



2023

VERIFICACIÓN DE UN MÉTODO
ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE
PIRETROIDES EN MIELES POR
CROMATOGRAFÍA GASEOSA CON
DETECTOR DE CAPTURA DE
ELECTRONES.

ESPECIALIZACIÓN EN CALIDAD E INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS

ALUMNA: ING. ONAGA FLORENCIA

DIRECTORA: MG. INDACO MERCEDES

Facultad de Ciencias y Tecnología de los Alimentos – Universidad Nacional
del Comahue

Contenido

Contenido.....	1
Agradecimientos.....	1
Resumen.....	2
1. Introducción.....	3
1.1 Antecedentes	3
1.2 Fundamentación del estudio propuesto	4
2. Objetivos.....	5
2.1 Objetivo General	5
2.2 Objetivos específicos	5
3. Marco Teórico	6
3.1 Apicultura en Argentina.....	6
3.2 Manejo y obtención de la miel.....	7
3.3 ¿Por qué es importante analizar piretroides?	8
3.3.1 Los Piretroides. Sus generalidades.	9
3.3.2 Efecto de piretroides sobre la salud humana	10
3.3.3 El efecto de los piretroides en las abejas.....	12
3.4 Técnicas de preparación y extracción de plaguicidas en miel de abejas.....	13
3.4.1 Extracción líquido-líquido (LLE)	13
3.4.2 Extracción en fase sólida (SPE)	14
3.4.3 Micro extracción en fase sólida (MSPE).....	15
3.4.4 Extracción por fluidos supercríticos (EFS)	16
3.4.5 Modo de extracción en fase sólida dispersiva (QuEChERS)	16
3.5 Métodos analíticos utilizados para la determinación de plaguicidas en miel de abejas... 18	
3.5.1 Cromatografía líquida (CL)	19
3.5.2 Cromatografía de gases (CG).....	19
3.5.3 Detector de ionización de llama (FID).....	20
3.5.4 Detector de captura de electrones (ECD)	21
3.5.6 Espectrómetro de masas	22
3.6 ¿Qué diferencia hay entre la validación y verificación de un método analítico?	23
4. Metodología.....	26
4.1 Alcance:	26
4.2 Parámetros de calidad:.....	26
4.3 Lugar de trabajo, instrumentos y equipos	28
4.4 Estándares y reactivos	28
4.5 Toma de muestras y selección de plaguicidas	29

4.6 Método de QueChers. Extracción y clean up.....	30
5. Resultados y discusión.....	31
5.1 Verificación del Método Analítico.....	31
5.2 Linealidad – Efecto Matriz	31
5.3 Límites	35
5.3.1 Límite de detección LD:.....	35
5.3.2 Límite de cuantificación LOQ:	36
5.4 Precisión: Repetibilidad (RSDr).	36
5.5 Veracidad: Recuperación	39
6. Conclusiones.....	40
7. Recomendaciones	40
8. Bibliografía.....	41
Anexo	47

Agradecimientos

Agradezco a Mercedes Indaco y al laboratorio de Cromatografía de la UNCo por haberme dado la posibilidad de realizar este trabajo integrador final. También agradecer a la Facultad de Ciencias y Tecnología de los Alimentos por apostar al desarrollo profesional de este rubro. Y un agradecimiento especial a mi familia que me acompañó en mis decisiones y esfuerzos.

Además, me gustaría contarles que, dado que no me desempeño en el área de alimentos, debimos pensar una temática que fuera de interés para el grupo de laboratorio, en concordancia con las temáticas abordadas en la especialización y dentro de las disponibilidades de los recursos al alcance. Este trabajo me significó un gran esfuerzo y por sobre todo un valioso aprendizaje. Cabe aclarar que también fueron los primeros ensayos en esta matriz por parte del laboratorio y podría ser un tema de interés para futuro.

Quisiera destacar la calidad de los cursos recibidos y el esfuerzo también de todos aquellos que hicieron muchas tareas de gestión, para coordinar y articular todas las actividades que implicaron esta especialización.

Me parece importante también mencionar, que siendo que decidí embarcarme en esto en plena pandemia, sin saber bien que forma tomaría el horizonte en un contexto tan complejo, la especialización representó para mí un gran sostén no solo intelectual sino también afectivo. Pues me tocó compartir con compañeros de otras ciudades y de diferentes profesiones, que me brindaron un trato fraterno y constructivo. Aprendí mucho no solo con las clases y testimonios profesionales de los docentes sino también de las experiencias compartidas por los distintos compañeros.

Simplemente resumir diciendo: ¡gracias por todo lo aprendido y la posibilidad de conocer buenas personas con las mismas ganas de potenciar el mundo de los alimentos!

Resumen

El uso frecuente e inadecuado de compuestos químicos, como los plaguicidas utilizados en actividades agropecuarias, traen consigo la contaminación del medio ambiente. Estos, inciden en la actividad apícola, debido a que pueden alcanzar las colmenas ya sea por aplicación incorrecta, por el viento o bien porque son recolectados, transportados y concentrados en la colmena por las abejas, durante la actividad de pecoreo, permaneciendo como residuos en la miel. La identificación y cuantificación de estos compuestos es de gran importancia, ya que la persistencia de estas sustancias tóxicas, perjudican tanto a las abejas como también representan un riesgo para las personas que las consumen. Entre estos compuestos cobran interés los piretroides debido a que son ampliamente aplicados en los cultivos de las zonas del Valle de Río Negro (Alto Valle y Valle Medio) y Neuquén. Mediante este trabajo, a nivel preliminar, se llevó a cabo la verificación de un método analítico para la cuantificación de piretroides en miel de abejas. El método demostró ser lineal, preciso y exacto para 5 piretroides: Bifentrin, Permetrina, Cipermetrina, Fenvalerato y Deltametrina.

1. Introducción

1.1 Antecedentes

La miel es un producto alimenticio natural elaborado por las abejas a partir del néctar de las flores. La definición, identidad y calidad de la miel se encuentran establecidas en el Capítulo X, Art. Nº 782 y Art. Nº 783 del Código Alimentario Argentino.

