamente la mitad de las muestras, o incluso menor (por ejemplo para las estaciones&variables químicas y kernel lineal, donde el número de vectores soporte es menor a un tercio del total de muestras). Este hecho (en el contexto de pocas muestras) es un indicador de ausencia de sobreajuste. Para algunos casos particulares (kernel lineal: estaciones&biológicas, $TU_{tot}(mam)$, $sumEIQp$, $TU_{tot}(mam)\&pestnum$; kernel RBF: todas las variables, $TU_{tot}(mam)$, $sumEIQp$), el número de vectores soporte es mayor, cercano al total de muestras, implicando que los modelos construidos con estas variables pueden no generalizar bien. En el paso de validación, cuando los modelos ajustados con los mejores parámetros se aplicaron para clasificar los casos 39 a 45 de la Tabla 8.2, el porcentaje de clasificaciones acertadas fue $> 85\%$ para ambos kernel y las diversas combinaciones de variables con la excepción de las variables biológicas que obtuvieron 57% . Es interesante notar que las variables químicas solas tuvieron un 100% de clasificaciones acertadas y el menor número de vectores soporte para el kernel lineal (11 vectores) y el RBF (15 vectores). Los resultados generales muestran que ambos kernel funcionan bien, por lo que cualquiera de ellos podría ser usado para esta aplicación. El porcentaje de clasificaciones acertadas del conjunto de validación es muy similar (incluso mayor en algunos casos) a los valores esperados de “mejor performance” mostrando que los métodos son robustos y que los parámetros establecidos no resultaron en sobreajuste del modelo.

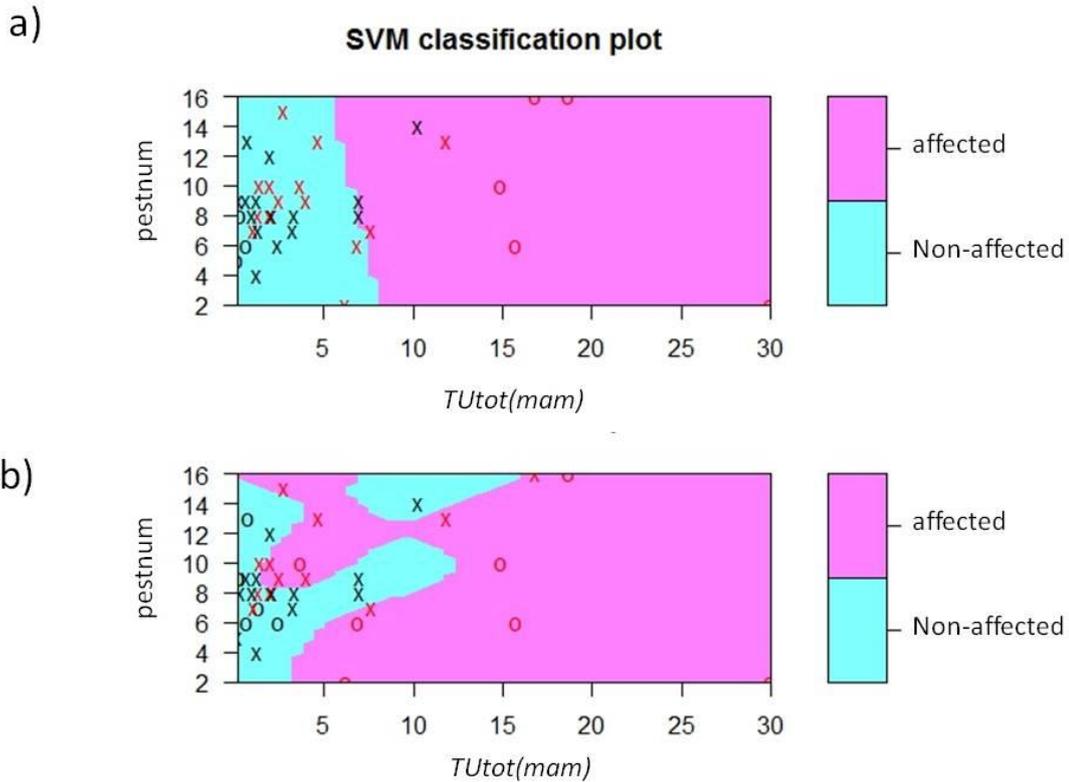


Figura 8.1 Clasificación obtenida con las variables $TU_{tot}(mam)$ y $pestnum$ a) kernel lineal b) kernel RBF

En la mayoría de los casos los modelos SVM se construyen sobre espacios multi dimensionales, los que no son posibles de graficar. Para dar una intuición del comportamiento de estos modelos, la Figura 8.1 presenta plots de clasificaciones para modelos SVM lineales y RBF construidos solamente con dos variables $TU_{tot}(mam)$ y $pestnum$. Esta figura muestra claramente la diferencia entre las clasificaciones lineales y no-lineales.

Los modelos basados en indicadores biológicos son promisorios (57% de exactitud), pero se necesita más investigación para mejorar este valor (en particular, estudiar el efecto de tener un conjunto de datos mayor, y eventualmente refinar cuales indicadores biológicos son los más eficientes). Esto permitiría obtener indicadores biológicos en muchos sitios y aplicar SVM para identificar estaciones y ecosistemas riesgosos donde más indicadores químicos deberían estudiarse. Como los análisis de residuos de pesticidas son mucho más costosos y llevan más tiempo que las estimaciones de

población y cría, es importante tener una herramienta para bajar el número de análisis químicos necesarios para monitorear adecuadamente los agroecosistemas.

Los mejores resultados del modelo para ambos kernel se obtuvieron al usar todos los indicadores químicos: *colmenaTUtot*, *pestnum*, *TUtot(mam)*, *sumEIQp*.

Este trabajo demuestra que SVM es una metodología útil para clasificar los ambientes donde se ubican los biomonitores (colmenas) a través de la información extraída de ellos, incluso cuando se disponen pocas muestras.

9 Conclusiones y perspectivas

El presente trabajo de tesis ha contribuido al desarrollo de herramientas innovadoras para el monitoreo ambiental de residuos de pesticidas en agroecosistemas. La unidad de estudio seleccionada para evaluar como biomonitor integrador que permita calificar la calidad ambiental ha sido la abeja melífera y su colmena. Para cumplir sus necesidades vitales, las abejas se encuentran en fuerte interrelación con el ambiente, y al tiempo que colectan y almacenan alimentos, también lo hacen con los contaminantes, incluyendo pesticidas que encuentran en sus recorridos y los depositan en la colmena.

La estrategia para cumplir este objetivo general fue estudiar el contenido de pesticidas en matrices de la colmena (cera, miel, abejas y polen almacenado) y sus parámetros biológicos en agroecosistemas definidos.

Se seleccionaron los pesticidas a ser evaluados en los distintos estudios según criterios definidos (en base a la probabilidad de ser encontrados en miel y productos de la colmena, determinada mediante la frecuencia de aparición de muestras positivas en la bibliografía y en la base de datos “*Pesticides Online*”, finalmente priorizada según datos de importación en Uruguay).

Se desarrollaron metodologías analíticas y se buscaron las mejores técnicas de detección, optimizando los modos instrumentales para la determinación de los pesticidas seleccionados. Estas metodologías permiten determinar la mayoría de los pesticidas seleccionados a niveles adecuados para cada matriz estudiada.

