



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

**Evaluación de biomonitores de agroecosistemas que permitan predecir
impactos ambientales por el uso de pesticidas**

Florencia Jesús Giles

Tesis de Maestría

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Magíster

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Octubre de 2022

**Evaluación de biomonitores de agroecosistemas que permitan predecir
impactos ambientales por el uso de pesticidas**

Tribunal:

Dr. Franco Teixeira de Mello

Dra. Karina Antúnez

Dra. Valery Bühl

Prof. Dr. Horacio Heinzen, Director

Prof. Dra. Silvina Niell, Directora

Evaluación de biomonitores de agroecosistemas que permitan predecir impactos ambientales por el uso de pesticidas

Florencia Jesús Giles, Mag.

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

2022

DIRECTOR DE TESIS: Prof. Dr. Horacio Heinzen

(Facultad de Química, Universidad de la República)

DIRECTORA ACADÉMICA: Prof. Dra. Silvina Niell

(Cenur Litoral Norte, Universidad de la República)

El uso de paquetes tecnológicos de pesticidas para asegurar los cultivos impacta sobre todo el ecosistema. No sólo se ven afectados los organismos blanco, sino también poblaciones no objetivo así como el ambiente en general. Este impacto es evaluado habitualmente analizando de forma individual suelo, agua, aire y biota. Aún no hay una propuesta global para determinar la calidad del ambiente en su totalidad.

En este trabajo de tesis el objetivo fue obtener información de la calidad de los agroecosistemas mediante el análisis de residuos de pesticidas en biomonitores que permitan predecir impactos ambientales.

Para ello se evaluaron cuatro sistemas como biomonitores: la colmena y sus productos como miel, cera, polen y abejas propiamente dichas como un sistema biomonitor de la calidad ambiental de ecosistemas agrícolas, dada su fuerte interacción con el mismo, necesaria para su supervivencia (alimentación y reproducción). La colmena monitorea los compartimentos terrestres. Para el monitoreo del ambiente acuático se emplearon los macroinvertebrados pertenecientes a los géneros *Aegla*, *Corbicula* y al orden Odonata. Se seleccionaron diferentes ecosistemas en la misma cuenca con condiciones variadas y en ellas se muestrearon las matrices definidas buscando, por un lado, demostrar que efectivamente estos organismos son capaces de asimilar y/o acumular pesticidas y por otro, comparar los datos químico analíticos de residuos de cada compartimento a fin de contribuir a la evaluación en forma global de los riesgos que tienen los paquetes

tecnológicos utilizados, tanto aisladamente como en conjunto, sobre los ecosistemas en estudio.

Para la determinación de los analitos seleccionados se utilizaron metodologías modernas miniaturizadas multiresiduos basadas en el enfoque QuEChERS para la preparación de muestras y cuantificación por cromatografía de líquidos y gases acoplada a espectrometría de masas en tándem. Se desarrollaron y validaron metodologías analíticas específicas para macroinvertebrados. En el caso de la colmena, se amplió el alcance de metodologías ya existentes. Se analizaron alrededor de 100 pesticidas y metabolitos en cada matriz ambiental.

Se realizaron monitoreos que involucraron colmenas caracterizadas localizadas en agroecosistemas que incluían cultivos extensivos típicos de nuestro país, a las que se les evaluó los residuos de pesticidas así como también fueron evaluados los macroinvertebrados acuáticos colectados en las mismas zonas.

Se logró diferenciar a través de los perfiles de residuos de pesticidas de cada una de las matrices estudiadas los cambios en los diversos agroecosistemas, durante las estaciones del año y según la producción desarrollada en cada sitio seleccionado.

Los resultados de esta tesis tienen no sólo relevancia para la actividad apícola, industria incipiente y cada vez más importante en nuestro país, con muchos problemas sin resolver aún, sino que también ha generado una información importantísima y novedosa acerca del posible empleo de los macroinvertebrados como biomonitores, los que aportan información adicional buscando conocer integralmente el estado del sistema ambiental evaluado.

Evaluation of biomonitors of agroecosystems for the prediction of environmental impacts due to the use of pesticides

Florencia Jesús Giles, Mag.

Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química

Universidad de la República

2022

THESIS DIRECTOR: Prof. Dr. Horacio Heinzen

(Facultad de Química, Universidad de la República)

ACADEMIC DIRECTOR: Prof. Dr. Silvina Niell

(Cenur Litoral Norte, Universidad de la República)

The use of technological packages of pesticides to protect crops impacts the whole ecosystem. Not only target organisms are affected, but also non-target populations, as well as the entire environment. This impact is usually evaluated individually analyzing soil, water, air and biota. Until now, there is no global proposal to determine the quality of the environment as a whole.

In this work, the main objective was to obtain information on the quality of different agroecosystems through the analysis of pesticide residues in biomonitors that will allow to predict environmental impacts.

To comply with the proposal, four biological systems were evaluated as biomonitors: the hive and its products such as honey, wax, pollen and bees as a biomonitor system of the environmental quality of agricultural ecosystems, given their strong interaction with the environment, necessary for their survival (feeding and reproduction). The hive monitors the terrestrial compartments. For the aquatic environment monitoring, macroinvertebrates such as *Aegla sp.*, *Corbicula sp.* and Odonata nymphs were selected.

Different ecosystems in the same basin with different conditions were selected. After the site's selection, the defined matrices were sampled and analysed to show if these organisms are able to uptake and/or accumulate pesticides. Also, the analytical data obtained in each compartment was compared in order to contribute to the global evaluation of the risks of the technological packages used, alone and as a whole, on the studied ecosystems. Modern miniaturized methodologies based on the QuEChERS

approach for sample preparation with liquid and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry were used for the determination of the selected analytes. Specific analytical methodologies were developed and validated for macroinvertebrates. In the case of the hive, the scope of already existing methodologies was expanded. Around 100 pesticides and metabolites were analysed in each environmental matrix.

A monitoring scheme was carried out in characterized hives located in agroecosystems that included different extensive crops typical of our country, which were evaluated for pesticide residues as well as the aquatic macroinvertebrates collected in the same areas.

The evaluation of the pesticide residue profiles of each of the studied matrices differentiate the changes depending on the agroecosystems, the seasons of the year and according to the production developed in each selected site.

The results of this thesis are not only relevant for the beekeeping activity, which is an incipient and increasingly important industry in our country, with many problems yet unsolved, they also generated very important and novel information about the usefulness of macroinvertebrates as biomonitors that provide data, seeking to fully understand the status of the entire environmental system evaluated.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	vii
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Uso de pesticidas	1
1.2. Impactos de los pesticidas.....	2
1.2.1. Evaluación de impactos y riesgos del uso de pesticidas	4
1.2.2. Impactos del uso de pesticidas en abejas y macroinvertebrados.....	5
1.3. Agroecosistemas, servicios ecosistémicos y biomonitores ambientales	6
1.3.1. Abejas melíferas y pesticidas	6
1.3.2. Macroinvertebrados acuáticos y pesticidas	7
1.4. Biomonitorio	9
1.4.1. La colmena como biomonitor	9
1.4.2. Macroinvertebrados acuáticos como biomonitores.....	12
1.5. Análisis de residuos de pesticidas.....	15
1.5.1. Preparación de la muestra	16
1.5.2. Técnicas instrumentales	18
1.5.2.1. Sistemas de ionización.....	19
1.5.2.2. Analizadores	20
1.6. Validación de las metodologías de análisis de residuos de pesticidas.....	22
1.6.1. Criterios para la identificación y confirmación de residuos de pesticidas según DG SANTE 2017	25
1.6.1.1. Requisitos en cromatografía	25
1.6.1.2. Requisitos en espectrometría de masas	26
2. OBJETIVOS.....	27

2.1. Objetivo general.....	27
2.2. Objetivos específicos	27
3. Metodologías de análisis de residuos de pesticidas en biomonitores	28
3.1. Introducción	28
3.2. Materiales y métodos	29
3.3. Resultados y discusión.....	40
3.3.1. Metodologías de análisis multiresiduo de pesticidas en abejas y productos de la colmena	40
3.3.1.1. Preparación de muestras	42
3.3.1.2. Validación de metodologías de análisis de residuos de pesticidas	43
3.3.2. Metodologías de análisis multiresiduo de pesticidas en macroinvertebrados acuáticos	78
3.3.2.1. Preparación de muestras	79
3.3.2.2. Validación de metodologías de análisis de residuos de pesticidas	80
4. Biomonitorio y evaluación de biomonitores.....	99
4.1. Introducción	99
4.2. Materiales y métodos	99
4.3. Resultados y discusión.....	103
4.3.1. Perfil de hallazgos de residuos de pesticidas en los biomonitores seleccionados	103
4.3.2. Descripción de los hallazgos según los lugares de muestreo seleccionados	106
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	127
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros y criterios de validación establecidos en el documento SANTE/11813/2017	25
Tabla 2. Requisitos para la identificación de los compuestos según el sistema de detección de MS.....	26
Tabla 3. Parámetros instrumentales utilizados en LC-MS/MS. DP: Declustering Potential; CE: Energía de colisión.	30
Tabla 4. Transiciones y energías de colisión (CE) a empleadas en el análisis por GC-MS/MS.	33
Tabla 5. Alcance y límites de cuantificación (LOQ) de las metodologías utilizadas previamente para el análisis de residuos de pesticidas en abejas y productos de la colmena	40
Tabla 6. Comparación de los métodos de extracción utilizados para abejas y productos de la colmena.....	42
Tabla 7. Recuperaciones, desviaciones estándar relativas (RSD), límites de cuantificación (LOQ), rangos lineales y efecto matriz obtenidos para los nuevos pesticidas analizados por LC-MS/MS en abejas	46
Tabla 8. Recuperaciones, desviaciones estándar relativas (RSD), límites de cuantificación (LOQ) y rangos lineales obtenidos para los nuevos pesticidas analizados por GC-MS/MS en abejas	48
Tabla 9. Recuperaciones, desviaciones estándar relativas (RSD), límites de cuantificación (LOQ), rangos lineales y efecto matriz obtenidos para los nuevos pesticidas analizados por LC-MS/MS en cera	52
Tabla 10. Recuperaciones, desviaciones estándar relativas (RSD), límites de cuantificación (LOQ) y rangos lineales obtenidos para los nuevos pesticidas analizados por GC-MS/MS en cera.....	53
Tabla 11. Recuperaciones, desviaciones estándar relativas (RSD), límites de cuantificación (LOQ), rangos lineales y efecto matriz obtenidos para los nuevos pesticidas analizados por LC-MS/MS en miel	60

Tabla 12. Recuperaciones, desviaciones estándar relativas (RSD), límites de cuantificación (LOQ) y rangos lineales obtenidos para los nuevos pesticidas analizados por GC-MS/MS en miel	62
Tabla 13. Recuperaciones, desviaciones estándar relativas (RSD), límites de cuantificación (LOQ), rangos lineales y efecto matriz obtenidos para los pesticidas analizados por LC-MS/MS en polen utilizando el método de extracción con buffer acético/acetato	66
Tabla 14. Recuperaciones, desviaciones estándar relativas (RSD), límites de cuantificación (LOQ), rangos lineales y efecto matriz obtenidos para los pesticidas analizados por LC-MS/MS en polen utilizando el método de extracción con <i>buffer</i> cítrico/citrato.....	71
Tabla 15. Recuperaciones, desviaciones estándar relativas (RSD), límites de cuantificación (LOQ) y rangos lineales obtenidos para los nuevos pesticidas analizados por GC-MS/MS en polen utilizando el método de extracción con buffer cítrico/citrato	75
Tabla 16. Alcance y límites de cuantificación (LOQ) de la metodología validada para el análisis de residuos de pesticidas en ninfas de Odonata.....	78
Tabla 18. Comparación de los métodos de extracción utilizados para macroinvertebrados acuáticos	79
Tabla 18. Recuperaciones, desviaciones estándar relativas (RSD), límites de cuantificación (LOQ), rangos lineales y efecto matriz obtenidos para los nuevos pesticidas analizados por LC-MS/MS en <i>Corbicula</i>	83
Tabla 19. Recuperaciones, desviaciones estándar relativas (RSD), límites de cuantificación (LOQ) y rangos lineales obtenidos para los nuevos pesticidas analizados por GC-MS/MS en <i>Corbicula</i>	86
Tabla 21. Recuperaciones, desviaciones estándar relativas (RSD), límites de cuantificación (LOQ), rangos lineales y efecto matriz obtenidos para los nuevos pesticidas analizados por LC-MS/MS en <i>Aegla</i>	92
Tabla 21. Recuperaciones, desviaciones estándar relativas (RSD), límites de cuantificación (LOQ) y rangos lineales obtenidos para los nuevos pesticidas analizados por GC-MS/MS en <i>Aegla</i>	95

Tabla 22. Residuos de pesticidas hallados en muestras de abejas y productos de la colmena en el Arroyo Capilla Vieja	109
Tabla 23. Residuos de pesticidas hallados en muestras de macroinvertebrados acuáticos en el Arroyo Capilla Vieja.....	110
Tabla 24. Residuos de pesticidas hallados en muestras de abejas y productos de la colmena en el Arroyo Manguera de Piedras.....	113
Tabla 25. Residuos de pesticidas hallados en muestras de macroinvertebrados acuáticos en el Arroyo Manguera de Piedras	114
Tabla 26. Residuos de pesticidas hallados en muestras de abejas y productos de la colmena en el Arroyo Santana.....	118
Tabla 27. Residuos de pesticidas hallados en muestras de macroinvertebrados acuáticos en el Arroyo Santana	119
Tabla 28. Residuos de pesticidas hallados en muestras de abejas y productos de la colmena en el Arroyo Amarillo	123
Tabla 29. Residuos de pesticidas hallados en muestras de macroinvertebrados acuáticos en el Arroyo Amarillo.....	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Intensidad de uso de pesticidas (en kg ha ⁻¹) en el mundo; promedio período 2000-2020. Adaptado de FAOSTAT [2].....	2
Figura 2. Intensidad de uso de pesticidas (en kg ha ⁻¹) en Uruguay durante el período 2000-2020. Adaptado de FAOSTAT [2]	2
Figura 3. Impacto de un contaminante en las distintas escalas de organización biológica	4
Figura 4. Transporte y distribución de pesticidas en los cuatro principales compartimentos ambientales: agua, tierra, aire y biota (Modificado de Majewski y Capel, 1995).....	8
Figura 5. Esquema de la configuración de un espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolo, operando en modo MRM	21
Figura 7. Gradientes de fase móvil utilizados en el análisis por LC-MS/MS.	30
Figura 8. Programa de temperatura del horno utilizado en GC-MS/MS.....	33
Figura 9. Efecto matriz (EM) de los nuevos pesticidas validados por LC-MS/MS en abejas (en azul EM bajo, en anaranjado EM moderado).....	45
Figura 10. Efecto matriz (EM) de los nuevos pesticidas validados por LC-MS/MS en cera (en azul EM bajo, en anaranjado EM moderado, en rojo EM pronunciado).....	51
Figura 11. Efecto matriz (EM) de los nuevos pesticidas validados por LC-MS/MS en cera (en azul EM bajo, en anaranjado EM moderado, en rojo EM pronunciado).....	58
Figura 12. Efecto matriz (EM) de los pesticidas validados por LC-MS/MS en polen utilizando el método de extracción con <i>buffer</i> acético/acetato.....	65
Figura 13. Límites de cuantificación (en mg kg ⁻¹) obtenidos para los compuestos analizados en polen por LC-MS/MS utilizando el método de extracción con <i>buffer</i> cítrico/citrato.....	69
Figura 14. Efecto matriz (EM) de los pesticidas validados por LC-MS/MS en polen utilizando el método de extracción con <i>buffer</i> cítrico/citrato	70
Figura 15. Límites de cuantificación (en mg kg ⁻¹) obtenidos para los compuestos analizados en <i>Corbicula</i> por LC-MS/MS y GC-MS/MS	81

Figura 16. Efecto matriz (EM) de los pesticidas validados por LC-MS/MS en <i>Corbicula</i>	82
Figura 17. Límites de cuantificación (en mg kg ⁻¹) obtenidos para los compuestos analizados en <i>Aegla</i> por LC-MS/MS.....	90
Figura 18. Efecto matriz (EM) de los pesticidas validados por LC-MS/MS en <i>Aegla</i> ..	91
Figura 19. Localización de los sitios de muestreo.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 20. Número de detecciones positivas en las distintas matrices del estudio	104
Figura 21. Frecuencia de ocurrencia de los pesticidas detectados en la colmena (ambiente terrestre) y en los macroinvertebrados acuáticos (ambiente acuático)	106

LISTA DE ABREVIATURAS

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APCI	Ionización química a presión atmosférica
AcOEt	Acetato de etilo
AMA	Arroyo Amarillo
API	Ionización a presión atmosférica
APPI	Foto-ionización a presión atmosférica
CAP	Arroyo Capilla Vieja
CE	Energía de colisión
d	Compuesto detectado, no incluido en el alcance por no cumplir con algún criterio de validación
DP	Potencial de <i>declustering</i>
dSPE	Extracción en fase sólida dispersiva
DT ₅₀	Vida media
EFSA	Agencia Europea de Seguridad Alimentaria
EI	Ionización electrónica
EM	Efecto matriz
ESI	Electrospray
FAO	Food Agricultural Organization (Organización para la Agricultura y la Alimentación)
FAOSTAT	Base de datos estadísticos de la Organización para la Agricultura y la Alimentación
GC	Cromatografía gaseosa
GCB	Graphitized carbon black
GC-MS/MS	Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas en tándem
HPLC	Cromatografía líquida de alto desempeño
ISO	International Standardization Organisation
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
k _{ow}	Constante de partición octanol/agua
LC	Cromatografía líquida
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem

LMR	Límite máximo de residuo
LOQ	Límite de cuantificación
m/z	Relación masa/carga
MDP	Arroyo Manguera de Piedras
MeCN	Acetonitrilo
MRM	Multiple Reaction Monitoring / Método multirresiduo
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MSPD	Dispersión de la matriz en fase sólida
n/m	No se realizó muestreo
na	No analizado
NCI	Ionización química negativa
nd	No detectado
PCI	Ionización química positiva
pK_{ow}	Logaritmo de la constante de partición octanol/agua
PM	Peso molecular
PSA	Amina primaria y secundaria
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
QuEChERS	Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe
RSD	Desviación estándar relativa
s/m	No se encontró el organismo
S/N	Relación señal / ruido
SAN	Arroyo Santana

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Uso de pesticidas

Como es de público conocimiento, los pesticidas constituyen un grupo de contaminantes de particular relevancia. Un pesticida, según lo define el artículo 2 del Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Pesticidas de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), es “cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, 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” [1]. La definición no incluye normalmente los fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal, aditivos alimentarios ni medicamentos para animales.

El aumento de la superficie agrícola a nivel mundial ha llevado a una intensificación en el uso de pesticidas (Figura 1). En Uruguay, en los últimos 20 años, la intensidad de uso de pesticidas (en kg ha⁻¹) se ha triplicado, lo cual se relaciona directamente con la evolución del área agrícola del país, en particular del cultivo de soja [2], [3] (Figura 2). La importación de pesticidas en Uruguay en 2019 representó 143,8 millones de dólares, en 2020, Uruguay importó \$161M en pesticidas, convirtiéndose en el importador número 61 de pesticidas en el mundo. [3], aumentando aún más en 2021. Es de destacar que los datos de importaciones indican siempre que el mayor porcentaje corresponde con importación de formulados o principios activos de herbicidas [4].

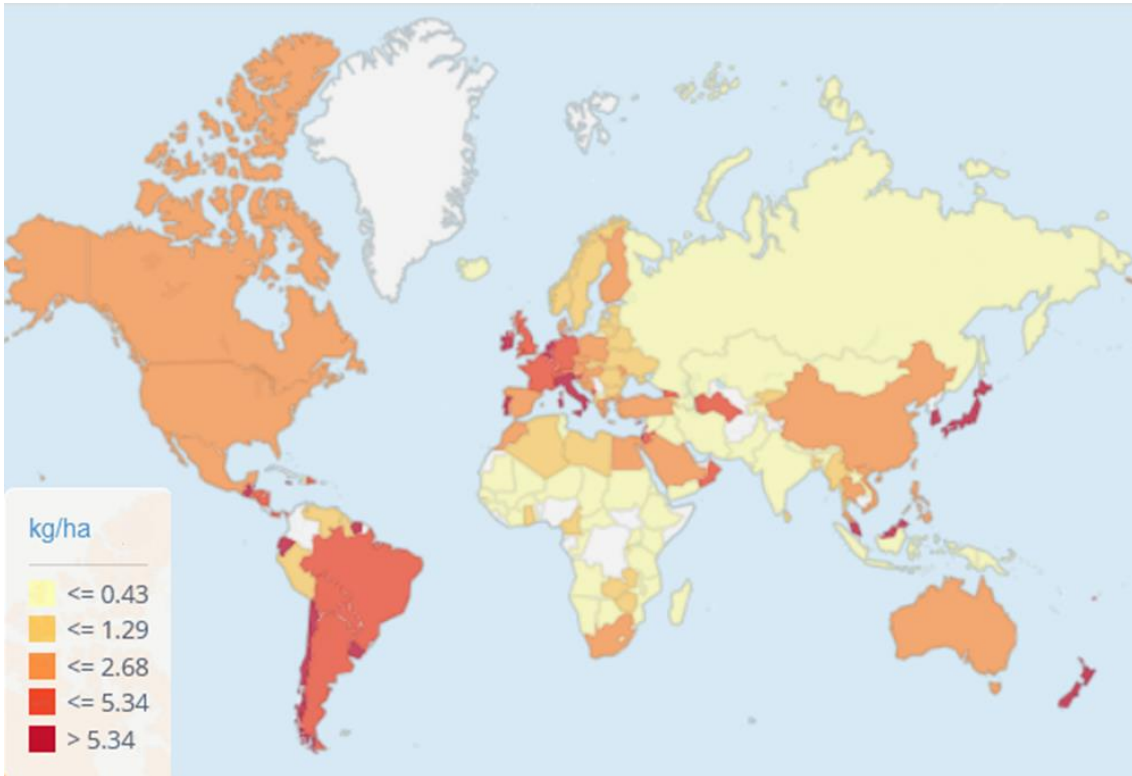


Figura 1. Intensidad de uso de pesticidas (en kg ha^{-1}) en el mundo; promedio período 2000-2020. Adaptado de FAOSTAT [2].

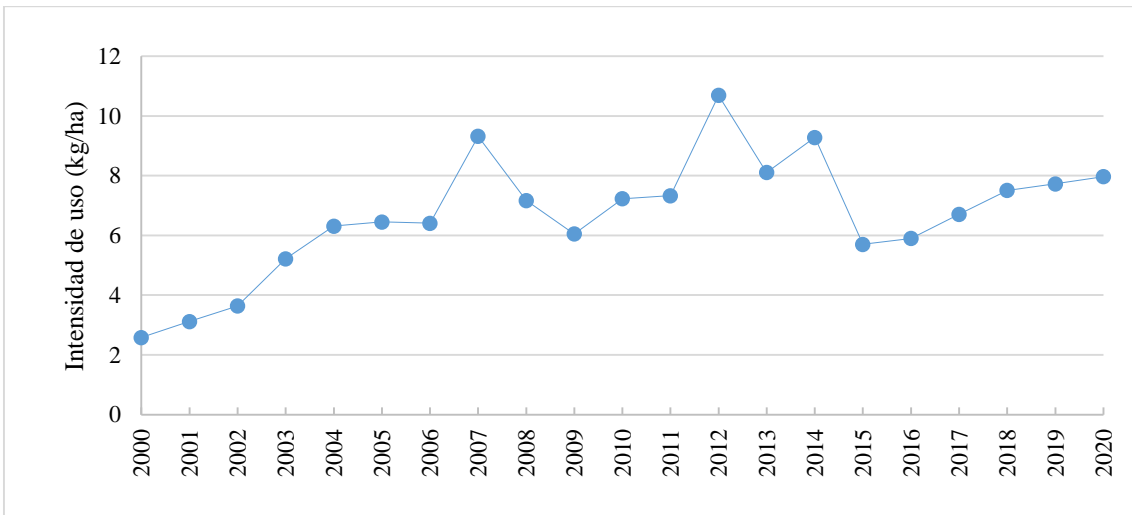


Figura 2. Intensidad de uso de pesticidas (en kg ha^{-1}) en Uruguay durante el período 2000-2020. Adaptado de FAOSTAT [2]

1.2. Impactos de los pesticidas

Las actividades agrícolas, tanto extensivas como intensivas, se desarrollan en los denominados agroecosistemas, los cuales pueden proveer un amplio rango de bienes y

servicios a la sociedad. Los agroecosistemas se definen como ecosistemas bajo manejo agrícola, que se encuentran en conexión con otros ecosistemas [5], los cuales les proveen los insumos necesarios para poder desarrollarse (energía, agua, nutrientes, polinización, etc.), llamados servicios ecosistémicos [6]–[8].

Cuando las actividades agrícolas se vuelven más intensas, extensivas y continuas en el tiempo, se hace indispensable suministrar insumos en cantidades crecientes. En particular estos insumos incluyen fertilizantes y pesticidas, entre otros. El uso de pesticidas, históricamente, ha contribuido a mejorar la productividad agrícola. Sin embargo, su uso continuado puede tener efectos imprevistos sobre el ambiente cuando no se aplican adecuadamente. A diferencia de lo que ocurre con contaminantes puntuales, el origen difuso de la contaminación en la producción agrícola hace que sus efectos no sean fácilmente observables. Estos efectos ocurren en una escala temporal muy larga y avanzan desde el nivel de especie hasta alcanzar la totalidad del ecosistema en un plazo de muchos años (Figura 3). Cuando un contaminante ingresa en el ambiente, primero afecta a los organismos a nivel bioquímico y se extiende a lo largo de distintos niveles o escalas. El primer impacto sobre los procesos bioquímicos de los organismos lleva a alteraciones fisiológicas, alteraciones celulares, alteraciones a escala individuo y finalmente a alteraciones a escala poblacional y de comunidades, lo cual determina un cambio en la estructura y dinámica del ecosistema [9].

Un ejemplo de esto, es el hecho de que el insecticida organoclorado DDT haya jugado un rol protagónico en la disminución de las poblaciones de águila calva y otras aves rapaces observada durante las décadas de los cincuenta y sesenta en los Estados Unidos. A nivel del organismo de las aves, el DDT actúa como disruptor endocrino e inhibe el paso de calcificación del huevo, volviéndolo inviable y por lo tanto impidiendo la reproducción y amenazando la supervivencia de la especie [10].

El ejemplo del DDT no es el único; otros pesticidas han demostrado su peligrosidad para el ambiente y la vida en general.

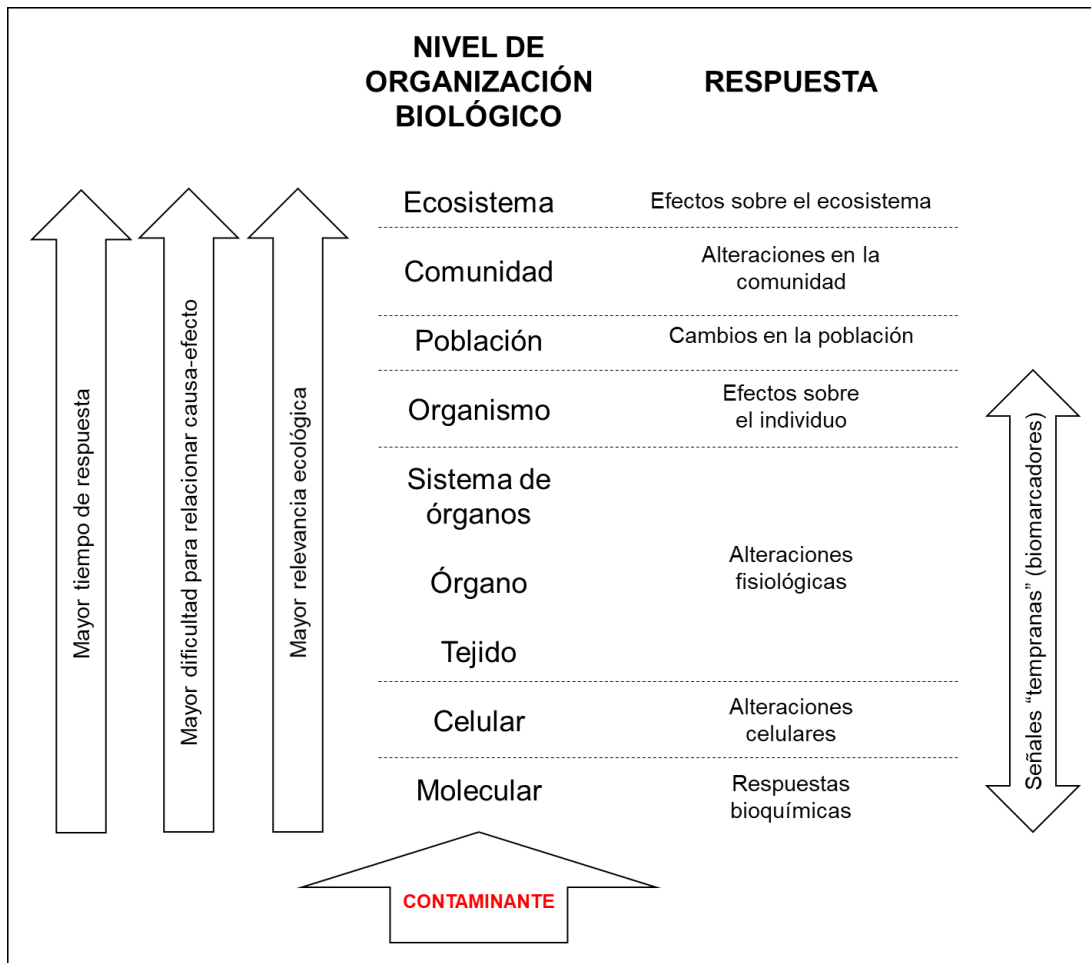


Figura 3. Impacto de un contaminante en las distintas escalas de organización biológica

1.2.1. Evaluación de impactos y riesgos del uso de pesticidas

La evaluación de riesgo de sustancias activas evalúa si, cuando se usan correctamente, estas sustancias tienen probabilidad de causar algún efecto nocivo en humanos o animales o en la calidad del agua subterránea. La evaluación de riesgo ambiental apunta a evaluar el impacto potencial en organismos no-blanco blanco según la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés). Es necesario contar con datos objetivos de la presencia de los pesticidas, su distribución en el ambiente y su concentración. La evaluación de impactos ambientales se realiza de manera interdisciplinaria, mediante evaluaciones ecotoxicológicas y químicas. Es posible, a partir de las propiedades fisicoquímicas de los pesticidas estimar la concentración en diversos compartimentos ambientales, valor que se expresa como Predicted Environmental Concentration (PEC). A su vez, de datos ecotoxicológicos, es posible conocer las dosis tóxicas para los diversos organismos. De particular interés es la concentración límite que

no produce efectos nocivos en la biota y se conoce como PNEC, Predicted No Effect Concentration (PNEC). El PNEC se obtiene de dividir el valor más bajo de LC_{50}/EC_{50} o NOEC para tres grupos tróficos de organismos marinos por un factor de evaluación apropiado. El cociente PEC/PNEC debe ser menor que uno para asegurar no ser una amenaza para la biota en cuestión [11]. Estos resultados se contrastan con la MEC (Measured Environmental Concentration) del agroquímico en estudio y se establece su peligrosidad y riesgo.

El aumento en el uso de agroquímicos y la intensificación de la actividad agrícola productiva del país hace 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.

El enfoque usualmente aplicado para determinar el estado de contaminación de los ambientes acuáticos es el análisis químico de matrices ambientales, como aguas superficiales y sedimentos. Sin embargo, las concentraciones tisulares de sustancias químicas pueden servir como indicadores de los contaminantes biodisponibles en los ecosistemas acuáticos [12].

1.2.2. Impactos del uso de pesticidas en abejas y macroinvertebrados

Como se dijo más arriba, a pesar del beneficio productivo que conlleva el uso de los pesticidas, el efecto sobre poblaciones no blanco de organismos beneficios debe ser evaluado, no solo debido por razones de conservación de los ambientes agrícolas sino también por el impacto en actividades como la apicultura.

En Uruguay, se realizó un estudio donde se encontró que la diversidad de abejas fue mayor en la región sur, donde se desarrollaba agricultura tradicional, que en la región litoral donde durante la última década ha tenido lugar un incremento de la agricultura de secano, particularmente del cultivo de soja. Esta investigación tuvo como objetivo estudiar la presencia de abejas nativas y de *Apis mellifera* L. (Apinae) en un campo de soja en cuatro transectos ubicados a 0, 50, 100 y 200 m del borde del cultivo en ambas temporadas. Las especies de abejas nativas sólo estuvieron presentes a 0 y 50 m, lo que

apunta a la relevancia de las comunidades naturales de plantas de los bordes para su preservación [13].

Se demuestra así el impacto de las prácticas agrícolas tienen sobre la biodiversidad y los insectos beneficios en particular y como ellos pueden dar información sobre el impacto que le causan los pesticidas.

1.3. Agroecosistemas, servicios ecosistémicos y biomonitores ambientales

1.3.1. Abejas melíferas y pesticidas

Entre los servicios ecosistémicos, la polinización resulta relevante por su impacto en la productividad de la actividad agrícola y el mantenimiento de la flora globalmente. Las abejas melíferas (*Apis mellifera*) son insectos muy valorados, entre otros motivos, por brindar servicios de polinización en ecosistemas naturales y con manejo agrícola. El servicio de polinización brindado por las abejas en los agroecosistemas, contribuye significativamente a la producción mundial de alimentos y, por ende, a la seguridad alimentaria. Debido a que las actividades apícolas se desarrollan en estrecha relación con los agroecosistemas, las abejas se encuentran expuestas, en particular durante su búsqueda de alimentos, a los variados pesticidas utilizados en cada agroecosistema [14]. Actualmente, las causas de la franca disminución en la población de abejas es un fenómeno que permanece sin ser descrito con total certeza. Se ha propuesto como una de las principales causas de estas mortandades masivas el envenenamiento con pesticidas [15]. Es por ello que se postula que la colmena y sus productos son indicadores del uso de pesticidas en los agroecosistemas y por lo tanto aportan al estudio de los impactos que estos provocan [16]. Con el fin de comprobar esta hipótesis, acerca de la incidencia de los pesticidas en la mortalidad de las abejas se intenta desde diferentes ámbitos de la investigación estudiar su presencia en la colmena. [16]–[19]

Para ello es necesario poder determinar cuáles y en qué cantidades se encuentran estos residuos en las diferentes matrices de la colmena.

A pesar del progreso observado en la analítica de pesticidas en los últimos años, aún se encuentra en desarrollo la investigación sobre el mejoramiento de los métodos empleados en el diagnóstico del envenenamiento de abejas. Esta tarea no es sencilla, ya que la determinación del contenido de cantidades traza (frecuentemente iguales a dosis subletales) de una amplia gama de compuestos con diversas propiedades fisicoquímicas

en muestras de abejas con una composición compleja de la matriz es un desafío actual para la química analítica moderna [20].

En la literatura se encuentran varios reportes de monitoreo donde se detectan residuos de pesticidas no solo en abejas, sino también en los productos de la colmena como son la miel, el polen y la cera. Los pesticidas se distribuyen entre las matrices de la colmena de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas y los resultados en cada una de ellas proveen información en una dimensión espacio temporal sobre la aplicación de pesticidas en un determinado ambiente [17]. La cera acumula compuestos lipofílicos, convirtiéndose así en un reservorio histórico de los contaminantes a los que estuvo expuesta la colmena. El polen, muestra lo que se colecta de pesticidas sistémicos y las abejas contienen en sus cuerpos a lo que se exponen en el momento que se las muestrea. La miel, concentra pesticidas hidrofílicos, generalmente herbicidas. En base a estos estudios se muestra que algunos de los pesticidas más ampliamente aplicados en el mundo como: clorpirifos, imidacloprid, dimetoato y tebuconazol, entre otros, se encuentran en las diferentes matrices de la colmena. Además se ha observado que un alto porcentaje de las muestras analizadas contienen al menos un pesticida y en muchos casos co-ocurren más de un compuesto [16]–[19].

Para poder postular la relación entre las aplicaciones y los comportamientos de los biomonitores es necesario poder determinar el mayor número posible de compuestos utilizados en los diferentes manejos agrícolas.

1.3.2. Macroinvertebrados acuáticos y pesticidas

Los invertebrados acuáticos contribuyen a la provisión de múltiples servicios ecosistémicos, entre ellos la descomposición de la hojarasca en ecosistemas fluviales [21]. Este servicio ecosistémico de regulación que proveen los invertebrados acuáticos colabora a mantener la calidad del agua [22], [23].

La calidad del agua del agroecosistema es fundamental para su conservación. El compartimento acuático es receptor de todos los excedentes químicos del uso del suelo, desde fertilizantes a pesticidas que llegan a él por la lluvia, deriva de la fumigación, lixiviado o escorrentía [24].

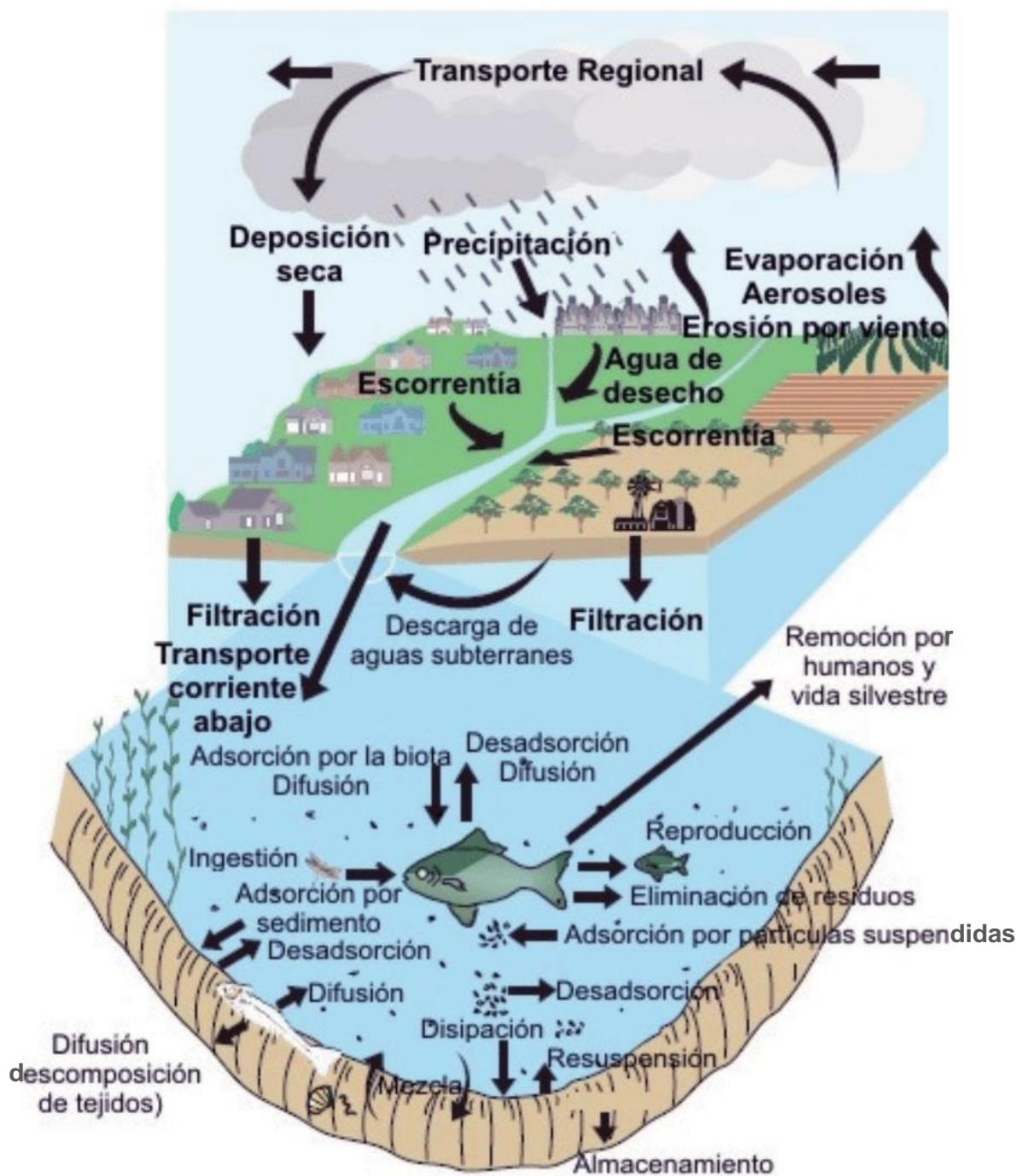


Figura 4. Transporte y distribución de pesticidas en los cuatro principales compartimentos ambientales: agua, tierra, aire y biota (Modificado de Majewski y Capel, 1995).

Todos estos fenómenos de transporte de los pesticidas suceden diferencialmente dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de cada compuesto (Figura 4).