Las abejas melíferas son importantes polinizadores de una gran diversidad de cultivos y plantas nativas, la polinización llevada a cabo por estos insectos es necesaria para el 35 % de los cultivos destinados a la alimentación humana (Ollerton, 2017); sin embargo, a nivel mundial han sufrido una disminución en sus poblaciones, fenómeno llamado el Desorden del Colapso de las Colonias (DCC) (Brutscher, 2016). Las características de las colonias colapsadas, son: la muerte parcial o total de la colonia con presencia de abejas muertas dentro o cerca de la colmena, la desaparición parcial o total de la colonia, con el abandono de las reservas de alimento y las crías y el debilitamiento de la colonia mediante un lento desarrollo durante la primavera, bajo condiciones óptimas (Simon-Delso, 2014). Aunque se han reportado diversos factores como las probables causas del colapso de las colonias, uno de los más importantes es la exposición a plaguicidas (Calatayud-Vernich, 2018; Sánchez-Bayo, 2016; Traynor, 2016). Las abejas se exponen a los plaguicidas cuando buscan los recursos néctar-poliníferos, sobre todo si las colonias están ubicadas cerca de áreas agrícolas (O'Neal, 2018). Se ha demostrado que la exposición a dosis subletales de plaguicidas puede afectar el comportamiento de la abeja (Balbuena, 2015), el pecoreo (Cresswell & Thompson, 2012), su longevidad (Wu, 2011), la termorregulación (Tosi, 2016); así como su aprendizaje olfativo y memoria (Lu, 2014). Los residuos de plaguicidas pueden acumularse en el pan de abeja, miel y cera (Johnson, 2013; Lozano, 2018); presentándose en esta última la capacidad de almacenamiento residual de plaguicidas (Benuszak, 2017). Por tanto, de un panal contaminado, los residuos pueden transferirse a la miel almacenada, presentando un riesgo para los consumidores (Wilmart, 2016).

Según estadísticas de la FAO, Argentina es el segundo productor y exportador mundial de miel, detrás de China. El 95 % de la miel que se produce en Argentina se exporta a más de veinte países diferentes (SENASA, 2022). Los principales destinos de la miel argentina son Estados Unidos, Alemania y Japón. La miel producida en nuestro país es considerada una de las de mejor calidad en el mundo. En la mayoría de los países existen Autoridades Regulatorias que evalúan y administran la aprobación del uso de aquellos productos fitosanitarios que pueden ser comercializados y utilizados en concordancia con las Buenas prácticas agrícolas, buscando

de esta manera que la producción de alimentos se realice de forma segura para la población y el ambiente.

Según el Codex Alimentarius, por "residuo de plaguicida o fitosanitario", se entiende cualquier sustancia especificada presente en alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales como consecuencia del uso de un fitosanitario. Este término incluye cualquier derivado de un fitosanitario, como sus productos de conversión, metabolitos o productos de reacción, y las impurezas con relevancia toxicológica (Codex, Normas Internacionales de los Alimentos, 2022). Un límite máximo de residuos (LMR) es el nivel máximo de residuos de un plaguicida que se permite legalmente en los alimentos o piensos (tanto en el interior como en la superficie) cuando los plaguicidas se aplican correctamente conforme a las buenas prácticas agrícolas (FAO). Actualmente la Resolución SENASA Nº 934/2010, establece las tolerancias de residuos de fitosanitarios en productos y subproductos agropecuarios comercializados en nuestro país, así como también indica aquellos productos y usos que se hallan exentos del requisito de fijación de tolerancias y además la Resolución SENASA 559/2011 establece los LMRs en productos de origen animal, incluyendo la miel. A nivel internacional existen varias fuentes que publican los LMRs de plaguicidas en mieles que sirven de referencias, algunos de ellos son los citados por el CODEX ALIMENTARIUS, la normativa de Estados Unidos (U.S. EPA) y la normativa de la Unión Europea (EUR-Lex).

1.2 Fundamentación del estudio propuesto

En las últimas décadas varios países (EE.UU, México, Brasil, entre otros) inclusive en el Alto Valle de Río Negro en el año 2021, han reportado la desaparición y mortandad masiva de abejas (RíoNegro, 2022; BBC-News, 2019; Ciatej, 2017; RíoNegro, 2021). Diversos factores han sido atribuidos como el cambio climático, plagas e infecciones, así como el uso de plaguicidas de uso agrícola. Este último argumento ha cobrado fuerza tras publicaciones de organismos oficiales de investigación, respecto de la presencia de plaguicidas tanto en abejas como en mieles (Christodoulou, 2015; LAPRW, 2021). Estos hechos se vinculan principalmente con la aplicación de plaguicidas tanto en cultivos aledaños a las zonas productoras de miel, en los cultivos con colmenas para polinización, como así mismo al curado de colmenas para combatir las enfermedades y plagas de las abejas. Si bien el sector apícola ha ido migrando a modos de producción más amigables con el medio ambiente, es muy difícil controlar la contaminación que llega por el desarrollo de otros sectores productivos, lo que implica consecuencias de gravedad ecológica, sanitaria y económica tanto a nivel internacional como nacional.

Una gran variedad de pesticidas puede ser dañinos para las abejas, entre los cuales se destacan los piretroides que son de aplicación conocida en las zonas del Valle de Río Negro (Alto Valle y Valle Medio) y Neuquén, debido a los cultivos desarrollados (principalmente manzanas, peras, tomates, entre otros). Los piretroides pueden contribuir al mencionado fenómeno DCC de las abejas melíferas. Sin embargo, la determinación de piretroides en la miel sigue siendo una tarea difícil para los analistas hasta la fecha debido a la complejidad de esta matriz y a los LMR, que son cada vez más bajos (Belinato, 2021).

En este estudio se pretende verificar un método analítico (BS EN 15662:2008) que permita identificar y cuantificar piretroides (Bifentrin, Permetrina, Cipermetrina, Fenvalerato y Deltametrina) en mieles de abejas, siendo esto importante no solo como un indicador del estado del ambiente (Murcia-Morales, 2020), sino también como un modo de garantizar inocuidad en estos productos de consumo humano, para contribuir al conocimiento de la interacción entre apicultura y agricultura, y de evitar la pérdida del principal recurso productivo del sector apícola, las abejas. El presente trabajo corresponde al primer estudio realizado en mieles de abeja en nuestro laboratorio, por lo cual lo consideramos de carácter preliminar. A grandes rasgos consiste en la extracción y limpieza de las muestras por método de QuEChERS, y la detección por cromatografía de gases con detector de captura de electrones, técnicas que ofrecen límites de detección relativamente bajos, lo que permite cubrir los rangos de concentración estipulados en la normativa internacional.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Verificar un método analítico (BS EN 15662:2008) para identificar y cuantificar piretroides (Bifentrin, Permetrina, Cipermetrina, Fenvalerato y Deltametrina) en mieles de abejas de las zonas del Valle de Río Negro (Alto Valle y Valle Medio) y Neuquén por cromatografía gaseosa con detector de captura de electrones.