Se validó una metodología analítica para la determinación de residuos de pesticidas en cera. Usando la estrategia QuEChERS, se estudiaron los impactos del tamaño de partícula de la cera, la cantidad de muestra, el procedimiento de *cleanup* (agregado de agua, extracción en fase sólida dispersiva, freeze out, y combinaciones de ellos) en el rendimiento de la extracción y la carga de coextractivos. Se desarrolló un método de preparación de muestra a través de una extracción líquido-líquido entre acetonitrilo y cera en estado líquido (~80°C), seguido por *freeze out* y *cleanup* dispersivo con amina primaria y secundaria para 51 residuos de pesticidas. Las determinaciones se realizaron mediante las técnicas LC-MS/MS y GC×GC-TOF, y se validó todo el procedimiento. Se obtuvieron recuperaciones entre 70 y 120% y RSDs debajo de 20% en la mayoría de

los casos. Los límites de cuantificación en LC-MS/MS estuvieron entre 0,01 y 0,1 mg kg⁻¹ mientras que para los pesticidas que son más adecuados para ser determinados por cromatografía gaseosa GC×GC-TOF estuvieron en el rango (0,1–0,2 mg kg⁻¹). Los rangos lineales obtenidos para cada pesticida por GC×GC-TOF fueron acotados (entre 0,25 y 1 mg kg⁻¹) y se utilizó estándar interno para la calibración. Los rangos lineales para los pesticidas analizados por LC-MS/MS estuvieron entre 0,005 y 0,25 mg kg⁻¹ para la mayoría de los compuestos. El efecto matriz observado tanto en GC como LC fue pronunciado y variable entre analitos.

Se validó una metodología analítica para la determinación de residuos de pesticidas en miel. Para el ajuste se realizó una simple variación del método QuEChERS. Se evaluaron dos métodos de *cleanup*: uno utilizando *freeze out* (dejando el extracto a -20 °C durante 15 hs) y otro utilizando d-SPE utilizando como sorbente PSA. Los pesticidas fueron determinados por LC-MS/MS en modo positivo y negativo. Las recuperaciones estuvieron entre 81-111% para el *cleanup* dispersivo con excepción de 5 pesticidas ácidos que si se recuperaron al realizar el paso de *freeze out* (recuperaciones entre 80-114% con excepción de 3 pesticidas). Las RSD fueron menores al 20% en la mayoría de los compuestos evaluados. Los límites de cuantificación fueron 0,01 mg kg⁻¹ para la mayoría de los compuestos. El rango lineal se encontró entre 0,01 y 0,4 mg L⁻¹. Se evaluó el efecto matriz, que fue < 11% excepto amitraz (-48%), clorpirifos (17%) e imazapir (43%).

El método desarrollado para miel cumple el doble objetivo de evaluar la calidad de las mieles uruguayas, cumpliendo con conceptos de seguridad alimentaria, facilitar el comercio internacional así como encaminar los intentos de utilizar la colmena como bioindicador de calidad ambiental de una región.

Se desarrolló y validó una metodología analítica para la determinación de residuos de pesticidas en abejas. Los porcentajes de recuperación estuvieron entre 71 y 119% con RSDs < 19%. El LOQ de cada pesticida está por debajo de su LD₅₀, y en muchos casos, varios órdenes de magnitud, como por ejemplo 0,0001 mg kg⁻¹ para azoxistrobin, dimetoato y metomil. El rango lineal (0,002-0,1 mg L⁻¹) fue adecuado al uso considerando las concentraciones encontradas en las muestras reales. Se estudió el efecto matriz para cada pesticida que fue pronunciado y variable entre los compuestos.

Se validó una metodología analítica para la determinación de residuos de pesticidas en polen. Se ajustó un método adecuado donde también se cumplían los criterios de todos los parámetros de validación. Los porcentajes de recuperación estuvieron entre 72 y 119 % con RSDs < 20% para la mayoría de los analitos. Se obtuvieron LOQs de 0,0001 mg kg⁻¹ para varios compuestos, siendo 0,05 mg kg⁻¹ el más alto sólo para algunos compuestos. El efecto matriz fue más pronunciado y variable que para las demás matrices.

Una vez obtenidos todos los métodos se amplió el alcance de los mismos a todos los pesticidas de interés y se validaron nuevamente y se estudiaron niveles más bajos. Finalmente los límites de cuantificación para todas las matrices estuvieron en el rango 0,0001 y 0,01 para LC-MS/MS y 0,05 y 0,1 para GC-MS.

Las metodologías analíticas optimizadas son una herramienta que permite la vigilancia de la inocuidad de la miel y la cera y por otro lado, la determinación de causas en casos de mortandades masivas de abejas donde se presume intoxicación por pesticidas. En particular, se comprobó en un caso la intoxicación por paratión metil microencapsulado porque las abejas transportaron las microcápsulas a la colmena confundiéndolas con polen.

Con las metodologías desarrolladas y validadas para determinar residuos de pesticidas adecuados a cada matriz del estudio, se ensayaron distintos experimentos y monitoreos para coleccionar información de la colmena buscando comprobar su capacidad como bioindicador de calidad ambiental de un agroecosistema.

Se exploraron y confirmaron nuevos enfoques para utilizar la información que la colmena puede suministrar sobre la situación ambiental que la rodea, a través de la determinación de las concentraciones de residuos de pesticidas encontradas en la misma.

Los niveles detectados en todos los casos estuvieron por debajo de las dosis letales y por lo tanto no se observaron mortandades masivas, sin embargo, los resultados permiten extraer información del ambiente.

Del monitoreo de las diferentes matrices y a partir del tratamiento estadístico de los residuos encontrados se pudo concluir que es importante analizar cada una de las

matrices: abejas, cera, miel y polen por separado ya que cada una de ellas nos brinda distinta información relevante.

Miel y polen contienen los residuos que son colectados directamente de lo aplicado en los cultivos. Las abejas muestran los contaminantes a los que fueron expuestas como máximo en las tres semanas anteriores en promedio, que es el período de tiempo en el que son pecoreadoras. En cambio, la cera es el reservorio histórico de lo que han sido expuestas ya que se reutiliza constantemente.

Se demostró que, los cambios en los diversos agroecosistemas antes y después de una cosecha así como en las diferentes estaciones del año se pueden registrar estudiando los perfiles de residuos de pesticidas de cada producto de la colmena.

A través de un experimento a semi-campo fue posible demostrar que las abejas efectivamente transfieren residuos de neonicotinoides aplicados en soja al interior de la colmena detectándose los mismos en cera.

Se relacionaron las concentraciones de insecticidas presentes en el ambiente con las trazas encontradas en las abejas mediante el cociente entre la concentración de cada neonicotinoide obtenida en hojas de soja y la concentración de cada uno medida en las abejas. Esta transferencia de los pesticidas mostró una relación lineal inversa con su propiedad fisicoquímica K_{ow} . Además es de destacar que el pesticida que menos se transfirió, acetamiprid, tiene la presión de vapor más alta.

El encontrar relaciones entre la transferencia y las propiedades fisicoquímicas de tiametoxan, imidacloprid y acetamiprid justifica el estudio de más compuestos de interés y abre la pregunta de si la colmena puede efectivamente monitorear cuantitativamente los pesticidas (u otros contaminantes), es decir que se pueda relacionar las concentraciones de residuos que se encuentran en la colmena con las dosis aplicadas a campo.

Se investigó la aplicabilidad de la herramienta informática Support Vector Machine para la clasificación de los agroecosistemas como contaminados o no en base a los monitoreos realizados en ambientes definidos.

SVM demostró ser una metodología útil para clasificar los ambientes con los que interactúan los biomonitores (colmenas), dando buenos resultados aún cuando se

dispone de un pequeño número de muestras desde el punto de vista de una herramienta de aprendizaje automático.

Modelos que incluyen indicadores químicos o combinan indicadores biológicos demostraron altos niveles de exactitud incluso al ser entrenados con un conjunto de datos pequeño. Los modelos basados en indicadores biológicos son promisorios para la clasificación ambiental (57% de exactitud; 0,35 en mejor performance durante el entrenamiento para el kernel RBF) pero se necesita continuar la investigación en este sentido.

Los mejores resultados del modelo (100% exactitud y número de vectores soporte más bajo) se obtuvieron para ambos kernel lineal y RBF al usar los indicadores químicos juntos: *colmenaTUtot*, *pestnum*, *TUtot(mam)*, *sumEIQp*. Como las variables de entrada son totalmente explícitas y se pueden cambiar o actualizar, la estrategia seguida en este estudio usando SVM provee una base estable para mejorar el desarrollo de indicadores para el biomonitoreo de sistemas de producción agrícola.