La contaminación química afecta la calidad de los ecosistemas y de los servicios ecosistémicos que estos proporcionan. Se ha reportado la presencia de pesticidas agrícolas en peces [25], en macroinvertebrados acuáticos [26], en el caracol de agua dulce *Chilina*

parchappii [27], lo cual demuestra la transferencia de los contaminantes del agua hacia la biota que habita ese ecosistema. En el río Júcar en España, se han encontrado simultáneamente pesticidas en agua y biota, mostrando la distribución de los contaminantes entre diversos compartimentos ambientales [28]. Dadas las propiedades de biomagnificación y bioacumulación de algunos pesticidas, actualmente prohibidos como los organoclorados, la preocupación por su presencia en el alimento ha llevado a regular los niveles aceptables de estos compuestos en los organismos acuáticos comestibles. Para este caso es particularmente importante conocer el contenido lipídico, pues es el tejido adiposo donde se encuentran estos compuestos. Comunicaciones recientes muestran la acumulación de pesticidas de alto k_{ow} como los insecticidas de las familias piretroides y organofosforados en músculos de peces [25]. Sin embargo compuestos como el metsulfuron metil de $k_{ow}=2,2$ en principio no bioacumulable, se han encontrado en ninfas de Odonata, cuyo contenido lipídico es muy bajo [26],[29]

1.4. Biomonitorio

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) [30]. 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 [30]. Un bioindicador o biomonitor 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. 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 [30]. Los biomonitores proporcionan advertencias sobre situaciones ambientales riesgosas para la salud humana y los ecosistemas. Muchos organismos biológicos, como plantas, peces, insectos e invertebrados, se han utilizado con fines de biomonitorio basados en el análisis de sus tejidos o fluidos [31].

1.4.1. La colmena como biomonitor

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 [32]. Los productos de la colmena en Uruguay, han demostrado ser potentes monitores de residuos de pesticidas que se originan en los agroecosistemas durante los ciclos de producción. Para analizar sistemáticamente abejas y productos de la colmena (cera, miel, polen), se desarrollaron metodologías analíticas para la determinación de residuos de pesticidas en estas matrices. Estas, permiten recopilar una gran cantidad de información rápida y efectiva que hace factible la idea de monitorear agroecosistemas a través del análisis de productos complejos de la colmena. Las oscilaciones en la cantidad y ocurrencia de residuos para apiarios específicos se correlacionaron estadísticamente con la estación de muestreo y el agroecosistema donde se ubicaron las colmenas, mostrando el potencial de las abejas y productos apícolas para registrar información relevante con el fin de estudiar los productos químicos aplicados en su entorno [16]. Se ha estudiado también la transferencia realizada por las abejas melíferas de insecticidas neonicotinoides de aplicaciones a campo al interior de la colmena [33]. Estos datos permitieron realizar un estudio sobre la colmena como biomonitor construyendo índices basados en la biología y en los hallazgos de residuos de pesticidas encontrados en apiarios situados en diferentes agroecosistemas y posteriormente aplicando modelos de aprendizaje automático (Support Vector Machines) para clasificar los agroecosistemas según la incidencia de residuos de pesticidas en las colmenas [34], [35].

1.4.1.1. Abejas

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 [36]. 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 la afecten y con esto, se afectan los parámetros biológicos de funcionamiento general de la colmena [37]–[39].

1.4.1.2. Cera

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 [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].

1.4.1.3. Miel

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 [43]. 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 melisopolinológicos que permiten referenciarlos como marcadores del origen botánico y geográfico [44].

1.4.1.4. Polen

El polen está compuesto principalmente por lípidos y proteínas [45], [46]. 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 [47]. El polen 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 también prolina

e hidroxiprolina, así como todos los aminoácidos esenciales y semi-esenciales. La fracción proteica del polen posee cantidades notables de enzimas, especialmente amilasa, invertasa, fosfatasas, transferasas así como factores coenzimáticos, como biotina, glutatión y ciertos nucleótidos [46].

1.4.2. Macroinvertebrados acuáticos como biomonitores

Por otro lado, en los ecosistemas acuáticos, los invertebrados desempeñan un papel clave en las redes alimentarias y para las funciones de los ecosistemas (por ejemplo, la degradación de la hojarasca) [21]. Muchos de ellos pasan gran parte de su vida en contacto con los sedimentos, proporcionando una exposición continua a contaminantes hidrofílicos e hidrofóbicos del agua y de los sedimentos [12]. Debido a estos hábitos, se pueden considerar como monitores continuos de compartimentos acuáticos [48]. Los cambios en la calidad del agua y su relación con la comunidad de macroinvertebrados acuáticos, se han relacionado frecuentemente con análisis fisicoquímicos [49], [50], los cuales sólo permiten obtener una estimación de las condiciones del momento particular en el cual el curso de agua fue estudiado [51]. Esta estrategia resulta insuficiente para comprender los cambios en los ecosistemas naturales, principalmente cuando las causas de contaminación son difusas, como en el caso de la agricultura [49], [51], [52]. Distintos estudios han demostrado la importancia de entender las redes tróficas que involucran organismos acuáticos donde insectos predadores acumulan contaminantes de acuerdo al fenómeno denominado biomagnificación [53], [54]. Se han empleado dos enfoques generales que usan invertebrados acuáticos en todo el mundo para realizar evaluaciones biológicas de arroyos y ríos. Uno es el taxonómico (“¿qué es?”), y el otro es el funcional (“¿qué hace?”). El enfoque taxonómico se centra en determinar alguna medida de riqueza o diversidad. Si el énfasis principal del análisis de invertebrados es evaluar la biodiversidad o la sensibilidad a un contaminante químico dado, como un metal pesado, entonces el enfoque taxonómico debería ser el más útil. Sin embargo, si el objetivo es caracterizar la condición del ecosistema, el enfoque funcional puede ser más apropiado y, sin duda, más rápido. El enfoque funcional se basa en características morfológicas y de comportamiento fácilmente reconocibles de los invertebrados que se relacionan directamente con los hábitos alimentarios de estos individuos. Esto hace que la técnica sea particularmente sensible al impacto del uso del suelo en la cuenca. Este enfoque debería ser particularmente útil para evaluar las tendencias en los cambios en el uso del suelo en la

región a lo largo del tiempo. Los grupos funcionales de macroinvertebrados acuáticos descritos por Cummins y Merritt son: los fragmentadores, los colectores-filtradores, los colectores-recolectores, los raspadores y los predadores. Los fragmentadores poseen piezas bucales fuertes y afiladas que les permiten triturar y masticar el tejido vegetal vascular vivo o fragmentos de hojarasca en descomposición. Los colectores se alimentan de materia orgánica particulada del detrito: algas, bacterias heces; dentro de los colectores, los filtradores se alimentan de ese material que se encuentra en suspensión en la columna de agua filtrándolo, mientras que los recolectores lo hacen ingiriéndolo a partir de los intersticios en los sedimentos o recogiendo partículas sueltas en áreas deposicionales. Los raspadores “cosechan” algas adheridas y el detrito asociado a la superficie de rocas, madera o tallos de plantas. Por último, los depredadores se definen como aquellos invertebrados que capturan presas vivas y consumen sus tejidos o ingieren sus fluidos corporales [55].

Se hace interesante el encontrar aquellos macroinvertebrados que puedan acumular o retener contaminantes en sus organismos. Estos contaminantes generalmente se encuentran en concentraciones no letales para ese organismo. Por ejemplo, se han encontrado herbicidas como metilsulfuron metil en ninfas de Odonata [26]. Este fue un hallazgo relevante, dada la muy baja concentración de uso de estos herbicidas (5 g ha^{-1}), que hace muy difícil detectarlos libres en el ambiente, pero son acumulados por depredadores como organismos del orden Odonata. Es necesario el estudio de diferentes especies de macroinvertebrados que puedan acumular pesticidas y servir de bioindicadores de la presencia de pesticidas en el ambiente.

1.4.2.1. Ninfas de Odonata

Las larvas de Odonata y de otros insectos con metamorfosis incompleta son denominadas ninfas. Las ninfas de Odonata ocupan hábitats acuáticos convencionales y pertenecen al grupo funcional de predadores [56]. En algunos ecosistemas, están en la cima de la cadena trófica. Son predadores generalizados que detectan a sus presas por medio de sus ojos compuestos y/o mecanorreceptores. La especialización de los ojos y el modo de alimentación están estrechamente relacionados. Su alimentación en la naturaleza varía según la posición de la ninfa en el hábitat acuático, el tipo de labium (la más posterior de las piezas bucales de los insectos), la estación y el tamaño y disponibilidad relativa de las especies presa. A medida que las ninfas crecen, las presas se hacen más grandes y más

variadas, principalmente porque las ninfas más grandes conservan la capacidad de consumir presas pequeñas. Además de consumir insectos acuáticos, se alimentan también de muchos otros invertebrados (protozoos, oligoquetos, crustáceos, moluscos); algunas especies se alimentan de pequeños vertebrados como larvas de peces y anfibios [56]. El canibalismo entre las ninfas de Odonata en la naturaleza es muy raro. La mayoría de las ninfas se arrastra en el fondo o se sube a las plantas acuáticas en busca de presas. Algunos son expertos en excavar en el sedimento y pueden tener miembros modificados para ese propósito. Las ninfas suelen permanecer en el mismo soporte o en la misma madriguera o en la base de una hoja durante largos períodos, pero también pueden deambular, particularmente si tienen hambre y especialmente por la noche, cuando también se alimentan. Es habitual que las especies que habitan de manera permanente tierras bajas en latitudes tropicales y templadas completen una o más generaciones por año y que las especies en latitudes templadas a frías sean univoltinas o semivoltinas [56]–[59].

1.4.2.2. *Corbicula*

Entre los macroinvertebrados acuáticos, diferentes grupos pueden ser interesante objeto de estudio como acumuladores debido a sus hábitos alimentarios descritos más arriba. Entre estos grupos, se destacan los bivalvos, que son comúnmente utilizados como especies centinelas en estudios de contaminación ambiental ya que estos organismos están en contacto directo con los compartimentos contaminados (agua y sedimentos) y, por lo tanto, tienden a acumular grandes niveles de contaminantes [60], [61].

Corbicula es un género de moluscos bivalvos que se encuentran en la interfase agua-sedimento en ambientes acuáticos; tiene movilidad limitada y es fácil de recolectar. Debido a sus capacidades de alimentación por filtración, tiene la capacidad de acumular compuestos químicos en sus tejidos junto con una alta tolerancia a los efectos resultantes de la exposición a los contaminantes disueltos en agua o adsorbidos a partículas en suspensión [62]. Aunque tiene el potencial de ser un biomonitor eficaz de pesticidas en ecosistemas de agua dulce, esta propiedad aún no se ha evaluado completamente.

1.4.2.3. *Aegla*

Entre los macroinvertebrados que se encuentran en nuestros ríos y arroyos, se cuenta con los del género *Aegla*. Son macroinvertebrados típicos de la zona austral oriental de América del Sur. Se los conoce como cangrejos tanque, cangrejillos de río, tienen hábitos similares a los langostinos, usan sus pinzas para rascar o romper estructuras de donde consiguen su alimento. *Aegla* presenta distintos hábitos alimenticios que las ninfas de Odonata. Son especies que recorren el fondo de los cuerpos de agua en los que habitan, en búsqueda de su alimento, ocultándose bajo rocas del lecho, en cuevas o grietas. Son omnívoros, con una variada dieta que incluye desde materia vegetal a insectos, moluscos, peces, renacuajos. Están en una posición intermedia de la cadena trófica, ya que son alimento de aves, peces y caimanes [63]–[65].

Su estudio podría darnos información complementaria dada la variedad de su dieta, ya que son recolectores del fondo de los cursos de aguas.

Es de interés por lo tanto, la evaluación de procedimientos analíticos novedosos en condiciones del mundo real, caracterizado por matrices complejas que contienen mezclas complejas de analitos a concentraciones internas a menudo bajas y subtóxicas, es una clave para proponerlos con fines de monitoreo [12]. El considerar más de un organismo, ya sea por su diferente hábito alimenticio o por sus características de movimiento, brindan información complementaria que permiten una visión más ajustada de la presencia de agroquímicos en los ecosistemas [66], [67].

1.5. 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* [68]. 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 [69].

En la actualidad, el desarrollo de métodos multiresiduo (MRM) es el enfoque más utilizado para el análisis de trazas de contaminantes orgánicos tanto en matrices alimentarias como ambientales con respecto a los métodos antiguamente utilizados que

sólo permitían el análisis de uno o de un reducido número de pesticidas por cada determinación analítica [70]. Los métodos analíticos modernos basados en una preparación de muestra miniaturizada y en el acoplamiento de métodos cromatográficos con espectrometría de masas y masas en tándem permiten la determinación simultánea de hasta 200 compuestos en un solo análisis [71]. Para lograr esto, la preparación de la muestra se torna un paso fundamental ya que esta etapa influye de forma significativa en la fiabilidad de los resultados obtenidos. La naturaleza fisicoquímica de las moléculas a investigar es muy variada, pues va desde una marcada lipofilia como los insecticidas organoclorados hasta compuestos relativamente hidrofílicos como algunos herbicidas. El otro aspecto a considerar para el desarrollo de un método multiresiduo es la matriz de interés. De acuerdo a la naturaleza química de dicha matriz, la distribución de estos compuestos será diferencial. Aquellas matrices más lipofílicas se enriquecerán con compuestos con k_{ow} elevado, mientras que compuestos más solubles en agua estarán presentes en matrices hidrofílicas [72]–[75]. Las variedades de los cultivos y las diferentes propiedades fisicoquímicas de los compuestos a analizar dificultan el desarrollo de metodologías analíticas que puedan cubrirlos en una sola determinación. Para cada matriz y grupo de pesticidas seleccionados de acuerdo al objetivo del análisis, se debe evaluar un método que se ajuste al propósito y luego de demostrarlo, se debe validar la metodología para asegurar resultados confiables.

1.5.1. Preparación de la muestra

Los pesticidas generalmente se extraen con un solvente orgánico de polaridad alta o media. Los solventes típicamente utilizados para este propósito son la acetona, el acetato de etilo y el acetonitrilo, ya que permiten la extracción de un amplio rango de pesticidas. En todos los casos, los pesticidas se reparten entre una fase acuosa y una fase orgánica. Con acetona y acetonitrilo, esto se realiza en dos pasos sucesivos, con acetato de etilo en un solo paso [76]. La selección de un solvente u otro depende de la composición química de la matriz y de las características fisicoquímicas de los pesticidas a analizar. El acetonitrilo es un solvente caro y tóxico, pero la principal ventaja es que prácticamente no extrae componentes lipofílicos, que muchas veces son los principales interferentes desde la matriz a la hora de realizar un análisis. El acetato de etilo es parcialmente miscible en agua. Por su polaridad, es capaz de extraer compuestos no polares de aquellas

matrices con alto contenido en lípidos. La principal desventaja del acetato de etilo es que por su relativa baja polaridad muchos pesticidas polares no se reparten en la fase orgánica, por lo que las recuperaciones de este tipo de pesticidas pueden ser bajas. Esto puede evitarse agregando una etapa de *salting-out* mediante el agregado de sal, que en caso de los métodos multiresiduo basados en acetato de etilo, ha sido sulfato de sodio. De esta forma las sales compiten con los analitos de interés por la solvatación con el agua, disminuyendo su afinidad por la fase acuosa y migrando hacia la fase orgánica [76].

A partir del año 2007, Pihlström *et al.*, adicionaron bicarbonato de sodio durante la extracción con el fin de ajustar el pH de las muestras en el rango de 6 a 8 para mejorar la estabilidad y aumentar las recuperaciones de pesticidas básicos en matrices ácidas [77]. En el mismo año, Mol *et al.*, reportaron el uso de una nueva modificación de esta metodología que consistió en la extracción de la muestra con acetato de etilo y posteriormente una etapa de *clean-up* con carbono grafitizado (GCB) y amina primaria y secundaria (PSA) [76].

En 1975, Luke *et al.*, desarrollaron un método multiresiduo para la extracción y *clean-up* de pesticidas de un amplio rango de polaridades, en alimentos para su determinación por cromatografía de gases. Las muestras se extraen con acetona y se reparten con una mezcla en cantidades iguales de éter de petróleo y diclorometano para eliminar el agua, seguido de un *clean-up* con florisil. Este método no sólo permitía analizar pesticidas organoclorados sino también organofosforados y algunos carbamatos [78]. La metodología de *clean-up* utilizada ocasionaba bajas recuperaciones de los pesticidas más polares, por lo que en 1981 estos autores sustituyeron el uso de florisil por un mayor volumen de éter de petróleo que se adicionaba a continuación de la partición para remover trazas de diclorometano. Años más tarde se ajustaron las condiciones de esta metodología con el fin de disminuir la cantidad de muestra, solventes y sales. Este método se llamó Mini-Luke y actualmente hay varias aplicaciones del mismo en matrices alimentarias [78]–[80].

El método QuEChERS (por sus siglas en inglés *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), desarrollado por Anastassiades *et al.* en 2003 [70] y sus variantes con *buffer* acetato y citrato [81], [82], han sido y son alternativas muy empleadas en la actualidad para el análisis multiresiduo de pesticidas en frutas y hortalizas por su alta eficiencia, bajo costo, sencillez y mínimo número de pasos. Se basa en la extracción de una muestra sólida con acetonitrilo con una etapa posterior de *salting-out*, seguido por un *clean-up* dispersivo en fase sólida para remover las posibles interferencias de la matriz. Es

fácilmente adaptable según el tipo de matriz, los pesticidas a analizar y el equipamiento del laboratorio. Las modificaciones del método original, se han desarrollado con el fin de mejorar las recuperaciones en matrices complicadas y de pesticidas problemáticos como captan, folpet, diclofluanid, pimetrozina y clorotalonil. Dichas modificaciones consisten en el uso de sales que actúan como *buffer* durante la extracción para, de esta forma, mantener el pH en un valor adecuado para favorecer la recuperación de este tipo de pesticidas. Así, se desarrollaron dos variaciones de esta metodología que actualmente son muy utilizadas: QuEChERS acetato [81] y QuEChERS citrato [82].

Las metodologías de preparación de muestra para el análisis multiresiduo de pesticidas en insectos han sido reportadas principalmente para abejas melíferas utilizando diferentes enfoques de QuEChERS y cantidades de muestra entre 2 y 5 g [16], [83]–[85]. El muestreo de abejas no es un aspecto limitante para el análisis, dado que se encuentran fácilmente disponibles. Por lo tanto, no existe la necesidad de minimizar la cantidad de muestra a utilizar para este propósito. Sin embargo, se encuentran reportados dos métodos que utilizan bajas cantidades de muestra: una metodología que utiliza dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) para el análisis de residuos de pesticidas en 0,5 g de abejas [86] y una metodología para la determinación de insecticidas neonicotinoides en una abeja (aproximadamente 100 mg), desarrollada específicamente para investigar su relevancia en las pérdidas de colmenas [87].

Un método con un enfoque “micro-QuEChERS” para el análisis de 9 pesticidas en insectos, caracoles y arañas por GC-MS/MS ha sido recientemente publicado. En este método se utilizan 500 mg de matriz seca y homogeneizada, 1,0 mL de acetato de etilo como solvente de extracción, *salting-out* con 250 mg de MgSO₄:NaCl (4:1) y *clean-up* mediante extracción en fase sólida dispersiva (*dSPE*) con 75 mg de MgSO₄:PSA (4:1) [88]. Una metodología que utiliza 100 mg de muestra de macroinvertebrados de otras especies ha sido reportada para el análisis de contaminantes emergentes (productos farmacéuticos de varias clases y disruptores endócrinos) [89].

1.5.2. Técnicas instrumentales

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 [90] y su capacidad para detectar concentraciones de pesticidas mucho más bajas, especialmente los detectores de masas en tándem [85], [91].

Un espectrómetro de masas consta básicamente de una fuente de ionización que produce iones, un analizador que los clasifica por su masa y un detector que mide la intensidad relativa de las diferentes masas. El principio de todos los espectrómetros de masas es que el comportamiento de una corriente de iones en fase gaseosa, a través de un campo electromagnético es dependiente de la relación m/z de los iones y dicha relación es usada por el analizador para distinguir unos de otros, consiguiendo así su separación [92].

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).

1.5.2.1. Sistemas de ionización

1.5.2.1.1. *Electrospray* (ESI)

Después de la introducción de la muestra desde el sistema HPLC, ésta es ionizada en la fuente de ionización. Existen diferentes tipos de fuentes de ionización: *termospray*, *particle beam*, foto-ionización a presión atmosférica (APPI) e ionización a presión atmosférica (API), siendo esta última una de las más utilizadas [93], [94]. La ionización a presión atmosférica involucra un grupo de interfases llamadas Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI) y *Electrospray* (ESI) [94]. La ionización por ESI es un proceso de ionización suave, a presión atmosférica con una alta eficiencia, en comparación con otras formas de ionización convencionales. En modo positivo, el efluente del LC es bombeado a través de una aguja nebulizadora que se encuentra a un potencial bajo y éste pasa a través de un electrodo semicilíndrico que se encuentra a un alto potencial. La diferencia de potencial producida entre la aguja y el electrodo genera un campo eléctrico que carga la superficie del líquido y forma gotas cargadas. Éstas son conducidas a través de un capilar que por medio de un gas a alta temperatura (N_2) elimina el solvente no cargado. A medida que las micro gotas atraviesan el capilar, las cargas

positivas migran hacia la superficie de la micro gota mientras que las cargas negativas permanecen en el centro de ésta. Paralelamente, el solvente continúa evaporándose hasta que el tamaño de la micro gota es tal que se rompe. En este momento el campo eléctrico generado es tal que logra ionizar el analito eliminando el resto del solvente, generando así iones cargados (sin solvente). Una vez obtenidos los iones, se introducen formando un ángulo de 90° con el analizador, separándolos así de las moléculas neutras. Dadas las características de ESI, su aplicación es indicada principalmente para el análisis de compuestos polares [93], [94].

1.5.2.1.2. Ionización electrónica

En cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas, la ionización de los compuestos se puede realizar mediante ionización electrónica (EI) o ionización química positiva o negativa (PCI, NCI) [93], [95]. En ionización electrónica, un filamento calentado emite electrones que son acelerados dentro de la cámara de ionización por una diferencia de potencial generalmente de 70 eV. La ionización de la muestra se produce por la remoción de un electrón de la molécula generando un ion cargado positivamente con un electrón desapareado. Moléculas neutras, en fase gaseosa, a una presión de 10^{-5} torr, son bombardeadas por electrones, con una energía típica de 70 eV. Ocurre principalmente el desplazamiento o captura de un electrón formando iones M^+ . [96]. La alta energía de los electrones produce la formación del ion molecular y posteriormente la fragmentación de las moléculas de manera específica en iones cargados, llamados iones fragmento. Dicha fragmentación es única para cada molécula. El patrón de fragmentación que ocurre a través de mecanismos predecibles es una huella digital que permite la identificación inequívoca de cada compuesto [97]. En general los espectros son reproducibles; pudiéndose construir bibliotecas de espectros de EI a 70 eV, lo que constituye una ventaja al momento de la identificación y confirmación de un analito [96]. Se aplica a moléculas de media y baja polaridad y bajo PM (~ 500 uma), volátiles y termoestables.

1.5.2.2. Analizadores

1.5.2.2.1. Analizador de triple cuadrupolo

Es 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. Estos 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 ion 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 colisiona con los iones que fueron seleccionados en Q1.
- Q3 filtra y 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 ion precursor o también llamado padre, Q2 fragmenta el ion seleccionado en Q1 y Q3 monitorea solamente un ion hijo. Se esquematiza un triple cuadrupolo y el modo operacional MRM en la Figura 5.

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 ion hijo es conocido comúnmente como “transición”.

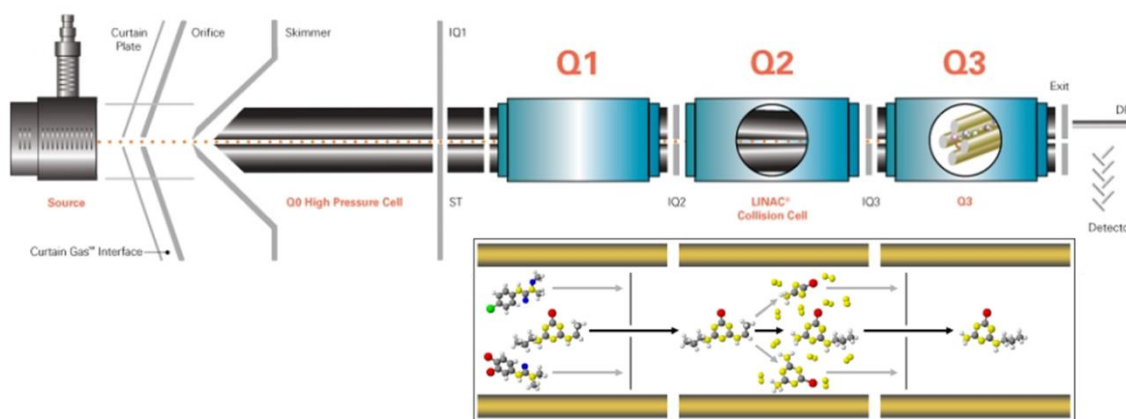


Figura 5. Esquema de la configuración de un espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolo, operando en modo MRM

En el caso de las muestras ambientales los analizadores de triple cuadrupolo tienen la ventaja de su alta sensibilidad que lleva a detectar residuos del orden de las décimas de $\mu\text{g}/\text{kg}$.

La alta sensibilidad y bajo límite de detección de los métodos modernos de análisis de residuos de contaminantes nos permite plantearnos el estudio de la presencia de residuos de pesticidas en organismos que los asimilen, aún en pequeñas concentraciones.

1.6. 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/11813/2017 [98], la cual tiene criterios exigentes pero a la vez adaptados a las particularidades del análisis de residuos de pesticidas. 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, o 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.

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.

Recuperación

Se define como la proporción de un analito remanente en el punto final de su determinación, luego de su agregado, 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 dos niveles de concentración, al 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 adecuadas (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. Para evaluar la veracidad de cada método, se estudian los porcentajes de recuperación para cada compuesto, calculados según la Ecuación 1. Para ello, previo a realizar el procedimiento de extracción, a una muestra blanco se le adiciona una cantidad conocida de los pesticidas en estudio.

$$\% Rec = \frac{Concentración_{experimental}}{Concentración_{teórica}} \times 100$$

Ecuación 1. Cálculo del 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.

Efecto Matriz (EM)

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), obteniendo finalmente los mismos niveles de concentración en ambas curvas y luego se comparan. 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.

Algunas condiciones instrumentales como la fuente de ionización (APCI vs. ESI), el modo de ionización y el flujo de fase móvil también influyen en el efecto matriz [99].

Si el valor de porcentaje EM es igual a cero, no existe efecto matriz, un valor mayor o menor a cero indica que existe efecto matriz, ya sea un aumento de la señal (EM mayor que cero), o una supresión de la señal (EM menor que cero). Dependiendo del valor resultante algunos autores clasifican el efecto matriz en diferentes categorías. Un porcentaje entre -20 % y 20 % se considera como que no existe EM, ya que esta variación se encuentra en un valor cercano a la repetitividad aceptada por el método. Un EM medio se observa cuando los valores se encuentran entre -50 % y -20 % o 20 % y 50 %, mientras

que si los valores son menores a -50 % o mayores que +50 % el EM es pronunciado [100], [101].

Los parámetros de validación con sus criterios de aceptabilidad establecidos en la guía europea se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros y criterios de validación establecidos en el documento SANTE/11813/2017

Parameter	What/how	Criterion	Cross reference to AQC document
Sensitivity/linearity	Linearity check from five levels	Deviation of back-calculated concentration from true concentration $\leq \pm 20\%$	C14-C19
Matrix effect	Comparison of response from solvent standards and matrix-matched standards	*	C22-C24
LOQ	Lowest spike level meeting the method performance criteria for trueness and precision	\leq MRL	G6
Specificity	Response in reagent blank and blank control samples	$\leq 30\%$ of RL	C42
Trueness (bias)	Average recovery for each spike level tested	70-120%	G3,G6
Precision (RSD _r)	Repeatability RSD _r for each spike level tested	$\leq 20\%$	G3, G6
Precision (RSD _{wr})	Within-laboratory reproducibility, derived from on-going method validation / verification	$\leq 20\%$	G3, G6
Robustness	Average recovery and RSD _{wr} , derived from on-going method validation / verification	See above	G6, C40-C44
Ion ratio	Check compliance with identification requirements for MS techniques	Table 4	Section D
Retention time		± 0.1 min.	D2

**En casos de más de 20 % de supresión o incremento de la señal, el efecto matriz debe ser considerado en la calibración*

1.6.1. Criterios para la identificación y confirmación de residuos de pesticidas según DG SANTE 2017

1.6.1.1. Requisitos en cromatografía

El tiempo de retención del analito en el extracto debe coincidir con el del estándar en la curva de calibración en matriz, tanto en LC como en GC, en $\pm 0,1$ min.

1.6.1.2. Requisitos en espectrometría de masas

Dado que la selectividad depende del detector, se deben seguir criterios de identificación determinados establecidos según el tipo de detector (Tabla 2). En este trabajo se utilizó LC-MS/MS, por lo que se describen a continuación los criterios de identificación para un detector de tipo MS/MS.

La identificación depende de la selección de 2 transiciones adecuadas. Los picos observados en los cromatogramas generados para cada transición del analito deben presentar relación señal / ruido (S/N) mayor a 3, deben estar completamente solapados y presentar forma de pico que coincidan con el estándar utilizado para la calibración. Otro criterio que se debe cumplir para la identificación es la relación de abundancia de transiciones. La intensidad relativa de las transiciones detectadas, expresada en porcentaje de intensidad de la transición más abundante, se debe corresponder en $\pm 30\%$ con el promedio de las abundancias obtenidas de la curva de calibración del estándar en las mismas condiciones de medida.

Tabla 2. Requisitos para la identificación de los compuestos según el sistema de detección de MS

MS detector/Characteristics		Acquisition	Requirements for identification	
Resolution	Typical systems (examples)		minimum number of ions	other
Unit mass resolution	Single MS quadrupole, ion trap, TOF	full scan, limited m/z range, SIM	3 ions	S/N $\geq 3^a$ Analyte peaks from both product ions in the extracted ion chromatograms must fully overlap.
	MS/MS triple quadrupole, ion trap, Q-trap, Q-TOF, Q-Orbitrap	selected or multiple reaction monitoring (SRM, MRM), mass resolution for precursor-ion isolation equal to or better than unit mass resolution	2 product ions	Ion ratio from sample extracts should be within $\pm 30\%$ (relative) of average of calibration standards from same sequence
Accurate mass measurement	High resolution MS: (Q-)TOF (Q-)Orbitrap FT-ICR-MS sector MS	full scan, limited m/z range, SIM, fragmentation with or without precursor-ion selection, or combinations thereof	2 ions with mass accuracy ≤ 5 ppm ^{a, b, c}	S/N $\geq 3^a$ Analyte peaks from precursor and/or product ion(s) in the extracted ion chromatograms must fully overlap. Ion ratio: see D12

^a) preferably including the molecular ion, (de)protonated molecule or adduct ion

^b) including at least one fragment ion

^c) < 1 mDa for $m/z < 200$

^d) in case noise is absent, a signal should be present in at least 5 subsequent scans

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Obtener información de la calidad de los agroecosistemas mediante el análisis de residuos de pesticidas en biomonitores que permitan predecir impactos ambientales.

2.2. Objetivos específicos

- Desarrollar metodologías analíticas multiresiduos para los distintos organismos a evaluar como biomonitores.
- Realizar biomonitoreos reales para poder evaluar diferentes biomonitores en distintos ambientes ligados a agroecosistemas.
- Seleccionar el o los biomonitores más adecuado(s) para cada sistema, según el objetivo del estudio, en base a los resultados químico-analíticos obtenidos.
- Proponer una estrategia global de evaluación de agroecosistemas basada en el análisis de residuos de pesticidas de diferentes biomonitores y la combinación de estos resultados.

3. Metodologías de análisis de residuos de pesticidas en biomonitores

3.1. Introducción

La continua actualización de los paquetes tecnológicos utilizados en la producción agropecuaria, ya sea por la incorporación de nuevos principios activos en el mercado, así como por prohibiciones o restricciones en el uso de productos existentes, genera cambios en el uso de los mismos en las áreas productivas. Por esto, resulta de gran importancia la actualización de las metodologías de análisis de pesticidas adecuadas al propósito que la propuesta plantea.

Es entonces necesario proceder al ajuste y validación de las metodologías analíticas para el análisis de los residuos de pesticidas seleccionados en las matrices definidas para este estudio en particular. Se seleccionó trabajar para evaluar diferentes procedimientos de preparación de muestra el esquema del método QuEChERS en su versión citrato por ser este el método oficial de la Unión Europea para el análisis de residuos de pesticidas en frutas y hortalizas (CEN 15662). Es decir, se utilizó como solvente de extracción Acetonitrilo, se realizó un salting-out convencional para favorecer la separación de fases y posteriormente el paso de limpieza fue variado de acuerdo a las características de las diferentes matrices a evaluar. Se observará los cambios en las sales en la sección de materiales y métodos.

Así mismo se tuvo en cuenta las características de las muestras y las cantidades plausibles de colectar para el desarrollo del método.

Fue de fundamental importancia miniaturizar algunos esquemas de trabajo debido a la peculiaridad de algunas matrices como las ninfas de Odonata por ejemplo.

El análisis instrumental se basó en espectrometría de masas utilizando las dos configuraciones cromatográficas más convencionales para análisis de residuos de pesticidas: LC y GC -MS/MS.

Si bien el grupo posee experiencia en el desarrollo de metodologías analíticas en biota. Se debieron desarrollar metodologías analíticas específicas y selectivas para un grupo de pesticidas muy usados los primeros años de este siglo.

Estos métodos ya validados deben ampliarse para demostrar su utilidad y confiabilidad y que es apto para el propósito analítico para el cual se va a utilizar.

Para esto, se siguieron las directrices establecidas en el documento de la Unión Europea SANTE/11813/2017, la cual tiene criterios exigentes, pero a la vez adaptados a las particularidades del análisis de residuos de pesticidas.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Reactivos y estándares

Se utilizó acetonitrilo (MeCN) y acetato de etilo (AcOEt) de calidad HPLC de Merck (Darmstadt, Alemania) y J. T. Mallinckrodt Baker Inc. (Phillipsburg, NJ, USA), respectivamente. El n-hexano utilizado fue de Carlo Erba (Milan, Italia). Agua tipo 1 (ASTM) con resistencia específica de 18 M Ω fue obtenida a partir de un sistema de purificación de agua Barnstead™ Easypure™ RoDi Thermo Fischer Scientific (Marietta, OH, USA). El cloruro de sodio p.a. (NaCl) y el citrato de sodio dihidratado p.a. fueron suministrados por Carlo Erba. El ácido fórmico p.a. (98-100 %) fue obtenido de Merck y una solución de ácido fórmico al 5% (v/v) fue preparada en acetonitrilo. Citrato de sodio dibásico sesquihidratado p.a., sulfato de magnesio anhidro (MgSO₄) ppa y los adsorbentes amina primaria y secundaria (PSA, 40-60 μ m), octadecilsilano (C18, 40-60 μ m) utilizados fueron de Scharlab (Barcelona, España). Los estándares analíticos de pureza \geq 95% fueron de Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania). Las soluciones *stock* de estándares de 2 mg mL⁻¹ se prepararon en un disolvente apropiado considerando su solubilidad. Las soluciones de trabajo se prepararon mezclando y diluyendo exacta y apropiadamente múltiples soluciones *stock* con acetonitrilo. Todas las soluciones se conservaron en la oscuridad a -18 °C.

3.2.2. Condiciones experimentales de LC-MS/MS

Para el análisis por LC-MS/MS se utilizó un cromatógrafo de líquidos Agilent 1200 acoplado a un sistema de espectrometría de masas 4000 QTRAP de Sciex operado como triple cuadrupolo con una fuente de ionización por *Electrospray* (ESI) en modos de ionización positiva y negativa, dependiendo de la naturaleza de los analitos. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m). Se emplearon gradientes de fase móvil compuesta por: A) solución 2% metanol en agua, conteniendo formiato de amonio 5 mM y ácido fórmico 0,1% (v/v) y B) solución 2% agua en metanol, conteniendo formiato de amonio 5 mM y ácido fórmico 0,1% (v/v), en el caso del análisis en modo positivo, y A) solución de ácido fórmico 0,1%

(v/v) en agua y B) acetonitrilo, para el análisis en modo negativo. En la Figura 6 se muestran los gradientes utilizados para los modos positivos y negativo, respectivamente. En ambos casos se trabajó con un flujo constante de $600 \mu\text{L min}^{-1}$. El volumen de inyección fue $5 \mu\text{L}$. El análisis por espectrometría de masas se realizó mediante monitoreo de reacciones múltiples (*Multiple Reaction Monitoring*, MRM) en modo *Scheduled MRM*TM. En el caso de ionización positiva, el voltaje de ionización fue 5000 V, el gas de nebulización fue nitrógeno a 50 psi, y el *curtain gas*, nitrógeno a 20 psi; la evaporación por solvente en la fuente fue asistida por un gas para secado (nitrógeno a 50 psi calentado a $500 \text{ }^\circ\text{C}$). En ionización negativa, el voltaje utilizado fue -4500 V, el gas de nebulización fue nitrógeno a 50 psi, y el *curtain gas*, nitrógeno a 20 psi; la evaporación por solvente en la fuente fue asistida por un gas para secado (nitrógeno a 50 psi calentado a $450 \text{ }^\circ\text{C}$). Para determinar las transiciones óptimas, energías de colisión (CE) y potenciales de *declustering* (DP) para cada compuesto, se inyectó directamente al espectrómetro de masas la solución del estándar utilizando una bomba de jeringa a flujo constante. Estos parámetros están reportados en la Tabla 3.

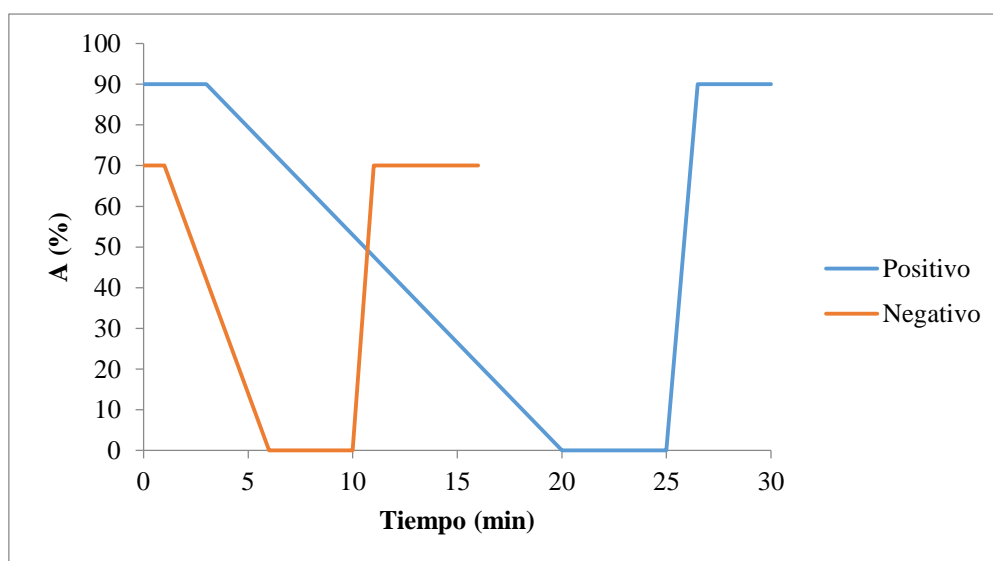


Figura 6. Gradientes de fase móvil utilizados en el análisis por LC-MS/MS.

Tabla 3. Parámetros instrumentales utilizados en LC-MS/MS. DP: Declustering Potential; CE: Energía de colisión.