2.2 Objetivos específicos

- Conocer qué tipo de plaguicidas se aplican en el Valle de Río Negro (Alto Valle y Valle Medio) y Neuquén.
- Analizar posible efecto matriz en las muestras.

3. Marco Teórico

3.1 Apicultura en Argentina

Argentina se ubica entre los tres principales productores a nivel mundial, siendo el segundo exportador de miel con un volumen promedio superior a las 75.000 toneladas (t) anuales, mientras en el país se consume alrededor de 6.000 t promedio (Argentina.gob.ar, 2021).

El Registro Nacional de Productores Apícolas (RENAPA online) nos permite conocer que existen 15.306 apicultores, los cuales manejan 33.477 apiarios y más de 3.500.000 colmenas. El sector cuenta con un total de 1.209 salas de extracción de miel habilitadas por el Senasa.

Gran parte del territorio es apto para el desarrollo de la actividad, y presenta distintos potenciales productivos tanto para la miel como para otros productos de la colmena, estando presente la actividad en muchas localidades de nuestro país.

En este sentido, las condiciones climáticas y los avances tecnológicos permiten obtener una miel de calidad con múltiples identidades que las distinguen internacionalmente.

Las colmenas se ubican principalmente en las provincias que conforman la región de la Pampa Húmeda. Casi el 50% del total de colmenas están en la provincia de Buenos Aires. Otro 35% se reparte entre las provincias de Córdoba, Santa Fe, La Pampa y Entre Ríos. El 15% restante se distribuye en el resto del territorio nacional. Con excepción de Tierra del Fuego, todas las provincias argentinas explotan colmenas comercialmente, generando un sensible impacto en las economías locales debido a que los productores viven en cercanía respecto al desarrollo de sus actividades. Sin embargo, un aspecto que resulta peligroso para el desarrollo de la actividad apícola es que, como consecuencia de la expansión de las fronteras del cultivo de la soja y otros monocultivos en provincia de Buenos Aires y región Pampeana en general, se ha producido el corrimiento o reducción de terrenos destinados a ganadería, a horticultura y a policultivos, los cuales favorecen la presencia de alta diversidad floral y recurso melífero, trayendo como consecuencia, la reducción del rendimiento por colmena (Salizzi, 2014; Grecia Stefanía de Groot, 2021). En la Patagonia la apicultura sigue siendo una actividad alternativa pero atada a un fuerte dinamismo que llevó a crear en la región un polo de producción que puede comenzar a pisar fuerte en el mercado nacional. Como se mencionó anteriormente las zonas del Valle de Río Negro (Alto Valle y Valle Medio) y Neuquén, presentan una importante producción agropecuaria lo que hace indispensable la actividad de polinización de los cultivos y, por lo tanto, la posibilidad del desarrollo de la apicultura.

En este marco es que SENASA diagramó sistemas de gestión y control de la cadena productiva y sus respectivas normativas de trazabilidad, que tienen en cuenta las necesidades del mercado interno y los diferentes requerimientos de los mercados externos a los que se envía la miel argentina. SENASA cuenta con una red de laboratorios que se dedican a analizar las mieles del territorio nacional y que poseen poder de policía en caso que una miel pueda considerarse como no apta. La mayoría de los mismos están ubicados en Buenos Aires y sólo dos se encuentran en Santa Fe y La Pampa. Por su parte el CIATI (Centro de Investigación y Asistencia Técnica a la Industria) realiza análisis fisicoquímico en mieles. Y en Cipolletti (provincia de Río Negro), el INTI (Instituto Nacional de Tecnología Industrial) realiza análisis microbiológicos, sensoriales y de origen botánico.

3.2 Manejo y obtención de la miel

Como para cualquier alimento, los procedimientos y métodos de manejo, los equipos e instalaciones y los manipuladores que intervengan en su obtención han de cumplir con los requisitos higiénico-sanitarios necesarios para ello. El respeto de unas prácticas correctas de higiene en todas y cada una de las etapas de producción es imprescindible para garantizar la calidad y seguridad del alimento obtenido (SAGPyA, 2023). Para obtener la miel, el proceso comienza por la recolección, cosecha. Comprende las operaciones realizadas en el campo para retirar de las colmenas los panales llenos de miel, previamente “desabejados” mediante ahumado y cepillado o soplado de los mismos, y trasladarlos a una instalación donde se realiza la extracción de la miel. Se comenzará con el desoperculado donde se elimina, mediante un instrumento afilado y generalmente caliente, la capa o lámina de cera (opérculo) con el que las abejas taponan las celdillas llenas de miel, en cada cuadro. Estas capas, generalmente caen en una batea en la que se separa la miel de opérculo de la cera de opérculo. Luego, esa miel se une al resto de la miel extraída en el proceso y la cera de opérculo es comercializada aparte. La extracción suele realizarse mediante centrífuga, ya que el prensado es una práctica en desuso que aporta una miel de peor calidad por las impurezas que contiene. Tras la centrifugación sigue el filtrado para eliminar impurezas como restos de cera, insectos, materia vegetal, etc. evitando eliminar por completo las sustancias propias de la miel, como el polen. Para eliminar las burbujas de aire introducidas durante la extracción e impurezas que hayan quedado, se realiza la decantación y desespumado. Finalmente, la miel se envasa. Los contenedores y recipientes de la miel se almacenarán en un local adecuado, de fácil limpieza, al abrigo de la luz solar, baja humedad relativa y temperatura lo más constante posible, que nunca supere los 35 °C. Los productos químicos, medicamentos veterinarios, productos de limpieza, etc., no se deben

guardar en la zona de almacenamiento de la miel. Se deben guardar en un armario cerrado para evitar contaminaciones cruzadas. El procesado de la miel se caracteriza por la reducida cantidad de residuos que genera y por las características de inocuidad de los mismos (SAGPyA, 2023).

3.3 ¿Por qué es importante analizar piretroides?

En cuanto al interrogante de los posibles plaguicidas a analizar, no encontramos estadísticas oficiales sobre qué sustancias se comercializan para los cultivos de la región, lo que implica una búsqueda a profundizar en trabajos futuros. Sin embargo, pudimos averiguar los tipos de plaguicidas que requieren los cultivos que se desarrollan en las distintas zonas seleccionadas en nuestro análisis (Alto Valle de Río Negro y Neuquén y el Valle Medio) (INDEC, 2021; Cichón, 2017; CASAFE, 2023). En la mayoría de estos cultivos observamos que es común la aplicación de piretroides, por lo que consideramos importante realizar el análisis de la presencia de éstos compuestos en la miel de abejas (Tabla 1).