Este es un punto de partida para el desarrollo de modelos que permitan una clasificación más detallada de los diferentes niveles de riesgo que producen los pesticidas presentes en los agroecosistemas. Por otra parte, para volverla una herramienta de aplicación más sencilla sería conveniente desarrollar un programa informático que permita ejecutar el modelo y visualizar los resultados de forma amigable.

Los resultados del presente trabajo de tesis demuestran que la colmena es un importante reservorio de la contaminación por pesticidas del agroecosistema en el que se encuentra. Los pesticidas detectados en los distintos compartimentos de la colmena corresponden con los paquetes tecnológicos aplicados en esa región. Se encontró un conjunto de indicadores biológicos y químicos que combinan hallazgos de residuos con efectos en abejas y humanos y un modelo implementable en un paquete informático, que son capaces de diferenciar los ambientes sin riesgo de los que presentan riesgo producido por los pesticidas provenientes de las actividades agrícolas que en él se desarrollan.

Referencias bibliográficas

1. FAOSTAT (2011) Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. FAOSTAT (Database). (Última actualización: 07 Mar 2014). Consultado 29 Diciembre 2011. Disponible en: <http://data.fao.org/ref/262b79ca-279c-4517-93de-ee3b7c7cb553.html?version=1.0>
2. OECD (2001) Environmental indicators for agriculture – Vol. 3: Methods and Results (2001) <https://stats.oecd.org/glossary/detail.asp?ID=82>.
3. Power AG (2010) Ecosystem services and agriculture: tradeoffs and synergies. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365 (1554):2959-2971. doi:10.1098/rstb.2010.0143
4. Wilcox JR (2004) World distribution and trade of soybeans. En: Boerma H, Specht J (eds) Soybean: improvement, production and uses. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA, pp 1-13
5. FAOSTAT (2013) Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. FAOSTAT (Database). (Última actualización: 07 Mar 2014). Consultado 29 Junio 2015. Disponible en: <http://data.fao.org/ref/262b79ca-279c-4517-93de-ee3b7c7cb553.html?version=1.0>
6. Oerke E-C, Dehne H-W (2004) Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. *Crop protection* 23 (4):275-285
7. FAOSTAT (2011) Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. FAOSTAT (Database). Consultado 29 Junio 2015. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/678/DesktopDefault.aspx?PageID=678#ancor>.
8. FAOSTAT (2016) Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. FAOSTAT (Database). Consultado 15 noviembre 2016. Disponible en: <http://faostat.fao.org/beta/en/#data/QC>.
9. *Codex Alimentarius* (1997) Comisión del *Codex Alimentarius*: Manual de procedimiento. En: Secretaría del Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. FAO, Roma, Italia
10. European Commission (1991) Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market. *Official Journal of the European Communities*:290

11. Tornisielo VL, Botelho RG, de Toledo Alves PA, Bonfleur EJ, Monteiro SH (2013) Pesticide tank mixes: an environmental point of view. *Herbicides - current research and case studies in use*. doi:44957
12. Cluzeau S (2002) Risk assessment of plant protection products on honey bees. In: *Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals*. CRC Press, pp 42-55. doi:doi:10.1201/9780203218655.ch3
13. Thompson HM (2003) behavioural effects of pesticides in bees—their potential for use in risk assessment. *Ecotoxicology* 12 (1):317-330. doi:10.1023/a:1022575315413
14. Thompson HM (2010) Risk assessment for honey bees and pesticides-recent developments and 'new issues'. *Pest Management Science* 66 (11):1157-1162. doi:10.1002/ps.1994
15. Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT, Roe RM (2004) Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection* 23 (5):371-378. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2003.08.018
16. Arena M, Sgolastra F (2014) A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. *Ecotoxicology* 23 (3):324-334. doi:10.1007/s10646-014-1190-1
17. Beketov MA, Liess M (2008) An indicator for effects of organic toxicants on lotic invertebrate communities: Independence of confounding environmental factors over an extensive river continuum. *Environmental Pollution* 156 (3):980-987. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2008.05.005
18. DIEA (2015) Anuario Estadístico Agropecuario 2015 <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-anuario-15,O,es,0>
19. OECD (2001) Test No. 121: Estimation of the adsorption coefficient (Koc) on soil and on sewage sludge using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). OECD Publishing
20. Watzin M, McIntosh A (1999) Aquatic ecosystems in agricultural landscapes: A review of ecological indicators and achievable ecological outcomes. *Journal of soil and water conservation* 54 (4):636-644
21. de Crespín de Billy V, Reyes-Marchant P, Lair N, Valadas B (2000) Impact of agricultural practices on a small headwater stream: terrestrial and aquatic characteristics and self-purifying processes. *Hydrobiologia* 421 (1):129-139. doi:10.1023/a:1003903307789

22. Neumann M, Dudgeon D (2002) The impact of agricultural runoff on stream benthos in Hong Kong, China. *Water Research* 36 (12):3103-3109
23. Bahar MM, Ohmori H, Yamamuro M (2008) Relationship between river water quality and land use in a small river basin running through the urbanizing area of Central Japan. *Limnology* 9 (1):19-26
24. Voelz NJ, Zuellig RE, Shieh, Ward JV (2005) The effects of urban areas on benthic macroinvertebrates in two colorado plains rivers. *Environmental Monitoring and Assessment* 101 (1):175-202. doi:10.1007/s10661-005-9147-8
25. Blakely TJ, Harding JS (2005) Longitudinal patterns in benthic communities in an urban stream under restoration. *New Zealand journal of marine and freshwater research* 39 (1):17-28
26. Winston ML (1991) *The biology of the honey bee*. Harvard University Press, USA
27. FAO, Agriculture and Consumer Protection (2008) Colony life and social organization. <http://www.fao.org/docrep/t0104e/T0104E05.htm#Chapter%20%20Colony%20life%20and%20social%20organization>. Consultado octubre 2016
28. Kevan PG (1999) Pollinators as bioindicators of the state of the environment: Species, activity and diversity. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 74 (1-3):373-393
29. Carrasco-Letelier L, Mendoza-Spina Y, Branchiccela MB (2012) Acute contact toxicity test of insecticides (Cipermetrina 25, Lorsban 48E, Thionex 35) on honeybees in the southwestern zone of Uruguay. *Chemosphere* 88 (4):439-444. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.02.062
30. Dadant C (1975) *La colmena y la abeja melífera*. Dadant e Hijos (Eds) Hemisferio Sur, Montevideo
31. Sanchez M (1999) Evolución de la actividad de las principales enzimas de la miel "Producto Galego de Calidade-Mel de Galicia". Universidad de Santiago de Compostela., Santiago de Compostela, España
32. Crane EE (2013) *The world history of beekeeping and honey hunting*. Routledge Taylor and Francis Group, New York
33. Bogdanov S, Ruoff K, Oddo LP (2004) Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie* 35 (Suppl. 1):S4-S17
34. Suárez-Luque S, Mato I, Huidobro JF, Simal-Lozano J, Sancho MT (2002) Rapid determination of minority organic acids in honey by high-performance liquid

chromatography. *Journal of Chromatography A* 955 (2):207-214.
doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00248-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00248-0)

35. Gheldof N, Engeseth NJ (2002) Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *J Agric Food Chem* 50 (10):3050-3055

36. Herbert EW, Shimanuki H (1978) Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. *Apidologie* 9 (1):33-40

37. Human H, Nicolson SW (2006) Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae). *Phytochemistry* 67 (14):1486-1492. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.05.023>

38. Almeida-Muradian LB, Pamplona LC, Coimbra SI, Barth OM (2005) Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis* 18 (1):105-111. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2003.10.008>

39. Tulloch AP (1980) Beeswax—Composition and Analysis. *Bee World* 61 (2):47-62. doi:10.1080/0005772X.1980.11097776

40. Kolattukudy PE (1976) Introduction to natural waxes. *Chemistry and biochemistry of natural waxes*. Elsevier, Amsterdam

41. Bogdanov S (2009) Beeswax: production, properties, composition and control. *Beeswax book*. Bee Product Science, libro online: www.bee-hexagon.net