Pesticida	Polaridad ESI	Primera transición ($m/z > m/z$)	DP (V)	CE (V)	Segunda transición ($m/z > m/z$)	DP (V)	CE (V)	Tercera transición ($m/z > m/z$)	DP (V)	CE (V)
2,4-D	ESI (-)	219 > 161	-50	-18	221 > 163	-50	-18	219 > 125	-50	-38
2,4-DB	ESI (-)	247 > 161	-43	-12	249 > 163	-43	-11	247 > 125	-43	-35

Acefato	ESI (+)	184 > 143	46	13	184 > 125	46	25			
Acetamiprid	ESI (+)	223 > 126	55	25	223 > 99	55	47			
Acetoclor	ESI (+)	270 > 224	36	11	270 > 148	36	29			
Alaclor	ESI (+)	270 > 238	31	15	270 > 162	31	25			
Ametrina	ESI (+)	228 > 186	80	26	228 > 96	80	34			
Atrazina	ESI (+)	216 > 174	66	25	216 > 104	66	41			
Atrazina desetil	ESI (+)	188 > 146	33	23	188 > 104	33	35	188 > 79	33	36
Atrazina desisopropil	ESI (+)	174 > 68	66	39	174 > 96	30	25	174 > 104	30	32
Azinfos metil	ESI (+)	318 > 160	50	11	318 > 132	50	21			
Azoxiostrobrina	ESI (+)	404 > 372	72	19	404 > 344	72	31			
Bifentrin	ESI (+)	440 > 181	36	21	440 > 166	36	55			
Bispiribac	ESI (+)	431 > 275	60	17	431 > 243	60	45			
Boscalid	ESI (+)	343 > 139	89	24	345 > 271	89	39			
Carbaril	ESI (+)	202 > 145	68	12	202 > 127	68	35			
Carbendazim	ESI (+)	192 > 160	51	25	192 > 132	51	43			
Carbofuran	ESI (+)	222 > 123	102	31	222 > 165	102	12			
Cimoxanilo	ESI (+)	199 > 128	46	13	199 > 111	46	27	199 > 83	46	33
Ciproconazol	ESI (+)	292 > 70	16	35	292 > 125	16	35			
Ciprodinil	ESI (+)	226 > 93	81	47	226 > 77	76	67			
Clomazone	ESI (+)	240 > 125	78	24	240 > 89	78	55	240 > 99	78	64
Clorantraniliprol	ESI (+)	484 > 453	44	22	484 > 286	44	21			
Clorpirifos	ESI (+)	350 > 198	80	23	350 > 97	80	38			
Clorsulfuron	ESI (+)	358 > 167	81	25	358 > 141	81	25			
Clotianidina	ESI (+)	250 > 169	56	17	250 > 132	56	19			
Cumafos	ESI (+)	363 > 227	100	33	363 > 307	100	22			
Diazinon	ESI (+)	305 > 169	51	29	305 > 153	51	27			
Dicamba	ESI (-)	219 > 175	-46	-9	221 > 177	-47	-9	219 > 145	-46	-15
Diclosulam	ESI (-)	404 > 181	-47	-26	404 > 153	-47	-44	181 > 153	-100	-21
Difenoconazol	ESI (+)	406 > 251	90	37	406 > 337	90	21			
Diflubenzuron	ESI (+)	311 > 158	31	19	311 > 141	31	47			
Dimetoato	ESI (+)	230 > 199	50	13	230 > 125	50	28			
Diuron	ESI (+)	233 > 72	67	36	235 > 72	67	39	233 > 160	67	35
Epoxiconazol	ESI (+)	330 > 121	36	27	330 > 101	36	63			
Etion	ESI (+)	385 > 199	61	15	385 > 143	61	33	385 > 171	61	13
Fenbuconazol	ESI (+)	337 > 125	110	37	337 > 70	110	43			
Fention sulfona	ESI (+)	311 > 125	56	29	311 > 279	56	24			
Fention sulfoxido	ESI (+)	295 > 280	60	26	295 > 109	60	51			
Fipronil	ESI (-)	435 > 330	-47	-24	435 > 250	-47	-50			
Fipronil desulfenil	ESI (-)	387 > 351	-59	-18	387 > 282	-59	-45			
Fipronil sulfona	ESI (-)	451 > 415	-48	-24	451 > 282	-48	-41			
Fipronil sulfuro	ESI (-)	419 > 262	-74	-39	419 > 314	-74	-27			
Fludioxonil	ESI (-)	247 > 180	-65	-40	247 > 126	-65	-42			
Flufenoxuron	ESI (+)	489 > 158	41	29	489 > 141	41	63			
Flumetsulam	ESI (+)	326 > 129	69	32	326 > 109	69	74			
Fluroxipir meptil	ESI (+)	367 > 209	61	32	369 > 211	58	34	367 > 181	61	47
Flusilazol	ESI (+)	316 > 247	100	26	316 > 165	100	40			
Fluvalinato	ESI (+)	520 > 208	31	23	520 > 181	31	41			
Haloxifop metil	ESI (+)	376 > 316	85	22	376 > 288	85	36			
Hexaconazol	ESI (+)	314 > 70	46	37	316 > 70	46	49	316 > 161	46	43
Hexitiazox	ESI (+)	353 > 228	70	23	353 > 168	70	34			
Imazalil	ESI (+)	297 > 159	56	32	299 > 161	46	30	297 > 201	56	24
Imazamox	ESI (+)	306 > 264	66	27	306 > 261	66	31	306 > 246	66	33
Imazapic	ESI (+)	276 > 86	48	36	276 > 145	48	50			

Imazapir	ESI (+)	262 > 217	56	28	262 > 220	56	24			
Imazetapir	ESI (+)	290 > 245	80	28	290 > 177	80	37			
Imidacloprid	ESI (+)	256 > 175	86	23	256 > 209	86	22			
Iprodione	ESI (+)	330 > 245	64	21	330 > 288	64	16			
Isoxadifen etil	ESI (+)	296 > 263	36	15	296 > 232	36	23	296 > 204	36	35
Linuron	ESI (+)	249 > 160	61	25	249 > 182	61	23			
Malaoxon	ESI (+)	315 > 127	66	17	315 > 99	66	31			
Malation	ESI (+)	331 > 285	56	11	331 > 99	56	35			
MCPA	ESI (-)	199 > 141	-60	-18	201 > 143	-55	-20	199 > 155	-60	-14
Metalaxil	ESI (+)	280 > 220	61	21	280 > 192	61	25			
Metamidofos	ESI (+)	142 > 94	26	19	142 > 125	26	19			
Metconazol	ESI (+)	320 > 70	36	55	322 > 70	31	51	320 > 125	31	53
Metiocarb	ESI (+)	226 > 169	78	13	226 > 121	78	26			
Metiocarb sulfona	ESI (+)	258 > 122	32	22	258 > 201	32	14			
Metiocarb sulfoxido	ESI (+)	242 > 185	33	17	242 > 122	33	37			
Metolaclor	ESI (+)	284 > 252	51	21	284 > 176	46	35			
Metomil	ESI (+)	163 > 106	44	14	163 > 122	44	7			
Metoxifenocide	ESI (+)	369 > 313	51	11	369 > 149	51	21			
Metsulfuron metil	ESI (+)	382 > 167	62	21	382 > 199	62	30	382 > 141	62	29
Paration metil	ESI (+)	264 > 232	71	23	264 > 125	71	27			
Penoxsulam	ESI (+)	484 > 195	100	40	484 > 326	100	38			
Picoxistrobin	ESI (+)	368 > 145	59	27	368 > 115	59	66	368 > 117	59	47
Piraclostrobina	ESI (+)	388 > 194	67	17	388 > 163	67	39			
Pirazosulfuron	ESI (+)	415 > 182	60	23	415 > 369	60	17	415 > 139	60	61
Pirimicarb	ESI (+)	239 > 72	51	37	239 > 182	51	23			
Pirimifos metil	ESI (+)	306 > 108	130	42	306 > 164	130	31			
Procloraz	ESI (+)	376 > 308	78	15	376 > 266	78	24			
Profenofos	ESI (+)	375 > 305	41	25	373 > 303	41	25	373 > 128	41	55
Propamocarb	ESI (+)	189 > 102	30	24	189 > 144	30	19			
Propanil	ESI (+)	218 > 162	64	23	218 > 127	64	36			
Propiconazol	ESI (+)	342 > 159	46	37	342 > 69	46	33			
Propoxur	ESI (+)	210 > 168	41	11	210 > 111	41	19			
Protiokonazol	ESI (-)	342 > 100	-89	-34	342 > 125	-89	-36	344 > 100	-80	-33
Saflufenacil	ESI (+)	501 > 459	82	20	501 > 349	82	40	501 > 198	82	61
Simazina	ESI (+)	202 > 132	71	27	202 > 104	66	37	204 > 134	51	27
Sulfentrazona	ESI (+)	404 > 307	40	39	387 > 307	52	30			
Tebuconazol	ESI (+)	308 > 70	85	40	308 > 125	85	53			
Tebufenocida	ESI (+)	353 > 297	41	11	353 > 133	41	23			
Terbacilo	ESI (-)	215 > 159	-74	-23	217 > 161	-83	-23			
Terbutilazina	ESI (+)	230 > 174	47	22	232 > 176	41	23	230 > 104	47	45
Tetraconazol	ESI (+)	372 > 159	88	39	372 > 70	88	65			
Tiabendazol	ESI (+)	202 > 175	100	34	202 > 131	100	43			
Tiacloprid	ESI (+)	253 > 126	98	28	255 > 128	98	25	253 > 186	98	19
Tiametoxan	ESI (+)	292 > 211	88	10	292 > 181	88	29	292 > 246	88	10
Tiodicarb	ESI (+)	355 > 88	61	33	355 > 108	61	21			
Triciclazol	ESI (+)	190 > 136	110	39	190 > 163	110	31			
Triclopir	ESI (-)	253 > 195	-40	-13	253 > 217	-40	-9			
Triclorfon	ESI (+)	276 > 109	36	31	274 > 109	39	31	276 > 257	56	11
Trifloxiestrobina	ESI (+)	409 > 186	50	22	409 > 206	50	18			
Triflumuron	ESI (-)	357 > 153	-16	-14	357 > 176	-16	-22			

3.2.3. Condiciones experimentales de GC-MS/MS

El análisis por GC-MS/MS se realizó con un equipo GCMS-TQ8040 de Shimadzu compuesto por un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de tipo triple cuadrupolo. Se inyectó 1 μL de los extractos en modo *splitless*. La temperatura del inyector fue 250 $^{\circ}\text{C}$, y el gas *carrier* fue helio a un flujo constante de 1 mL min^{-1} . La separación cromatográfica se realizó en una columna Rxi®-5Sil MS (5% difenil / 95% dimetil polisiloxano; 30 m; 0,25 mm *id*; 0,25 μm *df*) de Restek. El programa de temperatura utilizado se puede observar en la Figura 7. La temperatura de la interfase fue de 250 $^{\circ}\text{C}$ y la de la fuente de ionización 230 $^{\circ}\text{C}$. El modo de ionización utilizado fue ionización electrónica (70 eV). La detección fue realizada con un voltaje del detector de 1,5 kV. El gas de colisión fue argón a una presión constante de 200 kPa. Se trabajó en modo MRM utilizando las transiciones y energías de colisión previamente optimizadas para cada compuesto (Tabla 4).

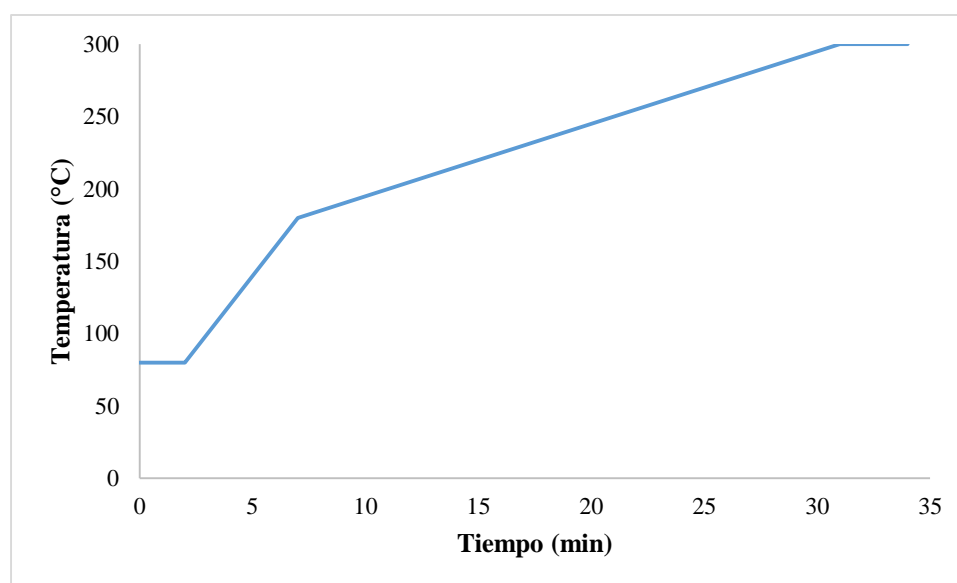


Figura 7. Programa de temperatura del horno utilizado en GC-MS/MS.

Tabla 4. Transiciones y energías de colisión (CE) a empleadas en el análisis por GC-MS/MS.

Pesticida	Primera transición ($m/z > m/z$)	CE (V)	Segunda transición ($m/z > m/z$)	CE (V)	Tercera transición ($m/z > m/z$)	CE (V)
Acetoclor	223 > 132	22	223 > 147	10	223 > 174	8
Alaclor	188 > 160	10	188 > 132	18	188 > 117	26
Aldrin	263 > 193	28	263 > 203	26	263 > 191	34

Ametrina	227 > 170	14	227 > 185	6	227 > 58	14
Azinfos metil	160 > 132	6	160 > 77	20	160 > 51	28
Azoxiestrobrina	344 > 329	16	344 > 183	24	344 > 156	32
Bifentrin	181 > 166	12	181 > 179	12	181 > 153	8
Boscalid	342 > 140	14	342 > 112	28	342 > 204	8
Bromopropilato	341 > 183	18	341 > 185	20	341 > 157	30
Carbofuran	164 > 149	8	164 > 131	18	164 > 103	24
Cialotrina	197 > 141	12	197 > 161	8		
Ciflutrina	226 > 206	14	226 > 199	6	226 > 151	28
Cihalofop butil	357 > 256	10	357 > 229	14	357 > 120	24
Cipermetrina	181 > 152	22	181 > 127	22	181 > 77	24
Clomazone	204 > 107	20	204 > 78	26	204 > 68	24
Clorantraniliprol	278 > 249	20	280 > 251	20		
Clordano, cis-	373 > 264	28	373 > 266	22	373 > 337	10
Clordano, trans-	373 > 264	28	373 > 266	22	373 > 337	10
Clorotalonil	266 > 231	14	266 > 168	22	266 > 133	28
Clorpirifos	314 > 258	14	314 > 287	8	314 > 194	28
Clorpirifos metil	286 > 93	22	286 > 271	14	286 > 241	26
DDD, o,p'-	235 > 165	24	235 > 199	14	235 > 99	30
DDD, p,p'-	235 > 165	24	235 > 199	14	235 > 99	30
DDE, o,p'-	246 > 176	30	246 > 211	22	246 > 220	24
DDE, p,p'-	246 > 176	30	246 > 211	22	246 > 220	24
DDT, o,p'-	235 > 165	24	235 > 199	16	235 > 149	40
DDT, p,p'-	235 > 165	24	235 > 199	16	235 > 149	40
Deltametrina	253 > 93	20	253 > 172	8	253 > 77	26
Diazinon	304 > 179	10	304 > 162	8	304 > 137	26
Dieldrin	277 > 241	8	277 > 170	38	277 > 172	38
Difenoconazol	323 > 265	14	323 > 202	28	323 > 209	28
Endosulfan sulfato	387 > 289	10	387 > 253	16	387 > 241	22
Endosulfan, alfa-	339 > 160	18	339 > 267	8	339 > 196	20
Endosulfan, beta-	339 > 160	18	339 > 267	8	339 > 196	20
Epoxiconazol	192 > 138	14	192 > 111	26	192 > 165	8
Etion	231 > 175	14	231 > 185	12	231 > 129	24
Fention	278 > 109	20	278 > 125	20	278 > 169	14
Fenvalerato	419 > 225	6	419 > 167	12	419 > 125	26
Fipronil	367 > 213	30	367 > 255	22	367 > 332	14
Fluvalinato	250 > 55	20	250 > 200	20	250 > 208	20
HCH, alfa-	219 > 183	8	219 > 145	20	219 > 109	28
HCH, beta-	219 > 183	8	219 > 145	20	219 > 109	28
HCH, delta-	219 > 183	8	219 > 145	20	219 > 109	28
HCH, gama-	219 > 183	8	219 > 145	20	219 > 109	28
Heptaclor	272 > 237	20	272 > 117	32	272 > 202	38
Heptaclor epoxido, cis-	353 > 263	14	353 > 282	12	353 > 317	10
Hexaclorobenceno	284 > 249	24	284 > 214	28	284 > 177	38
Iprodione	314 > 245	12	314 > 56	22	314 > 271	8
Isoxadifen etil	294 > 204	16	294 > 266	6	294 > 177	28
Kresoxim metil	206 > 116	6	206 > 131	14	206 > 59	16
Malation	173 > 99	14	173 > 127	6	173 > 145	6
Metalaxil	249 > 190	8	249 > 146	22	249 > 217	6
Metidation	145 > 85	8	145 > 58	14		
Metiocarb	168 > 153	8	168 > 109	14	168 > 45	22
Metolaclor	238 > 162	12	238 > 133	26	238 > 77	24
Metoxicloro	227 > 169	24	227 > 212	14	227 > 141	28

Metribuzin	198 > 82	14	198 > 110	10	198 > 153	8
Mirex	272 > 237	18	274 > 239	18		
Oxifluorfen	361 > 300	14	361 > 252	20	361 > 317	6
Paration	291 > 109	14	291 > 137	6	291 > 81	24
Paration metil	263 > 109	14	263 > 136	8	263 > 246	6
Permetrina	183 > 153	14	183 > 168	14	183 > 165	14
Pirimetanol	198 > 183	14	198 > 158	18	198 > 118	28
Pirimifos metil	305 > 290	12	305 > 180	8	305 > 125	28
Profenofos	337 > 267	14	337 > 309	6	337 > 295	10
Simazina	201 > 173	6	201 > 186	6	201 > 138	12
Tebuconazol	250 > 125	22	250 > 153	12	250 > 70	12
Tetradifon	356 > 229	12	356 > 159	18	356 > 127	16
Trifluralina	306 > 264	8	306 > 206	14	264 > 206	8
Vinclozolin	285 > 212	12	285 > 178	14	285 > 241	4

3.2.4. Blancos analíticos

Las muestras de macroinvertebrados acuáticos utilizadas como blanco analítico fueron obtenidas próximas a las nacientes del arroyo Sacra en el departamento de Paysandú, Uruguay (latitud 32°22'13.51"S, longitud 57°57'31.42"O). En este lugar, la principal actividad productiva es la ganadería extensiva.

Los blancos de cera, miel y polen fueron muestras adquiridas en el mercado local, mientras que las abejas provenían de muestreos de proyectos anteriores mantenidas en congelador a -18°C.

En todos los casos se realizaron análisis de residuos de pesticidas para comprobar la ausencia de los mismos.

3.2.5. Fortificación

En todos los casos, el procedimiento de fortificación consistió en agregar la cantidad de pesticida necesaria para cada nivel de concentración a partir de las soluciones de trabajo preparadas, en cada uno de los tubos de extracción. Las fortificaciones se realizaron sobre la matriz blanco antes de aplicar el procedimiento de preparación de extracción.

3.2.6. Preparación de muestras

3.2.6.1. Abejas

Extracción: Se pesan 2 g de muestra homogeneizada en un tubo de 50 mL para centrífuga. Se adicionan 5 mL de agua y 10 mL de acetonitrilo (MeCN), agitando vigorosamente durante 1 minuto. Se agregan sales buffer citrato (4 g de MgSO₄ anhidro, 1 g de NaCl, 1

g de citrato de sodio dihidratado y 0,5 g de citrato de sodio dibásico sesquihidratado), agitando nuevamente durante 1 minuto. El tubo se centrifuga 5 min a 5000 xg.

Purificación: Primero, se realiza *freeze-out*, colocando el extracto en congelador a -18 °C durante toda la noche y al día siguiente es filtrado inmediatamente al sacar del congelador utilizando un embudo con algodón. Luego, se realiza una extracción en fase sólida dispersiva (*d-SPE*) en un tubo de 15 mL con PSA y C18 25 mg mL⁻¹ y MgSO₄:GCB (59:1) 150 mg mL⁻¹, se agita en vortex durante 30 s y se centrifuga 5 minutos a 5000 xg. El extracto se filtra con filtro de PVDF de 0,45 µm y se acidifica con 10 µL mL⁻¹ de una solución de ácido fórmico 5% en MeCN.

Se toma una alícuota de 1 mL y se transfiere a un vial para analizar por LC-MS/MS. Otra alícuota de 1 mL de extracto se lleva a sequedad bajo corriente de N₂ y se redisuelve en 200 µL de acetato de etilo (AcOEt); luego se transfiere a un vial con inserto para analizar en GC-MS/MS.

3.2.6.2. Cera

Extracción: Se pesan 2 g de muestra homogeneizada y se adicionan 10 mL de MeCN. Se coloca el tubo en un baño de agua a 80 °C hasta que la cera funde. Se agita vigorosamente durante aproximadamente 10 segundos y se vuelve a colocar en el baño de agua; esta operación se repite 3-4 veces. Se retira el tubo del baño de agua y se espera a que alcance la temperatura ambiente. El tubo se centrifuga 5 min a 5000 xg.

Purificación: 1) *freeze-out* a -18 °C durante 2 h, 2) extracción L-L con 3 mL de hexano agitando en vortex durante 30 s, se toma la fase inferior correspondiente al extracto en MeCN, 3) *d-SPE* con PSA y C18 25 mg mL⁻¹ agitando en vortex durante 30 s. El tubo se centrifuga 5 minutos a 5000 xg. El extracto se filtra y se acidifica con 10 µL mL⁻¹ de ácido fórmico 5% en MeCN.

Se toma una alícuota de 1 mL y se transfiere a un vial para analizar por LC-MS/MS. Otra alícuota de 1 mL de extracto se lleva a sequedad bajo corriente de N₂ y se redisuelve en 200 µL de acetato de etilo (AcOEt); luego se transfiere a un vial con inserto para analizar en GC-MS/MS.

3.2.6.3. Miel

Extracción: Se pesan 5 g de muestra homogeneizada y se adicionan 10 mL de agua y 10 mL de MeCN, agitando vigorosamente durante 1 minuto. Se agregan sales buffer citrato, agitando durante 1 minuto. El tubo se centrifuga 5 min a 5000 xg.

Purificación: *d-SPE* con PSA 25 mg mL⁻¹ y MgSO₄ 150 mg mL⁻¹ agitando en vortex durante 30 s. El tubo se centrifuga 5 minutos a 5000 xg. El extracto se filtra y se acidifica con 10 µL mL⁻¹ de ácido fórmico 5% en MeCN.

Se toma una alícuota de 1 mL y se transfiere a un vial para analizar por LC-MS/MS. Otra alícuota de 1 mL de extracto se lleva a sequedad bajo corriente de N₂ y se redisuelve en 200 µL de acetato de etilo (AcOEt); luego se transfiere a un vial con inserto para analizar en GC-MS/MS.

3.2.6.4. Polen

3.2.6.4.1. Método acético/acetato

Extracción: Se pesan 5 g de muestra homogeneizada y se adicionan 5 mL de agua y 10 mL de MeCN, agitando vigorosamente durante 1 minuto. Se 4 g de MgSO₄ anhidro, 1 g de citrato de acetato de sodio y 100 µL de ácido acético, agitando nuevamente durante 1 minuto. El tubo se centrifuga 5 min a 5000 xg.

Purificación: 1) *freeze-out* a -18 °C durante toda la noche, 2) *d-SPE* con PSA y C18 50 mg mL⁻¹ y MgSO₄ 150 mg mL⁻¹, agitando en vortex durante 30 s. Centrifugar 5 minutos a 5000 xg.

Se toma una alícuota de 1 mL y se transfiere a un vial para analizar por LC-MS/MS. Otra alícuota de 1 mL de extracto se lleva a sequedad bajo corriente de N₂ y se redisuelve en 200 µL de acetato de etilo (AcOEt); luego se transfiere a un vial con inserto para analizar en GC-MS/MS.

3.2.6.4.2. Método cítrico/citrato

Extracción: Se pesan 5 g de muestra homogeneizada y se adicionan 5 mL de agua y 10 mL de MeCN, agitando vigorosamente durante 1 minuto. Se agregan sales buffer citrato, agitando nuevamente durante 1 minuto. El tubo se centrifuga 5 min a 5000 xg.

Purificación: 1) *freeze-out* a -18 °C durante al menos 4 h, 2) *d-SPE* con PSA y C18 50 mg mL⁻¹ y MgSO₄ 150 mg mL⁻¹, agitando en vortex durante 30 s. Centrifugar 5 minutos a 5000 xg. El extracto se filtra y se acidifica con 10 µL mL⁻¹ de ácido fórmico 5% en MeCN.

Se toma una alícuota de 1 mL y se transfiere a un vial para analizar por LC-MS/MS. Otra alícuota de 1 mL de extracto se lleva a sequedad bajo corriente de N₂ y se redisuelve en 200 µL de acetato de etilo (AcOEt); luego se transfiere a un vial con inserto para analizar en GC-MS/MS.

3.2.6.5. Ninfas de Odonata

Extracción: Se pesan 0,2 g de muestra homogeneizada en un microtubo de 2 mL para centrífuga. Se adicionan 0,5 mL de agua y 1 mL de MeCN, agitando en vortex durante 1 minuto. Se agregan sales buffer citrato (0,4 g de MgSO₄ anhidro, 0,1 g de NaCl, 0,1 g de citrato de sodio dihidratado y 0,05 g de citrato de sodio dibásico sesquihidratado), agitando nuevamente durante 1 minuto. El tubo se centrifuga 5 min a 5000 xg.

Purificación: *d-SPE* con C18 25 mg mL⁻¹ y MgSO₄:GCB (59:1) 150 mg mL⁻¹, agitando en vortex durante 30 s. Se centrifuga 5 minutos a 5000 xg. El extracto se filtra con filtro de PVDF de 0,45 µm.

Se toma una alícuota de 100 µL y se transfiere a un vial con inserto para analizar por LC-MS/MS. Otra alícuota de 500 µL de extracto se lleva a sequedad bajo corriente de N₂ y se redisuelve en 50 µL de AcOEt; luego se transfiere a un vial con inserto para inyectar en GC-MS/MS.

3.2.6.6. Corbicula

Extracción: Se pesan 0,2 g de muestra homogeneizada en un microtubo de 2 mL para centrífuga. Se adicionan 0,5 mL de agua y 1 mL de MeCN, agitando en vortex durante 1 minuto. Se agregan sales buffer citrato agitando nuevamente durante 1 minuto. El tubo se centrifuga 5 min a 5000 xg.

Purificación: *d-SPE* con C18 25 mg mL⁻¹ y MgSO₄ 150 mg mL⁻¹, agitando en vortex durante 30 s. Se centrifuga 5 minutos a 5000 xg. El extracto se filtra con filtro de PVDF de 0,45 µm.

Se toma una alícuota de 100 µL y se transfiere a un vial con inserto para analizar por LC-MS/MS. Otra alícuota de 500 µL de extracto se lleva a sequedad bajo corriente de N₂ y se redisuelve en 50 µL de AcOEt; luego se transfiere a un vial con inserto para inyectar en GC-MS/MS.

3.2.6.7. Aegla

Extracción: Se pesan 0,2 g de muestra homogeneizada en un microtubo de 2 mL para centrífuga. Se adicionan 0,5 mL de agua y 1 mL de MeCN, agitando en vortex durante 1 minuto. Se agregan sales buffer citrato agitando nuevamente durante 1 minuto. El tubo se centrifuga 5 min a 5000 xg.

Purificación: *d-SPE* con C18 25 mg mL⁻¹ y MgSO₄:GCB (59:1) 150 mg mL⁻¹, agitando en vortex durante 30 s. Se centrifuga 5 minutos a 5000 xg. El extracto se filtra con filtro de PVDF de 0,45 μm.

Se toma una alícuota de 100 μL y se transfiere a un vial con inserto para analizar por LC-MS/MS. Otra alícuota de 500 μL de extracto se lleva a sequedad bajo corriente de N₂ y se redisuelve en 50 μL de AcOEt; luego se transfiere a un vial con inserto para inyectar en GC-MS/MS.

3.2.7. Validación de las metodologías desarrolladas

Para la validación de las metodologías analíticas se siguieron los criterios del documento SANTE/11813/2017 de la Unión Europea. Los parámetros evaluados fueron: veracidad (porcentaje de recuperación), precisión (repetitividad RSD_r), linealidad, efecto matriz, límite de cuantificación (LOQ). Las pruebas se llevaron a cabo al menos a dos niveles de concentración con 5 réplicas cada uno.

Según el documento SANTE, la RSD_r es una estimación de la precisión del método. Se calcula como la desviación estándar relativa (coeficiente de variación, Ecuación 2) de las cinco repeticiones de la prueba de recuperación de cada analito, obtenida utilizando el mismo método en la misma muestra en un solo laboratorio durante un período corto de tiempo, durante el cual no hay diferencias entre los materiales y equipos utilizados y los analistas involucrados. Los límites de cuantificación se definen como la concentración más baja del analito que se ha validado con una exactitud y precisión aceptables (recuperaciones entre 70 y 120% y RSDs < 20%) aplicando el método analítico completo.

$$RSD(\%) = \frac{\sigma}{Rec_{promedio}} \times 100$$

Ecuación 2. Cálculo de desviación estándar relativa en porcentaje, con σ = desviación estándar.

Las curvas de calibración en matriz y en disolvente fueron comparadas para cuantificar el efecto matriz. El porcentaje de efecto matriz se calculó como el porcentaje de la diferencia entre la pendiente de la curva en matriz con respecto a la pendiente de la curva en solvente (Ecuación 3).

$$EM(\%) = \frac{pend_{mm} - pend_s}{pend_s} \times 100$$

Ecuación 3. Cálculo del porcentaje de efecto matriz.

3.3. Resultados y discusión

Se desarrollaron y validaron métodos para las distintas matrices ambientales estudiadas. La validación se realizó verificando los parámetros sugeridos en el documento SANTE/11813/2017. Una mención especial merece el caso del estudio efecto matriz por GC-MS/MS. El efecto matriz en GC se debe fundamentalmente a la degradación de analitos durante la corrida cromatográfica, fundamentalmente en el *liner* durante el proceso de inyección. Es conocido el efecto "protector de analitos" de los extractivos en el análisis de pesticidas y este fenómeno se observó en todos los casos. Este efecto fue muy pronunciado (>> 50%). Incluso, debido a las bajas concentraciones que se necesita evaluar en estas matrices en algunos casos no se obtenía señal de los compuestos en disolvente, pero sí en matriz. Por este motivo, resultó inviable realizar el cálculo de porcentaje de efecto matriz para las matrices del estudio por GC-MS/MS. Cabe resaltar que, por haberse comprobado que el efecto matriz en este instrumental es muy pronunciado, se abordó este problema considerando que para la cuantificación de las muestras reales, se utilizaron curvas de calibración preparadas en su matriz correspondiente para cada lote de muestras analizado.

3.3.1. Metodologías de análisis multiresiduo de pesticidas en abejas y productos de la colmena

La primera etapa de este trabajo consistió en la ampliación del alcance de las metodologías de análisis multiresiduo de pesticidas en abejas y productos de la colmena: cera, miel y polen. En el caso de estas matrices, se contaba con estudios previos y métodos desarrollados y validados para un conjunto de 40 pesticidas por LC-MS/MS y GC-MS, cuyos alcances y límites de cuantificación se detallan en la Tabla 5 [16], [102]–[104].

Tabla 5. Alcance y límites de cuantificación (LOQ) de las metodologías utilizadas previamente para el análisis de residuos de pesticidas en abejas y productos de la colmena

Abejas	Cera	Miel	Polen
--------	------	------	-------

Pesticida	Técnica instrumental	LOQ (mg kg⁻¹)	LOQ (mg kg⁻¹)	LOQ (mg kg⁻¹)	LOQ (mg kg⁻¹)
Acetamiprid	LC-MS/MS	0,001	0,001	0,001	0,001
Atrazina	LC-MS/MS	0,001	0,001	0,001	0,001
Azoxiestrobina	LC-MS/MS	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Boscalid	LC-MS/MS	0,001	0,001	0,001	0,001
Bromopropilato	GC-MS	0,1	0,1	0,1	na
Carbaril	LC-MS/MS	0,001	0,0001	0,001	0,001
Carbendazim	LC-MS/MS	0,001	0,001	0,0001	0,0001
Cialotrina, lambda-	GC-MS	0,1	0,1	0,1	0,05
Ciflutrina	GC-MS	0,1	0,1	0,1	na
Cipermetrina	GC-MS	0,1	0,1	0,1	0,1
Clorotalonil	GC-MS	0,1	0,1	0,1	0,1
Clorpirifos	GC-MS	0,1	0,1	0,1	0,05
Clorpirifos metil	GC-MS	0,1	0,1	0,1	0,05
Clotianidina	LC-MS/MS	0,001	0,001	0,0001	0,0001
Cumafos	LC-MS/MS	0,01	0,0001	0,0001	0,0001
DDE, p,p-	GC-MS	0,1	0,1	0,1	0,05
DDT, p,p-	GC-MS	0,1	0,1	0,1	0,05
Deltametrina	GC-MS	0,1	0,1	0,1	na
Diazinon	GC-MS	0,1	0,1	0,1	0,05
Dimetoato	LC-MS/MS	0,0001	0,001	0,001	0,001
Endosulfan sulfato	GC-MS	0,1	0,1	0,1	0,05
Endosulfan, alfa-	GC-MS	0,1	0,1	0,1	na
Endosulfan, beta-	GC-MS	0,1	0,1	0,1	na
Etion	GC-MS	0,1	0,1	0,1	na
Fipronil	GC-MS	0,1	0,1	0,1	0,05
Fluvalinato	GC-MS	0,1	0,1	0,1	0,05
Haloxifop metil	LC-MS/MS	0,0001	0,001	0,001	0,001
Hexitiazox	LC-MS/MS	0,001	0,001	0,001	0,001
Imazalil	LC-MS/MS	0,05	na	0,001	0,001
Imidacloprid	LC-MS/MS	0,01	0,001	0,001	0,001
Iprodione	LC-MS/MS	0,01	0,001	0,001	0,001
Malation	GC-MS	0,1	0,1	0,1	na
Metidation	GC-MS	0,1	0,1	0,1	0,1
Metomil	LC-MS/MS	0,0001	0,001	0,001	0,001
Paration metil	LC-MS/MS	0,2	na	na	na
Piraclostrobina	LC-MS/MS	0,001	0,001	0,001	0,001
Tebuconazol	LC-MS/MS	0,001	0,0001	0,001	0,001
Tiacloprid	LC-MS/MS	0,001	0,001	0,001	0,001
Tiametoxan	LC-MS/MS	0,001	0,001	0,001	0,001
Trifluralina	GC-MS	0,1	0,1	0,1	0,1

na: no analizado

En este sentido, se procedió a ampliar el alcance de los métodos con los que ya se contaba para incluir un número mayor y más actualizado de compuestos y se incorporó además el análisis por GC-MS/MS, una técnica más sensible que GC-MS, con el fin de bajar el límite de cuantificación de los compuestos analizados por cromatografía de gases.

Para cada una de las cuatro matrices, siguiendo las directrices del documento SANTE/11813/2017, se realizó la validación de los compuestos a incorporar en el estudio. En el caso de los compuestos analizados por cromatografía líquida, se realizó este estudio para los que no se encontraban previamente validados y en el caso de los compuestos analizados por cromatografía gaseosa, los parámetros de validación fueron evaluados en todos los casos ya que se modificó el sistema de detección por uno más sensible (de cuadrupolo simple a triple cuadrupolo).

3.3.1.1. Preparación de muestras

Para la preparación de muestras de abejas, cera y miel se decidió mantener los métodos de extracción de residuos de pesticidas con los que ya se contaba. Para polen, sin embargo, se debió desarrollar y validar una metodología diferente a la original, modificando el *buffer* utilizado en la etapa de extracción/partición. Todos los métodos de extracción utilizados fueron del tipo QuEChERS y se encuentran descritos en el apartado 3.2. del presente trabajo y se esquematizan en la Tabla 6.

Tabla 6. Comparación de los métodos de extracción utilizados para abejas y productos de la colmena

Método	Matriz				
	Abejas	Cera	Miel	Polen acético/acetato	Polen cítrico/citrato
Masa de muestra (g)	2	2	5	5	5
Agregado de agua (mL)	5	-	10	5	5
Disolvente de extracción (mL)	MeCN (10)	MeCN (10)	MeCN (10)	MeCN (10)	MeCN (10)
Partición	MgSO ₄ (4 g) + NaCl (1 g)	-	MgSO ₄ (4 g) + NaCl (1 g)	MgSO ₄ (4 g)	MgSO ₄ (4 g) + NaCl (1 g)
Ajuste de pH en partición	Buffer cítrico/citrato	-	Buffer cítrico/citrato	Buffer acético/acetato	Buffer cítrico/citrato
<i>Freeze-out</i>	Toda la noche	2 h	-	Toda la noche	4 h
Extracción L-L (mL)	-	Hexano (3)	-	-	-
<i>d-SPE clean-up</i>	MgSO ₄ :GCB (59:1) (150) + PSA (25) + C18 (25)	PSA (25) + C18 (25)	MgSO ₄ (150) + PSA (25)	MgSO ₄ (150) + PSA (50) + C18 (50)	MgSO ₄ (150) + PSA (50) + C18 (50)
Factor de concentración LC	-	-	-	-	-
Disolvente de inyección LC	MeCN	MeCN	MeCN	MeCN	MeCN
Concentración de matriz LC (g mL ⁻¹)	0,2	0,2	0,5	0,5	0,5
Factor de concentración GC	x 5	x 5	x 5	x 5	x 5
Disolvente de inyección GC	AcOEt	AcOEt	AcOEt	AcOEt	AcOEt

Es de destacar que esta estrategia de preparación de muestras (QuEChERS) permite la extracción simultánea de una gran variedad de pesticidas con diferentes propiedades fisicoquímicas. Por lo tanto, a partir de un mismo extracto de la muestra, se tomó una alícuota para analizar los compuestos compatibles con cromatografía líquida y otra alícuota para analizar los compuestos compatibles con cromatografía gaseosa, ahorrando de esta manera tiempo y dinero, y reduciendo los desechos. En el caso del análisis por LC-MS/MS se realizó la inyección directa de los extractos finales en acetonitrilo. Sin embargo, para el análisis por GC-MS/MS, se optó por concentrar los extractos 5 veces para alcanzar los límites de cuantificación deseados, y realizar cambio de disolvente de inyección por acetato de etilo.

3.3.1.2. Validación de metodologías de análisis de residuos de pesticidas

3.3.1.2.1. Abejas

Veracidad y precisión

La veracidad de los métodos se evaluó a través de los porcentajes de recuperación, mientras que la precisión se evaluó a través de la desviación estándar relativa (RSD). Para esto, se llevaron a cabo ensayos de fortificación por quintuplicado en matriz blanco (libre de los pesticidas de interés) de abejas con una solución que contenía todos los compuestos a ser evaluados, a diferentes niveles de concentración. Los ensayos de fortificación se realizaron a 0,001, 0,005 y 0,01 mg kg⁻¹. Por LC-MS/MS, se lograron validar 24 nuevos compuestos. Los porcentajes de recuperación obtenidos estuvieron entre 71% y 118% con RSDs entre 2% y 18% para 23 compuestos mientras que para diclosulam la recuperación fue de 64% para el nivel de 0,005 mg kg⁻¹ con RSD de 5% (Tabla 7). Por GC-MS/MS, se analizaron los niveles de concentración de 0,005 y 0,01 mg kg⁻¹, ya que al ser GC-MS/MS una técnica menos sensible que LC-MS/MS, no fue posible detectar los compuestos a 0,001 mg kg⁻¹ (para ninguna matriz). Porcentajes de recuperación entre 69% y 120% con RSDs menores o iguales a 20% fueron obtenidos para 42 pesticidas validados en abejas por GC (Tabla 8). De estos 42 compuestos, 29 corresponden a nuevos pesticidas validados por GC-MS/MS con respecto al alcance del método original.

Límite de cuantificación

Los límites de cuantificación (LOQ) fueron considerados como los niveles validados más bajos, es decir, los niveles más bajos en los que se lograron recuperaciones aceptables (70-120 %) y RSDs menores a 20%. Para los pesticidas analizados por LC-MS/MS, los límites de cuantificación obtenidos fueron 0,001 mg kg⁻¹ para 13 compuestos, 0,005 mg kg⁻¹ para otros 10 y 0,01 mg kg⁻¹ para el compuesto restante (diclosulam) (Tabla 7). Para los pesticidas analizados por GC-MS/MS, el límite de cuantificación fue 0,005 mg kg⁻¹ para 36 compuestos, 0,01 mg kg⁻¹ para otros 6 y 0,1 mg kg⁻¹ para 7 pesticidas que se encontraban en el alcance original del método a los cuales no fue posible bajar el límite de cuantificación (cipermetrina, clorotalonil, deltametrina, endosulfan sulfato, endosulfan alfa, endosulfan beta y fluvalinato) (Tabla 8).

Linealidad y efecto matriz

Para los compuestos analizados por LC-MS/MS, las curvas de calibración en disolvente y en matriz se construyeron a partir de los estándares a siete niveles de concentración entre 0,0005 y 0,015 mg kg⁻¹. El rango lineal fue determinado mediante el criterio establecido en el documento SANTE, según el cual para cada nivel de concentración de calibración, la desviación de la concentración re-calculada utilizando la curva en matriz con respecto a la concentración verdadera o teórica (Ecuación 4), no puede ser excedida en más de un 20% en valor absoluto. Para la mayoría de los compuestos, el rango lineal estuvo entre 0,001 y 0,015 mg kg⁻¹ (Tabla 7).

$$\text{Desviación de la concentración re - calculada (\%)} = 100 \times \frac{C_{\text{re-calculada}} - C_{\text{teórica}}}{C_{\text{teórica}}}$$

Ecuación 4. Cálculo del porcentaje de desviación de la concentración re-calculada mediante la curva de calibración.