Tabla 1: Cultivos en los cuales se aplican los piretroides analizados.

Piretroide	Cultivo
Bifentrin	Manzano, duraznero, papa, peral, poroto, acelga, achicoria, albahaca, berro, cilantro, eneldo, escarola, espinaca, frutilla, lechuga, orégano, radicheta, romero, rúcula, salvia, tomate, tomillo.
Permetrina	Alfalfa, arvejas, ciruelo, damasco, durazno, pelón, manzano, membrillo, peral, pimiento.
Cipermetrina	Álamos, alfalfa, algodón, arvejas, cebolla, ciruelo, damasco, duraznero, pelón, manzano, membrillo, peral, tomate, ajo, maíz dulce.
Fenvalerato	Papa, brócoli, coliflor, durazno, poroto, manzano, nogal.
Deltametrina	alfafa, arvejas, berenjena, coliflor, durazno, forestales y alamedas, manzano, peral, papa, pimiento, poroto, chaucha, repollo, rabanitos de Bruselas, tomate.

El hecho de poder detectar piretroides en mieles es muy importante, ya que estos resultados indican, por un lado, el potencial de las colmenas de abeja para detectar sustancias contaminantes en el ambiente y, por otro lado, riesgos para salud humana, las abejas y la incluida la de los trabajadores del campo y los consumidores de miel y de otros productos de la colmena, entre otros alimentos de origen agropecuario.

Para reducir el riesgo de intoxicación aguda de colmenas con plaguicidas se recomienda no fumigar durante la floración del cultivo. De ser inevitable, no hacerlo en horas del día en que las abejas y otros polinizadores están en las flores del cultivo y tapar las piqueras para evitar la salida de las abejas de la colmena para mitigar el impacto y principalmente mantener una comunicación permanente entre agricultores/as y apicultores/as. Desde una perspectiva agroecosistémica, la eliminación de pesticidas de alta y moderada peligrosidad, el reemplazo de plaguicidas de síntesis por productos orgánicos, el manejo integrado de plagas, la adopción de prácticas agroecológicas y el fortalecimiento de las regulaciones sobre el uso de pesticidas, monitoreos de residuos en mieles y otros alimentos, son medidas urgentes para cuidar la salud de los ambientes, las abejas y por, sobre todo, las personas.

3.3.1 Los Piretroides. Sus generalidades.

Los piretroides, son análogos sintéticos de las piretrinas naturales, esteres tóxicos aislados de las flores secas del crisantemo (*Chrysanthemum cineræ folium*, conocidas anteriormente como *Pyrethrum*) (Santos, 2007), obtenidos fácilmente por extracción, con disolventes como metanol, acetona, etc. Ellos actúan sobre todo por contacto y se introdujeron en el mercado en los años 70 seguido de un cambio estructural de las piretrinas, para modificar la estructura química y obtener sustancias con mayor estabilidad y potencial insecticida (persistentes), con la inclusión de átomos de nitrógeno, azufre y de halógenos, manteniendo relativamente baja toxicidad aguda en mamíferos (Heudorf, 2001; Soderlund, 2002). Con amplio espectro de acción contra todo tipo parásitos externos (moscas, garrapatas, pulgas, piojos, ácaros, mosquitos, etc en el ganado y otras mascotas), se han usado abundantemente para el control de plagas en la agricultura, apicultura, en salud pública e higiene privada (Retana, C, & Aguilera, 2008).

Pertenecen a estos grupos los insecticidas: Aletrina, Resmetrina y Tetrametrin, usados en el control de insectos, vectores de enfermedades humanas. La Cipermetrina, Deltametrina, Fenvalerato, Permetrina, Fenpropatrina, Tralometrina, Lambda Cihalotrina, Teflutrina, Ciflutrina, Flucinatrinato, Tau-fluvalinato y Bifenato, son usados para el control de insectos en la agricultura. La Flumetrina, Kadetrina y Telaetrina, son empleados para el control de insectos domésticos, así también como la Deltametrina, Cipermetrina y Lambda Cyhalotrina (Retana, C, & Aguilera, 2008; Santos, 2007; PIMPÃO, 2012).

En el medio ambiente, los piretroides, como otros plaguicidas, se pueden usar como un modelo para el estudio de ecotoxicidad, porque contaminan el aire, la tierra y el agua, ocasionando efectos adversos que afectan desde una bacteria hasta el hombre. Son

comprobadamente muy tóxicos para las abejas, peces y los artrópodos acuáticos (PIMPÃO, 2012).

En general, son compuestos lipofílicos, con tendencia a la bioacumulación. Se absorben rápidamente por el tracto gastrointestinal después de la administración oral y por el tracto respiratorio a través de inhalación de polvo o spray. Mientras su absorción por vía dérmica (a través de la piel intacta) es relativamente baja.

En el aire, las piretrinas y muchos de los piretroides son degradados rápidamente por la luz solar o por otros compuestos que se encuentran en la atmósfera. La lluvia y la nieve ayudan a remover del aire a los piretroides que no son degradados rápidamente. Debido a que muchos de estos compuestos son extremadamente tóxicos para los peces, generalmente no se rocían directamente sobre el agua, sin embargo, pueden entrar a los lagos, lagunas, ríos y arroyos a través de la lluvia o de agua de escorrentía proveniente de terrenos agrícolas. Estos compuestos se adhieren fuertemente al suelo y generalmente no son muy móviles en el suelo. Las piretrinas y los piretroides no son incorporados fácilmente por las raíces de las plantas y la vegetación porque se adhieren firmemente al suelo; sin embargo, a menudo se rocían directamente sobre cosechas y plantas, de manera que pueden encontrarse en hojas, frutas y hortalizas. Estos compuestos eventualmente son degradados por los microorganismos presentes en el suelo y el agua. También pueden ser degradados por la luz solar en la superficie del agua, el suelo o las plantas. Sin embargo, algunos de los piretroides que se han desarrollado recientemente pueden persistir en el ambiente durante meses antes de ser degradados (ATSDR, 2023).

La degradación acelerada, combinada con una biodisponibilidad hasta cierto punto pobre, explica en gran medida, que su toxicidad para los mamíferos sea relativamente baja. La mayoría de los metabolitos de los piretroides son excretados con rapidez por los riñones. Esta rápida metabolización, junto con la pobre absorción, explica la baja toxicidad de los piretroides en los humanos. En la administración oral de dosis diarias, los piretroides alcanzan niveles estables en los tejidos internos en pocos días. Estos niveles persisten durante todo el período de dosificación y disminuyen cuando la exposición cesa (Soderlund, 2002).