42. Maia M, Nunes FM (2013) Authentication of beeswax (*Apis mellifera*) by high-temperature gas chromatography and chemometric analysis. *Food Chemistry* 136 (2):961-968. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.003>

43. Markert BA, Breure AM, Zechmeister HG (2003) *Bioindicators & biomonitoring: principles, concepts, and applications*, vol 6. Elsevier, Amsterdam

44. Gestel CAM, Brummelen TC (1996) Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5 (4):217-225. doi:10.1007/bf00118992

45. Svoboda J (1961) Prumyslové otravy včel arsenem (Industrial poisoning of bees by arsenic). *Ved Pr Vyzk Ustavu Včelarskeho CSAZV* 2:55–60

46. Porrini C, Ghini S, Girotti S, Sabatini A, Celli G, Gattavecchia E (2002) Use of honey bees as bioindicators of environmental pollution in Italy. In: *Honey bees:*

- estimating the environmental impact of chemicals. CRC Press, pp 186-247. doi:doi:10.1201/9780203218655.ch11
47. Decourtye A, Devillers J, Genecque E, Menach KL, Budzinski H, Cluzeau S, Pham-Delègue MH (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. doi:10.1007/s00244-003-0262-7
48. Decourtye A, Pham-Delègue M (2002) The proboscis extension response: assessing the sublethal effects of pesticides on the honey bee. In: Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals. CRC Press, pp 67-84. doi:doi:10.1201/9780203218655.ch5
49. El Hassani A, 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. doi:10.1007/s00244-007-9071-8
50. Hashimoto JH, Colla Ruvolo-Takasusuki MC, Arnaut De Toledo VDA (2003) Evaluation of the use of the inhibition esterases activity on *Apis mellifera* as bioindicators of insecticide thiamethoxam pesticide residues. Sociobiology 42 (3):693-699
51. Porrini C, Sabatini AG, Girotti S, Ghini S, Medrzycki P, Grillenzoni F, Bortolotti L, Gattavecchia E, Celli G (2003) Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination. Apiacta 38:63-70
52. Porrini C, Caprio E, Tesoriero D, Prisco GD (2014) Using honey bee as bioindicator of chemicals in Campanian agroecosystems (South Italy). Bulletin of Insectology 67 (1):137-146
53. Balayiannis G, Balayiannis P (2008) Bee honey as an environmental bioindicator of pesticides' occurrence in six agricultural areas of Greece. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 55 (3):462-470. doi:10.1007/s00244-007-9126-x
54. Chauzat M, Martel A, Cougoule N, Porta P, Lachaize J, Zeggane S, Aubert M, Carpentier P, Faucon J (2011) An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France. Environmental Toxicology and Chemistry 30 (1):103-111. doi:10.1002/etc.361

55. Chauzat MP, Faucon JP, Martel AC, 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
56. Lambert O, Piroux M, Puyo S, Thorin C, L'Hostis M, Wiest L, Buleté A, Delbac F, Pouliquen H (2013) Widespread occurrence of chemical residues in beehive matrices from apiaries located in different landscapes of western France. *PLoS ONE* 8 (6)
57. Malhat FM, Haggag MN, Loutfy NM, Osman MAM, Ahmed MT (2015) Residues of organochlorine and synthetic pyrethroid pesticides in honey, an indicator of ambient environment, a pilot study. *Chemosphere* 120 (0):457-461. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.032>
58. Chauzat MP, Carpentier P, Martel AC, Bougeard S, Cougoule N, Porta P, Lachaize J, Madec F, Aubert M, Faucon JP (2009) Influence of pesticide residues on honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony health in France. *Environmental Entomology* 38 (3):514-523
59. Chauzat MP, Faucon JP (2007) Pesticide residues in beeswax samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in France. *Pest Management Science* 63 (11):1100-1106
60. Johnson R, Ellis M, Mullin C, Frazier M (2010) Pesticides and honey bee toxicity — USA. *Apidologie* 41 (3):312-331. doi:10.1051/apido/2010018
61. Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, vanEngelsdorp D, Pettis JS (2010) High levels of miticides and agrochemicals in north american apiaries: implications for honey bee health. *PLoS ONE* 5 (3):e9754
62. Bargańska Ż, Namieśnik J (2010) pesticide analysis of bee and bee product samples. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 40 (3):159-171. doi:10.1080/10408347.2010.490484
63. Fernández M, Picó Y, Mañes J (2002) Analytical methods for pesticide residue determination in bee products. *Journal of Food Protection* 65 (9):1502-1511
64. Jiménez JJ, Bernal JL, Nozal MJd, Alonso C (2004) Liquid-liquid extraction followed by solid-phase extraction for the determination of lipophilic pesticides in beeswax by gas chromatography-electron-capture detection and matrix-matched calibration. *Journal of Chromatography A* 1048 (1):89-97. doi:10.1016/j.chroma.2004.07.034

65. Karazafiris E, Menkissoglu-Spiroudi U, Thrasyvoulou A (2008) New multiresidue method using solid-phase extraction and gas chromatography-micro-electron-capture detection for pesticide residues analysis in royal jelly. *Journal of Chromatography A* 1209 (1-2):17-21
66. Kasiotis KM, Anagnostopoulos C, Anastasiadou P, Machera K (2014) Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC–MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees. *Science of The Total Environment* 485–486:633-642. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.042>
67. Kristenson EM, Shahmiri S, Slooten CJ, Vreuls RJJ, Brinkman UAT (2004) Matrix solid-phase dispersion micro-extraction of pesticides from single insects with subsequent GC–MS analysis. *Chromatographia* 59 (5):315-320. doi:10.1365/s10337-003-0166-8
68. Panseri S, Catalano A, Giorgi A, Arioli F, Procopio A, Britti D, Chiesa LM (2014) Occurrence of pesticide residues in Italian honey from different areas in relation to its potential contamination sources. *Food Control* 38 (1):150-156
69. Pérez-Parada A, Colazzo M, Besil N, Geis-Asteggiane L, Rey F, Heinzen H (2011) Determination of coumaphos, chlorpyrifos and ethion residues in propolis tinctures by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography coupled to flame photometric and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* 1218 (34):5852-5857. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.097>
70. Rissato SR, Galhiane MS, de Almeida MV, Gerenutti M, Apon BM (2007) Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography-mass spectrometry and application in environmental contamination. *Food Chemistry* 101 (4):1719-1726. doi:10.1016/j.foodchem.2005.10.034
71. Rodríguez López D, Ahumada DA, Díaz AC, Guerrero JA (2014) Evaluation of pesticide residues in honey from different geographic regions of Colombia. *Food Control* 37 (0):33-40. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.011>
72. Rossi S, Dalpero AP, Ghini S, Colombo R, Sabatini AG, Girotti S (2001) Multiresidual method for the gas chromatographic analysis of pesticides in honeybees cleaned by gel permeation chromatography. *Journal of Chromatography A* 905 (1–2):223-232. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00928-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00928-6)