El efecto matriz se evaluó comparando las pendientes de la curva de calibración en matriz y la curva de calibración en disolvente (acetonitrilo) en el mismo rango de concentración. En la Figura 8 se muestra el efecto matriz de los nuevos pesticidas validados por LC-MS/MS. En la mayoría de los casos fue bajo (menor a 20% en valor absoluto), excepto para atrazina desisopropil, fipronil y terbacilo, que presentaron efecto matriz moderado (entre -20% y 20%). Además, la mayoría de los compuestos presentaron supresión de la señal (efecto matriz negativo), excepto atrazina desisopropil, diuron, fipronil, fluroxipir

meptil, metiocarb y propanil. Esto se explica por el hecho de que el efecto matriz depende de si un analito coeluye con los componentes de la matriz que fueron coextraídos, afectando la eficiencia de ionización de las moléculas de los analitos en la fuente de ionización por *Electrospray* y por lo tanto, provocando una disminución de la señal.

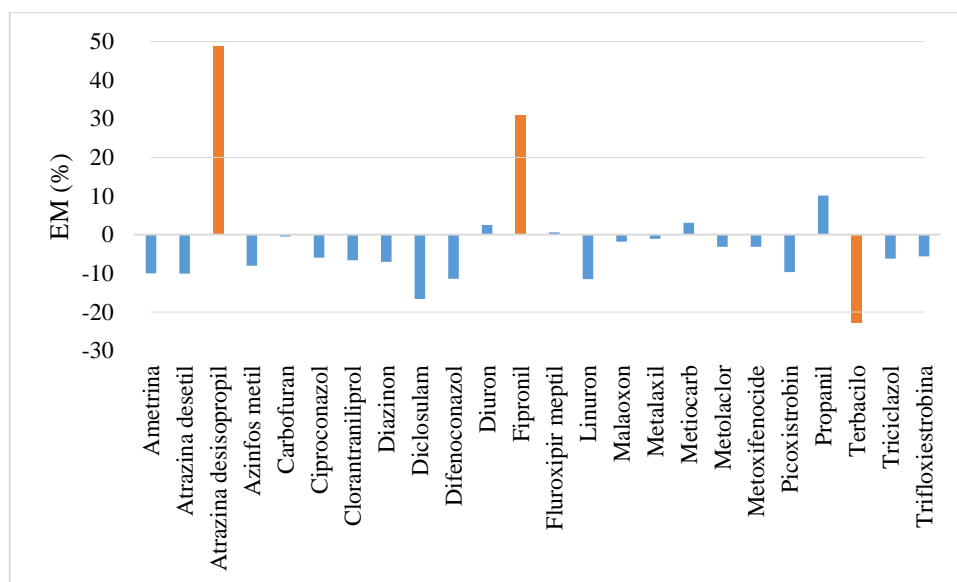


Figura 8. Efecto matriz (EM) de los nuevos pesticidas validados por LC-MS/MS en abejas (en azul EM bajo, en anaranjado EM moderado)

Para los compuestos analizados por GC-MS/MS, la linealidad se evaluó entre 0,005 y 0,2 mg kg⁻¹, resultando que para la mayoría el rango lineal estuvo entre 0,005 y 0,1 mg kg⁻¹ (Tabla 8).

Alcance final

En resumen, por LC se logró tener un alcance de 43 pesticidas mientras que por GC el alcance fue de 49. Del total de compuestos validados en esta matriz, 4 se validaron por ambas técnicas. Por lo tanto, el alcance final del método se amplió de 40 a 88 pesticidas.

Tabla 7. Recuperaciones, desviaciones estándar relativas (RSD), límites de cuantificación (LOQ), rangos lineales y efecto matriz obtenidos para los nuevos pesticidas analizados por LC-MS/MS en abejas

Pesticida	0,001 mg kg ⁻¹		0,005 mg kg ⁻¹		0,010 mg kg ⁻¹		LOQ (mg kg ⁻¹)	Rango lineal (mg kg ⁻¹)	Efecto matriz (%)
	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)			
2,4-D	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Acefato	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Acetoclor	na	-	na	-	na	-	-	-	-
Alaclor	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Ametrina	95	6	97	6	88	6	0,001	0,0005-0,015	-10
Atrazina desetil	nd	-	105	2	95	8	0,005	0,0025-0,015	-10
Atrazina									
desisopropil	nd	-	94	15	99	14	0,005	0,005-0,015	49
Azinfos metil	86	18	102	3	93	5	0,001	0,0005-0,015	-8
Bispiribac	nd	-	nd	-	9	15	-	0,001-0,015	10
Carbofuran	nd	-	101	6	103	8	0,005	0,005-0,015	0
Ciproconazol	nd	-	93	9	92	12	0,005	0,005-0,015	-6
Clorantraniliprol	nd	-	96	14	97	7	0,005	0,005-0,015	-7
Clorsulfuron	nd	-	53	14	52	5	-	0,001-0,015	1
Diazinon	97	18	93	5	88	6	0,001	0,0005-0,015	-7
Dicamba	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Diclosulam	nd	-	64	5	71	16	0,010	0,0025-0,015	-17
Difenoconazol	94	9	100	4	104	4	0,001	0,001-0,015	-11
Diuron	93	12	106	7	86	6	0,001	0,0005-0,015	2
Epoxiconazol	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Fipronil	99	7	78	4	89	9	0,001	0,0005-0,010	31
Flumetsulam	nd	-	56	11	43	9	-	0,005-0,015	24
Fluroxipir meptil	nd	-	96	12	104	15	0,005	0,0025-0,015	1
Imazapic	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Imazapir	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Imazetapir	nd	-	13	26	14	9	-	0,001-0,015	-4

Linuron	102	10	96	7	93	9	0,001	0,001-0,015	-11
Malaoxon	97	6	102	5	93	6	0,001	0,0005-0,015	-2
MCPA	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Metalaxil	96	12	99	3	87	5	0,001	0,001-0,015	-1
Metiocarb	nd	-	91	2	87	8	0,005	0,001-0,015	3
Metolaclor	nd	-	106	14	95	5	0,005	0,0025-0,015	-3
Metoxifenocide	90	7	95	4	95	7	0,001	0,0005-0,015	-3
Penoxsulam	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Picoxistrobin	nd	-	99	3	92	7	0,005	0,001-0,015	-10
Propamocarb	na	-	na	-	na	-	-	-	-
Propanil	nd	-	112	10	96	11	0,005	0,0025-0,015	10
Propiconazol	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Protioconazol	nd	-	198	8	185	7	-	0,005-0,015	-44
Tebufenocida	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Terbacilo	118	13	94	8	91	11	0,001	0,001-0,015	-23
Tiabendazol	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Triciclazol	92	7	87	6	84	6	0,001	0,001-0,015	-6
Triclorfon	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Trifloxiestrobina	84	12	95	5	87	6	0,001	0,0005-0,015	-6
Triflumuron	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-

nd: no detectado, na: no analizado

Tabla 8. Recuperaciones, desviaciones estándar relativas (RSD), límites de cuantificación (LOQ) y rangos lineales obtenidos para los nuevos pesticidas analizados por GC-MS/MS en abejas

Pesticida	0,005 mg kg ⁻¹		0,010 mg kg ⁻¹		LOQ (mg kg ⁻¹)	Rango lineal (mg kg ⁻¹)
	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)		
Acetoclor	96	6	104	7	0,005	0,005-0,100
Alaclor	73	18	84	12	0,005	0,005-0,200
Aldrin	70	10	95	16	0,005	0,005-0,100
Ametrina	na	-	na	-	-	-
Azinfos metil	na	-	na	-	-	-
Azoxiestrobina	na	-	na	-	-	-
Bifentrin	95	5	90	9	0,005	0,005-0,100
Boscalid	na	-	na	-	-	-
Bromopropilato	nd	-	73	14	0,010	0,005-0,100
Carbofuran	na	-	na	-	-	-
Cialotrina	90	17	88	19	0,005	0,005-0,100
Ciflutrina	51	78	84	19	0,010	0,005-0,200
Cihalofop butil	90	9	83	14	0,005	0,005-0,100
Cipermetrina	nd	-	nd	-	0,100	0,020-0,200
Clomazone	99	11	82	9	0,005	0,005-0,100
Clorantraniliprol	na	-	na	-	-	-
Clordano, cis-	96	12	104	26	-	-
Clordano, trans-	38	30	126	19	-	-
Clorotalonil	nd	-	nd	-	0,100	0,100-0,200
Clorpirifos	115	9	88	10	0,005	0,005-0,100
Clorpirifos metil	97	9	81	13	0,005	0,005-0,100
DDD, o,p'-	93	8	90	8	0,005	0,005-0,100
DDD, p,p'-	92	4	92	11	0,005	0,005-0,100
DDE, o,p'-	89	7	94	18	0,005	0,005-0,100
DDE, p,p'-	96	11	92	6	0,005	0,005-0,200
DDT, o,p'-	95	6	91	6	0,005	0,005-0,100
DDT, p,p'-	93	9	96	8	0,005	0,005-0,100
Deltametrina	nd	-	nd	-	0,100	0,050-0,200
Diazinon	44	31	69	15	0,010	0,005-0,100
Dieldrin	415	73	-	-	-	-
Difenoconazol	na	-	na	-	-	-
Endosulfan sulfato	nd	-	nd	-	0,100	0,050-0,200
Endosulfan, alfa-	nd	-	nd	-	0,100	0,050-0,200
Endosulfan, beta-	nd	-	nd	-	0,100	0,050-0,200
Epoxiconazol	99	3	96	8	0,005	0,005-0,100
Etion	113	10	94	13	0,005	0,005-0,100
Fention	nd	-	nd	-	-	-
Fenvalerato	nd	-	nd	-	-	-
Fipronil	111	12	82	14	0,005	0,005-0,100
Fluvalinato	nd	-	nd	-	0,100	0,005-0,100

HCH, alfa-	84	14	86	20	0,005	0,005-0,100
HCH, beta-	nd	-	nd	-	-	-
HCH, delta-	70	13	79	12	0,005	0,005-0,100
HCH, gama-	73	8	79	16	0,005	0,005-0,100
Heptaclor	89	14	89	17	0,005	0,005-0,100
Heptaclor epoxido, cis-	nd	-	nd	-	-	-
Hexaclorobenceno	58	17	68	34	-	-
Iprodione	na	-	na	-	-	-
Isoxadifen etil	80	10	92	19	0,005	0,005-0,100
Kresoxim metil	94	13	89	17	0,005	0,005-0,100
Malation	85	7	93	8	0,005	0,005-0,100
Metalaxil	na	-	na	-	-	-
Metidation	82	20	86	8	0,005	0,005-0,200
Metiocarb	na	-	na	-	-	-
Metolaclor	95	9	86	8	0,005	0,005-0,200
Metoxicloro	100	6	99	8	0,005	0,005-0,200
Metribuzin	78	13	73	13	0,005	0,005-0,200
Mirex	82	2	83	6	0,005	0,005-0,100
Oxifluorfen	77	9	93	10	0,005	0,005-0,100
Paration	nd	-	105	4	0,010	0,005-0,200
Paration metil	nd	-	117	15	0,010	0,005-0,100
Permetrina	99	17	101	16	0,005	0,005-0,100
Pirimetnil	84	6	84	5	0,005	0,005-0,100
Pirimifos metil	121	19	85	11	0,010	0,005-0,100
Profenofos	69	15	45	47	-	-
Simazina	83	12	85	9	0,005	0,005-0,100
Tebuconazol	na	-	na	-	-	-
Tetradifon	nd	-	nd	-	-	-
Trifluralina	71	10	75	8	0,005	0,005-0,100
Triticonazol	89	8	88	10	0,005	0,005-0,200
Vinclozolin	nd	-	nd	-	-	-

nd: no detectado, na: no analizado

3.3.1.2.2. Cera

Veracidad y precisión

Los ensayos de fortificación se realizaron a 0,001, 0,005 y 0,01 mg kg⁻¹ y además a 0,02 mg kg⁻¹ (sólo para algunos compuestos evaluados por GC). Por LC-MS/MS, se lograron validar 20 nuevos compuestos. Los porcentajes de recuperación obtenidos estuvieron entre 72% y 108%, con RSDs entre 2% y 17% (Tabla 9). Por GC-MS/MS, se analizaron los niveles de concentración de 0,005, 0,01 y 0,02 mg kg⁻¹. Porcentajes de recuperación entre 70% y 115% con RSDs menores o iguales a 20% fueron obtenidos para 39

compuestos, 28 de los cuales corresponden a nuevos pesticidas validados por GC-MS/MS con respecto al alcance del método original (Tabla 10).

Límite de cuantificación

Para los pesticidas analizados por LC-MS/MS, los límites de cuantificación obtenidos fueron 0,001 mg kg⁻¹ para 12 compuestos y 0,005 mg kg⁻¹ para los 8 restantes (Tabla 9). Para los pesticidas analizados por GC-MS/MS, el límite de cuantificación fue 0,005 mg kg⁻¹ para 33 compuestos, 0,01 mg kg⁻¹ para 4 compuestos, 0,02 mg kg⁻¹ para otros 2, y permaneció en 0,1 mg kg⁻¹ para 9 pesticidas que se encontraban en el alcance original del método a los cuales no fue posible bajar el límite de cuantificación (bromopropilato, ciflutrina, cipermetrina, clorotalonil, deltametrina, diazinon, endosulfan sulfato, endosulfan alfa y endosulfan beta) (Tabla 10).

Linealidad y efecto matriz

Para los compuestos analizados por LC-MS/MS, las curvas de calibración en disolvente y en matriz se construyeron a partir de los estándares a siete niveles de concentración entre 0,0005 y 0,015 mg kg⁻¹. Para la mayoría de los compuestos, el rango lineal estuvo entre 0,0005 y 0,015 mg kg⁻¹ (Tabla 9). En la Figura 9 se muestra el efecto matriz de los nuevos pesticidas validados por LC-MS/MS. En la mayoría de los casos fue bajo (menor a 20% en valor absoluto), excepto para atrazina desetil, diazinon, fipronil, metolaclor, picoxistrobin y trifloxiestrobina que presentaron efecto matriz moderado (entre -20% y 20%) y para linuron y metiocarb que presentaron efecto matriz pronunciado (mayor a 50% en valor absoluto). Además, en la mayoría de los casos el efecto matriz fue negativo, implicando supresión de la señal con respecto a la señal en el disolvente.

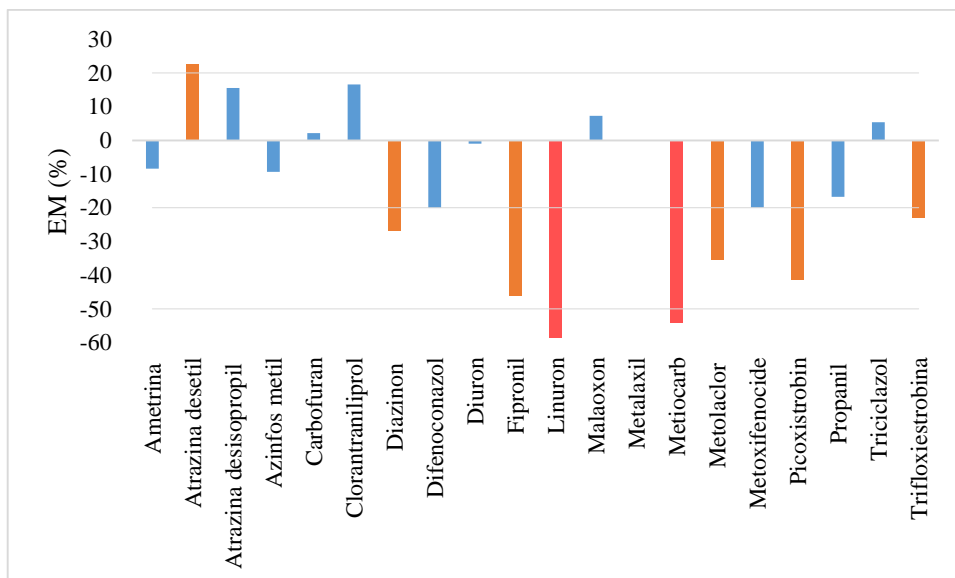


Figura 9. Efecto matriz (EM) de los nuevos pesticidas validados por LC-MS/MS en cera (en azul EM bajo, en anaranjado EM moderado, en rojo EM pronunciado)

Para los compuestos analizados por GC-MS/MS, la linealidad se evaluó entre 0,005 y 0,2 mg kg⁻¹, resultando que para la mayoría el rango lineal estuvo entre 0,005 y 0,2 mg kg⁻¹ (Tabla 10).

Alcance final

En resumen, por LC se logró tener un alcance de 37 pesticidas mientras que por GC el alcance fue de 48. Del total de compuestos validados en esta matriz, 4 se validaron por ambas técnicas. Por lo tanto, el alcance final del método se amplió de 38 a 81 pesticidas.

Tabla 9. Recuperaciones, desviaciones estándar relativas (RSD), límites de cuantificación (LOQ), rangos lineales y efecto matriz obtenidos para los nuevos pesticidas analizados por LC-MS/MS en cera

Pesticida	0,001 mg kg ⁻¹		0,005 mg kg ⁻¹		0,010 mg kg ⁻¹		LOQ (mg kg ⁻¹)	Rango lineal (mg kg ⁻¹)	Efecto matriz (%)
	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)			
2,4-D	56	8	29	10	26	8	-	0,0005-0,015	-40
Acefato	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Acetoclor	na	-	na	-	na	-	-	-	-
Alaclor	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Ametrina	78	10	72	3	64	11	0,001	0,0005-0,015	-8
Atrazina desetil	nd	-	87	6	81	4	0,005	0,0025-0,015	23
Atrazina desisopropil	nd	-	81	3	85	7	0,005	0,005-0,015	16
Azinfos metil	107	3	80	2	81	4	0,001	0,0005-0,015	-9
Bispiribac	nd	-	40	6	43	8	-	0,001-0,015	-7
Carbofuran	81	14	102	8	86	8	0,001	0,001-0,015	2
Ciproconazol	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Clorantraniliprol	nd	-	92	7	86	13	0,005	0,001-0,015	17
Clorsulfuron	nd	-	64	6	55	6	-	0,001-0,015	50
Diazinon	96	12	77	7	80	8	0,001	0,0005-0,015	-27
Dicamba	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Diclosulam	nd	-	74	12	61	14	-	0,0025-0,015	-66
Difenoconazol	102	6	88	13	98	8	0,001	0,001-0,015	-20
Diuron	95	8	80	6	73	5	0,001	0,0005-0,015	-1
Epoxiconazol	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Fipronil	86	5	80	3	80	4	0,001	0,0005-0,010	-46
Flumetsulam	nd	-	59	8	62	3	-	0,005-0,015	17
Fluroxipir meptil	nd	-	nd	-	72	14	-	-	-
Imazapic	nd	-	59	12	57	5	-	0,001-0,015	20
Imazapir	nd	-	51	6	51	9	-	0,0025-0,015	25
Imazetapir	63	11	58	9	58	7	-	0,001-0,010	9

Linuron	nd	-	108	14	97	17	0,005	0,005-0,015	-59
Malaixon	104	10	92	6	82	5	0,001	0,0005-0,015	7
MCPA	33	19	20	15	26	10	-	0,001-0,010	-10
Metalaxil	105	11	88	3	79	5	0,001	0,0005-0,015	0
Metiocarb	nd	-	89	6	82	6	0,005	0,0025-0,015	-54
Metolaclor	nd	-	91	8	88	8	0,005	0,0025-0,010	-35
Metoxifenocide	104	4	97	3	80	4	0,001	0,0005-0,015	-20
Penoxsulam	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Picoxistrobin	nd	-	92	4	88	3	0,005	0,0025-0,015	-41
Propamocarb	na	-	na	-	na	-	-	-	-
Propanil	nd	-	87	12	85	15	0,005	0,0025-0,015	-17
Propiconazol	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Protioconazol	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Tebufenocida	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Terbacilo	nd	-	74	3	69	5	-	0,0025-0,015	-51
Tiabendazol	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Triciclazol	101	7	84	5	80	3	0,001	0,001-0,015	5
Triclorfon	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Trifloxiestrobina	91	6	87	4	87	8	0,001	0,0005-0,015	-23
Triflumuron	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-

nd: no detectado, na: no analizado

Tabla 10. Recuperaciones, desviaciones estándar relativas (RSD), límites de cuantificación (LOQ) y rangos lineales obtenidos para los nuevos pesticidas analizados por GC-MS/MS en cera

Pesticida	0,005 mg kg ⁻¹		0,010 mg kg ⁻¹		0,020 mg kg ⁻¹		LOQ (mg kg ⁻¹)	Rango lineal (mg kg ⁻¹)
	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)		
Acetoclor	96	6	104	7	98	11	0,005	0,005-0,200
Alaclor	73	18	84	12	81	8	0,005	0,005-0,200

Aldrin	70	10	95	16	na	-	0,005	0,005-0,200
Ametrina	na	-	na	-	na	-	-	-
Azinfos metil	na	-	na	-	na	-	-	-
Azoxiestrobina	na	-	na	-	na	-	-	-
Bifentrin	95	5	90	9	101	5	0,005	0,005-0,200
Boscalid	na	-	na	-	na	-	-	-
Bromopropilato	nd	-	111	20	17	20	0,100	0,005-0,200
Carbofuran	na	-	na	-	na	-	-	-
Cialotrina	90	17	88	19	-	-	0,005	0,005-0,200
Ciflutrina	51	78	84	19	-	-	0,100	0,050-0,200
Cihalofop butil	90	9	83	14	98	6	0,005	0,005-0,200
Cipermetrina	nd	-	nd	-	nd	-	0,100	0,100-0,200
Clomazone	63	10	119	14	-	-	0,010	0,005-0,200
Clorantraniliprol	na	-	na	-	na	-	-	-
Clordano, cis-	96	12	104	26	37	55	-	-
Clordano, trans-	38	30	126	19	-	-	-	-
Clorotalonil	nd	-	nd	-	nd	-	0,100	0,005-0,200
Clorpirifos	115	9	88	10	82	12	0,005	0,005-0,200
Clorpirifos metil	97	9	81	13	74	8	0,005	0,005-0,200
DDD, o,p'-	93	8	90	8	-	-	0,005	0,005-0,200
DDD, p,p'-	92	4	92	11	-	-	0,005	0,005-0,200
DDE, o,p'-	89	7	94	18	-	-	0,005	0,005-0,200
DDE, p,p'-	96	11	92	6	-	-	0,005	0,005-0,200
DDT, o,p'-	95	6	91	6	-	-	0,005	0,005-0,200
DDT, p,p'-	93	9	96	8	-	-	0,005	0,005-0,200
Deltametrina	25	138	60	70	88	8	0,100	0,020-0,200
Diazinon	44	31	82	21	62	9	0,100	0,005-0,200
Dieldrin	415	73	-	-	-	-	-	-
Difenoconazol	na	-	na	-	na	-	-	-

Endosulfan sulfato	nd	-	nd	-	nd	-	0,100	0,020-0,200
Endosulfan, alfa-	nd	-	nd	-	nd	-	0,100	0,050-0,200
Endosulfan, beta-	nd	-	nd	-	nd	-	0,100	0,050-0,200
Epoxiconazol	100	11	92	14	-	-	0,005	0,005-0,200
Etion	113	10	94	13	83	11	0,005	0,005-0,200
Fention	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Fenvalerato	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Fipronil	111	12	82	14	97	6	0,005	0,005-0,200
Fluvalinato	nd	-	109	8	97	3	0,010	0,005-0,200
HCH, alfa-	84	14	86	20	60	24	0,005	0,005-0,200
HCH, beta-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
HCH, delta-	70	13	79	12	-	-	0,005	0,005-0,200
HCH, gama-	73	8	79	16	-	-	0,005	0,005-0,200
Heptaclor	89	14	89	17	-	-	0,005	0,005-0,200
Heptaclor epoxido, cis-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Hexaclorobenceno	58	17	68	34	-	-	-	-
Iprodione	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Isoxadifen etil	80	10	92	19	85	6	0,005	0,005-0,200
Kresoxim metil	94	13	89	17	106	12	0,005	0,005-0,200
Malation	85	7	93	8	93	9	0,005	0,005-0,200
Metalaxil	na	-	na	-	na	-	-	-
Metidation	82	20	86	8	84	7	0,005	0,005-0,200
Metiocarb	na	-	na	-	na	-	-	-
Metolaclor	94	6	86	13	-	-	0,005	0,005-0,200
Metoxicloro	100	6	99	8	71	8	0,005	0,005-0,200
Metribuzin	nd	-	100	19	79	10	0,010	0,010-0,200
Mirex	82	2	83	6	-	-	0,005	0,005-0,200
Oxifluorfen	77	9	93	10	-	-	0,005	0,005-0,200

Paration	nd	-	nd	-	76	12	0,020	0,005-0,200
Paration metil	nd	-	nd	-	74	11	0,020	0,005-0,200
Permetrina	99	17	101	16	70	5	0,005	0,005-0,200
Pirimetaniil	51	11	52	16	-	-	-	-
Pirimifos metil	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Profenofos	69	15	45	47	61	15	-	-
Simazina	83	12	85	9	-	-	0,005	0,005-0,200
Tebuconazol	nd	-	83	17	82	9	0,010	0,005-0,200
Tetradifon	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Trifluralina	71	10	75	8	-	-	0,005	0,005-0,200
Triticonazol	89	8	88	10	-	-	0,005	0,005-0,200
Vinclozolin	nd	-	nd	-	nd	-	-	-

nd: no detectado, na: no analizado

3.3.1.2.3. Miel

Veracidad y precisión

Los ensayos de fortificación se realizaron a 0,001, 0,005 y 0,01 mg kg⁻¹. Por LC-MS/MS, se lograron validar 37 nuevos compuestos. Los porcentajes de recuperación obtenidos estuvieron entre 70% y 118%, con RSDs entre 1% y 20% (Tabla 11). Respecto al herbicida 2,4-D, se obtuvieron recuperaciones de alrededor de 50%, lo cual era de esperar ya que en la metodología de extracción se utiliza PSA (amina primaria y secundaria) en la etapa de purificación. Por lo tanto, no se pudo validar, pero cabe destacar que para este compuesto, se obtuvieron RSD bajas (entre 6 y 8%), es decir, su extracción en miel es reproducible. Por GC-MS/MS, se analizaron los niveles de concentración de 0,005 y 0,01 mg kg⁻¹, obteniendo porcentajes de recuperación entre 70% y 120% con RSDs menores o iguales a 20% para 46 compuestos (Tabla 12). De esos 46 compuestos, 33 corresponden a nuevos pesticidas validados por GC-MS/MS con respecto al alcance del método original.

Límite de cuantificación

Para los pesticidas analizados por LC-MS/MS, los límites de cuantificación obtenidos fueron 0,001 mg kg⁻¹ para 27 compuestos y 0,005 mg kg⁻¹ para los 10 restantes (Tabla 11). Para los pesticidas analizados por GC-MS/MS, el límite de cuantificación fue 0,005 mg kg⁻¹ para 43 compuestos, 0,01 mg kg⁻¹ para 3 compuestos, y permaneció en 0,1 mg kg⁻¹ para 7 pesticidas que se encontraban en el alcance original del método a los cuales no fue posible bajar el límite de cuantificación (bromopropilato, clorotalonil, endosulfan sulfato, endosulfan alfa, endosulfan beta, fluvalinato y trifluralina) (Tabla 12).

Linealidad y efecto matriz

Para los compuestos analizados por LC-MS/MS, las curvas de calibración en disolvente y en matriz se construyeron a partir de los estándares a siete niveles de concentración entre 0,0005 y 0,015 mg kg⁻¹. Para la mayoría de los compuestos, el rango lineal estuvo entre 0,0005 y 0,015 mg kg⁻¹ (Tabla 11). En la Figura 10 se muestra el efecto matriz de los nuevos pesticidas validados por LC-MS/MS. En la mayoría de los casos fue bajo (menor a 20% en valor absoluto), excepto para acefato y propiconazol que presentaron

efecto matriz moderado (26% y -31%, respectivamente) y para protioconazol y triclorfon que presentaron efecto matriz pronunciado (-59% y 122%, respectivamente). En el caso del triclorfon, el efecto matriz se calculó utilizando el punto de calibración de 0,015 mg kg⁻¹ en disolvente y en matriz ya que en los niveles inferiores de la curva en disolvente no fue detectado. Además, en la mayoría de los casos el efecto matriz fue negativo, implicando supresión de la señal con respecto a la señal en el disolvente, excepto para acefato, clorantraniliprol, clorsulfuron, flumetsulam, fluroxipir meptil, linuron, penoxsulam y triclorfon.

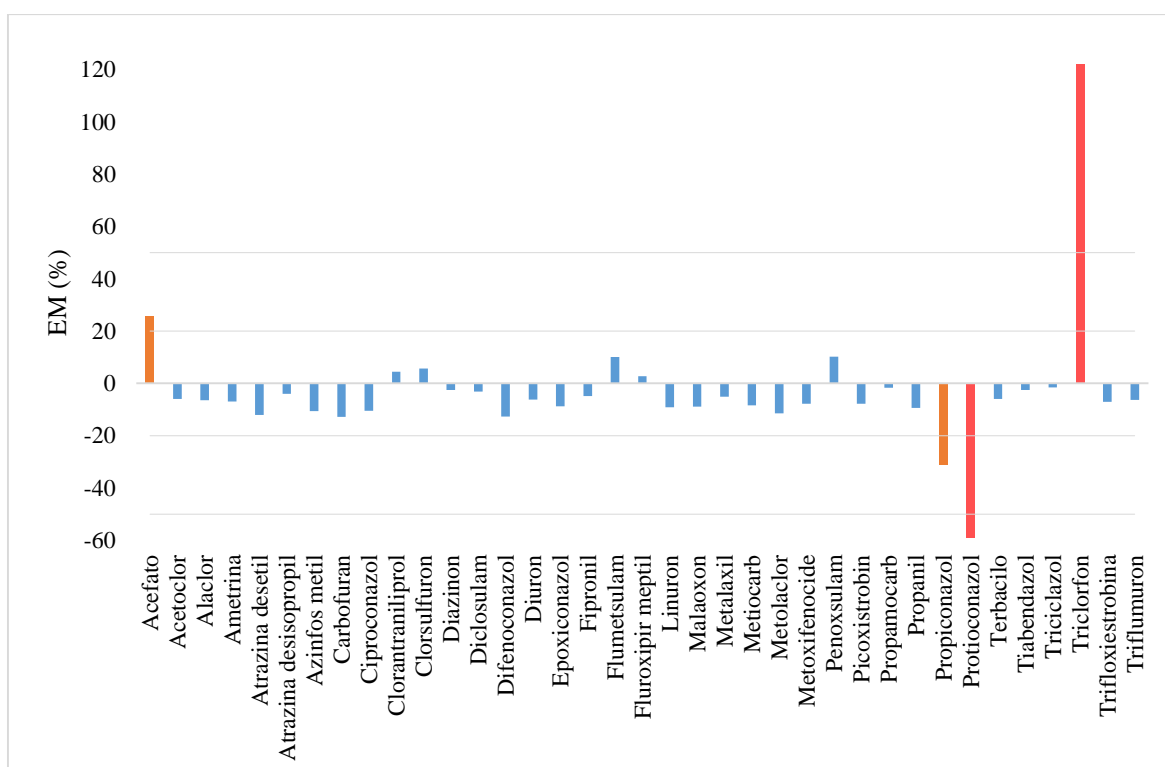


Figura 10. Efecto matriz (EM) de los nuevos pesticidas validados por LC-MS/MS en miel (en azul EM bajo, en anaranjado EM moderado, en rojo EM pronunciado)

Para los compuestos analizados por GC-MS/MS, la linealidad se evaluó entre 0,005 y 0,2 mg kg⁻¹, resultando que para la mayoría el rango lineal estuvo entre 0,005 y 0,150 mg kg⁻¹ (Tabla 12).

Alcance final

En resumen, por LC se logró tener un alcance de 55 pesticidas mientras que por GC el alcance fue de 53. Del total de compuestos validados en esta matriz, 6 se validaron por ambas técnicas. Por lo tanto, el alcance final del método se amplió de 39 a 102 pesticidas.

Tabla 11. Recuperaciones, desviaciones estándar relativas (RSD), límites de cuantificación (LOQ), rangos lineales y efecto matriz obtenidos para los nuevos pesticidas analizados por LC-MS/MS en miel

Pesticida	0,001 mg kg ⁻¹		0,005 mg kg ⁻¹		0,010 mg kg ⁻¹		LOQ (mg kg ⁻¹)	Rango lineal (mg kg ⁻¹)	Efecto matriz (%)
	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)			
2,4-D	nd	-	45	8	44	6	-	0,0025-0,015	-4
Acefato	78	8	79	10	80	11	0,001	0,001-0,015	26
Acetoclor	91	4	95	5	100	5	0,001	0,001-0,015	-6
Alaclor	nd	-	85	14	88	5	0,005	0,0025-0,015	-6
Ametrina	100	4	97	6	96	3	0,001	0,0005-0,015	-7
Atrazina desetil	102	16	97	5	94	5	0,001	0,0005-0,015	-12
Atrazina desisopropil	nd	-	104	11	102	9	0,005	0,0025-0,015	-4
Azinfos metil	100	8	95	3	97	4	0,001	0,001-0,015	-11
Bispiribac	52	16	47	10	42	6	-	0,0005-0,015	-9
Carbofuran	107	11	88	3	99	3	0,001	0,0005-0,015	-13
Ciproconazol	106	9	87	5	95	2	0,001	0,001-0,015	-10
Clorantraniliprol	99	14	97	5	94	6	0,001	0,0005-0,015	4
Clorsulfuron	99	15	87	6	79	4	0,001	0,001-0,015	6
Diazinon	101	7	95	4	93	2	0,001	0,0005-0,015	-3
Dicamba	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Diclosulam	106	9	78	4	87	3	0,001	0,0005-0,010	-3
Difenoconazol	nd	-	101	6	100	5	0,005	0,005-0,015	-13
Diuron	104	6	90	5	92	1	0,001	0,0005-0,015	-6
Epoxiconazol	101	20	93	12	91	8	0,001	0,001-0,015	-9
Fipronil	93	4	95	7	96	2	0,001	0,001-0,015	-5
Flumetsulam	nd	-	72	5	70	2	0,005	0,0025-0,015	10
Fluroxipir meptil	nd	-	101	10	86	8	0,005	0,0025-0,015	3
Imazapic	nd	-	20	11	23	9	-	0,001-0,015	11
Imazapir	nd	-	19	7	16	14	-	0,001-0,015	-7
Imazetapir	36	16	28	5	27	9	-	0,0005-0,015	-6

Linuron	118	8	91	5	102	6	0,001	0,001-0,015	-9
Malaoxon	100	7	101	4	101	3	0,001	0,0005-0,015	-9
MCPA	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Metalaxil	110	3	99	2	98	3	0,001	0,0005-0,015	-5
Metiocarb	109	10	99	2	97	5	0,001	0,0005-0,015	-8
Metolaclor	nd	-	94	2	100	3	0,005	0,0005-0,015	-11
Metoxifenocide	101	6	94	4	96	4	0,001	0,0005-0,015	-8
Penoxsulam	91	19	75	3	84	4	0,001	0,001-0,010	10
Picoxistrobin	99	4	94	4	93	2	0,001	0,001-0,015	-8
Propamocarb	nd	-	74	3	78	2	0,005	0,0025-0,015	-2
Propanil	nd	-	90	5	100	6	0,005	0,005-0,015	-9
Propiconazol	nd	-	99	13	103	7	0,005	0,005-0,015	-31
Protioconazol	105	18	98	16	84	20	0,001	0,0005-0,010	-59
Tebufenocida	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Terbacilo	97	7	93	2	97	2	0,001	0,0005-0,010	-6
Tiabendazol	99	11	94	8	92	3	0,001	0,0005-0,015	-3
Triciclazol	97	3	96	3	93	2	0,001	0,001-0,015	-2
Triclorfon	nd	-	109	9	102	7	0,005	0,0025-0,015	-
Trifloxiestrobina	97	6	95	3	97	2	0,001	0,0005-0,015	-7
Triflumuron	78	5	103	7	102	3	0,001	0,001-0,015	-6

nd: no detectado, na: no analizado

Tabla 12. Recuperaciones, desviaciones estándar relativas (RSD), límites de cuantificación (LOQ) y rangos lineales obtenidos para los nuevos pesticidas analizados por GC-MS/MS en miel

Pesticida	0,005 mg kg ⁻¹		0,010 mg kg ⁻¹		LOQ (mg kg ⁻¹)	Rango lineal (mg kg ⁻¹)
	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)		
Acetoclor	95	9	96	5	0,005	0,005-0,150
Alaclor	96	11	95	6	0,005	0,005-0,150
Aldrin	95	17	66	16	0,005	0,005-0,150
Ametrina	66	45	97	5	0,010	0,010-0,150
Azinfos metil	na	-	na	-	-	-
Azoxiestrobina	na	-	na	-	-	-
Bifentrin	82	8	92	4	0,005	0,005-0,150
Boscalid	na	-	na	-	-	-
Bromopropilato	nd	-	nd	-	0,100	0,005-0,200
Carbofuran	na	-	na	-	-	-
Cialotrina	96	2	114	5	0,005	0,005-0,150
Ciflutrina	110	12	105	10	0,005	0,005-0,150
Cihalofop butil	88	3	90	3	0,005	0,005-0,150
Cipermetrina	82	17	92	18	0,005	0,005-0,200
Clomazone	85	5	88	8	0,005	0,005-0,150
Clorantraniliprol	na	-	na	-	-	-
Clordano, cis-	96	19	88	9	0,005	0,005-0,150
Clordano, trans-	87	18	82	8	0,005	0,005-0,150
Clorotalonil	nd	-	nd	-	0,100	0,020-0,200
Clorpirifos	75	12	88	4	0,005	0,005-0,150
Clorpirifos metil	99	5	95	7	0,005	0,005-0,150
DDD, o,p'-	88	8	95	5	0,005	0,005-0,150
DDD, p,p'-	89	9	96	3	0,005	0,005-0,150
DDE, o,p'-	79	11	84	4	0,005	0,005-0,150
DDE, p,p'-	75	7	81	5	0,005	0,005-0,150
DDT, o,p'-	89	8	94	3	0,005	0,005-0,150
DDT, p,p'-	84	8	92	3	0,005	0,005-0,150
Deltametrina	75	13	117	9	0,005	0,005-0,150
Diazinon	77	10	79	14	0,005	0,005-0,150
Dieldrin	90	5	78	14	0,005	0,005-0,150
Difenoconazol	na	-	na	-	-	-
Endosulfan sulfato	nd	-	nd	-	0,100	0,020-0,200
Endosulfan, alfa-	nd	-	nd	-	0,100	0,050-0,200
Endosulfan, beta-	nd	-	nd	-	0,100	0,050-0,200
Epoxiconazol	na	-	na	-	-	-
Etion	88	8	98	3	0,005	0,005-0,150
Fention	nd	-	nd	-	-	-
Fenvalerato	nd	-	nd	-	-	-
Fipronil	77	13	88	2	0,005	0,005-0,150
Fluvalinato	nd	-	nd	-	0,100	0,020-0,200

HCH, alfa-	72	13	60	12	0,005	0,005-0,150
HCH, beta-	80	12	88	9	0,005	0,005-0,150
HCH, delta-	113	20	120	4	0,005	0,005-0,150
HCH, gama-	86	12	82	9	0,005	0,005-0,150
Heptaclor	65	9	60	10	-	-
Heptaclor epoxido, cis-	74	9	76	9	0,005	0,005-0,150
Hexaclorobenceno	34	16	29	26	-	-
Iprodione	nd	-	nd	-	-	-
Isoxadifen etil	79	7	88	4	0,005	0,005-0,150
Kresoxim metil	96	10	100	2	0,005	0,005-0,150
Malation	102	7	103	3	0,005	0,005-0,150
Metalaxil	na	-	na	-	-	-
Metidation	103	10	120	6	0,005	0,005-0,150
Metiocarb	na	-	na	-	-	-
Metolaclor	87	8	93	3	0,005	0,005-0,150
Metoxicloro	84	10	94	4	0,005	0,005-0,150
Metribuzin	80	7	92	1	0,005	0,005-0,150
Mirex	83	10	94	4	0,005	0,005-0,150
Oxifluorfen	54	43	174	7	-	-
Paration	nd	-	86	5	0,010	0,010-0,150
Paration metil	nd	-	75	4	0,010	0,010-0,150
Permetrina	80	8	93	7	0,005	0,005-0,150
Pirimetnil	89	8	96	8	0,005	0,005-0,150
Pirimifos metil	80	13	87	10	0,005	0,005-0,150
Profenofos	114	15	116	4	0,005	0,005-0,150
Simazina	87	10	101	7	0,005	0,005-0,150
Tebuconazol	na	-	na	-	-	-
Tetradifon	nd	-	nd	-	-	-
Trifluralina	65	8	59	14	0,100	0,020-0,200
Triticonazol	83	5	83	5	0,005	0,005-0,200
Vinclozolin	nd	-	nd	-	-	-

nd: no detectado, na: no analizado

3.3.1.2.4. Polen

3.3.1.2.4.1. Método acético/acetato

Esta metodología consistió en la ampliación del alcance de la metodología con la que se contaba para analizar residuos de pesticidas en polen cuyo alcance original está detallado en la Tabla 5, agregando una etapa de *freeze-out* en la preparación de muestras. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios para los nuevos pesticidas analizados por LC-MS/MS, pero no para los analizados por GC-MS/MS. Esta metodología no fue utilizada en el análisis de las muestras reales.