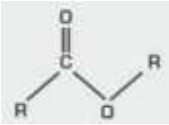
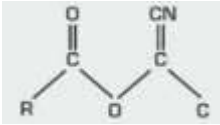
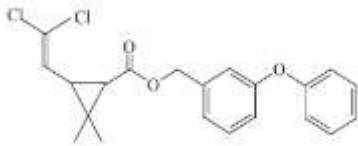
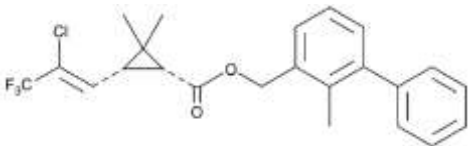
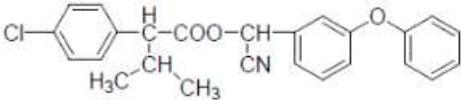
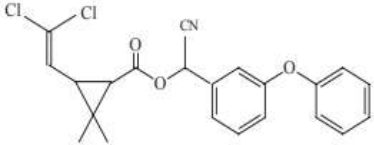
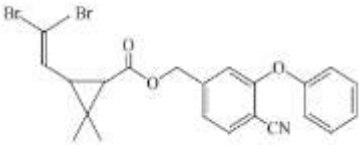
3.3.2 Efecto de piretroides sobre la salud humana

Las piretrinas y piretroides son compuestos poco tóxicos en forma aguda. Los casos de mayor toxicidad fueron atribuidos a reacciones alérgicas. Su uso se extiende desde la agricultura (agroquímicos) hasta el uso en hogares (Insecticida o biocida domisanitario).

Las piretrinas naturales suelen tener un 30% de principio activo insecticida y son más activas en cuadros de intoxicación por contacto que por ingestión. Los piretroides sintéticos

muestran una particular toxicidad al ser ingeridos. Por su estructura química se los puede dividir en dos grupos, los de tipo I, en el que se encuentran la Tetrametrina, Permetrina, etc. que no contienen grupo ciano, y que son ésteres del crisanténico y el grupo tipo II, que incluye la Deltametrina, Cipermetrina, etc. que contienen grupo ciano, y que son ésteres del ácido pirétrico (Santos, 2007). En la Tabla 2 se presentan sus estructuras:

Tabla 2: Estructuras químicas de piretrinas y piretroides.

Estructuras químicas de las piretrinas.	
 <p style="text-align: center;">Tipo I</p>	 <p style="text-align: center;">Tipo II</p>
Estructuras químicas de los piretroides analizados en este trabajo.	
Tipo I	
 <p style="text-align: center;">Permetrina</p>	 <p style="text-align: center;">Bifentrin</p>
Tipo II	
 <p style="text-align: center;">Fenvalerato</p>	 <p style="text-align: center;">Cipermetrina</p>
<p style="text-align: center;">Deltametrina</p>	

El mecanismo de acción de los piretroides se debe a que prolongan la inactivación de los canales de sodio, por unirse a ellos en su estado abierto. La absorción se produce por todas las vías, inhalatoria, digestiva y cutánea. Se metabolizan rápidamente por hidrólisis, por hidroxilación o por mecanismos, a través del sistema de las monooxigenasas microsomaes. La eliminación es por orina habiéndose metabolizado la gran mayoría, pero con una pequeña proporción sin cambios, y por materia fecal.

Tienen una escasa toxicidad crónica en animales y humanos, esto es debido a la escasa acumulación de estos agentes en el organismo y a la alta capacidad de detoxificación eficiente ante estos tipos de insecticidas tóxicos.

La exposición a piretrinas puede presentar un cuadro clínico de dermatitis de contacto, siendo desde eritema localizado a erupción vesicular. Dada la naturaleza alergizante de este tipo de productos, se han observado crisis asmáticas, reacciones anafilácticas y colapso vascular periférico. Hay poca evidencia de reacciones tipo alérgicas en humanos expuestos a piretroides sintéticos, siendo una forma notable de toxicidad la parestesia cutánea observada en trabajadores que utilizan en sus rociadores sustancias que llevan el grupo ciano (Deltametrina, Cipermetrina, etc.) la que se desarrolla varias horas después de la exposición y que suelen describir como quemazón o pinchazos en la piel y que en algunos casos sigue como un hormigueo y adormecimiento que suele durar hasta 18 horas y ser muy desagradable y molesta. El contacto en la cara o a través de los ojos suele producir dolor, lacrimación, fotofobia, congestión y edema de la conjuntiva y párpados. La ingestión de piretroides puede causar dolor epigástrico, náuseas, vómitos, cefalea, vértigo, anorexia, fatiga, opresión torácica, visión borrosa, parestesia y palpitaciones, fasciculaciones en músculos de las extremidades y disturbios de la conciencia. En intoxicaciones severas, las convulsiones pueden persistir de 30 a 120 segundos acompañadas por flexión de miembros superiores y extensión de los inferiores con opistótonos y pérdida de conciencia. Los signos y síntomas de la exposición aguda parecen ser reversibles (ATSDR, 2023; Puraire, 2022).

3.3.3 El efecto de los piretroides en las abejas

Actualmente, hay gran variedad de insecticidas disponibles para el control de plagas de cultivos, incluyendo piretroides y neonicotinoides (Zhu, 2017). En Argentina, la combinación de Thiametoxám + Lambda cialotrina se emplea en cultivos polinizados por abejas melíferas, por ejemplo: *Prunus persica* L. (durazno) y *Medicago sativa* L. (alfalfa). Por otro lado, la combinación de Imidacloprid + Bifentrín + Lambdacialotrina se utiliza en *Glycine max* L. (soja), cultivo que representa el 45 % de la superficie productiva del país, estimada para la campaña 2018-2019 (Copati, 2023). En cuanto al herbicida 2,4 D es utilizado ampliamente en los sistemas agrícolas para el control de malezas de hoja ancha (Mondino, 2020). Según las estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAOSTAT, Argentina empleó 3.736 t de insecticidas en 2017 (FAOSTAT, 2023), de los cuales 591,5 t corresponden a piretroides.