73. Stoner KA, Eitzer BD (2013) Using a hazard quotient to evaluate pesticide residues detected in pollen trapped from honey bees (*Apis mellifera*) in Connecticut. PLoS ONE 8 (10):e77550. doi:10.1371/journal.pone.0077550
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. doi:10.1016/j.chroma.2009.07.045
75. Wiest L, Buleté A, Giroud B, Fratta C, Amic S, Lambert O, Pouliquen H, Arnaudguilhem C (2011) Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. Journal of Chromatography A 1218 (34):5743-5756. doi:10.1016/j.chroma.2011.06.079
76. Yáñez KP, Bernal JL, Nozal MJ, Martín MT, Bernal J (2013) Fast determination of imidacloprid in beeswax by liquid chromatography coupled to electrospray-mass spectrometry. Current Analytical Chemistry 9 (3):495-503
77. Bogdanov S (2006) Contaminants of bee products. Apidologie 37 (1):1-18
78. Bargańska Ż, Ślebioda M, Namieśnik J (2013) Pesticide residues levels in honey from apiaries located of Northern Poland. Food Control 31 (1):196-201. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.049
79. Blasco C, Lino CM, Picó Y, Pena A, Font G, Silveira MIN (2004) Determination of organochlorine pesticide residues in honey from the central zone of Portugal and the Valencian community of Spain. Journal of Chromatography A 1049 (1-2):155-160
80. Pareja L, Colazzo M, Pérez-Parada A, Niell S, Carrasco-Letelier L, Besil N, Cesio MV, Heinzen H (2011) Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay. International Journal of Environmental Research and Public Health 8 (10):3844-3858. doi:10.3390/ijerph8103844
81. Mariana Ríos, Natalia Zaldúa, Leonidas Carrasco-Letelier, Jorge Harriet, Ruben Pedretti, Gerardo Baeten, Jorge Nieto, Martín Steinhardt, Samuel Posse, Ruben Maidana, Jorge Ivanchenko, Miguel Cáceres, Rosano. Á (2010) Evaluación participativa de niveles de plaguicidas en la producción apícola en la cuenca del sitio RAMSAR. En: Mariana Ríos, Zaldúa N, Cupeiro S (eds) Evaluación participativa de plaguicidas en el sitio RAMSAR, Parque Nacional Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay. Vida Silvestre Uruguay, pp 39-58

82. Tomlin C (1996) *The Pesticide Manual*. British Crop Protection Council Farnham, Reino Unido
83. Cremlyn RJ (1991) *Agrochemicals, Preparation and Mode of Action.*, 2nd edition. John Wiley & sons, New York
84. Zhu WY, Schmehl DR, Mullin CA, Frazier JL (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-e77547
85. Porrini C, Mutinelli F, Bortolotti L, Granato A, Laurenson L, Roberts K, Gallina A, Silvester N, Medrzycki P, Renzi T, Sgolastra F, Lodesani M (2016) The status of honey bee health in Italy: results from the nationwide bee monitoring network. *PLoS ONE* 11 (5):e0155411-e0155411
86. Calatayud-Vernich P, Calatayud F, Simó E, Suarez-Varela MM, Picó Y (2016) Influence of pesticide use in fruit orchards during blooming on honeybee mortality in 4 experimental apiaries. *Science of The Total Environment* 541:33-41. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.131>
87. MGAP (2002) Resolución Ministerio Ganadería Agricultura y Pesca http://www.mgap.gub.uy/dgssaa/Normativa/Archivos/PROD_FIT_RES_DGSA/Res%20MGAP%2030-01-02%20MetilParat.pdf Accessed 19 August 2015
88. Bartlett DW, Clough JM, Godwin JR, Hall AA, Hamer M, Parr-Dobrzanski B (2002) The strobilurin fungicides. *Pest Management Science* 58 (7):649-662. doi:10.1002/ps.520
89. Edwards PG, Murphy TM, Lydy MJ (2016) Fate and transport of agriculturally applied fungicidal compounds, azoxystrobin and propiconazole. *Chemosphere* 146:450-457. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.116>
90. Goulson D (2013) An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology* 50 (4):977-987. doi:10.1111/1365-2664.12111
91. van der Sluijs JP, Simon-Delso N, Goulson D, Maxim L, Bonmatin J-M, Belzunces LP (2013) Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Current Opinion in Environmental Sustainability* 5 (3-4):293-305. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cosust.2013.05.007>
92. 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. doi:10.1002/arch.1065

93. 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 Manag Sci* 57 (7):577-586. doi:10.1002/ps.331
94. Suchail S, Guez D, Belzunces LP (2001) Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 20 (11):2482-2486
95. Colin ME, Bonmatin JM, Moineau I, Gaimon C, Brun S, Vermandere JP (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. doi:10.1007/s00244-004-3052-y
96. Decourtye A, Lacassie E, Pham-Delegue MH (2003) Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L) are differentially affected by imidacloprid according to the season. *Pest Manag Sci* 59 (3):269-278. doi:10.1002/ps.631
97. Decourtye A, Devillers J (2010) Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. En: Thany SH (ed) *Insect nicotinic acetylcholine receptors*. Springer, New York, NY, pp 85-95. doi:10.1007/978-1-4419-6445-8_8
98. 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* 56:63-68
99. 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
100. Yang E, Chuang Y, Chen Y, Chang L (2008) Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of economic entomology* 101 (6):1743-1748
101. Cutler GC, Scott-Dupree CD (2007) Exposure to clothianidin seed-treated canola has no long-term impact on honey bees. *J Econ Entomol* 100 (3):765-772
102. Schmuck R, Schoning R, Stork A, Schramel O (2001) Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pest Manag Sci* 57 (3):225-238. doi:10.1002/ps.270
103. Faucon JP, Aurières C, Drajnudel P, Mathieu L, Ribière M, Martel AC, Zeggane S, Chauzat MP, Aubert MFA (2005) Experimental study on the toxicity of imidacloprid

given in syrup to honey bee (*Apis mellifera*) colonies. Pest Management Science 61 (2):111-125

104. Nguyen BK, Saegerman C, Pirard C, Mignon J, Widart J, Thirionet B, Verheggen FJ, Berkvens D, De Pauw E, Haubruge E (2009) Does imidacloprid seed-treated maize have an impact on honey bee mortality? J Econ Entomol 102 (2):616-623

105. 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. doi:10.1002/ps.626

106. Blacquièrre T, Smagghe G, Gestel CAMv, Mommaerts V (2012) Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. Ecotoxicology 21 (4):973-992

107. Cresswell JE (2011) A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. Ecotoxicology 20 (1):149-157. doi:10.1007/s10646-010-0566-0

108. Piiroinen S, Goulson D (2016) Chronic neonicotinoid pesticide exposure and parasite stress differentially affects learning in honeybees and bumblebees. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 283 (1828). doi:10.1098/rspb.2016.0246

109. Pisa LW, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Downs CA, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke C, Liess M, McField M, Morrissey CA, Noome DA, Settele J, Simon-Delso N, Stark JD, Van der Sluijs JP, Van Dyck H, Wiemers M (2015) Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. Environmental Science and Pollution Research 22 (1):68-102. doi:10.1007/s11356-014-3471-x

110. 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. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2012.09.020

111. Brandt A, Gorenflo A, Siede R, Meixner M, Büchler R (2016) The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). Journal of Insect Physiology 86:40-47. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.01.001

112. Simon-Delso N, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Chagnon M, Downs C, Furlan L, Gibbons DW, Giorio C, Girolami V, Goulson D, Kreutzweiser DP,

- Krupke CH, Liess M, Long E, McField M, Mineau P, Mitchell EAD, Morrissey CA, Noome DA, Pisa L, Settele J, Stark JD, Tapparo A, Van Dyck H, Van Praagh J, Van der Sluijs JP, Whitehorn PR, Wiemers M (2015) Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research* 22 (1):5-34. doi:10.1007/s11356-014-3470-y
113. Baur ME, Sosa-Gomez DR, Ottea J, Leonard BR, Corso IC, Da Silva JJ, Temple J, Boethel DJ (2010) Susceptibility to insecticides used for control of *Piezodorus guildinii* (Heteroptera: Pentatomidae) in the United States and Brazil. *Journal of Economic Entomology* 103 (3):869-876. doi:10.1603/ec09364
114. M Kogan a, Turnipseed SG (1987) Ecology and management of soybean arthropods. *Annual Review of Entomology* 32 (1):507-538. doi:doi:10.1146/annurev.en.32.010187.002451
115. Temple JH (2011) redbanded stink bug, *piezodorus guildinii* (westwood): pest status, control strategies, and management in Louisiana soybean. M.S. Louisiana State University
116. de O. Milfont M, Rocha EEM, Lima AON, Freitas BM (2013) Higher soybean production using honeybee and wild pollinators, a sustainable alternative to pesticides and autopollination. *Environmental Chemistry Letters* 11 (4):335-341. doi:10.1007/s10311-013-0412-8
117. Stanley J, Sah K, Jain SK, Bhatt JC, Sushil SN (2015) Evaluation of pesticide toxicity at their field recommended doses to honeybees, *Apis cerana* and *A. mellifera* through laboratory, semi-field and field studies. *Chemosphere* 119:668-674. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.07.039
118. Lu CS, Warchol KM, Callahan RA (2014) Sub-lethal exposure to neonicotinoids impaired honey bees winterization before proceeding to colony collapse disorder. *Bulletin of Insectology* 67 (1):125-130
119. Thompson HM, Fryday SL, Harkin S, Milner S (2014) Potential impacts of synergism in honeybees (*Apis mellifera*) of exposure to neonicotinoids and sprayed fungicides in crops. *Apidologie* 45 (5):545-553. doi:10.1007/s13592-014-0273-6
120. Johnson RM, Dahlgren L, Siegfried BD, Ellis MD (2013) Acaricide, fungicide and drug interactions in honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE* 8 (1):e54092. doi:10.1371/journal.pone.0054092