Veracidad y precisión

Los ensayos de fortificación se realizaron a 0,001, 0,005 y 0,01 mg kg⁻¹. Por LC-MS/MS, se lograron validar 28 nuevos compuestos. Los porcentajes de recuperación obtenidos para 27 compuestos estuvieron entre 71% y 117%, con RSDs entre 2% y 19%, mientras que para metiocarb las recuperaciones obtenidas a 0,005 y 0,01 mg kg⁻¹ fueron de 66% y 60% con RSDs de 13% y 6%, respectivamente (Tabla 13).

Límite de cuantificación

Los límites de cuantificación obtenidos para los nuevos compuestos analizados por LC-MS/MS fueron 0,001 mg kg⁻¹ para 16 compuestos, 0,005 mg kg⁻¹ para los restantes 12, incluido metiocarb (Tabla 13).

Linealidad y efecto matriz

Para los compuestos analizados por LC-MS/MS, las curvas de calibración en disolvente y en matriz se construyeron a partir de los estándares a siete niveles de concentración entre 0,0005 y 0,015 mg kg⁻¹. Para la mayoría de los compuestos, el rango lineal estuvo entre 0,001 y 0,015 mg kg⁻¹ (Tabla 13).

. En la Figura 11 se muestra el efecto matriz de los nuevos pesticidas validados por LC-MS/MS. En la mayoría de los casos fue pronunciado, excepto para protioconazol y tiabendazol que presentaron efecto matriz bajo (-19% y -20%, respectivamente) y para diclosulam, flumetsulam y metiocarb que presentaron efecto matriz moderado (-47%, -49% y -50%, respectivamente). En todos los casos hubo supresión de la señal con respecto a la señal en el disolvente.

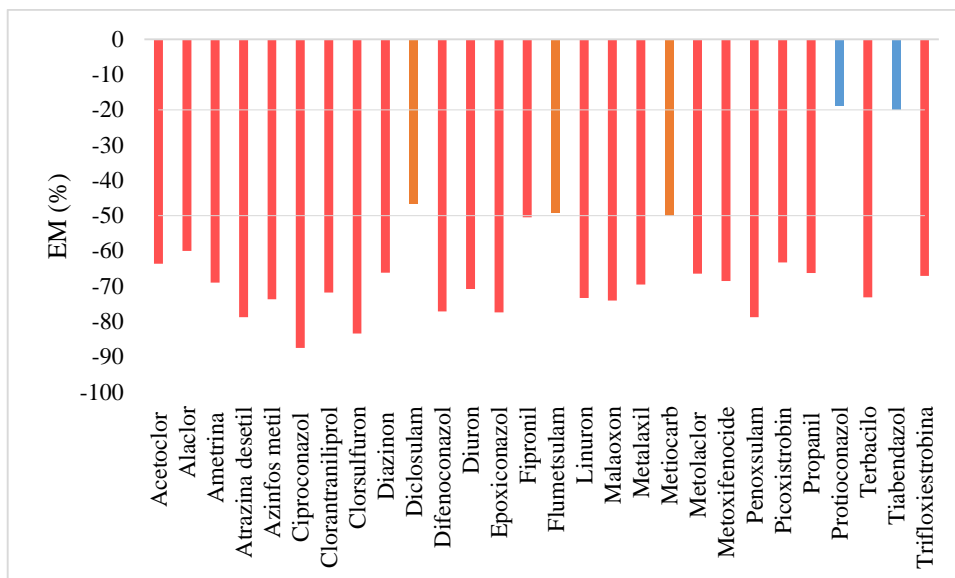


Figura 11. Efecto matriz (EM) de los pesticidas validados por LC-MS/MS en polen utilizando el método de extracción con *buffer* acético/acetato

Alcance final

En resumen, por LC se logró tener un alcance de 46 pesticidas mientras que por GC el alcance original de 14 compuestos no se pudo ampliar.

Tabla 13. Recuperaciones, desviaciones estándar relativas (RSD), límites de cuantificación (LOQ), rangos lineales y efecto matriz obtenidos para los pesticidas analizados por LC-MS/MS en polen utilizando el método de extracción con buffer acético/acetato

Pesticida	0,001 mg kg ⁻¹		0,005 mg kg ⁻¹		0,010 mg kg ⁻¹		LOQ (mg kg ⁻¹)	Rango lineal (mg kg ⁻¹)	Efecto matriz (%)
	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)			
Acefato	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Acetoclor	nd	-	93	12	74	12	0,005	0,0025-0,015	-64
Alaclor	nd	-	99	16	75	3	0,005	0,005-0,015	-60
Ametrina	93	6	78	3	73	6	0,001	0,0005-0,015	-69
Atrazina desetil	nd	-	83	5	80	2	0,005	0,0025-0,015	-79
Atrazina desisopropil	na	-	na	-	na	-	-	-	-
Azinfos metil	86	13	93	14	76	4	0,001	0,001-0,015	-74
Carbofuran	nd	-	82	23	76	23	-	0,005-0,015	-88
Ciproconazol	nd	-	83	11	76	6	0,005	0,005-0,015	-88
Clorantraniliprol	nd	-	81	8	81	6	0,005	0,001-0,015	-72
Clorsulfuron	87	9	73	6	75	7	0,001	0,001-0,015	-83
Diazinon	111	7	78	4	71	6	0,001	0,001-0,015	-66
Diclosulam	84	18	72	23	72	10	0,001	0,0005-0,010	-47
Difenoconazol	108	19	90	11	89	12	0,001	0,001-0,015	-77
Diuron	75	15	76	8	81	8	0,001	0,001-0,015	-71
Epoxiconazol	nd	-	84	18	93	9	0,005	0,0025-0,015	-77
Fipronil	94	10	79	4	85	6	0,001	0,001-0,015	-51
Flumetsulam	nd	-	76	3	81	4	0,005	0,0025-0,015	-49
Fluroxipir meptil	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Linuron	nd	-	115	8	75	6	0,005	0,005-0,015	-73
Malaoxon	99	9	78	9	82	5	0,005	0,0005-0,015	-74
Metalaxil	105	9	83	3	79	5	0,001	0,001-0,015	-70
Metiocarb	nd	-	66	13	60	6	0,005	0,001-0,015	-50
Metolaclor	101	8	80	5	80	6	0,001	0,0005-0,015	-66
Metoxifenocide	108	7	89	8	72	11	0,001	0,0005-0,015	-69
Penoxsulam	nd	-	91	8	90	9	0,005	0,005-0,015	-79

Picoxistrobin	97	8	89	9	79	4	0,001	0,001-0,015	-63
Propamocarb	na	-	na	-	na	-	-	-	-
Propanil	nd	-	100	9	78	10	0,005	0,005-0,015	-66
Propiconazol	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Protioconazol	117	14	116	7	100	2	0,001	0,001-0,010	-19
Terbacilo	94	7	87	8	84	4	0,001	0,001-0,015	-73
Tiabendazol	71	8	73	5	73	3	0,001	0,001-0,015	-20
Triciclazol	nd	-	71	3	67	4	-	0,0025-0,015	-55
Triclorfon	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Trifloxiestrobina	103	11	84	9	81	4	0,001	0,0005-0,015	-67
Triflumuron	nd	-	68	9	77	8	-	0,005-0,015	-88

nd: no detectado, na: no analizado

3.3.1.2.4.2. Método cítrico/citrato

Esta metodología consistió en una nueva preparación de muestras para analizar residuos de pesticidas en polen que difiere de la preparación de muestras original en la utilización de *buffer* cítrico/citrato en la etapa de extracción/partición y 4 h de *freeze-out* en la etapa de purificación del extracto. Esta metodología fue utilizada en el análisis de las muestras reales.

Veracidad y precisión

Los ensayos de fortificación se realizaron a 0,001, 0,005, 0,01, 0,02 y 0,05 mg kg⁻¹. Por LC-MS/MS, se lograron validar 80 compuestos. Los porcentajes de recuperación obtenidos estuvieron entre 70% y 120%, con RSDs menores o iguales a 20% (Tabla 14). Respecto a los herbicidas ácidos 2,4-D e imazamox, se obtuvieron recuperaciones de alrededor de 40%, lo cual era de esperar ya que en la metodología de extracción se utiliza PSA (amina primaria y secundaria) en la etapa de purificación. Por lo tanto, no se pudieron validar, pero cabe destacar que para estos compuestos, se obtuvieron RSD bajas (menores a 20%), es decir, su extracción en polen es reproducible. Por GC-MS/MS, se analizaron los niveles de concentración de 0,005, 0,01 y 0,02 mg kg⁻¹, obteniendo porcentajes de recuperación entre 72% y 115% con RSDs menores o iguales a 19% para 42 compuestos (Tabla 15).

Límite de cuantificación

Para los pesticidas analizados por LC-MS/MS, los límites de cuantificación alcanzados se muestran en la Figura 12. Para los pesticidas analizados por GC-MS/MS, el límite de cuantificación fue 0,005 mg kg⁻¹ para 8 compuestos, 0,01 mg kg⁻¹ para 18 compuestos y 0,02 mg kg⁻¹ para los restantes 16 pesticidas validados (Tabla 15).

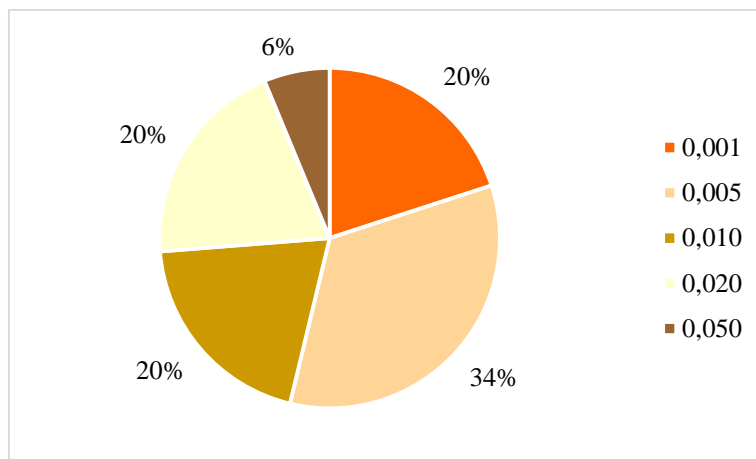


Figura 12. Límites de cuantificación (en mg kg⁻¹) obtenidos para los compuestos analizados en polen por LC-MS/MS utilizando el método de extracción con *buffer* cítrico/citrato

Linealidad y efecto matriz

Para los compuestos analizados por LC-MS/MS, las curvas de calibración en disolvente y en matriz se construyeron a partir de los estándares a seis niveles de concentración entre 0,001 y 0,2 mg kg⁻¹. Para la mayoría de los compuestos, el rango lineal estuvo entre 0,002 y 0,2 mg kg⁻¹ (Tabla 14). En la Figura 13 se muestra el efecto matriz de los pesticidas validados por LC-MS/MS. En la mayoría de los casos fue moderado.

Además, la mayoría de los compuestos presentaron supresión de la señal con respecto a la señal en el disolvente.

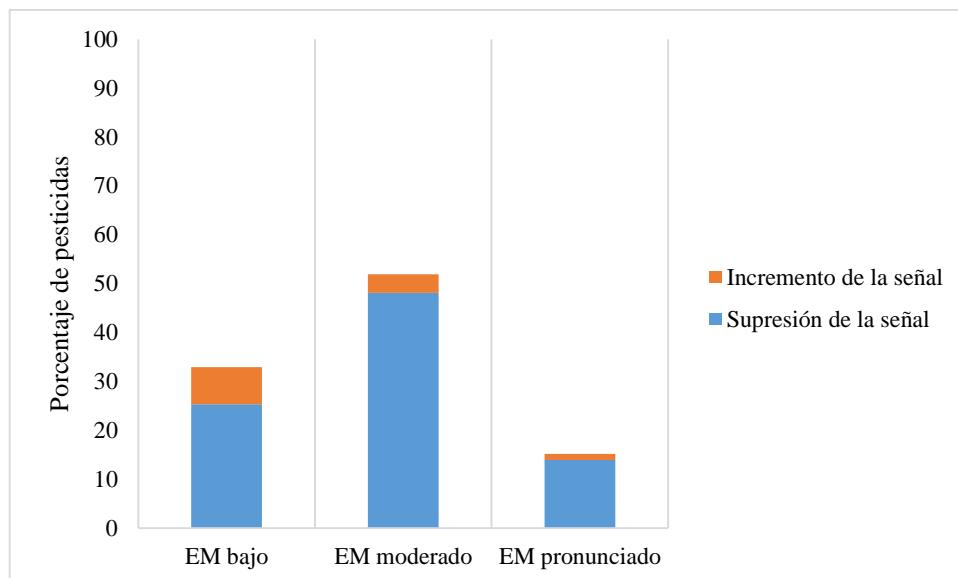


Figura 13. Efecto matriz (EM) de los pesticidas validados por LC-MS/MS en polen utilizando el método de extracción con *buffer* cítrico/citrato

Para los compuestos analizados por GC-MS/MS, la linealidad se evaluó entre 0,005 y 0,2 mg kg⁻¹, resultando que para la mayoría el rango lineal estuvo entre 0,005 y 0,150 mg kg⁻¹ (Tabla 15).

Alcance final

En resumen, por LC se logró tener un alcance de 80 pesticidas mientras que por GC el alcance fue de 42. Del total de compuestos validados en esta matriz, 16 se validaron por ambas técnicas. Por lo tanto, el alcance final del método fue 106 pesticidas.

Tabla 14. Recuperaciones, desviaciones estándar relativas (RSD), límites de cuantificación (LOQ), rangos lineales y efecto matriz obtenidos para los pesticidas analizados por LC-MS/MS en polen utilizando el método de extracción con *buffer* cítrico/citrato

Pesticida	0,001 mg kg ⁻¹		0,005 mg kg ⁻¹		0,010 mg kg ⁻¹		0,020 mg kg ⁻¹		0,050 mg kg ⁻¹		LOQ (mg kg ⁻¹)	Rango lineal (mg kg ⁻¹)	Efecto matriz (%)
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)			
2,4-D	nd	-	nd	-	nd	-	36	7	38	5	-	-	-
2,4-DB	nd	-	nd	-	nd	-	72	9	77	5	0,020	0,020-0,200	-54
Acefato	nd	-	nd	-	72	10	66	5	72	3	0,010	0,010-0,200	-13
Acetamiprid	141	5	128	4	93	3	86	5	83	6	0,010	0,002-0,100	-17
Acetoclor	nd	-	nd	-	79	19	80	10	74	14	0,010	0,002-0,100	-17
Alaclor	nd	-	nd	-	70	18	120	11	77	15	0,010	0,010-0,200	42
Ametrina	nd	-	83	6	79	7	73	4	75	4	0,005	0,002-0,100	-28
Atrazina	nd	-	96	21	86	3	67	8	81	2	0,010	0,010-0,200	-48
Atrazina desetil	nd	-	103	5	92	2	73	8	77	2	0,005	0,002-0,200	-46
Atrazina desisopropil	nd	-	162	24	163	10	74	14	80	6	0,020	0,002-0,100	-25
Azinfos metil	nd	-	113	12	109	8	72	5	92	5	0,005	0,002-0,200	-37
Azoxiestrobina	123	5	102	9	85	4	70	7	84	4	0,005	0,002-0,100	-25
Bifentrin	nd	-	79	7	71	10	54	4	56	4	0,005	0,002-0,100	-68
Bispiribac	nd	-	nd	-	nd	-	39	8	40	5	-	-	-
Boscalid	nd	-	nd	-	nd	-	134	32	92	25	-	-	-
Carbaril	nd	-	nd	-	79	10	75	7	83	6	0,010	0,010-0,200	-52
Carbendazim	147	3	110	5	78	5	72	5	72	3	0,005	0,002-0,100	-15
Carbofuran	nd	-	nd	-	nd	-	105	18	148	11	0,020	0,020-0,200	-91
Cimoxanilo	nd	-	nd	-	101	3	86	3	90	6	0,010	0,010-0,200	-35
Ciproconazol	nd	-	nd	-	nd	-	77	12	86	8	0,020	0,002-0,200	-25
Ciprodinil	nd	-	nd	-	nd	-	52	16	66	10	-	-	-
Clomazone	nd	-	nd	-	nd	-	83	10	93	6	0,020	0,010-0,200	-41
Clorantraniliprol	nd	-	102	17	81	6	73	8	79	8	0,005	0,002-0,100	-6

Clorpirifos	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	77	6	0,050	0,002-0,200	-63
Clorsulfuron	nd	-	nd	-	82	24	67	7	68	8	-	-	-
Clotianidina	nd	-	81	12	72	7	82	6	83	5	0,005	0,002-0,100	-8
Cumafos	163	15	154	5	91	5	82	3	112	9	0,010	0,002-0,200	-19
Diazinon	80	8	105	12	98	5	65	5	79	4	0,001	0,001-0,200	-33
Dicamba	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Diclosulam	74	25	95	6	94	11	84	8	84	5	0,005	0,002-0,200	-34
Difenoconazol	168	12	114	16	87	8	68	14	76	5	0,005	0,002-0,100	-6
Diflubenzuron	nd	-	98	22	83	12	61	11	90	11	0,005	0,002-0,040	3
Dimetoato	61	13	98	7	92	4	83	7	84	3	0,005	0,002-0,100	-35
Diuron	nd	-	nd	-	nd	-	75	8	75	6	0,020	0,020-0,200	-36
Epoxiconazol	nd	-	nd	-	nd	-	81	17	84	7	0,020	0,010-0,200	-13
Etion	109	11	99	8	83	5	69	1	79	4	0,001	0,001-0,100	-58
Fenbuconazol	nd	-	nd	-	76	24	100	24	87	24	-	-	-
Fention sulfona	nd	-	nd	-	104	12	98	11	96	6	0,010	0,002-0,200	-45
Fention sulfoxido	nd	-	96	7	96	6	76	6	83	3	0,005	0,002-0,100	-41
Fipronil	81	4	101	1	91	3	81	4	93	3	0,001	0,001-0,040	3
Fipronil desulfinil	80	2	97	4	91	4	77	5	95	2	0,001	0,001-0,040	-24
Fipronil sulfona	82	4	101	1	95	2	81	6	95	3	0,001	0,001-0,040	6
Fipronil sulfuro	83	9	95	1	94	3	83	6	95	3	0,001	0,001-0,040	-8
Fludioxonil	71	21	98	6	96	8	85	3	90	2	0,001	0,001-0,100	-33
Flufenoxuron	nd	-	80	20	83	20	76	15	82	10	0,005	0,002-0,200	-53
Flumetsulam	nd	-	nd	-	nd	-	76	11	73	6	0,020	0,002-0,100	7
Fluroxipir meptil	nd	-	nd	-	81	22	57	9	85	10	-	-	-
Flusilazol	110	9	105	16	83	21	86	15	79	9	0,001	0,001-0,200	-12
Fluvalinato	163	2	110	5	79	7	74	5	88	2	0,005	0,002-0,200	-44
Haloxifop metil	nd	-	96	13	90	10	73	9	83	8	0,005	0,002-0,200	-24
Hexaconazol	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Hexitiazox	nd	-	70	14	73	9	71	4	78	7	0,010	0,010-0,200	-53

Imazalil	nd	-	85	10	63	16	71	6	60	8	0,005	0,002-0,100	-46
Imazamox	nd	-	nd	-	45	16	43	9	39	13	-	-	-
Imazapic	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Imazapir	nd	-	34	19	34	11	23	9	29	3	-	-	-
Imazetapir	43	46	57	13	50	16	43	9	43	3	-	-	-
Imidacloprid	nd	-	136	27	108	13	79	23	70	8	0,010	0,010-0,200	-32
Iprodione	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Isoxadifen etil	nd	-	93	27	100	18	66	8	86	3	0,010	0,010-0,200	-28
Linuron	nd	-	nd	-	97	24	82	11	91	11	0,020	0,002-0,200	-22
Malaoxon	77	16	104	7	96	5	90	5	93	3	0,001	0,001-0,100	-37
Malation	84	12	93	9	88	3	74	8	87	4	0,001	0,001-0,200	-16
MCPA	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	34	4	-	-	-
Metalaxil	128	7	100	5	88	4	82	7	92	4	0,005	0,002-0,200	-26
Metamidofos	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Metconazol	nd	-	nd	-	nd	-	64	6	72	3	0,050	0,002-0,200	-9
Metiocarb	nd	-	73	20	76	11	62	9	88	6	0,005	0,002-0,200	-48
Metiocarb sulfona	94	11	105	3	99	6	86	7	92	2	0,001	0,001-0,100	-34
Metiocarb sulfoxido	76	7	96	5	87	4	77	6	82	3	0,001	0,001-0,100	-13
Metolaclor	165	4	123	6	97	7	83	4	86	4	0,010	0,010-0,100	-19
Metomil	80	7	72	3	66	7	120	8	124	4	0,001	0,001-0,100	-37
Metoxifenocide	66	7	93	5	84	10	69	3	85	6	0,005	0,002-0,040	-11
Metsulfuron metil	nd	-	115	7	89	9	76	6	75	3	0,005	0,002-0,100	34
Paration metil	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Penoxsulam	nd	-	nd	-	83	12	83	6	74	4	0,010	0,010-0,100	54
Picoxistrobin	nd	-	113	5	87	12	77	15	83	7	0,005	0,002-0,200	-16
Piraclostrobina	86	6	95	7	85	3	75	6	79	7	0,001	0,001-0,100	-31
Pirazosulfuron	nd	-	nd	-	nd	-	79	7	88	3	0,020	0,010-0,200	18
Pirimicarb	69	12	107	2	99	4	89	6	89	2	0,005	0,002-0,200	-44

Pirimifos metil	nd	-	nd	-	nd	-	79	11	82	11	0,020	0,002-0,100	-41
Procloraz	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Profenofos	nd	-	nd	-	nd	-	66	9	72	3	0,050	0,002-0,200	-32
Propamocarb	nd	-	52	10	57	23	41	9	44	4	-	-	-
Propanil	nd	-	90	13	76	16	76	9	90	7	0,005	0,002-0,200	-28
Propiconazol	nd	-	nd	-	nd	-	81	10	81	10	0,020	0,002-0,200	-11
Propoxur	160	7	132	4	96	2	6875	5	91	4	0,010	0,010-0,200	-60
Protioconazol	nd	-	194	13	180	8	83	3	97	8	0,020	0,020-0,200	-
Saflufenacil	nd	-	nd	-	nd	-	64	9	82	8	0,050	0,002-0,200	-10
Simazina	nd	-	nd	-	125	12	99	6	76	6	0,020	0,002-0,200	-79
Sulfentrazona	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Tebuconazol	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Tebufenocida	81	15	92	11	93	9	74	3	79	4	0,001	0,001-0,100	-20
Terbacilo	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Terbutilazina	nd	-	nd	-	81	6	75	9	76	9	0,010	0,002-0,200	-36
Tetraconazol	nd	-	nd	-	nd	-	78	15	77	17	0,020	0,010-0,200	-47
Tiabendazol	nd	-	68	11	63	5	58	6	59	5	-	-	-
Tiacloprid	nd	-	95	13	93	17	69	14	80	12	0,005	0,002-0,100	-42
Tiametoxan	nd	-	nd	-	69	32	85	15	82	8	0,020	0,010-0,200	29
Tiodicarb	nd	-	370	17	444	17	13	21	22	10	-	-	-
Triciclazol	nd	-	79	6	71	5	67	7	70	5	0,005	0,002-0,100	-29
Triclopir	nd	-	nd	-	46	8	37	17	36	12	-	-	-
Triclorfon	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	80	12	0,050	0,020-0,200	6
Trifloxiestrobina	87	9	102	4	100	5	78	2	88	5	0,001	0,001-0,100	-34
Triflumuron	nd	-	93	7	90	6	85	7	104	6	0,005	0,002-0,040	-56

nd: no detectado

Tabla 15. Recuperaciones, desviaciones estándar relativas (RSD), límites de cuantificación (LOQ) y rangos lineales obtenidos para los nuevos pesticidas analizados por GC-MS/MS en polen utilizando el método de extracción con buffer cítrico/citrato

Pesticida	0,005 mg kg ⁻¹		0,010 mg kg ⁻¹		0,020 mg kg ⁻¹		LOQ (mg kg ⁻¹)	Rango lineal (mg kg ⁻¹)
	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)		
Acetoclor	nd	-	69	8	84	7	0,010	0,005-0,150
Alaclor	nd	-	nd	-	91	11	0,020	0,010-0,200
Aldrin	nd	-	10	224	56	8	-	-
Ametrina	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Azinfos metil	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Azoxiestrobina	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Bifentrin	nd	-	59	12	74	7	0,020	0,010-0,200
Boscalid	122	7	80	5	91	3	0,010	0,005-0,150
Bromopropilato	125	8	74	10	84	4	0,010	0,005-0,150
Carbofuran	nd	-	nd	-	99	16	0,020	0,010-0,200
Cialotrina	nd	-	96	11	93	10	0,010	0,010-0,150
Ciflutrina	nd	-	nd	-	85	7	0,020	0,020-0,150
Cihalofop butil	140	17	82	10	97	3	0,010	0,005-0,150
Cipermetrina	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Clomazone	150	9	77	7	97	1	0,010	0,005-0,150
Clorantraniliprol	nd	-	nd	-	104	10	0,020	0,010-0,200
Clordano, cis-	nd	-	61	21	70	13	-	-
Clordano, trans-	nd	-	53	11	69	3	-	-
Clorotalonil	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Clorpirifos	103	14	73	9	82	5	0,005	0,005-0,200
Clorpirifos metil	nd	-	72	19	77	8	0,010	0,005-0,150
DDD, o,p'-	86	9	63	8	79	4	0,005	0,005-0,200
DDD, p,p'-	114	8	56	10	72	4	0,005	0,005-0,200

DDE, o,p'-	99	11	56	9	66	1	0,005	0,005-0,200
DDE, p,p'-	nd	-	57	11	69	4	0,020	0,005-0,150
DDT, o,p'-	101	11	58	12	75	6	0,005	0,005-0,200
DDT, p,p'-	nd	-	67	12	91	4	0,020	0,010-0,200
Deltametrina	nd	-	nd	-	114	7	0,020	0,020-0,150
Diazinon	nd	-	nd	-	98	4	0,020	0,010-0,200
Dieldrin	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Difenoconazol	134	6	78	7	92	5	0,010	0,005-0,150
Endosulfan sulfato	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Endosulfan, alfa-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Endosulfan, beta-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Epoxiconazol	150	5	81	13	96	4	0,010	0,005-0,200
Etion	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Fention	153	7	85	8	93	7	0,010	0,005-0,150
Fenvalerato	nd	-	72	15	72	9	0,010	0,010-0,200
Fipronil	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Fluvalinato	123	6	81	6	79	2	0,010	0,005-0,150
HCH, alfa-	98	12	66	8	65	7	0,005	0,005-0,200
HCH, beta-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
HCH, delta-	nd	-	nd	-	67	19	-	-
HCH, gama-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Heptaclor	nd	-	nd	-	53	10	-	-
Heptaclor epoxido, cis-	nd	-	nd	-	84	15	-	-
Hexaclorobenceno	nd	-	22	17	37	12	-	-
Iprodione	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Isoxadifen etil	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Kresoxim metil	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Malation	nd	-	nd	-	89	18	0,020	0,010-0,200

Metalaxil	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Metidation	nd	-	75	13	91	6	0,010	0,010-0,200
Metiocarb	nd	-	46	58	84	8	0,020	0,020-0,200
Metolaclor	147	3	77	8	94	3	0,010	0,005-0,150
Metoxicloro	nd	-	107	10	110	6	0,010	0,005-0,200
Metribuzin	nd	-	74	11	94	7	0,010	0,010-0,150
Mirex	63	9	28	57	44	8	-	-
Oxifluorfen	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Paration	164	18	78	9	96	2	0,010	0,005-0,150
Paration metil	nd	-	66	9	91	9	0,020	0,010-0,200
Permetrina	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Pirimetanol	nd	-	53	57	90	6	0,020	0,005-0,150
Pirimifos metil	146	22	99	16	89	10	0,010	0,005-0,150
Profenofos	nd	-	nd	-	76	4	0,020	0,010-0,200
Simazina	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Tebuconazol	102	9	72	9	99	6	0,005	0,005-0,200
Tetradifon	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Trifluralina	121	7	70	8	69	7	0,005	0,005-0,200
Triticonazol	nd	-	nd	-	115	8	0,020	0,020-0,150
Vinclozolin	nd	-	nd	-	106	14	0,020	0,010-0,150

nd: no detectado

3.2.2. Metodologías de análisis multiresiduo de pesticidas en macroinvertebrados acuáticos

La siguiente etapa del trabajo fue el desarrollo y validación de metodologías de análisis multiresiduo de pesticidas en biomonitores del ambiente acuático. En este caso, las matrices seleccionadas para el estudio fueron tres grupos de macroinvertebrados acuáticos: ninfas de Odonata (pertenecientes al grupo funcional depredadores), moluscos bivalvos del género *Corbicula* (grupo funcional filtradores) y crustáceos decápodos del género *Aegla* (grupo funcional fragmentadores). Se contaba con un método desarrollado y validado previamente para el análisis de 73 residuos de pesticidas en ninfas de Odonata por LC-MS/MS y GC-MS/MS [26]. En la Tabla 16 se detallan el alcance y los límites de cuantificación del método.

Tabla 16. Alcance y límites de cuantificación (LOQ) de la metodología validada para el análisis de residuos de pesticidas en ninfas de Odonata

Pesticida	Técnica instrumental	LOQ (mg kg⁻¹)	Pesticida	Técnica instrumental	LOQ (mg kg⁻¹)
Acetamiprid	LC-MS/MS	0,01	Azinfos metil	GC-MS/MS	0,01
Atrazina	LC-MS/MS	0,001	Bifentrin	GC-MS/MS	0,01
Azoxiestrobina	LC-MS/MS	0,001	Bromopropilato	GC-MS/MS	0,01
Boscalid	LC-MS/MS	0,001	Carbofuran	GC-MS/MS	0,01
Carbaril	LC-MS/MS	0,01	Cialotrina	GC-MS/MS	0,01
Carbendazim	LC-MS/MS	0,01	Ciflutrina	GC-MS/MS	0,01
Ciproconazol	LC-MS/MS	0,001	Cipermetrina	GC-MS/MS	0,01
Ciprodinil	LC-MS/MS	0,01	Clorfenvinfos	GC-MS/MS	0,01
Clomazone	LC-MS/MS	0,001	Clorpirifos	GC-MS/MS	0,01
Clotianidina	LC-MS/MS	0,001	Clorpirifos metil	GC-MS/MS	0,01
Diazinon	LC-MS/MS	0,001	DDE, p,p'-	GC-MS/MS	0,01
Difenoconazol	LC-MS/MS	0,001	DDT, p,p'-	GC-MS/MS	0,01
Dimetoato	LC-MS/MS	0,001	Deltametrina	GC-MS/MS	0,01
Epoconazol	LC-MS/MS	0,001	Etion	GC-MS/MS	0,01
Fenbuconazol	LC-MS/MS	0,01	Fention	GC-MS/MS	0,01
Fluopicolida	LC-MS/MS	0,01	Fenvalerato	GC-MS/MS	0,01
Flusilazol	LC-MS/MS	0,001	Fipronil	GC-MS/MS	0,01
Haloxifop metil	LC-MS/MS	0,001	Fludioxonil	GC-MS/MS	0,01
Hexaconazol	LC-MS/MS	0,001	Fluvalinato	GC-MS/MS	0,01
Hexitiazox	LC-MS/MS	0,001	Kresoxim metil	GC-MS/MS	0,01
Imazalil	LC-MS/MS	0,01	Paration	GC-MS/MS	0,01
Imidacloprid	LC-MS/MS	0,01	Paration metil	GC-MS/MS	0,01
Iprodione	LC-MS/MS	0,01	Permetrina	GC-MS/MS	0,01
Malaonox	LC-MS/MS	0,001	Tetradifon	GC-MS/MS	0,01
Malation	LC-MS/MS	0,01	Trifluralina	GC-MS/MS	0,01
Mepanipirim	LC-MS/MS	0,01	Vinclozolin	GC-MS/MS	0,01

Metalaxil	LC-MS/MS	0,001
Metamidofos	LC-MS/MS	0,001
Metconazol	LC-MS/MS	0,01
Metomil	LC-MS/MS	0,01
Metoxifenocide	LC-MS/MS	0,001
Metsulfuron metil	LC-MS/MS	0,001
Piraclostrobina	LC-MS/MS	0,001
Pirimetamil	LC-MS/MS	0,001
Pirimicarb	LC-MS/MS	0,001
Procloraz	LC-MS/MS	0,01
Propiconazol	LC-MS/MS	0,001
Propoxur	LC-MS/MS	0,001
Tebuconazol	LC-MS/MS	0,001
Tebufenocida	LC-MS/MS	0,001
Tetraconazol	LC-MS/MS	0,01
Tiacloprid	LC-MS/MS	0,001
Tiametoxan	LC-MS/MS	0,01
Tiodicarb	LC-MS/MS	0,01
Triciclazol	LC-MS/MS	0,001
Trifloxiestrobina	LC-MS/MS	0,001
Triticonazol	LC-MS/MS	0,001

3.2.2.1. Preparación de muestras

Las metodologías de preparación de muestra se encuentran descritas en el apartado 3.2. Al igual que para las matrices de la colmena, la preparación de muestras para análisis de residuos de pesticidas en ninfas de Odonata se basó en la estrategia de QuEChERS. En particular, se miniaturizó la metodología, utilizando 0,2 g de muestra y 1 mL de acetonitrilo en la extracción. Para las matrices *Corbicula* y *Aegla*, se siguió la misma estrategia de preparación de muestra. Se realizó la validación de los métodos en las dos matrices por LC-MS/MS y GC-MS/MS. En la Tabla 17 se muestra la comparación de los métodos desarrollados para las tres matrices, donde se puede observar que la única diferencia entre ellos está en la etapa de purificación del extracto ya que para *Corbicula* no se utilizó GCB, mientras que para ninfas de Odonata y *Aegla* sí.

Tabla 17. Comparación de los métodos de extracción utilizados para macroinvertebrados acuáticos

Método	Matriz		
	Ninfas de Odonata	<i>Corbicula</i>	<i>Aegla</i>
Masa de muestra (g)	0,2	0,2	0,2
Agregado de agua (mL)	0,5	0,5	0,5
Disolvente de extracción (mL)	MeCN (1)	MeCN (1)	MeCN (1)

Partición	MgSO ₄ (0,4 g) + NaCl (0,1 g)	MgSO ₄ (0,4 g) + NaCl (0,1 g)	MgSO ₄ (0,4 g) + NaCl (0,1 g)
Ajuste de pH en partición	Buffer cítrico/citrato	Buffer cítrico/citrato	Buffer cítrico/citrato
<i>d-SPE clean-up</i>	MgSO ₄ :GCB (59:1) (150) + PSA (25) + C18 (25)	MgSO ₄ (150) + PSA (25) + C18 (25)	MgSO ₄ :GCB (59:1) (150) + PSA (25) + C18 (25)
Factor de concentración LC	-	-	-
Disolvente de inyección LC	MeCN	MeCN	MeCN
Concentración de matriz LC (g mL ⁻¹)	0,2	0,2	0,2
Factor de concentración GC	x 10	x 10	x 10
Disolvente de inyección GC	AcOEt	AcOEt	AcOEt
Concentración de matriz GC (g mL ⁻¹)	2	2	2

3.2.2.2. Validación de metodologías de análisis de residuos de pesticidas

3.2.2.2.1. *Corbicula*

Veracidad y precisión

Los ensayos de fortificación se realizaron a 0,001, 0,005, 0,01 y 0,05 mg kg⁻¹. Por LC-MS/MS, se lograron validar 75 compuestos. Los porcentajes de recuperación obtenidos estuvieron entre 70% y 115%, con RSDs menores o iguales a 20% (Tabla 18). Por GC-MS/MS, se analizaron los niveles de concentración de 0,005, 0,01 y 0,02 mg kg⁻¹, obteniendo porcentajes de recuperación entre 70% y 114% con RSDs menores o iguales a 20% para 56 compuestos (Tabla 19).

Límite de cuantificación

Los límites de cuantificación alcanzados para los pesticidas analizados por LC-MS/MS y GC-MS/MS se muestran en la Figura 14.

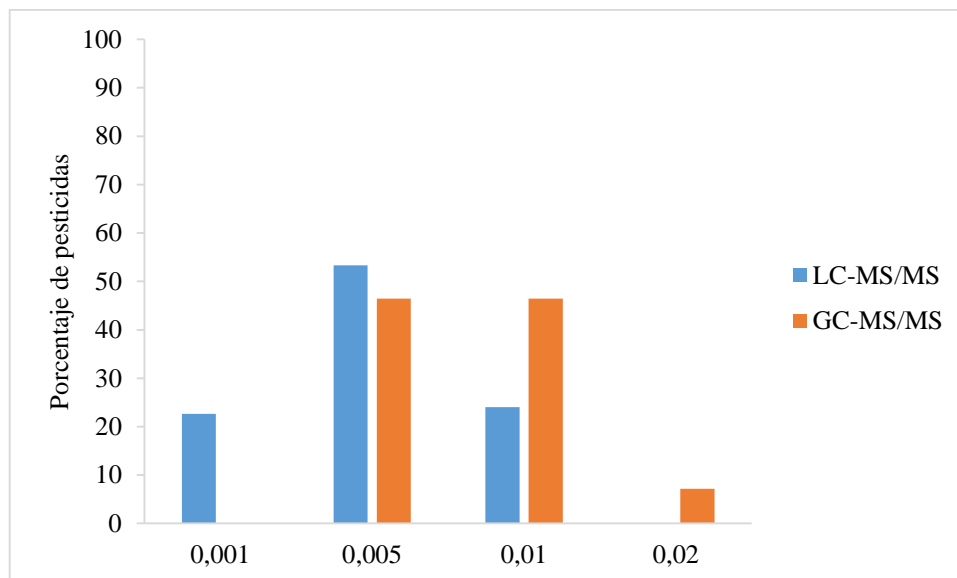


Figura 14. Límites de cuantificación (en mg kg⁻¹) obtenidos para los compuestos analizados en *Corbicula* por LC-MS/MS y GC-MS/MS

Linealidad y efecto matriz

Para los compuestos analizados por LC-MS/MS, las curvas de calibración en disolvente y en matriz se construyeron a partir de los estándares a ocho niveles de concentración entre 0,001 y 0,1 mg kg⁻¹. Para la mayoría de los compuestos, el rango lineal estuvo entre 0,005 y 0,1 mg kg⁻¹ (Tabla 18). En la Figura 15 se muestra el efecto matriz de los pesticidas validados por LC-MS/MS. En el 75% de los casos fue bajo y en el 23% moderado, mientras que sólo el 1% correspondiente a protioconazol mostró efecto matriz pronunciado (EM 58%). El 1% de compuestos restantes, correspondiente a metamidofos, no tuvo efecto matriz (EM 0%). Además, la mayoría de los compuestos presentaron supresión de la señal con respecto a la señal en el disolvente, excepto propamocarb (EM muy bajo, 1%) y protioconazol (EM 58%).

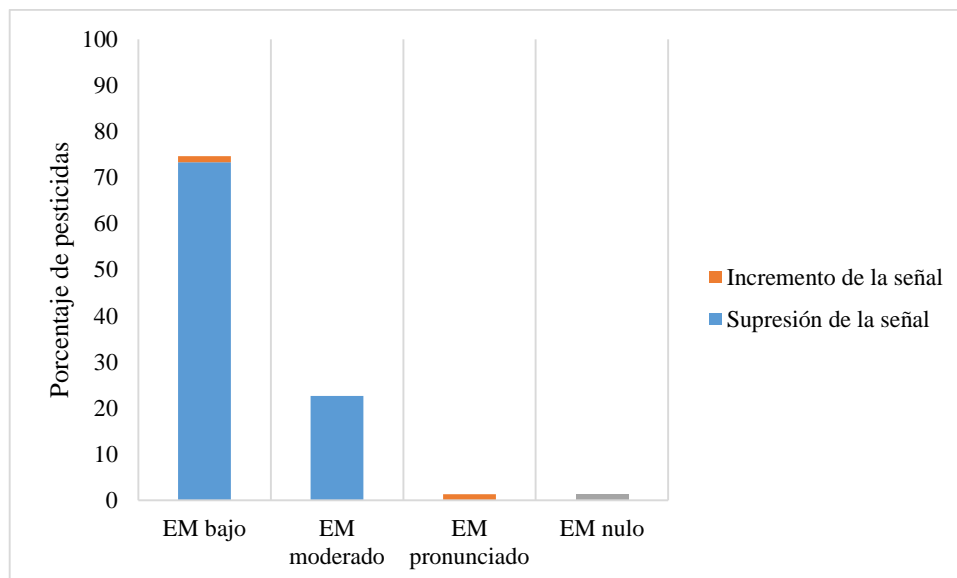


Figura 15. Efecto matriz (EM) de los pesticidas validados por LC-MS/MS en *Corbicula*

Para los compuestos analizados por GC-MS/MS, la linealidad se evaluó entre 0,001 y 0,2 mg kg⁻¹, resultando que para la mayoría el rango lineal estuvo entre 0,001 y 0,2 mg kg⁻¹ (Tabla 19).