Los piretroides son tóxicos para los insectos, incluidas las abejas. Actúan por ingestión y por contacto causando desorientación y cese de la actividad de alimentación en minutos, como consecuencia el insecto queda paralizado y muere (Mueller-Beilschmidt, 1990). Este insecticida inicialmente causa derribo (la incapacidad del insecto para mantener su posición normal) seguido por recuperación o muerte. El fenvalerato tiene cierta acción repelente sobre las abejas, como resultado de que reduce el contacto de las abejas con las superficies de las plantas; eso dura hasta un día después de la aplicación (Iqbal Sayeed, 2003). Dado que la mayoría de las abejas intoxicadas mueren en el campo antes de la contaminación de su colmena, la cría permanece no expuesta a insecticidas (Hasibur Rehman, 2014). Se ha estudiado la combinación de piretroides con otros insecticidas como los neonicotinoides y podría ser aditivo en términos de toxicidad para las abejas (Gill, 2012; Gill, 2014), pesticidas en la colmena (Palmer, 2013) o incluso interactuar sinérgicamente con fungicidas (Biddinger, 2013).

Las tasas altas de pérdida de colonias afectan directamente al ecosistema, a los apicultores y a la producción. Las posibles relaciones entre la pérdida de colonias de abejas melíferas y los efectos de los residuos de agroquímicos plantean una serie de preocupaciones.

3.4 Técnicas de preparación y extracción de plaguicidas en miel de abejas

En términos generales la preparación de la muestra tiene por finalidad aislar el analito de otros compuestos que dificulten su detección, este proceso es de gran importancia para obtener una detección inequívoca del compuesto de interés, un trato incorrecto de la muestra puede provocar la invalidación del ensayo, por esto se debe seleccionar el tipo de extracción que sea más eficiente y práctico para el análisis.

Como se indicó, la finalidad de este trabajo es realizar la verificación del método BS EN 15662:2008 (Foods Of Plant Origin. Determination Of Pesticide Residues Using GC-MS And/OR LC-MS/MS Following Acetonitrile Extraction/Partitioning And Clean-Up By Dispersive SPE. QuEChERS-Method_British Standard). Es por ello que es necesario conocer qué tipos de extracción son usados para el análisis de plaguicidas en alimentos y qué ventajas presenta el método de QuEChERS.

A continuación, se presentan los distintos métodos de extracción:

3.4.1 Extracción líquido-líquido (LLE)

En química, la extracción líquido-líquido, también conocida como extracción con solventes o extracción con disolventes, es un proceso físico empleado para la separación de una sustancia de interés (analito) que puede disolverse en dos disolventes inmiscibles o

parcialmente miscibles, con distinto grado de solubilidad y que están en contacto a través de una interfase (materia). Dicha técnica puede emplearse para la extracción líquido-líquido de plaguicidas en miel, para lo cual es recomendable antes de comenzar la extracción solubilizar la matriz (miel) en agua para disminuir su viscosidad y lograr así homogenizar el analito para su posterior extracción con el solvente.

Entre los solventes orgánicos usados para la extracción del analito de la matriz pueden mencionarse: acetato de etilo, diclorometano, hexano, éter de petróleo o mezclas de benceno-isopropanol, hexano-acetona, hexano-ácido acético glacial, n-hexano-2-propanol y agua-acetona-ácido fórmico. El método de extracción líquido-líquido aplicado correctamente ofrece bajos límites de detección y cuantificación, una de las desventajas radica en que se emplean grandes cantidades de solventes (Rodríguez Lopez, 2013).

3.4.2 Extracción en fase sólida (SPE)

La extracción en fase sólida (SPE) es una técnica diseñada para la preparación y la purificación rápidas y selectivas de la muestra antes del análisis cromatográfico (p. ej. HPLC, GC). En la SPE (Figura 1), se aíslan uno o más analitos de una muestra líquida extrayéndolo, separándolo o adsorbiéndolo en una fase estacionaria sólida, posteriormente se eluye el analito retenido en un solvente orgánico (Chen Y. , 2008).

La preparación de la muestra mediante SPE cambia la matriz original de una muestra a un entorno de matriz más sencilla. Esto hace que la muestra sea más adecuada para la cromatografía analítica posterior y con frecuencia simplifica y mejora el análisis cualitativo y cuantitativo final. La matriz de muestra más sencilla también indica la exigencia que se deposita en un sistema analítico, lo que podría ampliar la vida útil del sistema. Para disminuir la viscosidad de la miel y permitir el paso de ésta por la fase sólida es necesario disolverla en solventes como agua o metanol (M.W. Kujawski & J.Namieśnik, 2008) o su mezcla agua-metanol (Albero, Sánchez-Brunete, & Tadeo, 2004).

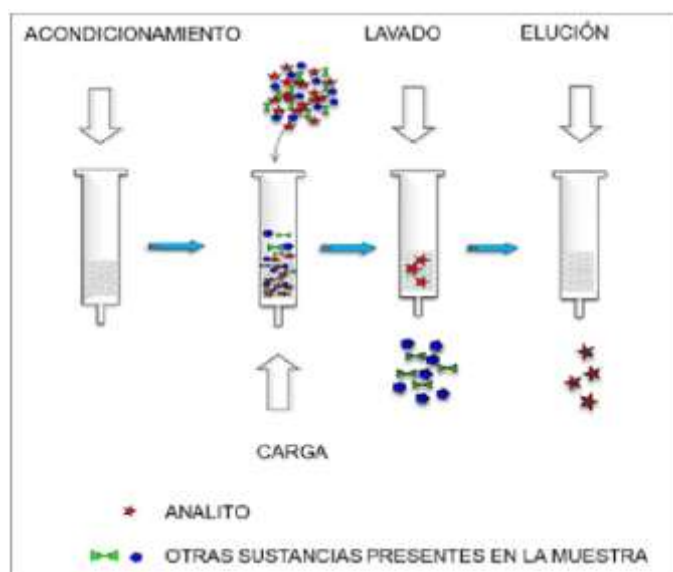


Figura 1: Esquema de procedimiento de extracción en fase sólida (SPE)

Esta técnica presenta desventajas como la limitación en la cantidad de muestra que pueda pasar por el cartucho, pérdida por retención irreversible de los analitos en algunas fases polares del sólido adsorbente y elución de residuos provenientes del polímero del cartucho (Rial-Otero, Gaspar, Moura, & Capelo, 2007).

3.4.3 Micro extracción en fase sólida (MSPE)

En la MSPE se utiliza una fibra recubierta con una fase de extracción: un líquido (polímero), un sólido (absorbente) o una combinación de ambos. La fibra recubierta está alojada en una aguja protectora y fijada a un soporte parecido a una jeringa.