121. Di Prisco G, Cavaliere V, Annoscia D, Varricchio P, Caprio E, Nazzi F, Gargiulo G, 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. doi:10.1073/pnas.1314923110
122. Suchail S, Debrauwer L, Belzunces LP (2004) Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest Management Science* 60 (3):291-296
123. Brunet JL, Badiou A, Belzunces LP (2005) In vivo metabolic fate of [14C]-acetamiprid in six biological compartments of the honeybee, *Apis mellifera* L. *Pest Management Science* 61 (8):742-748
124. Jones AK, Raymond-Delpech V, Thany SH, Gauthier M, Sattelle DB (2006) The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera*. *Genome Research* 16 (11):1422-1430. doi:10.1101/gr.4549206
125. Palmer MJ, Moffat C, Saranzewa N, Harvey J, Wright GA, Connolly CN (2013) Cholinergic pesticides cause mushroom body neuronal inactivation in honeybees. *Nature communications* 4:1634. doi:10.1038/ncomms2648
126. Godfray HCJ, Blacquière T, Field LM, Hails RS, Petrokofsky G, Potts SG, Raine NE, Vanbergen AJ, McLean AR (2014) A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281 (1786). doi:10.1098/rspb.2014.0558
127. Maggi M, Antúnez K, Invernizzi C, Aldea P, Vargas M, Negri P, Brasesco C, De Jong D, Message D, Teixeira EW, Principal J, Barrios C, Ruffinengo S, Da Silva RR, Eguaras M (2016) Honeybee health in South America. *Apidologie*:1-20. doi:10.1007/s13592-016-0445-7
128. Anastassiades M, Lehotay SJ, Štajnbaher D, Schenck FJ (2003) Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* 86 (2):412-431
129. Payá P, Anastassiades M, MacK D, Sigalova I, Tasdelen B, Oliva J, Barba A (2007) Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389 (6):1697-1714. doi:10.1007/s00216-007-1610-7

130. Luke MA, Froberg JE, Masumoto HT (1975) Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. *J AOAC* 58 (5):1020-1026
131. Hiemstra M, de Kok A (2007) Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1154 (1-2):3-25. doi:10.1016/j.chroma.2007.03.123
132. Pihlström T, Blomkvist G, Friman P, Pagard U, Österdahl B-G (2007) Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389 (6):1773-1789. doi:10.1007/s00216-007-1425-6
133. Mol HGJ, Rooseboom A, van Dam R, Roding M, Arondeus K, Sunarto S (2007) Modification and re-validation of the ethyl acetate-based multi-residue method for pesticides in produce. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389 (6):1715-1754. doi:10.1007/s00216-007-1357-1
134. Anastassiades M, Tasdelen B, Scherbaum E, Stajnbaher D (2007) Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. En: Ohkawa H MH, Lee PW (ed) *Pesticide chemistry: Crop protection, public health, environmental safety*. Wiley-VCH, Weinheim
135. Lehotay SJ, Mastovska K, Lightfield AR (2005) Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *J AOAC Int* 88 (2):615-629
136. DG-SANCO (2011) Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document No. SANCO/12495/2011.
137. Fernández M, Picó Y, Mañes J (2002) Rapid screening of organophosphorus pesticides in honey and bees by liquid chromatography—Mass spectrometry. *Chromatographia* 56 (9):577-583. doi:10.1007/bf02497673
138. Tuzimski T (2011) Multidimensional chromatography in pesticides analysis. En: Stoytcheva M (ed) *Pesticides - strategies for pesticides analysis*. InTech. doi:10.5772/13346
139. European Commission Directorate-General for health and food safety (2015) Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/11945/2015.

140. Zacharis CK, Rotsias I, Zachariadis PG, Zotos A (2012) Dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of organochlorine pesticides residues in honey by gas chromatography-electron capture and ion trap mass spectrometric detection. *Food Chemistry* 134 (3):1665-1672. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.073
141. Zhang J, Gao H, Peng B, Li S, Zhou Z (2011) Comparison of the performance of conventional, temperature-controlled, and ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography in analyzing pyrethroid pesticides in honey samples. *Journal of Chromatography A* 1218 (38):6621-6629. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.102
142. Fell R, Cobb J (2009) Miticide residues in virginia honeys. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 83 (6):822-827. doi:10.1007/s00128-009-9806-5
143. Fernandez M, Pico Y, Manes J (2002) Rapid screening of organophosphorus pesticides in honey and bees by liquid chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia* 56 (9-10):577-583
144. Herrera A, Pérez-Arquillué C, Conchello P, Bayarri S, Lázaro R, Yagüe C, Ariño A (2005) Determination of pesticides and PCBs in honey by solid-phase extraction cleanup followed by gas chromatography with electron-capture and nitrogen–phosphorus detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381 (3):695-701. doi:10.1007/s00216-004-2924-3
145. Khan MS, Kumari B, Rohilla HR, Kaushik HD, Arora RK (2004) Analysis of insecticide residues in honeys from apiary (*Apis mellifera*) and wild honey bee (*Apis dorsata* and *Apis florea*) colonies in India. *Journal of Apicultural Research* 43 (3):79-82
146. Pirard C, Widart J, Nguyen BK, Deleuze C, Heudt L, Haubruge E, de Pauw E, Focant JF (2007) Development and validation of a multi-residue method for pesticide determination in honey using on-column liquid-liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr, A* 1152 (1-2):116-123
147. Russo M, Neri B (2002) Fluvalinate residues in honey by capillary gas chromatography—Electron capture detection—Mass spectrometry. *Chromatographia* 55 (9):607-610. doi:10.1007/bf02492909
148. Tomasini D, Sampaio MRF, Cardoso LV, Caldas SS, Primel EG (2011) Comparison of dispersive liquid-liquid microextraction and the modified QuEChERS

method for the determination of fipronil in honey by high performance liquid chromatography with diode-array detection. *Analytical Methods* 3 (8):1893-1900

149. Laaniste A, Leito I, Rebane R, Lõhmus R, Lõhmus A, Punga F, Kruve A (2016) Determination of neonicotinoids in Estonian honey by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 51 (7):455-464. doi:10.1080/03601234.2016.1159457

150. Kujawski MW, Namieśnik J (2011) Levels of 13 multi-class pesticide residues in Polish honeys determined by LC-ESI-MS/MS. *Food Control* 22 (6):914-919. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.024

151. Souza Tette PA, Rocha Guidi L, de Abreu Glória MB, Fernandes C (2016) Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods. *Talanta* 149:124-141. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.11.045

152. Rial-Otero R, Gaspar EM, Moura I, Capelo JL (2007) Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: An overview. *Talanta* 71 (2):503-514. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2006.05.033

153. Campillo N, Peñalver R, Aguinaga N, Hernández-Córdoba M (2006) Solid-phase microextraction and gas chromatography with atomic emission detection for multiresidue determination of pesticides in honey. *Analytica Chimica Acta* 562 (1):9-15. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2006.01.034

154. 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. doi:10.1016/s0021-9673(02)01505-4