Alcance final

En resumen, por LC se logró tener un alcance de 75 pesticidas mientras que por GC el alcance fue de 56. Del total de compuestos validados en esta matriz, 13 se validaron por ambas técnicas. Por lo tanto, el alcance final del método fue 118 pesticidas.

Tabla 18. Recuperaciones, desviaciones estándar relativas (RSD), límites de cuantificación (LOQ), rangos lineales y efecto matriz obtenidos para los nuevos pesticidas analizados por LC-MS/MS en *Corbicula*

Pesticida	0,001 mg kg ⁻¹		0,005 mg kg ⁻¹		0,010 mg kg ⁻¹		0,050 mg kg ⁻¹		LOQ (mg kg ⁻¹)	Rango lineal (mg kg ⁻¹)	Efecto matriz (%)
	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)			
2,4-D	nd	-	95	9	84	5	84	2	0,005	0,005-0,100	-29
2,4-DB	nd	-	87	13	99	4	98	5	0,005	0,005-0,100	-30
Acefato	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Acetamiprid	nd	-	110	6	108	5	93	7	0,005	0,0025-0,100	-4
Acetoclor	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Alaclor	nd	-	nd	-	85	7	90	9	0,01	0,005-0,100	-21
Ametrina	102	6	99	3	96	5	88	4	0,001	0,001-0,075	-7
Atrazina	nd	-	108	7	105	7	92	4	0,005	0,0025-0,100	-12
Atrazina desetil	nd	-	101	9	105	3	95	6	0,005	0,0025-0,100	-15
Atrazina desisopropil	nd	-	nd	-	95	5	111	11	0,01	0,005-0,100	-11
Azinfos metil	nd	-	77	11	89	7	79	10	0,005	0,0025-0,100	-16
Azoxiestrobina	nd	-	91	8	99	3	93	5	0,005	0,0025-0,100	-19
Bifentrin	122	5	130	5	129	9	121	2	0,001	0,001-0,100	-19
Bispiribac	nd	-	87	2	95	7	94	6	0,005	0,0025-0,100	-9
Boscalid	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Carbaril	nd	-	102	7	110	7	94	6	0,005	0,005-0,100	-9
Carbendazim	nd	-	97	4	94	2	88	6	0,005	0,0025-0,100	-10
Carbofuran	nd	-	82	20	98	8	90	5	0,005	0,005-0,100	-12
Cimoxanilo	nd	-	96	3	99	4	95	4	0,005	0,005-0,100	-15
Ciproconazol	nd	-	87	13	108	9	95	5	0,005	0,005-0,100	-10
Ciprodinil	nd	-	nd	-	102	13	98	13	0,01	0,010-0,100	-8
Clomazone	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Clorantraniliprol	nd	-	111	12	98	12	106	6	0,005	0,0025-0,100	-1
Clorpirifos	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Clorsulfuron	nd	-	nd	-	91	17	91	11	0,01	0,010-0,100	-4

Clotianidina	nd	-	123	6	110	11	81	8	0,01	0,0025-0,100	-11
Cumafos	nd	-	83	12	81	6	77	7	0,005	0,0025-0,075	-19
Diazinon	84	15	113	14	99	8	84	4	0,001	0,001-0,075	-10
Dicamba	nd	-	nd	-	90	19	80	7	0,01	0,010-0,100	-25
Diclosulam	nd	-	63	8	69	7	86	6	-	0,005-0,100	-26
Difenoconazol	nd	-	103	7	106	6	99	6	0,005	0,005-0,100	-14
Diflubenzuron	nd	-	107	16	92	13	108	7	0,005	0,005-0,100	-7
Dimetoato	82	7	97	3	95	4	96	7	0,001	0,001-0,100	-17
Diuron	951	145	484	106	383	95	105	16	-	0,001-0,075	-7
Epoxiconazol	nd	-	109	17	98	6	90	4	0,005	0,005-0,075	-14
Etion	nd	-	12	17	10	13	17	11	-	-	-
Fenbuconazol	nd	-	nd	-	95	13	99	9	0,01	0,010-0,100	-19
Fention sulfona	nd	-	97	4	94	9	96	4	0,005	0,005-0,100	-7
Fention sulfoxido	nd	-	107	7	101	7	93	7	0,005	0,0025-0,100	-11
Fipronil	86	5	85	3	80	15	74	7	0,001	0,001-0,100	-29
Fipronil desulfinitil	92	10	88	2	87	13	76	5	0,001	0,001-0,100	-31
Fipronil sulfona	103	9	92	4	88	5	80	4	0,001	0,001-0,100	-15
Fipronil sulfuro	80	9	75	2	78	5	74	5	0,001	0,001-0,075	-26
Fludioxonil	nd	-	95	4	91	3	88	5	0,005	0,0025-0,100	-32
Flufenoxuron	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Flumetsulam	nd	-	106	13	102	5	101	7	0,005	0,005-0,100	-4
Fluroxipir meptil	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Flusilazol	nd	-	86	12	88	11	94	3	0,005	0,0025-0,100	-23
Fluvalinato	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Haloxifop metil	nd	-	91	9	78	12	81	4	0,005	0,005-0,100	-21
Hexaconazol	nd	-	nd	-	106	10	98	6	0,01	0,010-0,100	-4
Hexitiazox	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Imazalil	nd	-	nd	-	108	11	91	10	0,01	0,010-0,100	-11
Imazamox	nd	-	85	11	93	9	88	6	0,005	0,005-0,100	-8
Imazapic	nd	-	105	12	96	6	86	3	0,005	0,005-0,100	-7
Imazapir	nd	-	79	7	87	6	79	4	0,005	0,0025-0,100	-2
Imazetapir	nd	-	95	6	94	5	88	7	0,005	0,0025-0,100	-3

Imidacloprid	nd	-	108	13	86	11	84	11	0,005	0,005-0,100	-16
Iprodione	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Isoxadifen etil	nd	-	nd	-	97	6	87	13	0,01	0,005-0,100	-5
Linuron	nd	-	148	16	125	13	97	9	-	0,005-0,100	-11
Malaoxon	74	16	86	8	82	8	89	8	0,001	0,001-0,075	-8
Malation	98	6	97	2	95	2	86	5	0,001	0,001-0,075	-18
MCPA	nd	-	85	8	89	6	78	5	0,005	0,0025-0,100	-27
Metalaxil	90	7	105	3	93	3	91	5	0,001	0,001-0,100	-11
Metamidofos	nd	-	nd	-	103	9	83	6	0,01	0,010-0,100	0
Metconazol	nd	-	108	11	97	10	98	5	0,005	0,005-0,100	-13
Metiocarb	nd	-	113	7	91	7	93	5	0,005	0,0025-0,075	-21
Metiocarb sulfona	90	17	185	10	196	9	na	-	-	-	-
Metiocarb sulfoxido	nd	-	118	5	144	24	189	6	-	-	-
Metolaclor	nd	-	89	7	97	2	84	5	0,005	0,005-0,100	-15
Metomil	na	-	na	-	na	-	na	-	-	-	-
Metoxifenocide	68	8	91	5	93	4	87	3	0,005	0,001-0,100	-23
Metsulfuron metil	nd	-	nd	-	101	8	99	6	0,01	0,010-0,100	-9
Paration metil	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Penoxsulam	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Picoxistrobin	nd	-	nd	-	73	9	90	6	0,01	0,010-0,100	-21
Piraclostrobina	101	6	83	6	96	2	90	6	0,001	0,001-0,100	-24
Pirazosulfuron	nd	-	nd	-	91	7	96	7	0,01	0,010-0,100	-7
Pirimicarb	86	6	104	4	105	2	92	7	0,001	0,001-0,100	-7
Pirimifos metil	nd	-	nd	-	74	11	68	4	-	0,005-0,100	-27
Procloraz	na	-	na	-	na	-	na	-	-	-	-
Profenofos	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Propamocarb	75	6	90	6	90	5	87	3	0,001	0,001-0,100	1
Propanil	nd	-	95	14	103	13	97	9	0,005	0,0025-0,100	-14
Propiconazol	na	-	na	-	na	-	na	-	-	-	-
Propoxur	98	14	105	3	104	5	98	6	0,001	0,001-0,100	-4
Protioconazol	nd	-	181	21	75	8	102	7	0,01	0,005-0,100	58

Saflufenacil	nd	-	nd	-	85	47	109	13	-	0,010-0,075	-6
Simazina	nd	-	101	7	115	10	97	7	0,005	0,005-0,100	-13
Sulfentrazona	nd	-	nd	-	65	19	113	11	-	0,010-0,100	-25
Tebuconazol	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Tebufenocida	nd	-	106	4	79	9	87	7	0,005	0,0025-0,075	-22
Terbacilo	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Terbutilazina	nd	-	nd	-	93	2	93	6	0,01	0,005-0,100	-13
Tetraconazol	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Tiabendazol	nd	-	102	5	101	2	92	7	0,005	0,005-0,100	-4
Tiacloprid	nd	-	106	4	103	4	95	6	0,005	0,005-0,100	-10
Tiametoxan	nd	-	nd	-	72	14	82	8	0,01	0,010-0,100	-15
Tiodicarb	nd	-	30	13	42	23	48	17	-	0,001-0,100	-16
Triciclazol	108	12	100	12	97	4	90	4	0,001	0,001-0,075	-15
Triclopir	nd	-	70	7	96	8	88	5	0,005	0,005-0,100	-17
Triclorfon	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Trifloxiestrobina	81	10	79	3	93	4	85	7	0,001	0,001-0,100	-20
Triflumuron	nd	-	nd	-	74	8	79	9	0,01	0,005-0,100	-41

nd: no detectado, na: no analizado

Tabla 19. Recuperaciones, desviaciones estándar relativas (RSD), límites de cuantificación (LOQ) y rangos lineales obtenidos para los nuevos pesticidas analizados por GC-MS/MS en *Corbicula*

Pesticida	0,005 mg kg ⁻¹		0,010 mg kg ⁻¹		0,020 mg kg ⁻¹		LOQ (mg kg ⁻¹)	Rango lineal (mg kg ⁻¹)
	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)		
Acetoclor	101	15	108	6	76	12	0,005	0,001-0,200
Alaclor	98	13	104	4	79	13	0,005	0,005-0,200
Aldrin	93	23	96	11	77	13	0,01	0,005-0,200
Ametrina	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Azinfos metil	nd	-	nd	-	nd	-	-	-

Azoxiestrobina	87	18	98	3	77	12	0,005	0,001-0,200
Bifentrin	91	20	102	3	77	11	0,005	0,005-0,200
Boscalid	104	12	105	9	124	3	0,005	0,001-0,200
Bromopropilato	98	20	102	7	87	10	0,005	0,001-0,200
Carbofuran	71	13	97	11	72	17	0,005	0,005-0,200
Cialotrina	nd	-	111	7	97	11	0,01	0,010-0,200
Ciflutrina	101	8	99	3	88	13	0,005	0,005-0,200
Cihalofop butil	88	23	104	4	76	11	0,01	0,001-0,200
Cipermetrina	nd	-	104	3	89	13	0,01	0,010-0,200
Clomazone	95	22	109	4	73	14	0,01	0,001-0,200
Clorantraniliprol	nd	-	nd	-	69	14	-	-
Clordano, cis-	92	18	99	6	79	11	0,005	0,001-0,200
Clordano, trans-	94	19	100	10	82	11	0,005	0,001-0,200
Clorotalonil	nd	-	93	22	13	31	-	-
Clorpirifos	102	22	111	8	74	14	0,01	0,001-0,200
Clorpirifos metil	83	28	99	6	74	12	0,01	0,001-0,200
DDD, o,p'-	98	20	100	6	104	5	0,005	0,001-0,200
DDD, p,p'-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
DDE, o,p'-	89	20	98	6	80	9	0,005	0,001-0,200
DDE, p,p'-	97	13	101	9	88	8	0,005	0,001-0,200
DDT, o,p'-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
DDT, p,p'-	21	-	88	10	56	10	0,01	0,005-0,200
Deltametrina	nd	-	nd	-	93	19	0,02	0,010-0,200
Diazinon	95	24	97	8	80	11	0,01	0,001-0,200
Dieldrin	nd	-	nd	-	94	5	0,02	0,010-0,200
Difenoconazol	103	23	107	7	90	14	0,01	0,001-0,200
Endosulfan sulfato	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Endosulfan, alfa-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Endosulfan, beta-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Epoxiconazol	91	19	108	7	80	12	0,005	0,001-0,200
Etion	nd	-	124	4	60	9	-	-
Fention	107	17	110	13	96	11	0,005	0,001-0,200

Fenvalerato	97	14	98	8	86	10	0,005	0,005-0,200
Fipronil	nd	-	102	13	89	10	0,01	0,005-0,200
Fluvalinato	87	22	105	7	88	11	0,01	0,005-0,200
HCH, alfa-	96	24	98	3	69	14	0,01	0,001-0,200
HCH, beta-	75	15	84	12	69	15	0,005	0,005-0,200
HCH, delta-	nd	-	100	9	67	18	0,01	0,010-0,200
HCH, gama-	100	28	108	3	73	12	0,01	0,005-0,200
Heptaclor	81	21	96	6	64	14	0,005	0,005-0,200
Heptaclor epoxido, cis-	94	17	107	5	81	13	0,005	0,001-0,200
Hexaclorobenceno	80	17	84	5	61	15	0,005	0,001-0,200
Iprodione	nd	-	99	6	72	13	0,01	0,010-0,200
Isoxadifen etil	nd	-	97	10	79	11	0,01	0,005-0,200
Kresoxim metil	nd	-	99	20	150	8	-	-
Malation	90	17	101	5	83	14	0,005	0,005-0,200
Metalaxil	nd	-	114	5	79	13	0,01	0,010-0,200
Metidation	97	21	114	3	93	7	0,005	0,005-0,200
Metiocarb	nd	-	nd	-	73	9	0,02	0,020-0,200
Metolaclor	92	25	107	4	83	13	0,01	0,001-0,200
Metoxicloro	nd	-	nd	-	63	9	-	-
Metribuzin	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Mirex	77	20	88	7	65	11	0,005	0,001-0,200
Oxifluorfen	nd	-	112	9	100	4	0,01	0,010-0,200
Paration	94	18	112	4	97	10	0,005	0,005-0,200
Paration metil	97	23	96	11	77	11	0,01	0,005-0,200
Permetrina	nd	-	89	9	79	9	0,01	0,010-0,200
Pirimetaniil	129	27	87	13	75	11	0,01	0,005-0,200
Pirimifos metil	92	24	103	10	74	14	0,01	0,005-0,200
Profenofos	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Simazina	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Tebuconazol	91	20	112	8	77	7	0,005	0,005-0,200
Tetradifon	nd	-	109	8	86	12	0,01	0,005-0,200

Trifluralina	87	19	98	4	76	12	0,005	0,001-0,200
Triticonazol	nd	-	nd	-	89	13	0,02	0,010-0,200
Vinclozolin	111	28	104	7	84	14	0,01	0,005-0,200

nd: no detectado

3.2.2.2.2. *Aegla*

Veracidad y precisión

Los ensayos de fortificación se realizaron a 0,001, 0,005, 0,01, 0,02, 0,05 y 0,1 mg kg⁻¹. Por LC-MS/MS, se lograron validar 80 compuestos. Los porcentajes de recuperación obtenidos estuvieron entre 70% y 120%, con RSDs menores o iguales a 20% (Tabla 20). Por GC-MS/MS, se analizaron los niveles de concentración de 0,005, 0,01 y 0,05 mg kg⁻¹, obteniendo porcentajes de recuperación entre 70% y 120% con RSDs menores o iguales a 20% para 46 compuestos (Tabla 21).

Límite de cuantificación

Los límites de cuantificación alcanzados para los pesticidas analizados por LC-MS/MS se muestran en la Figura 16.

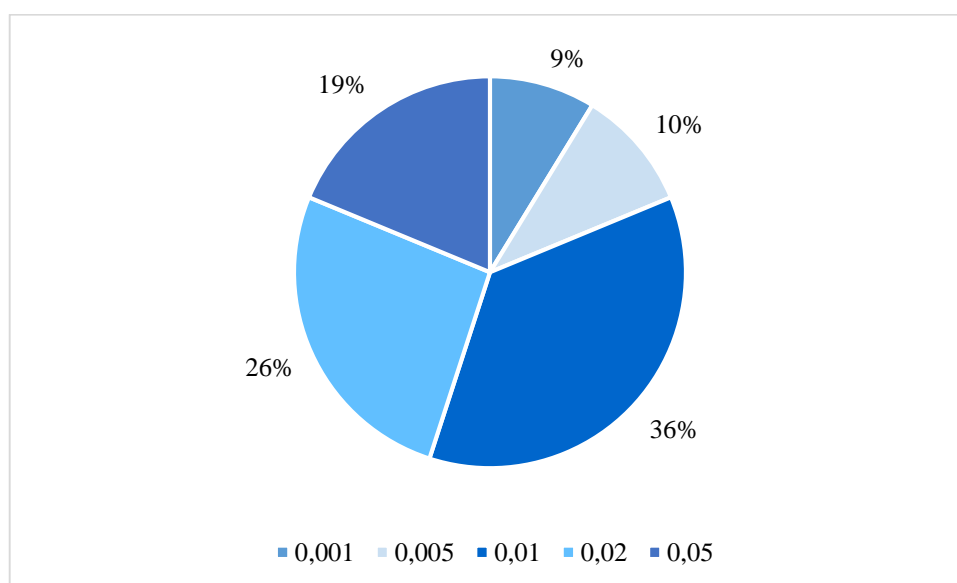


Figura 16. Límites de cuantificación (en mg kg⁻¹) obtenidos para los compuestos analizados en *Aegla* por LC-MS/MS

Para los pesticidas analizados por GC-MS/MS, el límite de cuantificación fue 0,005 mg kg⁻¹ para 36 compuestos, 0,01 mg kg⁻¹ para 8 compuestos y 0,02 mg kg⁻¹ para los restantes 2 pesticidas validados (Tabla 21).

Linealidad y efecto matriz

Para los compuestos analizados por LC-MS/MS, las curvas de calibración en disolvente y en matriz se construyeron a partir de los estándares a siete niveles de concentración entre 0,001 y 0,2 mg kg⁻¹. Para la mayoría de los compuestos, el rango lineal estuvo entre 0,01 y 0,2 mg kg⁻¹ (Tabla 20). En la Figura 17 se muestra el efecto matriz de los pesticidas validados por LC-MS/MS. En el 75% de los casos fue bajo y en el 23% moderado, mientras que sólo el 2% correspondiente a azoxiestrobina y propanil mostró efecto matriz pronunciado (EM 52% y -52%, respectivamente). Además, la mayoría de los compuestos (78%) presentaron supresión de la señal con respecto a la señal en el disolvente.

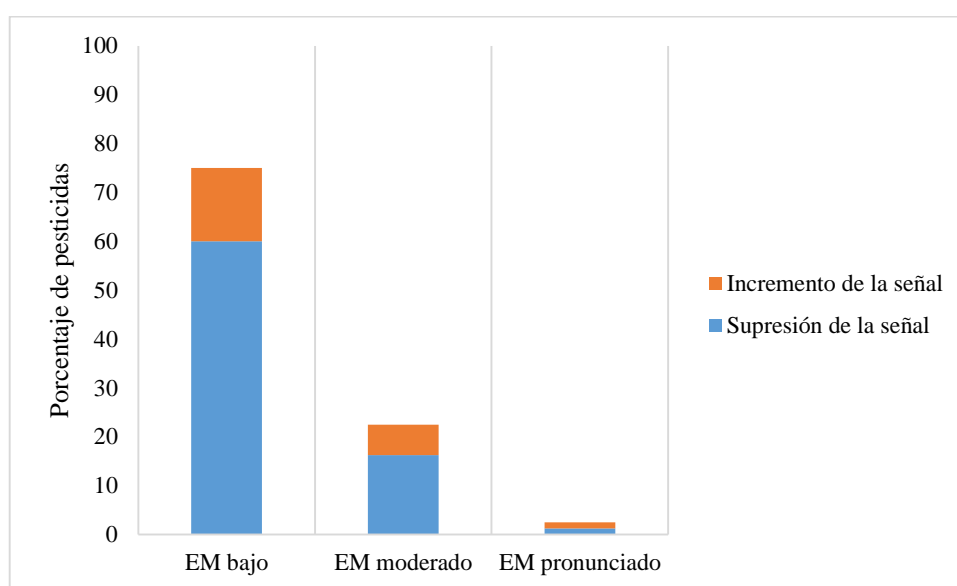


Figura 17. Efecto matriz (EM) de los pesticidas validados por LC-MS/MS en *Aegla*

Para los compuestos analizados por GC-MS/MS, la linealidad se evaluó entre 0,001 y 0,2 mg kg⁻¹, resultando que para la mayoría el rango lineal estuvo entre 0,001 y 0,2 mg kg⁻¹ (Tabla 21).

Alcance final

En resumen, por LC se logró tener un alcance de 80 pesticidas mientras que por GC el alcance fue de 46. Del total de compuestos validados en esta matriz, 13 se validaron por ambas técnicas. Por lo tanto, el alcance final del método fue 113 pesticidas.

Tabla 20. Recuperaciones, desviaciones estándar relativas (RSD), límites de cuantificación (LOQ), rangos lineales y efecto matriz obtenidos para los nuevos pesticidas analizados por LC-MS/MS en *Aegla*

Pesticida	0,001 mg kg ⁻¹		0,005 mg kg ⁻¹		0,010 mg kg ⁻¹		0,020 mg kg ⁻¹		0,050 mg kg ⁻¹		0,100 mg kg ⁻¹		LOQ (mg kg ⁻¹)	Rango lineal (mg kg ⁻¹)	Efecto matriz (%)
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)			
2,4-D	nd	-	nd	-	nd	-	105	9	81	14	97	8	0,02	0,020-0,200	27
2,4-DB	nd	-	nd	-	nd	-	91	19	73	15	94	8	0,02	0,020-0,200	35
Acefato	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	66	7	62	6	-	-	-
Acetamiprid	nd	-	nd	-	82	12	70	13	61	12	110	2	0,01	0,010-0,200	-5
Acetoclor	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	108	1	96	8	0,05	0,050-0,200	-44
Alaclor	nd	-	nd	-	nd	-	78	8	79	10	102	11	0,02	0,020-0,200	-22
Ametrina	nd	-	71	15	80	15	69	8	65	20	130	10	0,005	0,005-0,200	3
Atrazina	nd	-	nd	-	83	8	86	3	79	5	113	2	0,01	0,005-0,100	-10
Atrazina desetil	nd	-	nd	-	nd	-	79	11	70	8	109	5	0,02	0,010-0,200	-13
Atrazina desisopropil	nd	-	nd	-	74	18	89	5	73	12	107	4	0,01	0,010-0,200	-15
Azinfos metil	nd	-	nd	-	215	3	128	9	92	15	133	6	-	-	-
Azoxiestrobina	nd	-	111	9	81	9	75	4	58	7	112	6	0,005	0,005-0,100	52
Bifentrin	nd	-	192	26	168	3	187	11	141	8	206	2	-	-	-
Bispiribac	nd	-	nd	-	56	18	69	11	60	5	107	8	0,02	0,010-0,200	-19
Boscalid	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	116	13	73	4	0,05	0,020-0,200	-9
Carbaril	nd	-	nd	-	nd	-	73	4	60	5	89	2	0,02	0,010-0,200	-23
Carbendazim	nd	-	96	5	71	1	71	9	58	5	83	3	0,005	0,005-0,200	-11
Carbofuran	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	100	8	-	-	-
Cimoxanilo	nd	-	nd	-	nd	-	74	7	74	6	115	6	0,02	0,010-0,200	-15
Ciproconazol	nd	-	nd	-	nd	-	60	12	62	8	107	8	-	-	-
Ciprodinil	nd	-	nd	-	65	13	85	16	60	24	94	13	0,02	0,010-0,200	-2
Clomazone	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Clorantraniliprol	nd	-	nd	-	60	14	87	18	74	11	79	5	0,02	0,005-0,200	-12
Clorpirifos	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	90	8	91	6	0,05	0,050-0,200	-18
Clorsulfuron	nd	-	nd	-	nd	-	49	40	48	20	81	10	-	-	-

Clotianidina	nd	-	nd	-	88	26	70	2	64	10	98	9	0,02	0,005-0,200	-9
Cumafos	nd	-	nd	-	63	8	91	12	65	25	93	9	0,02	0,005-0,200	-21
Diazinon	54	20	97	29	92	3	101	9	74	7	117	12	0,01	0,001-0,200	-17
Dicamba	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	90	7	-	-	-
Diclosulam	nd	-	102	16	98	13	94	14	86	20	97	6	0,005	0,005-0,200	5
Difenoconazol	nd	-	nd	-	nd	-	77	13	69	20	102	17	0,02	0,010-0,200	5
Diflubenzuron	nd	-	nd	-	82	14	75	12	56	8	77	14	0,01	0,010-0,200	1
Dimetoato	73	32	85	32	73	6	65	13	62	5	95	3	0,01	0,001-0,200	-10
Diuron	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	69	10	110	1	0,05	0,050-0,200	-36
Epoxiconazol	nd	-	nd	-	78	10	70	9	71	8	113	9	0,01	0,010-0,200	-18
Etion	135	14	107	25	101	12	108	9	92	10	141	4	0,01	0,001-0,200	-14
Fenbuconazol	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	78	43	149	11	-	-	-
Fention sulfona	nd	-	nd	-	91	4	89	11	78	6	101	5	0,01	0,010-0,200	1
Fention sulfoxido	nd	-	113	27	91	2	114	7	69	16	115	7	0,01	0,005-0,200	-8
Fipronil	112	15	105	17	95	2	93	9	79	16	109	4	0,001	0,001-0,200	9
Fipronil desulfinitil	108	16	102	11	96	2	94	9	81	15	98	5	0,001	0,001-0,200	-8
Fipronil sulfona	94	19	96	16	91	2	90	11	74	16	97	5	0,001	0,001-0,200	-4
Fipronil sulfuro	102	17	90	14	86	1	84	12	78	11	99	5	0,001	0,001-0,200	-13
Fludioxonil	96	16	104	36	97	5	94	9	67	19	98	6	0,001	0,001-0,200	-7
Flufenoxuron	nd	-	nd	-	70	7	57	10	68	13	81	2	0,01	0,010-0,200	-15
Flumetsulam	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	75	12	112	4	0,05	0,020-0,200	-1
Fluroxipir meptil	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	75	6	115	6	0,05	0,010-0,200	-10
Flusilazol	nd	-	nd	-	86	8	67	13	59	7	101	5	0,01	0,005-0,200	-39
Fluvalinato	nd	-	nd	-	114	9	191	11	138	7	161	8	-	-	-
Haloxifop metil	nd	-	nd	-	79	4	71	17	65	13	130	5	0,01	0,010-0,200	-15
Hexaconazol	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	96	4	-	-	-
Hexitiazox	nd	-	101	27	84	7	96	9	70	5	98	7	0,01	0,005-0,200	-9
Imazalil	nd	-	nd	-	83	21	74	11	74	15	99	13	0,01	0,005-0,200	-11
Imazamox	nd	-	nd	-	55	18	89	14	61	5	93	8	0,02	0,010-0,200	-4
Imazapic	nd	-	115	16	71	8	68	7	61	7	97	4	0,005	0,005-0,200	5
Imazapir	nd	-	96	36	73	15	65	8	68	11	88	9	0,01	0,005-0,200	3
Imazetapir	nd	-	98	30	73	3	70	13	60	8	89	2	0,01	0,005-0,200	9

Imidacloprid	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	40	23	50	18	-	-	-
Iprodione	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Isoxadifen etil	nd	-	nd	-	nd	-	29	40	27	10	89	6	-	-	-
Linuron	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	69	8	113	15	0,05	0,010-0,200	-7
Malaoxon	nd	-	111	28	80	12	89	13	71	8	121	5	0,01	0,005-0,200	-20
Malation	nd	-	100	24	92	11	97	13	68	12	123	7	0,01	0,005-0,200	-29
MCPA	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	103	10	-	-	-
Metalaxil	nd	-	79	25	68	7	72	5	64	3	102	8	0,02	0,005-0,200	-8
Metamidofos	nd	-	nd	-	nd	-	69	10	62	2	43	6	-	-	-
Metconazol	nd	-	nd	-	nd	-	80	6	80	11	107	4	0,02	0,020-0,200	-6
Metiocarb	nd	-	nd	-	nd	-	95	19	63	27	92	16	0,02	0,020-0,200	-20
Metiocarb sulfona	nd	-	57	29	48	8	48	14	52	11	79	4	-	-	-
Metiocarb sulfoxido	nd	-	83	28	66	2	67	9	62	7	88	5	-	-	-
Metolaclor	nd	-	89	8	84	11	72	11	72	7	101	12	0,005	0,005-0,100	-9
Metomil	119	15	116	29	99	1	93	12	81	12	101	2	0,001	0,001-0,100	2
Metoxifenocide	nd	-	130	34	88	5	99	8	82	5	167	4	0,01	0,001-0,200	-7
Metsulfuron metil	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	65	19	118	8	0,05	0,050-0,200	25
Paration metil	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Penoxsulam	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	70	26	111	5	-	-	-
Picoxistrobin	nd	-	nd	-	nd	-	89	7	73	9	135	3	0,02	0,020-0,200	-14
Piraclostrobina	nd	-	76	36	85	6	82	17	69	3	109	15	0,01	0,001-0,200	-13
Pirazosulfuron	nd	-	nd	-	nd	-	66	17	78	18	116	1	0,05	0,010-0,200	-20
Pirimicarb	81	13	89	27	76	5	75	9	64	12	97	3	0,001	0,001-0,200	-8
Pirimifos metil	nd	-	nd	-	136	13	134	16	67	34	138	13	-	-	-
Procloraz	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Profenofos	nd	-	nd	-	nd	-	76	10	86	5	146	2	0,02	0,020-0,200	-21
Propamocarb	nd	-	nd	-	83	8	67	9	70	4	30	5	0,01	0,005-0,200	3
Propanil	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	95	3	117	11	0,05	0,010-0,200	-52
Propiconazol	nd	-	nd	-	nd	-	59	25	69	24	124	13	-	-	-
Propoxur	nd	-	nd	-	80	7	77	9	64	3	96	3	0,01	0,010-0,200	-29
Protioconazol	nd	-	nd	-	nd	-	122	41	230	31	468	49	-	-	-

Saflufenacil	nd	-	nd	-	nd	-	61	18	79	19	113	3	0,05	0,010-0,200	15
Simazina	nd	-	nd	-	110	19	71	15	73	15	96	6	0,01	0,010-0,200	-19
Sulfentrazona	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	104	11	82	18	0,05	0,020-0,200	-22
Tebuconazol	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	93	16	94	5	0,05	0,020-0,200	-17
Tebufenocida	nd	-	130	33	112	19	105	9	120	6	137	14	0,01	0,005-0,200	-9
Terbacilo	nd	-	nd	-	nd	-	82	13	72	18	111	8	0,02	0,020-0,200	21
Terbutilazina	nd	-	nd	-	79	6	85	4	66	19	113	4	0,01	0,010-0,200	-22
Tetraconazol	nd	-	nd	-	nd	-	68	21	84	20	96	16	0,02	0,020-0,200	-18
Tiabendazol	nd	-	88	31	72	2	66	10	53	10	86	5	0,01	0,005-0,200	-15
Tiacloprid	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	65	5	118	13	0,05	0,050-0,200	-40
Tiametoxan	nd	-	nd	-	nd	-	79	22	73	5	101	14	0,02	0,020-0,200	-1
Tiodicarb	nd	-	49	47	33	22	34	29	43	14	79	1	-	-	-
Triciclazol	nd	-	132	25	69	13	67	6	52	8	88	9	0,01	0,010-0,200	-11
Triclopir	nd	-	nd	-	78	7	85	11	73	11	85	7	0,01	0,010-0,200	40
Triclorfon	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	86	11	116	21	0,05	0,050-0,200	-30
Trifloxiestrobina	77	22	90	18	70	11	82	12	66	11	115	7	0,005	0,001-0,200	-20
Triflumuron	nd	-	99	3	88	5	85	14	67	8	99	10	0,005	0,005-0,200	-17

nd: no detectado

Tabla 21. Recuperaciones, desviaciones estándar relativas (RSD), límites de cuantificación (LOQ) y rangos lineales obtenidos para los nuevos pesticidas analizados por GC-MS/MS en *Aegla*

Pesticida	0,005 mg kg ⁻¹		0,010 mg kg ⁻¹		0,050 mg kg ⁻¹		LOQ (mg kg ⁻¹)	Rango lineal (mg kg ⁻¹)
	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)		
Acetoclor	99	15	92	11	70	9	0,005	0,005-0,200
Alaclor	nd	-	86	17	70	7	0,01	0,010-0,200
Aldrin	94	16	82	14	60	7	0,005	0,005-0,200
Ametrina	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Azinfos metil	nd	-	nd	-	nd	-	-	-

Azoxiestrobina	90	17	89	16	61	14	0,005	0,001-0,200
Bifentrin	98	14	78	14	69	10	0,005	0,001-0,200
Boscalid	105	10	84	12	80	8	0,005	0,001-0,200
Bromopropilato	111	9	90	14	78	13	0,005	0,001-0,200
Carbofuran	nd	-	nd	-	115	5	-	-
Cialotrina	138	25	102	12	76	14	0,01	0,005-0,200
Ciflutrina	nd	-	82	12	79	8	0,01	0,010-0,200
Cihalofop butil	91	13	75	20	70	11	0,005	0,001-0,200
Cipermetrina	nd	-	nd	-	78	6	0,05	0,010-0,200
Clomazone	100	17	91	11	67	9	0,005	0,001-0,200
Clorantraniliprol	nd	-	nd	-	93	20	-	-
Clordano, cis-	104	9	80	15	70	14	0,005	0,005-0,200
Clordano, trans-	98	12	86	14	69	13	0,005	0,005-0,200
Clorotalonil	nd	-	nd	-	16	16	-	-
Clorpirifos	95	12	78	11	70	12	0,005	0,001-0,200
Clorpirifos metil	103	12	87	20	68	12	0,005	0,005-0,200
DDD, o,p'-	107	12	80	12	70	9	0,005	0,001-0,200
DDD, p,p'-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
DDE, o,p'-	102	13	80	14	68	14	0,005	0,001-0,200
DDE, p,p'-	104	14	68	6	92	11	0,005	0,001-0,200
DDT, o,p'-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
DDT, p,p'-	118	11	77	18	78	19	0,005	0,001-0,200
Deltametrina	nd	-	nd	-	103	11	0,05	0,020-0,200
Diazinon	106	14	84	15	64	9	0,005	0,005-0,200
Dieldrin	nd	-	nd	-	73	21	-	-
Difenoconazol	105	11	95	13	79	6	0,005	0,001-0,200
Endosulfan sulfato	nd	-	nd	-	77	14	-	-
Endosulfan, alfa-	nd	-	nd	-	68	16	-	-
Endosulfan, beta-	nd	-	nd	-	76	7	-	-
Epoxiconazol	107	11	83	14	75	9	0,005	0,001-0,200
Etion	94	15	78	13	66	8	0,005	0,001-0,200
Fention	112	16	86	15	na	-	0,005	0,001-0,200

Fenvalerato	120	7	100	13	86	12	0,005	0,005-0,200
Fipronil	101	10	93	11	62	7	0,005	0,005-0,200
Fluvalinato	148	11	134	13	103	10	-	-
HCH, alfa-	110	16	84	17	70	13	0,005	0,001-0,200
HCH, beta-	102	6	92	13	72	14	0,005	0,005-0,200
HCH, delta-	nd	-	84	13	66	15	0,01	0,005-0,200
HCH, gama-	118	11	86	18	71	12	0,005	0,005-0,200
Heptaclor	103	12	80	13	71	15	0,005	0,005-0,200
Heptaclor epoxido, cis-	109	13	78	15	72	12	0,005	0,005-0,200
Hexaclorobenceno	94	10	65	17	55	15	0,005	0,001-0,200
Iprodione	nd	-	119	8	111	20	0,01	0,010-0,200
Isoxadifen etil	nd	-	nd	-	40	10	-	-
Kresoxim metil	nd	-	nd	-	53	7	-	-
Malation	99	15	77	22	78	19	0,005	0,005-0,200
Metalaxil	nd	-	81	21	67	13	-	-
Metidation	91	15	70	16	53	4	0,005	0,005-0,200
Metiocarb	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Metolaclor	104	10	85	11	72	8	0,005	0,001-0,200
Metoxicloro	111	10	82	14	77	18	0,005	0,005-0,200
Metribuzin	nd	-	112	5	66	-	-	-
Mirex	98	13	75	13	65	12	0,005	0,001-0,200
Oxifluorfen	nd	-	91	11	69	10	-	-
Paration	135	24	101	19	71	27	-	-
Paration metil	nd	-	104	15	56	23	-	-
Permetrina	nd	-	80	9	67	4	0,01	0,005-0,200
Pirimetanil	nd	-	nd	-	59	9	-	-
Pirimifos metil	95	13	76	14	64	3	0,005	0,005-0,200
Profenofos	nd	-	nd	-	139	17	-	-
Simazina	nd	-	nd	-	nd	-	-	-
Tebuconazol	100	12	84	14	67	7	0,005	0,001-0,200
Tetradifon	nd	-	91	18	77	13	0,01	0,010-0,200

Trifluralina	98	28	88	13	46	46	-	-
Triticonazol	123	20	88	16	59	15	-	-
Vinclozolin	nd	-	98	14	71	7	0,01	0,010-0,200

nd: no detectado

4. Biomonitorio y evaluación de biomonitores

4.1. Introducción

Si bien la evaluación de riesgos generalmente se basa en la medición de concentraciones externas de contaminantes en el agua, el suelo y los sedimentos, se está tomando conciencia de que las concentraciones internas o las cargas corporales de esos contaminantes son la clave para comprender los efectos adversos en los organismos, lo cual plantea un riesgo para los ecosistemas donde ellos habitan.

Los biomonitores proporcionan advertencias sobre situaciones ambientales riesgosas para la salud humana y los ecosistemas. Muchos organismos biológicos, como plantas, peces, insectos e invertebrados, se han utilizado con fines de biomonitorio basados en el análisis de sus tejidos o fluidos [31].

El empleo de organismos centinela, como los macroinvertebrados acuáticos, cuyas variaciones demográficas pueden ser indicadores del estado del recurso es una práctica que se usa en la actualidad.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Selección de biomonitores

Los biomonitores seleccionados para el estudio fueron por una parte la colmena (abejas, miel, cera, polen) y por otra, tres tipos de macroinvertebrados acuáticos pertenecientes a diferentes grupos funcionales: ninfas de Odonata (predadores), moluscos bivalvos del género *Corbicula* (filtradores) y crustáceos decápodos del género *Aegla* (fragmentadores y colectores detritívoros).

Las colmenas empleadas en el estudio fueron preparadas a partir de una misma reina. En cada sitio de muestreo se colocó un grupo de cuatro colmenas a la menor distancia posible de cada punto de muestreo de macroinvertebrados acuáticos, considerando, un radio de “muestreo” de las abejas de 2000 m en conjunto con la planicie de inundación.

Por otro lado, se seleccionó un tramo del curso de agua representativo de la zona que reflejara la variabilidad de microhábitats presente en dicho tramo. En este sitio, se realizaron los muestreos de los macroinvertebrados seleccionados y disponibles en el lugar al momento de los muestreos.

4.2.2. Selección de los sitios de muestreo

El estudio de biomonitordeo se realizó en microcuencas que reflejaran distintos usos productivos del suelo. Se seleccionaron cuatro arroyos afluentes del Río Queguay, en el departamento de Paysandú: Capilla Vieja, Manguera de Piedras, Santana y Amarillo. En ellos se establecieron las ocho estaciones de muestreo (1: aguas arriba o referencia, y 2: aguas abajo del sitio productivo). En general, se buscó que los sitios de estudio en cada ambiente o arroyo (sitio 2) tuvieran una mayor influencia de agricultura y por lo tanto, mayor intensidad de uso de pesticidas. En los sitios de referencia, aguas arriba (sitio 1) se observaba campo natural, ganadería y/o monte nativo en todos los arroyos.