Cuando la fibra se expone a una muestra, los analitos de la muestra se separan de la matriz hacia la fase estacionaria hasta que se establece un equilibrio. El recubrimiento de la fibra extrae los compuestos de la muestra ya sea por absorción (revestimientos líquidos) o por adsorción (revestimientos sólidos). Después de un tiempo de extracción prescrito, se retira la fibra y se inserta directamente en un cromatógrafo, normalmente de cromatografía de gases (GC) o cromatografía líquida de alta presión (HPLC), para su desorción y análisis. En la GC, la desorción de los analitos se realiza térmicamente, mientras que en la HPLC se utiliza un disolvente para la desorción en una fase líquida.

La principal ventaja es la eliminación de disolventes (Simplício & Boas, 1999) y su inconveniente es desconocer los efectos que pueda tener la matriz sobre el proceso (Chen, Poon, & Lam, 1998).

3.4.4 Extracción por fluidos supercríticos (EFS)

Los fluidos supercríticos incluyen propiedades de líquidos y sólidos, mientras que su densidad es correlativa con su temperatura y presión. Son un medio muy útil para el aislamiento selectivo de los compuestos en matrices complejas. La ventaja inicial es su bajo coste. Además, los analitos se extraen de manera más rápida y la técnica es mejor para el medio ambiente ya que no usa disolventes orgánicos. El dióxido de carbono (CO_2) es el más utilizado ya que es químicamente inerte, inocuo, no es inflamable y su punto crítico (T_c : 31.1°C y P_c : 72.9 atm) es fácilmente accesible. Otros fluidos menos usados son el óxido nitroso (N_2O), xenón (Xe), amoníaco (NH_3) y agua (H_2O), entre otros. Uno de los inconvenientes principales de su utilización surge a causa de la polaridad del CO_2 , ya que tiene un marcado carácter apolar y por tanto su empleo está limitado a la extracción de analitos de baja polaridad unidos débilmente a la muestra. Para resolver este problema, se añaden los llamados modificadores, como el metanol, por ejemplo, cambiando así la polaridad del CO_2 que conlleva la apertura del abanico de muestras en las que se puede utilizar esta técnica. Se ha reportado el uso de compuestos extractores como el CO_2 supercrítico para plaguicidas organoclorados, organofosforados, organonitrogenados y piretroides en miel a una presión de 400 bar, una temperatura de 90°C y acetonitrilo como modificador (Rissato, Galhiane, Knoll, & Apon, 2004).

3.4.5 Modo de extracción en fase sólida dispersiva (QuEChERS)

Como se ha mencionado, ciertas técnicas de extracción, como la líquido-líquido presentan algunas desventajas importantes, por ejemplo, ser laboriosa y con elevado consumo de solventes, los cuales en general presentan elevada toxicidad, tanto para el analista, como para el ambiente. Asimismo, dificultad para la automatización del procedimiento, sobre todo cuando se cuenta con un elevado número de muestras a analizar. Debido a estos inconvenientes han aparecido novedosas técnicas para el tratamiento de muestras. La extracción QuEChERS ha venido ganando popularidad por su simplicidad, rapidez y aplicabilidad. Este método es un sistema de extracción en fase sólida dispersiva (SPE) que implica dos etapas fundamentales, una primera etapa de extracción simple seguida de una fase de limpieza del extracto mediante extracción en fase sólida por dispersión (clean up).

Como su abreviación lo indica es un proceso: Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, y Safe (rápido, económico, efectivo, robusto y seguro). Es utilizado ampliamente para la extracción de residuos de plaguicidas en alimentos, algunas de sus ventajas son la buena recuperación tolerando una alta gama de polaridades y bajas cantidades de solventes orgánicos haciendo de este un método de extracción amigable con el medio ambiente (Nguyen, Yu, Lee,

& Lee, 2008). Se ha utilizado en estudios de contaminación de plaguicidas como fipronil, imidacloprid, thiamethoxam, dimethoate, carbendazin, tebuconazole, amitraz, τ -fluvalinate en miel de abejas obteniendo porcentajes de recuperación mayores al 70% (Tomasini et al., 2012), también en análisis multirresiduos (Nguyen, Yu, Lee, & Lee, 2008).

La metodología de QuEChERS fue introducido por Anastassiades (Anastassiades & Lehotay, 2003). La misma surge como un método de tratamiento de muestras de frutas y vegetales en la determinación de multirresiduos de plaguicidas, basándose el método original en una extracción a micro escala utilizando acetonitrilo como solvente extractor, la extracción de los analitos contenidos en las muestras con alto contenido acuoso y una partición líquido-líquido utilizando sulfato de magnesio y cloruro de sodio; por último, una etapa opcional de limpieza de extracción en fase sólida dispersiva (SPE), utilizando como sorbente amina primaria secundaria (PSA) (López, Martínez, & Segovia, 2015). Como ya se mencionó, QuEChERS engloba dos etapas principales, comenzando por la etapa de extracción de fase simple, en la que se realiza la adición de un solvente miscible en agua, de carácter hidrófilo, utilizando normalmente acetonitrilo o acetona, a la porción de una muestra homogenizada previamente; esto permite la extracción de los analitos en el solvente. Pese a que ambos solventes son miscibles en agua, pueden separarse fácilmente de la fase acuosa utilizando la adición de una mezcla de sulfato de magnesio anhidro más cloruro de sodio, lo que a su vez promueve la extracción de los analitos en el solvente, por efecto del “salting-out”. La segunda etapa comprende una SPE opcional, que involucra la adición de una cantidad de sorbente en bruto, siendo las más utilizadas la amina primaria secundaria (PSA), carbón negro grafitizado (GCB), octadecilsilano (C18), silicagel, lo mismo que combinaciones de estas, para realizar una limpieza que remueva de forma efectiva muchos de los componentes polares presentes en la matriz, como ácidos orgánicos, lípidos, algunos pigmentos polares y azúcares, que permanecen en el extracto. Actualmente existen tres variantes del método QuEChERS, los cuales se diferencian en función de los reactivos utilizados y se presentan a continuación: 1. Método original: introducido en 2003, utiliza cloruro de sodio para mejorar la extracción, 2. Método dispersivo AOAC 2007.01: Se utiliza acetato de sodio como tampón en sustitución del cloruro de sodio y 3. Método europeo EN15662: Similar al método AOAC utilizando cloruro de sodio, citrato de sodio dihidrato y citrato de sodio sequihidrato, en lugar del acetato de sodio. La Figura 2 muestra el proceso QuEChERS con sus diferentes variantes (Rodríguez, Martínez, & Henry., 2017).