155. Tapparo A, Giorio C, Soldà L, Bogialli S, Marton D, Marzaro M, Girolami V (2012) UHPLC-DAD method for the determination of neonicotinoid insecticides in single bees and its relevance in honeybee colony loss investigations. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 405 (2-3):1007-1014. doi:10.1007/s00216-012-6338-3

156. Adamczyk S, Lázaro R, Pérez-Arquillué C, Herrera A (2007) Determination of synthetic acaricides residues in beeswax by high-performance liquid chromatography with photodiode array detector. *Analytica Chimica Acta* 581 (1):95-101. doi:10.1016/j.aca.2006.07.085

157. Bogdanov S, Kilchenmann V, Seiler K, Pfefferli H, Frey T, Roux B, Wenk P, Noser J (2004) Residues of para-dichlorobenzene in honey and beeswax. *Journal of Apicultural Research* 43 (1):14-16

158. Bonmatin JM, Moineau I, Charvet R, Fleche C, Colin ME, Bengsch ER (2003) A LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens. *Analytical Chemistry* 75 (9):2027-2033
159. Kadar A, Faucon JP (2006) Determination of traces of fipronil and its metabolites in pollen by liquid chromatography with electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Journal Agriculture Food Chemistry* 54 (26):9741-9746
160. David A, Botías C, Abdul-Sada A, Goulson D, Hill EM (2015) Sensitive determination of mixtures of neonicotinoid and fungicide residues in pollen and single bumblebees using a scaled down QuEChERS method for exposure assessment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (26):8151-8162. doi:10.1007/s00216-015-8986-6
161. David A, Botías C, Abdul-Sada A, Nicholls E, Rotheray EL, Hill EM, Goulson D (2016) Widespread contamination of wildflower and bee-collected pollen with complex mixtures of neonicotinoids and fungicides commonly applied to crops. *Environment International* 88:169-178. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2015.12.011
162. Orantes-Bermejo FJ, Pajuelo AG, Megías MM, Fernández-Piñar CT (2010) Pesticide residues in beeswax and beebread samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in Spain. Possible implications for bee losses. *Journal of Apicultural Research* 49 (3):243-250. doi:10.3896/ibra.1.49.3.03
163. European Food Safety Authority (2014) Towards an integrated environmental risk assessment of multiple stressors on bees: review of research projects in Europe, knowledge gaps and recommendations. *EFSA Journal* 12 (3):3594-n/a. doi:10.2903/j.efsa.2014.3594
164. EPA (2014) Guidance for Assessing Pesticide Risks to Bees. https://www.epa.gov/sites/production/files/201406/documents/pollinator_risk_assessment_guidance_06_19_14.pdf.
165. Escofier BP, J. (1998) *Analyses factorielles simples et multiples*. 3e édition edn. Dunod, Paris
166. Gower JC (1971) A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics* 27:857–874
167. Mucherino A, Papajorgji PJ, Pardalos PM (2009) *Data mining in agriculture*. vol 34. Springer Publishing Company, Incorporated, New York
168. Vapnik VN (1998) *Statistical learning theory*. John Wiley & Sons, New York

169. Dong JX, Krzyzak A, Suen CY (2005) An improved handwritten Chinese character recognition system using support vector machine. *Pattern Recognition Letters* 26 (12):1849-1856
170. Fagerlund S (2007) Bird species recognition using support vector machines. *EURASIP Journal on Advances in Signal Processing* 38637 (2007):1-8
171. Fernández Pierna JA, Baeten V, Renier AM, Cogdill RP, Dardenne P (2004) Combination of support vector machines (SVM) and near-infrared (NIR) imaging spectroscopy for the detection of meat and bone meal (MBM) in compound feeds. *Journal of Chemometrics* 18 (7-8):341-349
172. Raza SEA, Smith HK, Clarkson GJJ, Taylor G, Thompson AJ, Clarkson J, Rajpoot NM (2014) Automatic detection of regions in spinach canopies responding to soil moisture deficit using combined visible and thermal imagery. *PLoS ONE* 9 (6)
173. Yang C, Lee WS, Gader P (2014) Hyperspectral band selection for detecting different blueberry fruit maturity stages. *Computers and Electronics in Agriculture* 109:23-31
174. Wilcox P, Horton TM, Youn E, Jeong MK, Tate D, Herrman T, Nansen C (2014) Evolutionary refinement approaches for band selection of hyperspectral images with applications to automatic monitoring of animal feed quality. *Intelligent Data Analysis* 18 (1):25-42
175. Alonso J, Villa A, Bahamonde A (2015) Improved estimation of bovine weight trajectories using support vector machine classification. *Computers and Electronics in Agriculture* 110:36-41
176. Florindo JB, da Silva NR, Romualdo LM, de Fátima da Silva F, de Cerqueira Luz PH, Herling VR, Bruno OM (2014) *Brachiaria* species identification using imaging techniques based on fractal descriptors. *Computers and Electronics in Agriculture* 103:48-54
177. Liao MS, Chuang CL, Lin TS, Chen CP, Zheng XY, Chen PT, Liao KC, Jiang JA (2012) Development of an autonomous early warning system for *Bactrocera dorsalis* (Hendel) outbreaks in remote fruit orchards. *Computers and Electronics in Agriculture* 88:1-12
178. Schmidt JO, Buchmann SL (1992) Other products of the hive. En: Graham JM (ed) *The hive and the honey bee*. Dadant & Sons, Hamilton, Illinois

179. Haarmann T (2002) Honey bees as indicators of radionuclide contamination. En: Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals. CRC Press, pp 132-150. doi:doi:10.1201/9780203218655.ch8
180. Kezic N, Barisic D, Bromenshenk J, Vertacnik A (2002) The role of honey bees in environmental monitoring in Croatia. En: Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals. CRC Press, pp 160-185. doi:doi:10.1201/9780203218655.ch10
181. Raeymaekers B (2006) A prospective biomonitoring campaign with honey bees in a district of upper-bavaria (Germany). *Environmental Monitoring and Assessment* 116 (1):233-243. doi:10.1007/s10661-006-7389-8
182. Adamczyk S, Lázaro R, Pérez-Arquillué C, Bayarri S, Herrera A (2010) Impact of the use of fluvalinate on different types of beeswax from spanish hives. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 58 (3):733-739. doi:10.1007/s00244-009-9387-7
183. Lodesani M, Costa C, Serra G, Colombo R, Sabatini A (2008) Acaricide residues in beeswax after conversion to organic beekeeping methods. *Apidologie* 39 (3):324-333. doi:10.1051/apido:2008012
184. Martel AC, Zeggane S, Aurières C, Drajnudel P, Faucon JP, Aubert M (2007) Acaricide residues in honey and wax after treatment of honey bee colonies with Apivar® or Asuntol® 50. *Apidologie* 38 (6):534-544
185. Pesticides Online website. www.pesticides-online.com (2007). Consultado 10 Febrero 2011
186. Kruve A, Künnapas A, Herodes K, Leito I (2008) Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1187 (1–2):58-66. doi:10.1016/j.chroma.2008.01.077
187. Maštovská K, Lehotay SJ, Anastassiades M (2005) Combination of analyte protectants to overcome matrix effects in routine GC analysis of pesticide residues in food matrixes. *Analytical Chemistry* 77 (24):8129-8137. doi:10.1021/ac0515576
188. Bonzini S, Tremolada P, Bernardinelli I, Colombo M, Vighi M (2011) Predicting pesticide fate in the hive (part 1): experimentally determined τ -fluvalinate residues in bees, honey and wax. *Apidologie* 42 (3):378-390. doi:10.1007/s13592-011-0011-2
189. MGAP – DGSSAA, División Análisis y Diagnostico, Área Tecnologías de Aplicación-Estadísticas (2010) Estadística importaciones fitosanitarios Uruguay