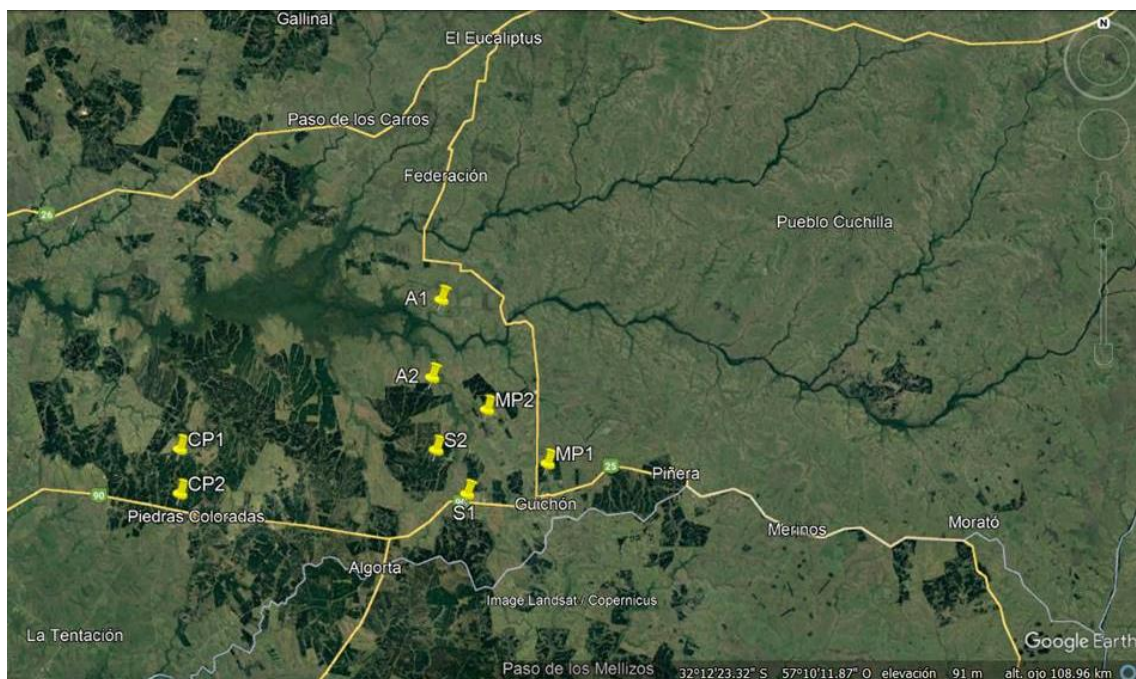


Figura 18. Localización de los sitios de muestreo

Previamente, se efectuó un relevamiento mediante Google Earth de subcuencas de interés, identificando zonas de cultivos y posibles puntos de referencia aguas arriba. Se estudió la posibilidad de realizar los estudios en la parte baja de la cuenca del Queguay, descartándose debido a que no se localizaron puntos que oficiaran como referencia.

Se seleccionaron los cuatro arroyos del estudio mediante recorridos preliminares de las microcuencas del Queguay para definir los puntos de estudio, relevar sitios y ambientes donde colocar las colmenas, realizar reconocimiento de lugares y accesos para muestreos de macroinvertebrados acuáticos. Se seleccionaron arroyos con área de cuenca similar y

con flujo continuo de agua, se buscó ubicar los sitios de muestreo a similar distancia de la desembocadura de cada arroyo en el Queguay.

A continuación, se presentan las coordenadas de los sitios elegidos, representados en la Figura 18.

-Arroyo Capilla Vieja

Capilla vieja 1: S: 32 18 067 - W: 057 30 443

Capilla vieja 2: S: 32 15 404 - W: 057 35 162

-Arroyo manguera de Piedra

Manguera de piedras 1: S: 32 13 418 - W: 057 12 007

Manguera de piedras 2: S: 32 13 228 - W: 057 12 259

-Arroyo Santana

Santana 1: S: 32 17 286 - W: 057 09 522

Santana 2: S: 32 15 250 - W: 057 12 472

-Arroyo Amarillo

Amarillo 1: S: 32 10 020 - W: 057 18 090

Amarillo 2: S: 32 10 294 - W: 057 18 129

Las colmenas fueron ubicadas de manera que hubiera superposición entre los puntos de muestreo en el arroyo con el radio de vuelo de las abejas.

4.2.3. Relevamiento cualitativo de usos de suelo actual e histórico con productores locales

El lo que respecta al arroyo Capilla Vieja, este curso de agua fue particularmente seleccionado como sitio de baja intensidad de uso de pesticidas. En el sitio 1 se observaba

campo natural, excepto en los últimos dos muestreos, en los cuales se había forestado. En el sitio 2 se observaba monte nativo muy denso. Este sitio se encuentra inserto en un campo del área protegida Rincón de Pérez y Montes del Queguay, perteneciente a una empresa forestal.

En el sitio 1 del arroyo Manguera de Piedras, se observó mayoritariamente ganadería extensiva en ambos márgenes. Cerca de este sitio, aguas abajo, se observó agricultura en determinadas parcelas de poca extensión superficial. El sitio 2 presentaba agricultura (soja) en uno de los márgenes del arroyo y ganadería en el otro margen. En los últimos dos muestreos se observó aplicación de herbicidas en la zona ganadera.

En el arroyo Santana, se observó ganadería extensiva en ambos márgenes en el sitio 1. En el sitio 2, se presentaban regiones de ganadería y parcelas de gran superficie de cultivos de soja. En este último sitio también se observó la influencia de un vivero perteneciente a una empresa forestal. Además, en los últimos muestreos llegaban efluentes de la ciudad de Guichón, lo cual repercute de manera negativa en la composición de la comunidad de macroinvertebrados acuáticos.

En el sitio 1 del arroyo Amarillo, se observó ganadería mientras que en el sitio 2 se observó la presencia de cultivos de soja y praderas mejoradas con distintas especies forrajeras. Se conoce además que en décadas pasadas en toda la región en la que se encuentra este arroyo, se cultivó mayoritariamente papa.

4.2.4. Muestreo

Se realizaron seis muestreos de los biomonitores definidos para el estudio durante un año en los ocho puntos definidos para esta evaluación, obteniéndose un total de 287 muestras. Las muestras de abejas se colectaron a la entrada de cada colmena mediante una aspiradora manual, asegurándose de esta manera que sean abejas que han estado en contacto con el agroecosistema (pecoreadoras). Se seleccionaron panales que se recortaban en cada colmena favoreciendo en cada sector la presencia de miel, polen y cera recientemente producida respectivamente.

Los muestreos de macroinvertebrados bentónicos se realizaron mediante el uso de una red de mano con apertura de malla de 250 μm , integrando 20 submuestras con el fin de representar proporcionalmente los microhábitats presentes (fondo, vegetación sumergida, vegetación acuática, rápidos y remansos). Si no se encontraban los organismos de interés se prolongaba su búsqueda durante 15 min. Se separaban los macroinvertebrados en el campo y se colocaban en un recipiente con agua del lugar y se trasladaban al laboratorio

procurando que tengan al menos de 12 hs de ayuno (este tiempo no fue optimizado para estos organismos en particular) para purgar el sistema digestivo. Se enjuagaban con agua de grifo retirando restos vegetales, y se colocaban en bolsas.

Se colectaron las muestras en febrero 2019, mayo 2019, octubre 2019, noviembre 2019, diciembre 2019 y febrero 2020.

En el arroyo Capilla Vieja no se pudo realizar el muestreo de macroinvertebrados bentónicos de febrero 2020 debido a la vegetación que no permitió acceder a los sitios.

4.2.5. Almacenamiento de las muestras

Todas las muestras se colocaron en bolsas rotuladas en congelador a -18°C hasta el momento del análisis multirresiduo de pesticidas.

4.2.6. Análisis de residuos de pesticidas

El análisis multirresiduo de pesticidas en las siete matrices del estudio se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección 3.2.

En el caso de las matrices de la colmena, fueron necesarias algunas operaciones previas. Por un lado, cada muestra de panal se separó manualmente para obtener las muestras de cera, miel y polen. Por otro lado, de cada matriz abejas, cera, miel y polen se analizó la muestra compuesta de las cuatro colmenas que se colocaron. En el caso de los macroinvertebrados se homogeneizaba toda la muestra (pool de organismos) proveniente del campo buscando representar el sitio.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Perfil de hallazgos de residuos de pesticidas en los biomonitores seleccionados

En los seis muestreos realizados se colectaron un total de 287 muestras a las que se les realizó análisis multirresiduo de pesticidas.

En las muestras de biomonitores se detectaron un total de 46 compuestos, de los cuales 9 correspondieron a herbicidas, 13 a fungicidas, 18 a insecticidas y 6 fueron metabolitos. Las concentraciones se encontraron en el rango $0,0001-0,5 \text{ mg kg}^{-1}$. En el caso de los macroinvertebrados acuáticos, se analizaron un total de 95 muestras correspondientes a 28 muestras de ninfas de Odonata, 31 de *Corbicula* y 36 de *Aegla*. De estos análisis se pudo observar que la mayoría de hallazgos positivos de residuos de pesticidas fueron

encontrados en *Corbicula* y ninfas de Odonata, mientras que en *Aegla* los hallazgos representaron solo el 5% de los positivos en muestras de macroinvertebrados acuáticos (Figura 19).

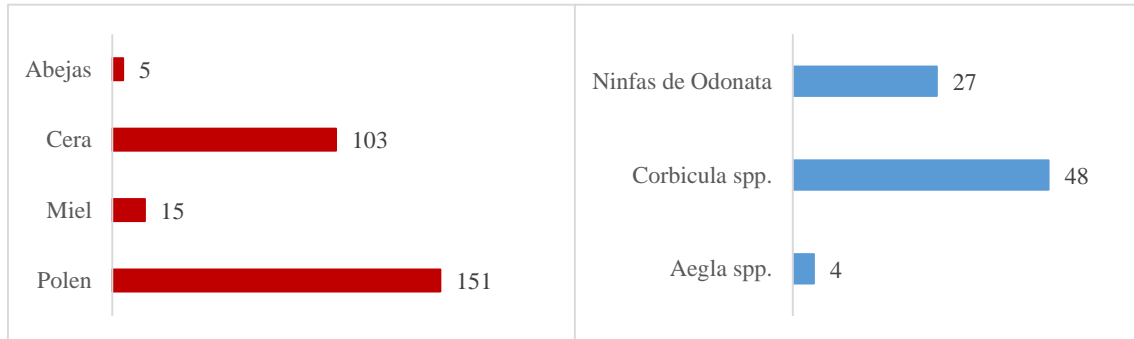


Figura 19. Número de detecciones positivas en las distintas matrices del estudio

El análisis de componentes principales muestra que la información que brinda cada una de las matrices del estudio es complementaria, ya que no hay un agrupamiento de los datos (Figura 20). Por este motivo, los resultados de los residuos se mostrarán de forma global para ambiente terrestre y acuático, respectivamente.

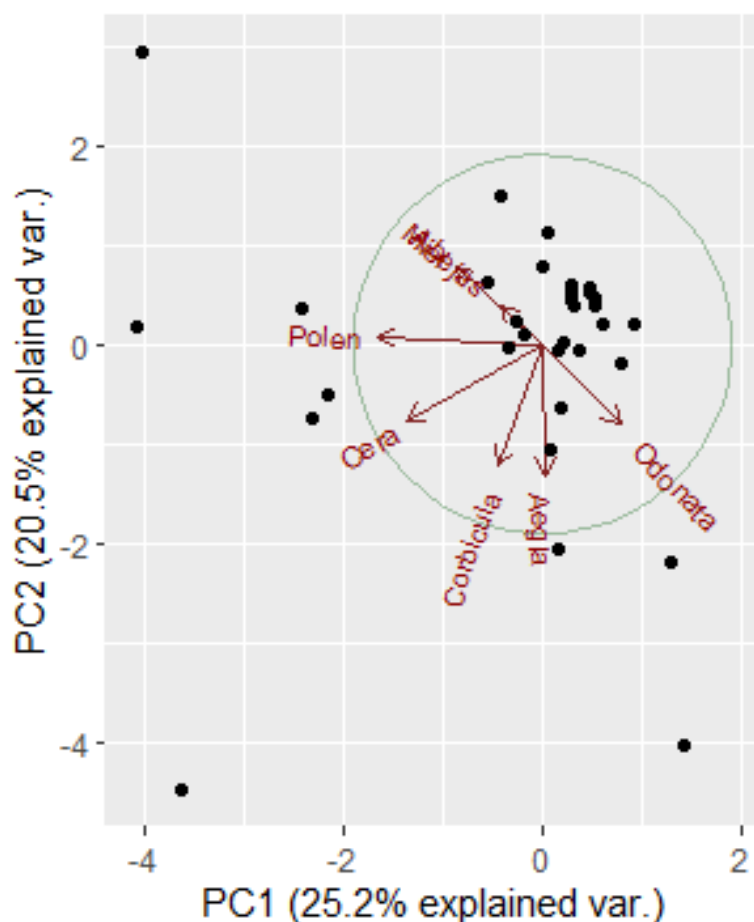


Figura 20. Análisis de componentes principales (PCA) de los resultados de residuos de pesticidas obtenidos para todas las matrices del estudio

Se calcularon las frecuencias de ocurrencia de cada pesticida en el total de muestras de la colmena, por un lado, como biomonitores del ambiente terrestre y por otro, en el total de muestras de macroinvertebrados acuáticos, como biomonitores del ambiente acuático (Figura 21). En general, se puede observar que el perfil de hallazgos no es el mismo en ambos casos, sino que resultan complementarios. Las frecuencias obtenidas fueron bajas, en ningún caso se superó el 20% de las muestras analizadas. Esto era esperable ya que en la cuenca estudiada la intervención antrópica es muy baja en la actualidad. Sin embargo, algunos resultados son destacables, como la presencia de compuestos de alta toxicidad como son los insecticidas cipermetrina, clorpirifos y fipronil en muestras de cera y polen. En el caso del ambiente acuático, se destaca la presencia de los insecticidas bifentrin y fipronil y sus metabolitos. Estos compuestos presentan potencial de bioacumulación en tejido adiposo ya que su pK_{ow} es mayor a 3. A pesar del bajo contenido de lípidos de las corbículas (del orden de 1%), estas fueron capaces de acumular estos compuestos [105].

En el caso del bifentrin resulta interesante su presencia en estos organismos ya que su vida media en agua es relativamente baja, de alrededor de 8 días, pero tiene en la interfase agua-sedimento, su estabilidad es mucho mayor (161 días). Este caso es similar al observado previamente en peces [25]. El compuesto es secuestrado del medio y se acumula en la biota. Otro caso relevante fue la detección de organoclorados en una muestra de ninfas de Odonata, compuestos que ya no se utilizan, pero aún hoy en día persisten en el ambiente. Este último caso puede relacionarse con trabajos de remoción de tierra en la orilla del arroyo. Esta fue una zona de plantación intensiva de remolacha azucarera en la década del 60, donde el DDT era ampliamente usado, por lo que es esperable su hallazgo aun en el ecosistema.

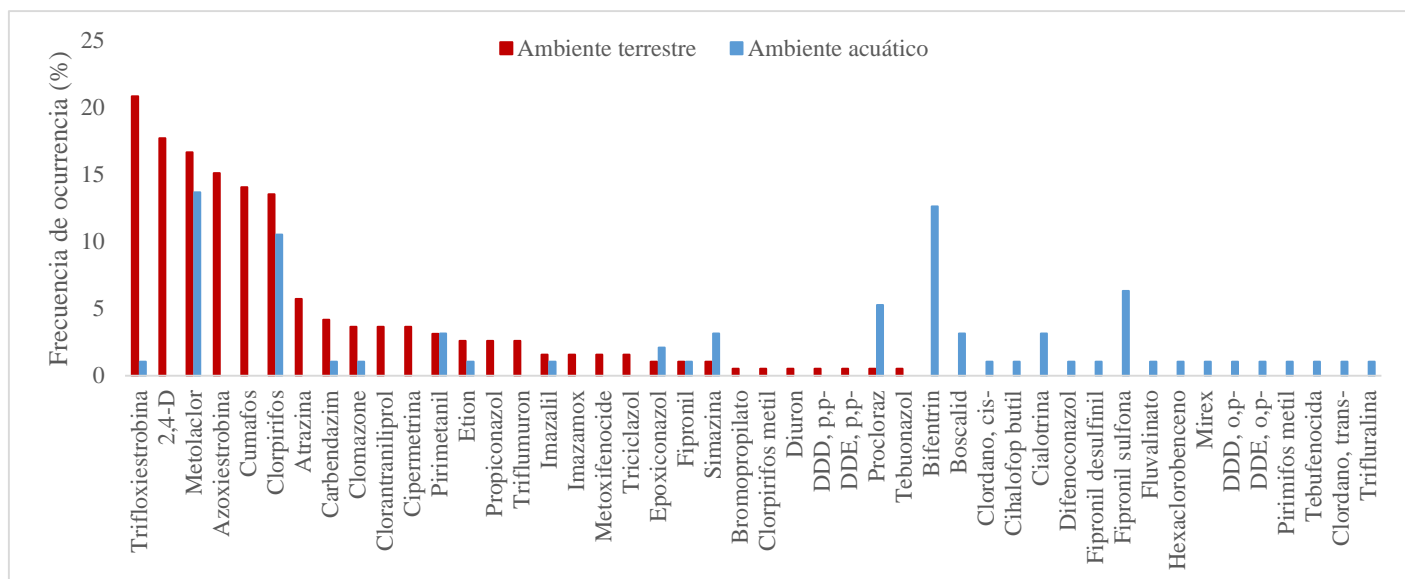


Figura 21. Frecuencia de ocurrencia de los pesticidas detectados en la colmena (ambiente terrestre) y en los macroinvertebrados acuáticos (ambiente acuático)

Se analizaron un total de 192 muestras correspondientes a 48 de cada matriz (abejas, cera, miel y polen), resultando en la detección de 29 diferentes pesticidas. El mayor número de hallazgos positivos de residuos de pesticidas se dio en cera y polen.

4.3.2. Descripción de los hallazgos según los lugares de muestreo seleccionados

4.3.2.1. Arroyo Capilla Vieja

Los resultados de los análisis de residuos de pesticidas en las muestras de abejas y productos de la colmena del arroyo Capilla Vieja, se encuentran detallados en la Tabla

22. Las colmenas evaluadas en este arroyo presentaron residuos en el primer muestreo, que fue inmediato a su instalación, los cuales corresponden a su “línea de base”. Es decir, son residuos que las abejas colectaron durante la preparación de las colmenas que se realizó en INIA “La Estanzuela” (Colonia, Uruguay), previo a este estudio. Estos residuos se encontraron principalmente en cera y polen. En abejas no hubo detecciones, mientras que en miel solo se detectó 2,4-D. En cera, se detectaron metolaclor, metoxifenocide y trifloxiestrobina, solamente en este primer muestreo. En polen, se detectaron clorantraniliprol, clorpirifos, metoxifenocide, solamente en este primer muestreo. Además, en polen se detectaron azoxiestrobina y trifloxiestrobina en el primer muestreo y en los siguientes muestreos, por lo tanto, la presencia de estos fungicidas no se puede atribuir a aplicaciones realizadas en este agroecosistema.

El compuesto 2,4-D, se detectó a partir de octubre y noviembre de 2019 en miel y polen. Esta época del año coincide con el momento en que se realizan aplicaciones de este herbicida en el cultivo de soja. El metolaclor se vuelve a detectar en noviembre/diciembre de 2019 en cera y polen, lo cual coincide también con la época de aplicación de este herbicida en cultivo de soja.

A partir de noviembre de 2019, se comenzaron a detectar residuos en cera correspondientes a pesticidas de pKow medio/alto como carbendazim, clorpirifos, etion y procloraz. En polen, en la misma época se detectaron carbendazim, diuron, atrazina e imazamox; en una ocasión los dos primeros y en dos ocasiones los dos últimos. El número de compuestos detectados en cera y polen, sin tener en cuenta los de la línea de base, fue similar, y las detecciones coinciden con el inicio del ciclo de cultivos de verano.

Cabe destacar que en este ambiente que es principalmente forestal, la floración es en otoño. Durante el resto del año, las abejas deben buscar alimento en flores de otras especies vegetales, pudiendo trasladarse para esto a otros cultivos de la zona. Como consecuencia de esto, resulta posible la presencia de residuos de pesticidas que no son habitualmente utilizados en la forestación.

Los resultados de los análisis de residuos de pesticidas en las muestras de macroinvertebrados acuáticos del arroyo Capilla Vieja, se encuentran detallados en la Tabla 23. Como se observa en dicha tabla, de los seis muestreos de macroinvertebrados acuáticos planteados en el arroyo Capilla Vieja, el último de ellos (febrero 2020) no pudo realizarse por inaccesibilidad al sitio de muestreo. En los cinco muestreos realizados, no pudieron recolectarse moluscos bivalvos pertenecientes al género *Corbicula*. Se recolectaron cinco muestras de ninfas de Odonata, correspondientes al punto de muestreo

aguas arriba. De organismos pertenecientes al género *Aegla*, se recolectaron nueve muestras; el único de los cinco muestreos que quedó incompleto fue el de mayo de 2019, donde solo se pudo obtener muestra del punto ubicado aguas arriba.

En el ambiente acuático del arroyo Capilla Vieja, durante el transcurso de todo el monitoreo se detectaron un total de tres compuestos en las catorce muestras analizadas: clorpirifos, etion y procloraz.

En ninfas de Odonata se detectó clorpirifos en el muestreo de diciembre de 2019, el cual es un insecticida de alta toxicidad.

Los organismos pertenecientes al género *Aegla* asimilaron dos compuestos que no habían sido detectados en ninfas de Odonata: etion y procloraz, siendo más tóxico el primero. El insecticida etion fue detectado en el punto de muestreo aguas arriba en noviembre de 2019, mientras que el fungicida procloraz, lo fue en el punto de muestreo aguas abajo en dos ocasiones (febrero y noviembre de 2019).

Tabla 22. Residuos de pesticidas hallados en muestras de abejas y productos de la colmena en el Arroyo Capilla Vieja

Pesticida	Sitio	Abejas						Cera						Miel						Polen					
		Feb-19	May-19	Oct-19	Nov-19	Dic-19	Feb-20	Feb-19	May-19	Oct-19	Nov-19	Dic-19	Feb-20	Feb-19	May-19	Oct-19	Nov-19	Dic-19	Feb-20	Feb-19	May-19	Oct-19	Nov-19	Dic-19	Feb-20
2,4 -D	CAP1																								
	CAP2													d			d	d				d			d
Atrazina	CAP1																								< LOQ
	CAP2																								< LOQ
Azoxiestrobina	CAP1																								< LOQ
	CAP2																								0,005 < LOQ < LOQ
Carbendazim	CAP1											0,002													< LOQ
	CAP2												0,001												< LOQ
Clomazone	CAP1										0,01														
	CAP2																								
Clorantraniliprol	CAP1																								0,01
	CAP2																								0,01
Clorpirifos	CAP1										0,036	< LOQ													0,005
	CAP2										0,009	< LOQ	0,034												0,005
Cumafos	CAP1										0,0007	0,0003	0,0003												
	CAP2										0,0003	0,0001	0,0008												< LOQ
Diuron	CAP1																								
	CAP2																								< LOQ
Etion	CAP1										< LOQ														
	CAP2																								
Imazamox	CAP1																								
	CAP2																						d		d
Metolaclor	CAP1							< LOQ			< LOQ														< LOQ
	CAP2							0,011			< LOQ		< LOQ												< LOQ
Metoxifenocide	CAP1							< LOQ																	
	CAP2																								0,02
Pirimetanil	CAP1																								

	CAP2			d			
Procloraz	CAP1						
	CAP2			d			
Trifloxistrobina	CAP1						0,030 0,001 < LOQ
	CAP2	< LOQ					0,002 < LOQ < LOQ 0,001

LOQ: límite de cuantificación; d: compuesto detectado, no incluido en el alcance por no cumplir con algún criterio de validación

Tabla 23. Residuos de pesticidas hallados en muestras de macroinvertebrados acuáticos en el Arroyo Capilla Vieja

Pesticida	Sitio	<i>Corbicula spp.</i>						Ninfas de Odonata						<i>Aegla spp.</i>							
		Feb-19	May-19	Oct-19	Nov-19	Dic-19	Feb-20	Feb-19	May-19	Oct-19	Nov-19	Dic-19	Feb-20	Feb-19	May-19	Oct-19	Nov-19	Dic-19	Feb-20		
Clorpirifos	CAP1	s/m	s/m	s/m	s/m	s/m	n/m													n/m	
	CAP2	s/m	s/m	s/m	s/m	s/m	n/m	s/m	s/m	s/m	s/m	s/m	n/m		s/m						n/m
Etion	CAP1	s/m	s/m	s/m	s/m	s/m	n/m														n/m
	CAP2	s/m	s/m	s/m	s/m	s/m	n/m	s/m	s/m	s/m	s/m	s/m	n/m		s/m						n/m
Procloraz	CAP1	s/m	s/m	s/m	s/m	s/m	n/m														n/m
	CAP2	s/m	s/m	s/m	s/m	s/m	n/m	s/m	s/m	s/m	s/m	s/m	n/m	d	s/m					d	n/m

LOQ: límite de cuantificación; n/m: no se realizó muestreo; s/m: no se encontró el organismo; d: compuesto detectado, no incluido en el alcance por no cumplir con algún criterio de validación

4.3.2.2. Arroyo Manguera de Piedras

Los resultados de los análisis de residuos de pesticidas en las muestras de abejas y productos de la colmena del arroyo Manguera de Piedras, se encuentran detallados en la Tabla 24. Las colmenas evaluadas en este arroyo, presentaron residuos en el primer muestreo, que fue inmediato a su instalación, los cuales corresponden a su “línea de base”. Es decir, son residuos que las abejas colectaron durante la preparación de las colmenas que se realizó en INIA “La Estanzuela” (Colonia, Uruguay), previo a este estudio. Estos residuos se encontraron solamente en cera y polen. En abejas y miel no hubo detecciones. En cera, se detectaron clorpirifos, metolaclor y trifloxiestrobina en este primer muestreo. En polen, se detectaron clorantraniliprol, clorpirifos, epoxiconazol y pirimetanil, solamente en este primer muestreo. Además, en polen se detectaron azoxiestrobina y trifloxiestrobina en el primer muestreo y en los siguientes muestreos, por lo tanto, la presencia de estos fungicidas no se puede atribuir exclusivamente a aplicaciones realizadas en este agroecosistema.

El compuesto 2,4-D, se detectó en miel y polen en mayo de 2019 y a partir de octubre y en estas dos matrices. Esta época del año coincide con el momento en que se realizan aplicaciones de este herbicida en el cultivo de soja. El metolaclor se vuelve a detectar en noviembre de 2019 en cera y se comienza a detectar a partir de este muestreo en polen, lo cual coincide también con la época de aplicación de este herbicida en cultivo de soja. En noviembre de 2019, se detectaron residuos en cera correspondientes a pesticidas de pKow medio/alto como carbendazim, cipermetrina, clorpirifos, etion y metabolitos de DDT. En polen, a partir de octubre de 2019, se atrazina, clorpirifos, imazalil, pirimetanil y triciclazol; el herbicida clomazone se detectó en dos oportunidades, en mayo y diciembre de 2019. El número de compuestos detectados en cera y polen, sin tener en cuenta los de la línea de base, fue similar, y en general, las detecciones coinciden con el inicio del ciclo de cultivos de verano.

Los resultados de los análisis de residuos de pesticidas en las muestras de macroinvertebrados acuáticos del arroyo Manguera de Piedras, se encuentran detallados en la Tabla 25. En el ambiente acuático de este arroyo, durante el transcurso de todo el monitoreo se detectaron un total de nueve compuestos.

Los organismos colectados pertenecientes al género *Corbicula*, asimilaron seis de ellos, correspondientes a distintas clases químicas. Se detectaron en estos organismos tres

insecticidas, dos fungicidas y un herbicida, destacándose bifentrin y clorpirifos por su toxicidad. Todos estos compuestos tienen un pk_{ow} (log P) medio/alto.

En ninfas de Odonata se detectaron un herbicida, un fungicida y un insecticida. En el muestreo de diciembre, luego de la etapa intensa de aplicaciones, no se encontraron muestras. En los muestreos correspondientes a los meses de febrero (2019 y 2020) y octubre de 2019, no hubo detecciones.

Coinciden en el mismo muestreo (mayo 2019) clorpirifos y pirimetanil en muestras de corbículas y ninfas de Odonata. Este momento del año se corresponde con el fin del ciclo productivo del cultivo de soja.

Los organismos pertenecientes al género *Aegla* asimilaron dos compuestos que no habían sido detectados por los anteriores organismos: imazalil y propoxur, siendo más tóxico este último.

Solo en *Corbicula* clorpirifos y pirimetanil fueron detectados tanto aguas arriba como aguas abajo. Tanto en el sitio de referencia (aguas arriba) como en el sitio de estudio (aguas abajo), se obtuvieron un total de 11 detecciones, pero correspondientes a distintos pesticidas en distintos organismos.

El hallazgo de mayor cantidad de compuestos en *Corbicula* puede estar relacionado con su forma de alimentación por filtración. Los compuestos de alta lipofilicidad que se encuentran en la materia en suspensión es más probable que sean asimilados por estos organismos.

Bifentrin fue detectado solo por corbículas, prácticamente en todos los muestreos. De acuerdo a las propiedades fisicoquímicas, observando la DT_{50} en agua-sedimento (161 días), este es un compuesto estable, por lo que este resultado es esperable.

En cuanto a los fungicidas determinados, los distintos organismos retienen algunos de estos compuestos pero no se ha podido aun determinar si siguen un patrón específico de comportamiento.

Tabla 24. Residuos de pesticidas hallados en muestras de abejas y productos de la colmena en el Arroyo Manguera de Piedras

Pesticida	Sitio	Abejas						Cera						Miel						Polen					
		Feb-19	May-19	Oct-19	Nov-19	Dic-19	Feb-20	Feb-19	May-19	Oct-19	Nov-19	Dic-19	Feb-20	Feb-19	May-19	Oct-19	Nov-19	Dic-19	Feb-20	Feb-19	May-19	Oct-19	Nov-19	Dic-19	Feb-20
2,4 -D	MDP1													d			d				d		d		
	MDP2													d	d	d					d		d	d	d
Atrazina	MDP1																			< LOQ			< LOQ		
	MDP2																								
Azoxiestrobina	MDP1											0,0020							0,005	< LOQ	< LOQ				
	MDP2																		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ			
Carbendazim	MDP1																								
	MDP2										0,002														
Cipermetrina	MDP1																								
	MDP2										< LOQ														
Clomazone	MDP1										0,04														
	MDP2																			0,01				0,01	
Clorantniliprol	MDP1																		< LOQ						
	MDP2																			0,024					
Clorpirifos	MDP1							< LOQ											< LOQ						
	MDP2										0,005														
Cumafos	MDP1										0,0004	0,0003								< LOQ		< LOQ		0,01	
	MDP2										0,0021	0,0001									< LOQ				
DDD, p,p-	MDP1										< LOQ														
	MDP2																								
DDE, p,p-	MDP1										< LOQ														
	MDP2																								
Epoxiconazol	MDP1					< LOQ													< LOQ						
	MDP2																								
Etion	MDP1																								
	MDP2										< LOQ														
Imazalil	MDP1																								

	MDP2																				0,005	
Metolaclor	MDP1																					< LOQ < LOQ
	MDP2																					< LOQ < LOQ 0,01
Pirimetaniil	MDP1																					< LOQ < LOQ
	MDP2																					< LOQ < LOQ
Triciclazol	MDP1																					0,005
	MDP2																					
Trifloxiestrobina	MDP1																					0,009 < LOQ < LOQ 0,001
	MDP2																					0,002 < LOQ 0,008 0,001 < LOQ 0,001

LOQ: límite de cuantificación; d: compuesto detectado, no incluido en el alcance por no cumplir con algún criterio de validación

Tabla 25. Residuos de pesticidas hallados en muestras de macroinvertebrados acuáticos en el Arroyo Manguera de Piedras

Pesticida	Sitio	<i>Corbicula spp.</i>						Ninfas de Odonata						<i>Aegla spp.</i>								
		Feb-19	May-19	Oct-19	Nov-19	Dic-19	Feb-20	Feb-19	May-19	Oct-19	Nov-19	Dic-19	Feb-20	Feb-19	May-19	Oct-19	Nov-19	Dic-19	Feb-20			
Bifentrin	MDP1	< LOQ	0,004	0,001	0,002																	
	MDP2		0,005	0,004	0,003		0,002															s/m
Boscalid	MDP1			< LOQ																		
	MDP2																					s/m
Cihalotrina	MDP1																					
	MDP2	0,013																				s/m
Clomazone	MDP1										0,01											
	MDP2																					s/m
Clorpirifos	MDP1		< LOQ								< LOQ											
	MDP2		< LOQ								< LOQ											s/m
Imazalil	MDP1																					
	MDP2																					s/m < LOQ
Metolaclor	MDP1				< LOQ																	
	MDP2				< LOQ																	s/m
Pirimetaniil	MDP1		0,066								0,002											
	MDP2		0,018																			s/m
Propoxur	MDP1																					
	MDP2																					s/m < LOQ

LOQ: límite de cuantificación; s/m: no se encontró el organismo

4.3.2.3. Arroyo Santana

Los resultados de los análisis de residuos de pesticidas en las muestras de abejas y productos de la colmena del arroyo Santana, se encuentran detallados en la Tabla 26. Las colmenas evaluadas en este arroyo, presentaron residuos en el primer muestreo, que fue inmediato a su instalación, los cuales corresponden a su “línea de base”. Es decir, son residuos que las abejas colectaron durante la preparación de las colmenas que se realizó en INIA “La Estanzuela” (Colonia, Uruguay), previo a este estudio. Estos residuos se encontraron solamente en cera y polen. En abejas y miel no hubo detecciones. En cera, se detectaron clorpirifos, metolaclor y metoxifenocida en este primer muestreo. Además, en cera se detectaron cipermetrina y trifloxiestrobina en el primer muestreo y en los siguientes muestreos, por lo tanto, la presencia de estos pesticidas no se puede atribuir a aplicaciones realizadas en este agroecosistema. En polen, se detectaron clorantraniliprol, clorpirifos, y tebuconazol, en este primer muestreo. Además, en polen se detectaron azoxiestrobina y trifloxiestrobina en el primer muestreo y en siguientes muestreos, por lo tanto, la presencia de estos fungicidas no se puede atribuir a aplicaciones realizadas en este agroecosistema.

En abejas, se detectaron pirimetanil y propiconazol en una ocasión cada uno mientras que en miel se detectó propiconazol una vez. Este último se encontró en abejas en mayo de 2019 y en miel en febrero de 2020.

Del análisis de las detecciones simultáneas se puede influir cierta causalidad entre aplicaciones y usos y por lo tanto la presencia de los contaminantes en ese ambiente.

El compuesto 2,4-D, se detectó en miel en diciembre de 2019 y en polen en octubre y noviembre de 2019. Esta época del año coincide con el momento en que se realizan aplicaciones de este herbicida en el cultivo de soja. El metolaclor se vuelve a detectar a partir de noviembre de 2019 en cera y se comienza a detectar a partir de este muestreo en polen, lo cual coincide también con la época de aplicación de este herbicida en cultivo de soja. El insecticida clorpirifos se vuelve a detectar a partir de noviembre de 2019 en cera y en diciembre de 2019 en polen.

En cera, se detectaron residuos correspondientes a pesticidas de pk_{ow} medio/alto como carbendazim, etion y pirimetanil con diferente frecuencia desde noviembre de 2019. En polen, en mayo de 2019 se detectaron fipronil, propiconazol y triflumuron; los primeros dos en esa única ocasión y el último también en el muestreo de octubre. A partir de octubre de 2019, se detectaron también en polen los herbicidas atrazina, clomazone, imazamox, los fungicidas carbendazim y pirimetanil y el insecticida clorpirifos metil en diferentes

frecuencias. El número de compuestos detectados fue superior en polen que en cera, sin tener en cuenta los de la línea de base, y en general, las detecciones coinciden con el inicio del ciclo de cultivos de verano.

Los resultados de los análisis de residuos de pesticidas en las muestras de macroinvertebrados acuáticos del arroyo Santana, se encuentran detallados en la Tabla 27. Como se observa en dicha tabla, de los seis muestreos de macroinvertebrados acuáticos planteados en el arroyo Santana, se pudieron realizar dos muestreos completos de moluscos bivalvos pertenecientes al género *Corbicula*, un muestreo completo de ninfas de Odonata, y 3 muestreos completos de organismos pertenecientes al género *Aegla*. En los demás muestreos no se pudo colectar muestras de estos organismos o sólo se colectaron en uno de los dos puntos de muestreo del arroyo. Probablemente, esto se deba a que, como se constató posteriormente, en el transcurso del proyecto hubo una conexión de la descarga de efluentes de la ciudad de Guichón. Es conocido que la influencia de efluentes urbanos, repercute de manera negativa sobre la composición de la comunidad de macroinvertebrados acuáticos.

En el ambiente acuático del arroyo Santana, durante el transcurso de todo el monitoreo se detectaron un total de siete compuestos en las 16 muestras colectadas.

Los organismos colectados pertenecientes al género *Corbicula*, asimilaron cinco de ellos, correspondientes a pesticidas de distintas clases químicas. Se detectaron en las siete muestras colectadas tres insecticidas y dos herbicidas, destacando clorpirifos, detectado en una ocasión, por su alta toxicidad. Todos estos compuestos tienen un pK_{ow} medio/alto. En las dos muestras colectadas de ninfas de Odonata, correspondientes al muestreo de mayo de 2019, se detectó clorpirifos en ambas y tebufenocida en una de ellas.

De las siete muestras colectadas de organismos pertenecientes al género *Aegla*, sólo se detectó el fungicida procloraz en el muestreo de febrero de 2019. Es el único organismo que asimiló este compuesto.

En el sitio de referencia (aguas arriba), se hallaron cuatro detecciones positivas mientras que en el sitio de estudio (aguas abajo), se obtuvieron un total de diez detecciones, correspondientes a distintos pesticidas en distintos organismos. Sin embargo, no puede establecerse una relación ya que no fue posible conocer la situación del punto de muestreo aguas arriba, con respecto a residuos de pesticidas, ya que se contó con pocas muestras.

Tabla 26. Residuos de pesticidas hallados en muestras de abejas y productos de la colmena en el Arroyo Santana

Pesticida	Sitio	Abejas						Cera						Miel						Polen					
		Feb-19	May-19	Oct-19	Nov-19	Dic-19	Feb-20	Feb-19	May-19	Oct-19	Nov-19	Dic-19	Feb-20	Feb-19	May-19	Oct-19	Nov-19	Dic-19	Feb-20	Feb-19	May-19	Oct-19	Nov-19	Dic-19	Feb-20
2,4 -D	SAN1																								
	SAN2																								
Atrazina	SAN1																								
	SAN2																								
Azoxiestrobina	SAN1																								
	SAN2																								
Carbendazim	SAN1																								
	SAN2																								
Cipermetrina	SAN1																								
	SAN2																								
Clomazone	SAN1																								
	SAN2																								
Clorantraniliprol	SAN1																								
	SAN2																								
Clorpirifos	SAN1																								
	SAN2																								
Clorpirifos metil	SAN1																								
	SAN2																								
Cumafos	SAN1																								
	SAN2																								
Etion	SAN1																								
	SAN2																								
Fipronil	SAN1																								
	SAN2																								
Imazamox	SAN1																								
	SAN2																								
Metolaclor	SAN1																								

	SAN2		0,008	< LOQ	< LOQ	< LOQ		< LOQ	< LOQ	< LOQ		
Metoxifenocide	SAN1											
	SAN2		0,001									
Pirimetaniil	SAN1	< LOQ										
	SAN2					d				< LOQ		
Propiconazol	SAN1							< LOQ		< LOQ		
	SAN2	d										
Tebuconazol	SAN1											
	SAN2									0,005		
Trifloxiestrobina	SAN1		< LOQ	< LOQ			0,003			0,002		
	SAN2		0,002			0,003	0,003	0,005		0,003	0,001	0,001
Triflumuron	SAN1									< LOQ		
	SAN2										< LOQ	

LOQ: límite de cuantificación; d: compuesto detectado, no incluido en el alcance por no cumplir con algún criterio de validación

Tabla 27. Residuos de pesticidas hallados en muestras de macroinvertebrados acuáticos en el Arroyo Santana

Pesticida	Sitio	<i>Corbicula spp.</i>						Ninfas de Odonata						<i>Aegla spp.</i>					
		Feb-19	May-19	Oct-19	Nov-19	Dic-19	Feb-20	Feb-19	May-19	Oct-19	Nov-19	Dic-19	Feb-20	Feb-19	May-19	Oct-19	Nov-19	Dic-19	Feb-20
Cihalotrina	SAN1	0,024	s/m	s/m		s/m	s/m	s/m		s/m	s/m	s/m	s/m	s/m	s/m				s/m
	SAN2	< LOQ	s/m					s/m		s/m	s/m	s/m	s/m		s/m				s/m
Clorpirifos	SAN1		s/m	s/m		s/m	s/m	s/m	< LOQ	s/m	s/m	s/m	s/m	s/m	s/m				s/m
	SAN2	0,01	s/m					s/m	< LOQ	s/m	s/m	s/m	s/m		s/m				s/m
Fipronil sulfona	SAN1	< LOQ	s/m	s/m		s/m	s/m	s/m		s/m	s/m	s/m	s/m	s/m	s/m				s/m
	SAN2	< LOQ	s/m					s/m		s/m	s/m	s/m	s/m		s/m				s/m
Metolaclor	SAN1		s/m	s/m		s/m	s/m	s/m		s/m	s/m	s/m	s/m	s/m	s/m				s/m
	SAN2	< LOQ	s/m	0,013	< LOQ	0,013		s/m		s/m	s/m	s/m	s/m	s/m	s/m				s/m
Procloraz	SAN1		s/m	s/m		s/m	s/m	s/m		s/m	s/m	s/m	s/m	s/m	s/m				s/m
	SAN2		s/m					s/m		s/m	s/m	s/m	s/m	d	s/m				s/m
Simazina	SAN1		s/m	s/m		s/m	s/m	s/m		s/m	s/m	s/m	s/m	s/m	s/m				s/m
	SAN2		s/m				< LOQ	s/m		s/m	s/m	s/m	s/m		s/m				s/m
Tebufenocida	SAN1		s/m	s/m		s/m	s/m	s/m	< LOQ	s/m	s/m	s/m	s/m	s/m	s/m				s/m
	SAN2		s/m					s/m		s/m	s/m	s/m	s/m		s/m				s/m

LOQ: límite de cuantificación; s/m: no se encontró el organismo; d: compuesto detectado, no incluido en el alcance por no cumplir con algún criterio de validación

4.3.2.4. Arroyo Amarillo

Los resultados de los análisis de residuos de pesticidas en las muestras de abejas y productos de la colmena del arroyo Amarillo, se encuentran detallados en la Tabla 28. Las colmenas evaluadas en este arroyo, presentaron residuos en el primer muestreo, que fue inmediato a su instalación, los cuales corresponden a su “línea de base”. Es decir, son residuos que las abejas colectaron durante la preparación de las colmenas que se realizó en INIA “La Estanzuela” (Colonia, Uruguay), previo a este estudio. Estos residuos se encontraron solamente en cera y polen. En abejas y miel no hubo detecciones. En cera, se detectaron 2,4-D, clorpirifos y metolaclor en este primer muestreo y en polen, se detectaron clorantraniliprol, clorpirifos, y tebuconazol, Además, en polen y en cera se detectó trifloxiestrobina y solo en polen azoxiestrobina en el primer muestreo y en siguientes muestreos, por lo tanto, la presencia de estos fungicidas no se puede atribuir exclusivamente a aplicaciones realizadas en este agroecosistema. Del análisis de las detecciones simultáneas se puede influir cierta causalidad entre aplicaciones y usos. Tal es el caso de trifloxiestrobina fue detectado en una muestra de abejas en el último muestreo (febrero 2020), lo cual implica que comenzó a utilizarse en cultivos de la zona. En abejas, se detectó, además de trifloxiestrobina, bromopropilato en una ocasión mientras que en miel se detectaron propiconazol y triflumuron en una ocasión cada uno. El compuesto 2,4-D, se detectó en miel en noviembre de 2019 y en polen en todos los muestreos excepto el de diciembre. El metolaclor se vuelve a detectar a partir de noviembre de 2019 en cera, lo cual coincide con la época de aplicación de este herbicida en cultivo de soja. El insecticida clorpirifos se volvió a detectar a partir de noviembre de 2019 en cera. En cera, se detectaron residuos correspondientes a pesticidas de pKow medio/alto como carbendazim, clomazone, cipermetrina, etion y triciclazol desde noviembre de 2019, en una ocasión cada uno. En polen, en mayo de 2019 se detectó atrazina, herbicida que volvió a detectarse en los muestreos de noviembre y diciembre. Además, a partir de octubre de 2019, se detectaron también en polen fipronil, triciclazol, imazalil, simazina y triflumuron en una ocasión los dos primeros y en dos ocasiones los últimos tres. El número de compuestos detectados fue similar en polen y en cera, sin tener en cuenta los de la línea de base, y en general, las detecciones coinciden con el inicio del ciclo de cultivos de verano.

Los resultados de los análisis de residuos de pesticidas en las muestras de macroinvertebrados acuáticos del arroyo Amarillo, se encuentran detallados en la Tabla

29. En el ambiente acuático del arroyo Amarillo, durante el transcurso de todo el monitoreo se detectaron un total de veinticuatro compuestos.

Los organismos colectados pertenecientes al género *Corbicula*, asimilaron diez de ellos, correspondientes a distintas clases químicas. Se detectaron en estos organismos cuatro insecticidas, dos fungicidas, dos herbicidas y dos metabolitos. Se destaca la presencia de bifentrin, clorpirifos y fipronil y sus metabolitos fipronil desulfinil y fipronil sulfona por su toxicidad. Todos estos compuestos tienen un pK_{ow} medio/alto.

En ninfas de Odonata se detectaron dieciséis compuestos, de los cuales seis fueron insecticidas, seis fungicidas, dos herbicidas y dos metabolitos. Se colectaron un total de diez muestras de estos organismos, de las cuales cuatro contenían entre uno y dos pesticidas, mientras que en una sola muestra (aguas arriba, mayo 2019) se detectaron catorce compuestos incluidos tres pesticidas y dos metabolitos organoclorados. El uso de los pesticidas organoclorados está prohibido en la actualidad, pero estos se destacan por su persistencia en el ambiente y su alta toxicidad. En los muestreos correspondientes a los meses de octubre y noviembre de 2019, no hubo detecciones.

Coinciden en el mismo muestreo (mayo 2019) bifentrin y clorpirifos en muestras de corbículas y ninfas de Odonata. Este momento del año se corresponde con el fin del ciclo productivo del cultivo de soja.

Se colectaron ocho muestras de organismos pertenecientes al género *Aegla*. Se detectó el herbicida metolaclor en una sola muestra (aguas abajo, febrero 2020).

Solo en corbículas clorpirifos y pirimetanil fueron detectados tanto aguas arriba como aguas abajo. Tanto en el sitio de referencia (aguas arriba) como en el sitio de estudio (aguas abajo), se obtuvieron un total de 11 detecciones, pero correspondientes a distintos pesticidas en distintos organismos.

Tabla 28. Residuos de pesticidas hallados en muestras de abejas y productos de la colmena en el Arroyo Amarillo

Pesticida	Sitio	Abejas						Cera						Miel						Polen					
		Feb-19	May-19	Oct-19	Nov-19	Dic-19	Feb-20	Feb-19	May-19	Oct-19	Nov-19	Dic-19	Feb-20	Feb-19	May-19	Oct-19	Nov-19	Dic-19	Feb-20	Feb-19	May-19	Oct-19	Nov-19	Dic-19	Feb-20
2,4 -D	AMA1																								
	AMA2																								
Atrazina	AMA1																								
	AMA2																								
Azoxiesterobina	AMA1																								
	AMA2											0,0033								0,0048	< LOQ	< LOQ			< LOQ
Bromopropilato	AMA1																								
	AMA2					< LOQ																			
Carbendazim	AMA1											0,001													
	AMA2																								
Clomazone	AMA1										0,02														
	AMA2																								
Clorantraniliprol	AMA1																			0,006					
	AMA2																			0,018					
Clorpirifos	AMA1							< LOQ			< LOQ	0,023								< LOQ					
	AMA2										0,011									< LOQ					
Cumafos	AMA1										0,0003	0,0012	0,0047									< LOQ			
	AMA2										0,0005	0,0002								< LOQ					
Cipermetrina	AMA1											< LOQ													
	AMA2																								
Etion	AMA1											< LOQ													
	AMA2																								
Fipronil	AMA1																								
	AMA2																								< LOQ
Imazalil	AMA1																						0,005		
	AMA2																						0,006		
Metolaclor	AMA1							< LOQ			< LOQ	< LOQ													

	AMA2		< LOQ	< LOQ															
Propiconazol	AMA1																		
	AMA2																		< LOQ
Simazina	AMA1																		0,061
	AMA2																		< LOQ
Triciclazol	AMA1																		0,005
	AMA2																		< LOQ
Trifloxiestrobina	AMA1																		0,004
	AMA2																		0,003
																			0,022
Triflumuron	AMA1																		< LOQ
	AMA2																		< LOQ
																			0,016

LOQ: límite de cuantificación; s/m: no se encontró el organismo; d: compuesto detectado, no incluido en el alcance por no cumplir con algún criterio de validación

Tabla 29. Residuos de pesticidas hallados en muestras de macroinvertebrados acuáticos en el Arroyo Amarillo

Pesticida	Sitio	<i>Corbicula spp.</i>						Ninfas de Odonata						<i>Aegla spp.</i>					
		Feb-19	May-19	Oct-19	Nov-19	Dic-19	Feb-20	Feb-19	May-19	Oct-19	Nov-19	Dic-19	Feb-20	Feb-19	May-19	Oct-19	Nov-19	Dic-19	Feb-20
Bifentrin	AMA1		0,001					s/m	0,054					s/m					s/m
	AMA2	< LOQ	0,001					s/m						s/m				s/m	
Boscalid	AMA1							s/m	< LOQ					s/m					s/m
	AMA2							s/m						s/m				s/m	
Carbendazim	AMA1						< LOQ	s/m						s/m					s/m
	AMA2							s/m						s/m				s/m	
Clordano, cis-	AMA1							s/m	d					s/m					s/m
	AMA2							s/m						s/m				s/m	

Clorpirifos	AMA1	< LOQ	s/m < LOQ	s/m	s/m
	AMA2		s/m	s/m	s/m
Cihalofop butil	AMA1		s/m d	s/m	s/m
	AMA2		s/m	s/m	s/m
Difenoconazol	AMA1		s/m 0,01	s/m	s/m
	AMA2		s/m	s/m	s/m
Epoxiconazol	AMA1		s/m 0,087	s/m	s/m
	AMA2		s/m < LOQ	s/m	s/m
Fipronil	AMA1		s/m	s/m	s/m
	AMA2	< LOQ	s/m	s/m	s/m
Fipronil desulfinitil	AMA1		s/m	s/m	s/m
	AMA2	0,002	s/m	s/m	s/m
Fipronil sulfona	AMA1	< LOQ < LOQ	s/m	s/m	s/m
	AMA2	0,002 < LOQ	s/m	s/m	s/m
Fluvalinato	AMA1		s/m < LOQ	s/m	s/m
	AMA2		s/m	s/m	s/m
Hexacloro-benceno	AMA1		s/m d	s/m	s/m
	AMA2		s/m	s/m	s/m
Imazalil	AMA1		s/m	s/m	s/m
	AMA2		s/m 0,01	s/m	s/m
Metolaclor	AMA1	< LOQ < LOQ 0,005 0,012	s/m	s/m	s/m
	AMA2	< LOQ 0,009	s/m	s/m	s/m < LOQ
Mirex	AMA1		s/m d	s/m	s/m

	AMA2		s/m	s/m	s/m
DDD, o,p'	AMA1		s/m d	s/m	s/m
	AMA2		s/m	s/m	s/m
DDE, o,p'	AMA1		s/m d	s/m	s/m
	AMA2		s/m	s/m	s/m
Pirimifos metil	AMA1	< LOQ	s/m	s/m	s/m
	AMA2		s/m	s/m	s/m
Procloraz	AMA1		s/m < LOQ < LOQ	s/m	s/m
	AMA2		s/m < LOQ	s/m	s/m
Simazina	AMA1	0,022	s/m	s/m	s/m
	AMA2	0,015	s/m	s/m	s/m
Clordano, trans-	AMA1		s/m d	s/m	s/m
	AMA2		s/m	s/m	s/m
Trifloxiestrobina	AMA1	0,001	s/m	s/m	s/m
	AMA2		s/m	s/m	s/m
Trifluralina	AMA1		s/m < LOQ	s/m	s/m
	AMA2		s/m	s/m	s/m

LOQ: límite de cuantificación; s/m: no se encontró el organismo; d: compuesto detectado, no incluido en el alcance por no cumplir con algún criterio de validación

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se desarrollaron metodologías analíticas novedosas para la detección de pesticidas en biota, ampliando el alcance de los métodos y mejorando los límites de cuantificación de los mismos. Se detectaron residuos de pesticidas y sus metabolitos en las muestras analizadas, demostrando la capacidad de la biota como monitor de la presencia de pesticidas en el ambiente. La información obtenida de ambos compartimentos ambientales acerca de los residuos de pesticidas fue diferente cuando se analizó la colmena que cuando se analizaron los macroinvertebrados acuáticos, demostrando su complementariedad como biomonitores del ambiente. La información que brinda la colmena es coincidente con la obtenida en trabajos anteriores del grupo, donde la distribución de pesticidas en sus matrices sigue el patrón observado según sus propiedades fisicoquímicas y modos de aplicación a campo de los mismos.

Los aportes más novedosos de la tesis se centran en la caracterización de los macroinvertebrados, como matrices analíticas y su aplicación como biomonitores. Se observó que la capacidad de detección de compuestos fue diferente para cada uno de los organismos estudiados. *Corbicula* es un filtrador y retiene pesticidas unidos a sedimentos, generalmente con k_{ow} medios a altos. Los pesticidas con k_{ow} bajos serán menos retenidos ya que se particionan hacia la fase móvil de la corriente de agua. Por otro lado, los hábitos alimenticios de las ninfas de Odonata las llevarían a bioacumular pesticidas [26]. Esto puede tener diferentes consecuencias, según la actividad del compuesto que se acumula. En ese marco, es esperable bajas concentraciones de insecticidas mientras que los compuestos de baja toxicidad para ellos como los fungicidas y los herbicidas, pueden ser detectados. *Aegla* es fragmentador, recorre el fondo de los cuerpos de agua y es omnívoro, por lo que a priori debería bioacumular pesticidas, sin embargo, solo se detectaron fungicidas en sus especímenes pero ha sido el único que en el que se detectó procloraz. Los organismos del género *Aegla* fueron en los que se tuvieron el menor número de detecciones. La sensibilidad a pesticidas de los posibles biomonitores debe ser evaluada a futuro, ya que la ausencia de ejemplares en determinados momentos del año (por ejemplo se observó en verano) que coinciden con épocas de aplicaciones de fitosanitarios en cultivos extensivos abre la pregunta sobre la posible correlación entre estos eventos. La detección de compuestos a concentraciones muy bajas, unida a observaciones ecotoxicológicas será una herramienta potente para la evaluación del impacto de los pesticidas en ambiente. Se observa que en general, se encuentran los

pesticidas aplicados en la zona según las prácticas agrícolas y cultivos que se emplean allí.

La determinación de residuos de pesticidas en biota de diferentes compartimentos ambientales, provee un amplio panorama de la presencia global de pesticidas en el sitio de estudio, así como de su dinámica, ya que se han encontrado metabolitos de los mismos. Los resultados obtenidos mostraron la importancia de realizar una evaluación global de los residuos de pesticidas en agroecosistemas mediante la integración de información proveniente de distintos compartimentos ambientales. Se vuelve necesario continuar esta investigación estudiando los efectos de estos compuestos y la sensibilidad específica de los biomonitores a pesticidas. Si bien los datos para *Apis mellifera* son abundantes, para las especies de macroinvertebrados, la información es muy escasa. En general se cuenta con información ecotoxicológica sólo de *Daphnia magna* y no se ha estudiado si es suficientemente representativa de los efectos de los pesticidas en otros macroinvertebrados.

Los datos presentados son un punto de partida para análisis más profundos con el fin de intentar visualizar la implicancia de los hallazgos encontrados y poder a futuro predecir impactos ambientales. Los resultados obtenidos en el transcurso de este trabajo son insumos para continuar con la línea de investigación del grupo sobre el desarrollo de modelos de aprendizaje automático con el fin de comprender mejor el destino de los pesticidas en el ambiente, su permanencia, su influencia en poblaciones no blanco y los potenciales riesgos e impactos de los residuos. Esta tarea solo puede encararse desde un punto de vista interdisciplinario tejiendo redes de conocimiento que sirvan de sustento a nuevos avances del conocimiento.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] FAO, *Código Internacional de Conducta sobre la Distribución y Utilización de Plaguicidas – Versión revisada. Adoptada por la 123 sesión del Consejo de la FAO en noviembre de 2002 (reimpresión 2005)*. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2002.
- [2] FAO, “FAOSTAT.” <http://www.fao.org/faostat/es/#home> (accessed Jun. 10, 2021).
- [3] DIEA/MGAP, “Anuario Estadístico Agropecuario 2020,” 2021. <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2020/ANUARIO2020.pdf> (accessed Jun. 10, 2021).
- [4] MGAP, “Importaciones de productos fitosanitarios.” <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/datos/importaciones-productos-fitosanitarios> (accessed Jun. 12, 2021).
- [5] OECD, “Environmental Indicators for Agriculture – Vol. 3: Methods and Results,” 2001. <https://stats.oecd.org/glossary/detail.asp?ID=82> (accessed Feb. 26, 2021).
- [6] W. Zhang, T. H. Ricketts, C. Kremen, K. Carney, and S. M. Swinton, “Ecosystem services and dis-services to agriculture,” *Ecol. Econ.*, vol. 64, no. 2, pp. 253–260, 2007, doi: 10.1016/j.ecolecon.2007.02.024.
- [7] A. G. Power, “Ecosystem services and agriculture: tradeoffs and synergies,” *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 365, no. 1554, pp. 2959–2971, 2010, doi: 10.1098/rstb.2010.0143.
- [8] K. Garbach, J. Milder, M. Montenegro, D. Karp, and F. Declerck, “Biodiversity and Ecosystem Services in Agroecosystems,” *Encycl. Agric. Food Syst.*, vol. 2, pp. 21–40, Dec. 2014, doi: 10.1016/B978-0-444-52512-3.00013-9.
- [9] P. Mussali-Galante, E. Tovar-Sánchez, M. Valverde, and E. Rojas del Castillo, “Biomarkers of exposure for assessing environmental metal pollution: from molecules to ecosystems,” *Rev. Int. Contam. Ambient.*, vol. 29, no. 1, pp. 117–149, 2013.
- [10] J. W. Grier, “Ban of DDT and subsequent recovery of Reproduction in bald eagles,” *Science*, vol. 218, no. 4578, pp. 1232–1235, Dec. 1982, doi: 10.1126/science.7146905.
- [11] J.-C. Amiard and C. Amiard-Triquet, “Chapter 2 - Conventional Risk Assessment

- of Environmental Contaminants,” C. Amiard-Triquet, J.-C. Amiard, and C. B. T.-A. E. Mouneyrac, Eds. Academic Press, 2015, pp. 25–49.
- [12] P. A. Inostroza, A. J. Wicht, T. Huber, C. Nagy, W. Brack, and M. Krauss, “Body burden of pesticides and wastewater-derived pollutants on freshwater invertebrates: Method development and application in the Danube River,” *Environ. Pollut.*, vol. 214, pp. 77–85, 2016, doi: 10.1016/j.envpol.2016.03.064.
- [13] E. Santos, G. Daners, E. Morelli, and G. A. Galván, “Diversity of Bee Assemblage (Family Apidae) in Natural and Agriculturally Intensified Ecosystems in Uruguay,” *Environ. Entomol.*, vol. 49, no. 5, pp. 1232–1241, Oct. 2020, doi: 10.1093/ee/nvaa078.
- [14] M. J. Colwell, G. R. Williams, R. C. Evans, and D. Shutler, “Honey bee-collected pollen in agro-ecosystems reveals diet diversity, diet quality, and pesticide exposure,” *Ecol. Evol.*, vol. 7, no. 18, pp. 7243–7253, Sep. 2017, doi: 10.1002/ece3.3178.
- [15] L. Pareja *et al.*, “Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay,” *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 8, no. 10, pp. 3844–3858, Oct. 2011, doi: 10.3390/ijerph8103844.
- [16] S. Niell *et al.*, “QuEChERS adaptability for the analysis of pesticide residues in beehive products seeking the development of an agroecosystem sustainability monitor,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 63, no. 18, 2015, doi: 10.1021/acs.jafc.5b00795.
- [17] M. Murcia-Morales, H. Heinzen, P. Parrilla-Vázquez, M. del M. Gómez-Ramos, and A. R. Fernández-Alba, “Presence and distribution of pesticides in apicultural products: A critical appraisal,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 146, Jan. 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116506>.
- [18] A. David *et al.*, “Widespread contamination of wildflower and bee-collected pollen with complex mixtures of neonicotinoids and fungicides commonly applied to crops,” *Environ. Int.*, vol. 88, pp. 169–178, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.12.011>.
- [19] O. Lambert *et al.*, “Widespread occurrence of chemical residues in beehive matrices from apiaries located in different landscapes of Western France,” *PLoS One*, vol. 8, no. 6, pp. e67007–e67007, Jun. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0067007.
- [20] I. Hrynko, P. Kaczyński, and B. Łozowicka, “A global study of pesticides in bees:

- QuEChERS as a sample preparation methodology for their analysis – Critical review and perspective,” *Sci. Total Environ.*, vol. 792, p. 148385, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148385>.
- [21] M. Barrios, M. Burwood, A. Kröger, C. Calvo, B. Ríos-Touma, and F. Teixeira-de-Mello, “Riparian cover buffers the effects of abiotic and biotic predictors of leaf decomposition in subtropical streams,” *Aquat. Sci.*, vol. 84, no. 4, p. 55, 2022, doi: [10.1007/s00027-022-00886-z](https://doi.org/10.1007/s00027-022-00886-z).
- [22] J. S. Richardson and D. E. L. Hanna, “Leaf Litter Decomposition as a Contributor to Ecosystem Service Provision BT - The Ecology of Plant Litter Decomposition in Stream Ecosystems,” C. M. Swan, L. Boyero, and C. Canhoto, Eds. Cham: Springer International Publishing, 2021, pp. 511–523.
- [23] M. A. S. Graça, “The Role of Invertebrates on Leaf Litter Decomposition in Streams – a Review,” *Int. Rev. Hydrobiol.*, vol. 86, no. 4–5, pp. 383–393, Jul. 2001, doi: [https://doi.org/10.1002/1522-2632\(200107\)86:4/5<383::AID-IROH383>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1522-2632(200107)86:4/5<383::AID-IROH383>3.0.CO;2-D).
- [24] N. Morin-Crini *et al.*, “Worldwide cases of water pollution by emerging contaminants: a review,” *Environ. Chem. Lett.*, vol. 20, no. 4, pp. 2311–2338, 2022, doi: [10.1007/s10311-022-01447-4](https://doi.org/10.1007/s10311-022-01447-4).
- [25] F. Ernst *et al.*, “Occurrence of pesticide residues in fish from south American rainfed agroecosystems,” *Sci. Total Environ.*, vol. 631–632, pp. 169–179, Aug. 2018, doi: [10.1016/j.scitotenv.2018.02.320](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.320).
- [26] F. Jesús *et al.*, “Miniaturized QuEChERS based methodology for multiresidue determination of pesticides in odonate nymphs as ecosystem biomonitors,” *Talanta*, vol. 178, 2018, doi: [10.1016/j.talanta.2017.09.014](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.014).
- [27] L. Girones, A. H. Arias, A. L. Oliva, T. Recabarren-Villalon, and J. E. Marcovecchio, “Occurrence and spatial distribution of organochlorine pesticides in the southwest Buenos Aires using the freshwater snail *Chilina parchappii* as environmental biomonitor,” *Reg. Stud. Mar. Sci.*, vol. 33, p. 100898, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2019.100898>.
- [28] V. Belenguer, F. Martinez-Capel, A. Masiá, and Y. Picó, “Patterns of presence and concentration of pesticides in fish and waters of the Júcar River (Eastern Spain),” *J. Hazard. Mater.*, vol. 265, pp. 271–279, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.11.016>.
- [29] C. A. Morrissey *et al.*, “Neonicotinoid contamination of global surface waters and

- associated risk to aquatic invertebrates: A review,” *Environ. Int.*, vol. 74, pp. 291–303, Jan. 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.10.024>.
- [30] B. Markert, A. Breure, and H. Zechmeister, *Bioindicators & biomonitoring: principles, concepts, and applications*. Amsterdam: Elsevier, 2003.
- [31] X. Fadic, F. Placencia, A. M. Domínguez, and F. Cereceda-Balic, “Tradescantia as a biomonitor for pesticide genotoxicity evaluation of iprodione, carbaryl, dimethoate and 4,4'-DDE,” *Sci. Total Environ.*, vol. 575, pp. 146–151, 2017, doi: [10.1016/j.scitotenv.2016.09.198](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.198).
- [32] M. L. Winston, *The Biology of the Honey Bee*. USA: Harvard University Press, 1991.
- [33] S. Niell *et al.*, “Neonicotinoids transference from the field to the hive by honey bees: Towards a pesticide residues biomonitor,” *Sci. Total Environ.*, vol. 581–582, pp. 25–31, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.011>.
- [34] S. Niell *et al.*, “Beehives biomonitor pesticides in agroecosystems: Simple chemical and biological indicators evaluation using Support Vector Machines (SVM),” *Ecol. Indic.*, vol. 91, pp. 149–154, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.03.028>.
- [35] S. Niell *et al.*, “Agroecology environment quality quotient (AEQ), an indicator of both, the beehive fitness and the contamination level of the environment by pesticides,” *Ecol. Indic.*, vol. 106, 2019, doi: [10.1016/j.ecolind.2019.105448](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105448).
- [36] J. Svoboda, “Industrial poisoning of bees by arsenic,” *Ved. Pr. Vyzk. Ust. Vcelarskeho CSAZV*, vol. 2, pp. 55–60, 1961.
- [37] A. Decourtye *et al.*, “Comparative Sublethal Toxicity of Nine Pesticides on Olfactory Learning Performances of the Honeybee *Apis mellifera*,” *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 48, no. 2, pp. 242–250, 2005, doi: [10.1007/s00244-003-0262-7](https://doi.org/10.1007/s00244-003-0262-7).
- [38] A. Decourtye and M. H. Pham-Delegue, “The proboscis extension response: assessing the sublethal effects of pesticides on the honey bee,” *Honey bees Estim. Environ. impact Chem.*, pp. 67–84, 2002.
- [39] A. K. El Hassani, M. Dacher, V. Gary, M. Lambin, M. Gauthier, and C. Armengaud, “Effects of Sublethal Doses of Acetamiprid and Thiamethoxam on the Behavior of the Honeybee (*Apis mellifera*),” *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 54, no. 4, pp. 653–661, 2008, doi: [10.1007/s00244-007-9071-8](https://doi.org/10.1007/s00244-007-9071-8).
- [40] A. P. Tulloch, “Beeswax—Composition and Analysis,” *Bee World*, vol. 61, no. 2,

- pp. 47–62, Jan. 1980, doi: 10.1080/0005772X.1980.11097776.
- [41] S. Bogdanov, “Beeswax: Production, Properties, Composition, Control,” *Bee Prod. Sci.*, Apr. 2016.
- [42] M. Maia and F. M. Nunes, “Authentication of beeswax (*Apis mellifera*) by high-temperature gas chromatography and chemometric analysis,” *Food Chem.*, vol. 136, no. 2, pp. 961–968, 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.003>.
- [43] S. Bogdanov, K. Ruoff, and L. P. Oddo, “Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review,” *Apidologie*, vol. 35, no. Suppl. 1, pp. S4–S17, 2004, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1051/apido:2004047>.
- [44] S. Suárez-Luque, I. Mato, J. F. Huidobro, J. Simal-Lozano, and M. T. Sancho, “Rapid determination of minority organic acids in honey by high-performance liquid chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 955, no. 2, pp. 207–214, 2002, doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00248-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00248-0).
- [45] E. Herbert and H. Shimanuki, “Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen,” *Apidologie*, vol. 9, no. 1, pp. 33–40, 1978, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1051/apido:19780103>.
- [46] H. Human and S. W. Nicolson, “Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae),” *Phytochemistry*, vol. 67, no. 14, pp. 1486–1492, 2006, doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.05.023>.
- [47] L. B. Almeida-Muradian, L. C. Pamplona, S. Coimbra, and O. M. Barth, “Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets,” *J. Food Compos. Anal.*, vol. 18, no. 1, pp. 105–111, 2005, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.10.008>.
- [48] C. R. Doughty, “Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates,” in *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, vol. 4, no. 1, V. H. R. D. M. Rosenberg, Ed. New York: Chapman and Hall, 1994, p. 92.
- [49] S. Segnini, “El uso de los macroinvertebrados bentónicos como indicadores de la condición ecológica de los cuerpos de agua corriente,” *Ecotropicos*, vol. 16, no. 2, pp. 45–63, 2003.
- [50] B. Suárez, M. Barrios, and F. Teixeira de Mello, “Macroinvertebrates’ response to different land use in lowland streams from Uruguay: use of artificial substrates for biomonitoring,” *Neotrop. Biodivers.*, vol. 8, no. 1, pp. 136–146, Dec. 2022, doi:

10.1080/23766808.2022.2049178.

- [51] M. Springer, “Biomonitoreo acuático,” in *Macroinvertebrados de agua dulce de Costa Rica I*, M. Springer, A. Ramírez, and P. Hanson, Eds. San José, Costa Rica: Revista de Biología Tropical, 58(4). pp. 53–59, 2010, pp. 53–59.
- [52] P. S. Corbet, “Are Odonata useful as bioindicators?,” *Libellula*, vol. 12, no. 3–4, pp. 91–102, 1993.
- [53] J. M. Alberts and S. M. P. Sullivan, “Factors influencing aquatic-to-terrestrial contaminant transport to terrestrial arthropod consumers in a multiuse river system,” *Environ. Pollut.*, vol. 213, pp. 53–62, 2016, doi: 10.1016/j.envpol.2016.02.003.
- [54] J. M. Daley, L. D. Corkum, and K. G. Drouillard, “Aquatic to terrestrial transfer of sediment associated persistent organic pollutants is enhanced by bioamplification processes,” *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 30, no. 9, pp. 2167–2174, 2011, doi: 10.1002/etc.608.
- [55] K. W. Cummins, R. W. Merritt, and P. C. Andrade, “The use of invertebrate functional groups to characterize ecosystem attributes in selected streams and rivers in south Brazil,” *Stud. Neotrop. Fauna Environ.*, vol. 40, no. 1, pp. 69–89, 2005, doi: 10.1080/01650520400025720.
- [56] P. S. Corbet, “Biology of Odonata,” *Annu. Rev. Entomol.*, vol. 25, pp. 189–217, 1980, doi: 10.1146/annurev.en.25.010180.001201.
- [57] C. W. Heckman, *Encyclopedia of South American Aquatic Insects: Odonata – Anisoptera*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2006.
- [58] C. W. Heckman, *Encyclopedia of South American Aquatic Insects: Odonata - Zygoptera*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008.
- [59] K. J. Tennessen, “Odonata: Dragonflies, damselflies,” *Encycl. Insects*, pp. 721–729, 2009, doi: 10.1016/B978-0-12-374144-8.00194-6.
- [60] K. Scully-Engelmeyer *et al.*, “Exploring Biophysical Linkages between Coastal Forestry Management Practices and Aquatic Bivalve Contaminant Exposure,” *Toxics*, vol. 9, no. 3. 2021, doi: 10.3390/toxics9030046.
- [61] N. R. Council, *Animals as Sentinels of Environmental Health Hazards*. Washington, DC: The National Academies Press, 1991.
- [62] H. Zhang, X. Hong, S. Yan, J. Zha, and J. Qin, “Environmentally relevant concentrations of bifenthrin induce changes in behaviour, biomarkers, histological characteristics, and the transcriptome in *Corbicula fluminea*,” *Sci. Total Environ.*,

- vol. 728, p. 138821, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138821>.
- [63] C. Cerezer *et al.*, “Influence of pesticides and abiotic conditions on biochemical biomarkers in *Aegla aff. longirostri* (crustacea, anomura): Implications for conservation,” *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 203, p. 110982, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110982>.
- [64] S. C. Faria *et al.*, “Phylogenetic and environmental components of inter-specific variability in the antioxidant defense system in freshwater anomurans *Aegla* (Crustacea, Decapoda),” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, p. 2850, 2018, doi: [10.1038/s41598-018-21188-1](https://doi.org/10.1038/s41598-018-21188-1).
- [65] K. D. Colpo, L. C. Ribeiro, B. Wesz, and L. O. Ribeiro, “Feeding preference of the South American endemic anomuran *Aegla platensis* (Decapoda, Anomura, Aeglididae),” *Naturwissenschaften*, vol. 99, no. 4, pp. 333–336, 2012, doi: [10.1007/s00114-012-0900-x](https://doi.org/10.1007/s00114-012-0900-x).
- [66] E. G. Vergara, V. Hernández, K. R. Munkittrick, R. Barra, C. Galban-Malagon, and G. Chiang, “Presence of organochlorine pollutants in fat and scats of pinnipeds from the Antarctic Peninsula and South Shetland Islands, and their relationship to trophic position,” *Sci. Total Environ.*, vol. 685, pp. 1276–1283, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.122>.
- [67] A. Pérez-Ruzafa *et al.*, “Presence of Pesticides throughout Trophic Compartments of the Food Web in the Mar Menor Lagoon (SE Spain),” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 40, no. 2, pp. 140–151, 2000, doi: [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(99\)00193-9](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(99)00193-9).
- [68] FAO/OMS, *Comisión del Codex Alimentarius: Manual de procedimiento*. 2016.
- [69] European Communities, “Council Directive 91/414/EEC,” *Off. J. Eur. Communities*, no. 230/1, pp. 1–32, 1991.
- [70] M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Stajnbaher, and F. Schenck, “Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and ‘Dispersive Solid-Phase Extraction’ for the Determination of Pesticide Residues in Produce,” *J. AOAC Int.*, vol. 86, no. 2, pp. 412–431, 2003.
- [71] P. Payá *et al.*, “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,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 389, no. 6, pp. 1697–1714, 2007, doi: [10.1007/s00216-007-1610-7](https://doi.org/10.1007/s00216-007-1610-7).

- [72] M.-P. Chauzat, J.-P. Faucon, A.-C. Martel, J. Lachaize, N. Cougoule, and M. Aubert, "A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France.," *J. Econ. Entomol.*, vol. 99, no. 2, pp. 253–262, 2006, doi: 10.1603/0022-0493-99.2.253.
- [73] J.-P. Chauzat, Marie-Pierre, Faucon, "Pesticide residues in beeswax samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L .) in France," *Pest Manag. Sci.*, vol. 1106, no. December 2006, pp. 1100–1106, 2007, doi: 10.1002/ps.
- [74] E. C. Bizzotto, S. Villa, and M. Vighi, "POP bioaccumulation in macroinvertebrates of alpine freshwater systems," *Environ. Pollut.*, vol. 157, no. 12, pp. 3192–3198, 2009, doi: 10.1016/j.envpol.2009.06.001.
- [75] F. B. Antwi and G. V. P. Reddy, "Toxicological effects of pyrethroids on non-target aquatic insects," *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 40, no. 3, pp. 915–923, 2015, doi: 10.1016/j.etap.2015.09.023.
- [76] H. Mol, A. Rooseboom, R. van Dam, M. Roding, K. Arondeus, and S. Sunarto, "Modification and re-validation of the ethyl acetate-based multi-residue method for pesticides in produce," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 389, no. 6, pp. 1715–1754, 2007.
- [77] T. Pihlström, G. Blomkvist, P. Friman, U. Pagard, and B.-G. Österdahl, "Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 389, no. 6, pp. 1773–1789, 2007.
- [78] M. Luke, J. Froberg, and H. Masumoto, "Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography," *J Assoc Off Anal Chem*, vol. 58, no. 5, pp. 1020–1026, 1975.
- [79] M. A. Luke, J. E. Froberg, G. M. Doose, and H. T. Masumoto, "Improved multiresidue gas chromatographic determination of organophosphorus, organonitrogen, and organohalogen pesticides in produce, using flame photometric and electrolytic conductivity detectors.," *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, vol. 64, no. 5, pp. 1187–1195, Sep. 1981.
- [80] M. Hiemstra and A. de Kok, "Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography–tandem mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1154, no. 1–2, pp. 3–25, 2007.
- [81] S. Lehotay, K. Maštovská, and A. Lightfield, "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.*, vol. 88, no. 2, pp. 615–629, 2005.
- [82] M. Anastassiades, B. Tasdelen, E. Scherbaum, and D. Stajnbaher, “Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis,” in *Pesticide Chemistry: Crop Protection, Public Health, Environmental Safety*, H. Ohkawa, H. Miyagawa, and P. Lee, Eds. Weinheim: Wiley-VCH, 2007, pp. 439–458.
- [83] P. Calatayud-Vernich, F. Calatayud, E. Simó, and Y. Picó, “Efficiency of QuEChERS approach for determining 52 pesticide residues in honey and honey bees,” *MethodsX*, vol. 3, no. 2015, pp. 452–458, 2016, doi: 10.1016/j.mex.2016.05.005.
- [84] S. Walorczyk and B. Gnusowski, “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,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, no. 37, pp. 6522–6531, 2009, doi: 10.1016/j.chroma.2009.07.045.
- [85] L. Wiest *et al.*, “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,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, no. 34, pp. 5743–5756, 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.079>.
- [86] B. Morzycka, “Simple method for the determination of trace levels of pesticides in honeybees using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 982, no. 2, pp. 267–273, 2002, doi: 10.1016/S0021-9673(02)01505-4.
- [87] A. Tapparo *et al.*, “UHPLC-DAD method for the determination of neonicotinoid insecticides in single bees and its relevance in honeybee colony loss investigations,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 405, no. 2–3, pp. 1007–1014, 2013, doi: 10.1007/s00216-012-6338-3.
- [88] M. Stöckelhuber *et al.*, “Determination of Pesticides Adsorbed on Arthropods and Gastropods by a Micro-QuEChERS Approach and GC–MS/MS,” *Chromatographia*, vol. 80, no. 5, pp. 825–829, 2017, doi: 10.1007/s10337-017-3280-8.
- [89] B. Huerta *et al.*, “Development of an extraction and purification method for the

- determination of multi-class pharmaceuticals and endocrine disruptors in freshwater invertebrates,” *Talanta*, vol. 132, pp. 373–381, 2015, doi: 10.1016/j.talanta.2014.09.017.
- [90] E. C. DG-SANTE, “Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed,” *SANTE/11945/2015*, 2015.
- [91] M. Fernández, Y. Picó, and J. Mañes, “Rapid screening of organophosphorus pesticides in honey and bees by liquid chromatography—Mass spectrometry,” *Chromatographia*, vol. 56, no. 9, pp. 577–583, 2002, doi: 10.1007/BF02497673.
- [92] J. H. Gross, *Mass Spectrometry: A Textbook*. 2004.
- [93] D. Barceló, *Chromatographic-Mass Spectrometric Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues*, vol. 3. Elsevier, 2005.
- [94] Y. Picó, G. Font, J. C. Moltó, and J. Mañes, “Pesticide residue determination in fruit and vegetables by liquid chromatography–mass spectrometry,” *J. Chromatogr. A*, vol. 882, no. 1, pp. 153–173, 2000, doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00294-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00294-6).
- [95] L. Alder, K. Greulich, G. Kempe, and B. Vieth, “Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC–MS or LC–MS/MS?,” *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 25, no. 6, pp. 838–865, Nov. 2006, doi: 10.1002/mas.20091.
- [96] J. H. Gross, “Gas Phase Ion Chemistry,” in *Mass Spectrometry: A Textbook*, J. H. Gross, Ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2004, pp. 13–66.
- [97] J. H. Gross, “Instrumentation,” in *Mass Spectrometry: A Textbook*, J. H. Gross, Ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2004, pp. 111–192.
- [98] The European Commission, “Sante/11813/2017 Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis,” pp. 1–46, 2018, doi: 10.13140/RG.2.2.33021.77283.
- [99] A. Kruve, A. Künnapas, K. Herodes, and I. Leito, “Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1187, no. 1, pp. 58–66, 2008, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.01.077>.
- [100] C. Ferrer, A. Lozano, A. Agüera, A. J. Girón, and A. R. Fernández-Alba, “Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, no. 42, pp. 7634–7639, 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.033>.

- [101] L. Pareja, M. J. Martínez-Bueno, V. Cesio, H. Heinzen, and A. R. Fernández-Alba, "Trace analysis of pesticides in paddy field water by direct injection using liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, no. 30, pp. 4790–4798, 2011, doi: 10.1016/j.chroma.2011.02.044.
- [102] S. Niell *et al.*, "Análisis multiresiduo de 41 pesticidas en miel por LC-MS / MS : evaluación de dos métodos de clean-up," *Agrociencia Uruguay*, vol. 17, no. 1, pp. 101–107, 2013.
- [103] S. Niell *et al.*, "QuEChERS-based method for the multiresidue analysis of pesticides in beeswax by LC-MS/MS and GC×GC-TOF," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 62, no. 17, pp. 3675–3683, 2014, doi: 10.1021/jf405771t.
- [104] S. Niell, N. Gerez, F. Jesús, V. Cesio, and H. Heinzen, "Case Study: Beehive Devastation by Microencapsulated Parathion-Methyl," *Chromatographia*, vol. 79, no. 17–18, 2016, doi: 10.1007/s10337-016-3027-y.
- [105] O. V. Tabakaeva, A. V. Tabakaev, and W. Piekoszewski, "Nutritional composition and total collagen content of two commercially important edible bivalve molluscs from the Sea of Japan coast.," *J. Food Sci. Technol.*, vol. 55, no. 12, pp. 4877–4886, Dec. 2018, doi: 10.1007/s13197-018-3422-5.