- <http://www.mgap.gub.uy/DGSSAA/DivAnálisisDiagnostico/documentosDAYD/estadísticas/Importación%20categoría%20toxicológica2010.pdf>. Consultado Mayo 2010
190. EFSA (2014) MUST-B & EPILOBEE EU efforts for the development of a holistic approach for the risk assessment on multiple stressors in bees. http://ec.europa.eu/food/committees/regulatory/scfcah/animal_health/docs/2014110304_ah_must-b_epilobee_efs.pdf. Consultado 19 Agosto 2015
191. Ghini S, Fernández M, Picó Y, Marín R, Fini F, Mañes J, Girotti S (2004) Occurrence and distribution of pesticides in the province of Bologna, Italy, using honeybees as bioindicators. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 47 (4):479-488
192. Waller GD, Erickson BJ, Harvey J, Archer TL (1984) Comparison of honey bee (*Hymenoptera: Apidae*) Losses from two formulations of methyl parathion applied to sunflowers, vol 77. vol 1. doi:10.1093/jee/77.1.230
193. Anderson JF, Wojtas MA (1986) Honey bees (*Hymenoptera: Apidae*) contaminated with pesticides and polychlorinated biphenyls, vol 79. vol 5. doi:10.1093/jee/79.5.1200
194. Niell S, Jesús F, Pérez C, Mendoza Y, Díaz R, Franco J, Cesio V, Heinzen H (2015) QuEChERS Adaptability for the analysis of pesticide residues in beehive products seeking the development of an agroecosystem sustainability monitor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63 (18):4484-4492. doi:10.1021/acs.jafc.5b00795
195. FAO (2001) Specifications and evaluations for plant protection products: Parathion-methyl http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/parathio.pdf Consultado 19 Agosto 2015
196. Genthon P (2012) Blue and green honey makes French beekeepers see red. <http://www.reuters.com/article/2012/10/04/us-france-bees-idUSBRE8930MQ20121004>. Consultado 6 Febrero 2015
197. Kasiotis KM, Anagnostopoulos C, Anastasiadou P, Machera K (2014) Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC–MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees. *Science of The Total Environment* 485–486 (0):633-642. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.042>
198. Niell S, Cesio V, Hepperle J, Doerk D, Kirsch L, Kolberg D, Scherbaum E, Anastassiades M, Heinzen H (2014) QuEChERS-based method for the multiresidue

analysis of pesticides in beeswax by LC-MS/MS and GC×GC-TOF. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (17):3675-3683

199. Celli G, Maccagnani B (2003) Honey bees as bioindicators of environmental pollution. *Bulletin of Insectology* 56 (1):137-139

200. Porrini C, Celli G, Radeghieri P (1998) Monitoring of pesticides through the use of honeybees as bioindicators of the Emilia-Romagna coastline (1995-1996). *Annali di Chimica* 88 (3-4):243-252

201. Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B (2010) Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of invertebrate pathology* 103 Suppl 1:S96-119. doi:10.1016/j.jip.2009.07.016

202. Locke B (2016) Inheritance of reduced *Varroa* mite reproductive success in reciprocal crosses of mite-resistant and mite-susceptible honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 47 (4):583-588. doi:10.1007/s13592-015-0403-9

203. Haarmann T, Spivak M, Weaver D, Weaver B, Glenn T (2002) Effects of fluvalinate and coumaphos on queen honey bees (Hymenoptera: Apidae) in two commercial queen rearing operations. *Journal Economic Entomology* 95 (1):28-35

204. Antunez K, Anido M, Branchiccela B, Harriet J, Campa J, Invernizzi C, Santos E, Higes M, Martin-Hernandez R, Zunino P (2015) Seasonal variation of honeybee pathogens and its association with pollen diversity in Uruguay. *Microbial Ecology* 70 (2):522-533. doi:10.1007/s00248-015-0594-7

205. Devillers J (2014) QSAR modeling of pesticide toxicity to bees, *In silico* bees. CRC Press, pp 135-152

206. Dulin F, Halm-Lemeille M-P, Lozano S, Lepailleur A, Sopkova-de Oliveira Santos J, Rault S, Bureau R (2012) Interpretation of honeybees contact toxicity associated to acetylcholinesterase inhibitors. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 79:13-21. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.01.007

207. Tremolada P, Bernardinelli I, Rossaro B, Colombo M, Vighi M (2011) Predicting pesticide fate in the hive (part 2): development of a dynamic hive model. *Apidologie* 42 (4):439-456. doi:10.1007/s13592-011-0012-1

208. Lewis KA, Tzilivakis J, Warner DJ, Green A (2016) An international database for pesticide risk assessments and management. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 22 (4):1050-1064. doi:10.1080/10807039.2015.1133242

209. Calatayud-Vernich P, Calatayud F, Simo E, Pico Y (2016) Efficiency of QuEChERS approach for determining 52 pesticide residues in honey and honey bees. *MethodsX* 3:452-458. doi:10.1016/j.mex.2016.05.005
210. Sánchez-Bayo F, Desneux N (2015) Neonicotinoids and the prevalence of parasites and disease in bees. *Bee World* 92 (2):34-40
211. Sánchez-Bayo F, Goulson D, Pennacchio F, Nazzi F, Goka K, Desneux N (2016) Are bee diseases linked to pesticides? — A brief review. *Environment International* 89–90:7-11. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2016.01.009
212. Loewe S, Muischnek H (1926) Über Kombinationswirkungen. *Naunyn-Schmiedeberg's. Archives of Experimental Pathology and Pharmacology* 114:313-326
213. Bliss CI (1939) The toxicity of poisons applied jointly¹. *Annals of Applied Biology* 26 (3):585-615. doi:10.1111/j.1744-7348.1939.tb06990.x
214. Ginebreda A, Kuzmanovic M, Guasch H, de Alda ML, Lopez-Doval JC, Munoz I, Ricart M, Romani AM, Sabater S, Barcelo D (2014) Assessment of multi-chemical pollution in aquatic ecosystems using toxic units: compound prioritization, mixture characterization and relationships with biological descriptors. *The Science of the total environment* 468-469:715-723. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.08.086
215. de Castro-Català N, Kuzmanovic M, Roig N, Sierra J, Ginebreda A, Barceló D, Pérez S, Petrovic M, Picó Y, Schuhmacher M, Muñoz I (2016) Ecotoxicity of sediments in rivers: Invertebrate community, toxicity bioassays and the toxic unit approach as complementary assessment tools. *Science of The Total Environment* 540:297-306. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.071
216. Rogers HR (2002) Assessment of PAH contamination in estuarine sediments using the equilibrium partitioning–toxic unit approach. *Science of The Total Environment* 290 (1–3):139-155. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697(01)01079-8
217. Sprague JB (1970) Measurement of pollutant toxicity to fish. II. Utilizing and applying bioassay results. *Water Research* 4 (1):3-32. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354(70)90018-7
218. Ferraro DO, Ghersa CM, Sznajder GA (2003) Evaluation of environmental impact indicators using fuzzy logic to assess the mixed cropping systems of the Inland Pampa, Argentina. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 96 (1-3):1-18
219. Nowell LH, Norman JE, Moran PW, Martin JD, Stone WW (2014) Pesticide Toxicity Index—A tool for assessing potential toxicity of pesticide mixtures to

- freshwater aquatic organisms. *Science of The Total Environment* 476–477:144-157.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.088>
220. Cortes C, Vapnik V (1995) Support-Vector Networks. *Machine Learning* 20 (3):273-297. doi:10.1023/a:1022627411411
221. Kotsiantis SB (2007) Supervised machine learning: A review of classification techniques. *Informatica (Ljubljana)* 31 (3):249-268
222. Kovach J, Petzoldt C, Degni J, Tette J (1992) A method to measure the environmental impact of pesticides. *New York's Food and Life Sciences Bulletin* 139:1–8
223. Eshenaur B, Grant J, Kovach J, Petzoldt C, Degni J, Tette J (2015) Environmental Impact Quotient: "A method to measure the environmental impact of pesticides." 1992-2015. New York State Integrated Pest Management Program, Cornell Cooperative Extension, Cornell University. www.nysipm.cornell.edu/publications/EIQ.
224. Hsu C-W, Chang C-C, Lin C-J (2003) A practical guide to support vector classification. Disponible en: <http://www.csie.ntu.edu.tw/~cjlin/papers/guide/guide.pdf>