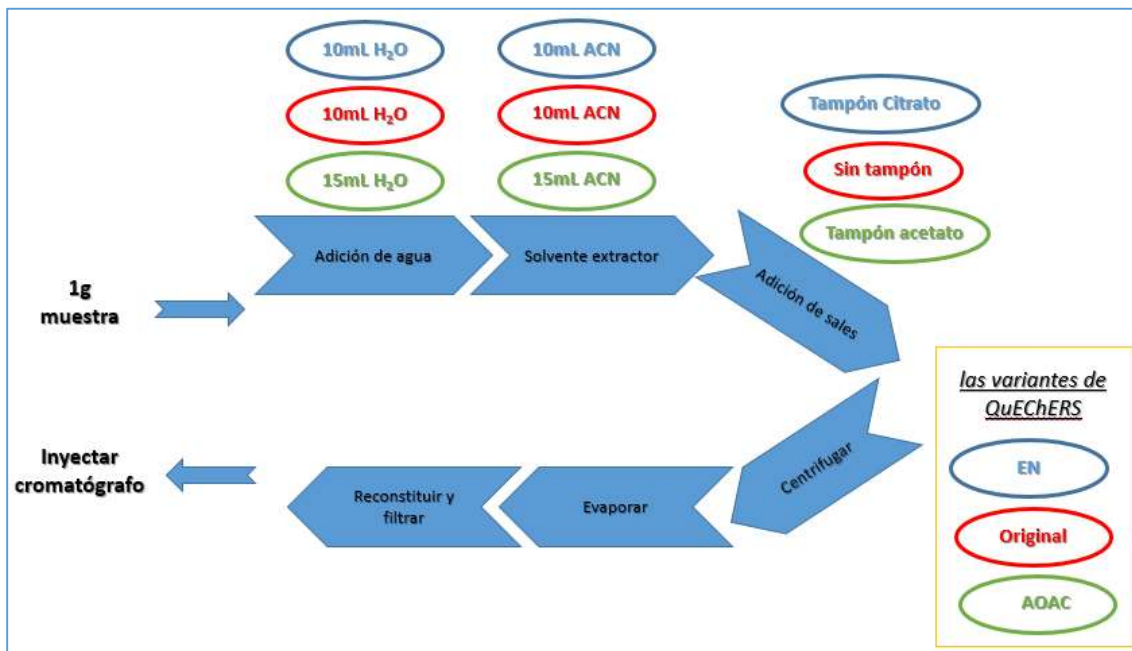


Figura 2: Esquema de las variantes de QuEChERS.

3.5 Métodos analíticos utilizados para la determinación de plaguicidas en miel de abejas

Dado que la verificación del método analítico BS EN 15662:2008 implica el empleo de cromatografía para el análisis de estos compuestos de interés, es importante hacer una breve descripción de la misma.

Las técnicas cromatográficas son las más utilizadas para el análisis de plaguicidas. El término cromatografía fue introducido en 1906 por el botánico ruso Mikhailil Tswett, para hacer referencia a la separación de los pigmentos contenidos en extractos vegetales, conforme éstos se filtraban a través de una columna rellena con un sólido poroso. Keulemans (1959) definió cromatografía como “Método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen en dos fases, una de las cuales constituye un lecho estacionario de gran desarrollo superficial y la otra un fluido que pasa a través o a lo largo del lecho estacionario (fase móvil)”. Por tanto, la cromatografía comprende procesos en los que los componentes de una mezcla, disueltos en una fase móvil, se van desplazando con diferente velocidad a través de una fase estacionaria. La adecuada elección de estas fases puede permitir que tales diferencias se traduzcan en una separación efectiva de los solutos, a la vez que éstos pueden identificarse atendiendo a su particular velocidad de avance. Como resultado de esto los componentes de la

mezcla se separan discriminadamente lo cual permite su posterior análisis cualitativo y cuantitativo (Araceli, Soberón, Sampietro, & Vattuone, 2010).

El estado físico de la fase móvil determina la primera gran división de los métodos cromatográficos. En esencia, algún tipo de fluido puede ser usado como fase móvil. Históricamente, los líquidos fueron los primeros en ser usados dando lugar a un amplio rango de métodos clasificados como cromatografía líquida (CL). Los gases también pueden ser usados como fase móvil, los métodos basados en este principio se clasifican como cromatografía gaseosa (CG).

3.5.1 Cromatografía líquida (CL)

La CL permite una rápida y eficiente determinación, esta separa los componentes de la muestra con base en su polaridad, además admite el estudio de plaguicidas termolábiles. La CL posee la ventaja de poder determinar componentes como los plaguicidas independientemente de su volatilidad o termoestabilidad (Juan, Picó, & Font, 2003). Los detectores más utilizados en la cromatografía líquida son: el UV-visible el cual es universal, aunque poco selectivo ya que muchas moléculas absorben a la misma longitud de onda. El detector de fluorescencia que, contrario al anterior es selectivo, para su utilización en plaguicidas organofosforados, estos deben ser sometidos a un proceso de derivatización debido a que no son compuestos fluorescentes.

3.5.2 Cromatografía de gases (CG)

En este tipo de cromatografía no sólo la fase móvil debe ser un gas, sino que también debe serlo la mezcla a separar, por ello la CG requiere un paso previo de volatilización, que no siempre es factible, si se considera la termolabilidad de ciertas sustancias. En esta técnica la fase móvil es un gas inerte el cual fluye a través de una columna que contiene la fase estacionaria, la cual puede ser un sólido poroso (Gas- Sólido) o una película líquida delgada (Gas-Líquido) (Figura 3).

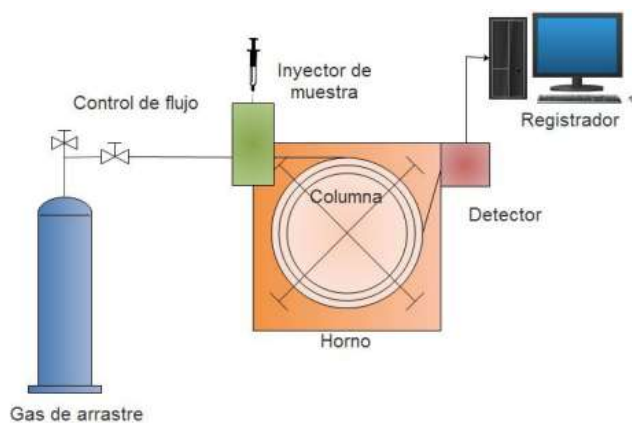


Figura 3: Diagrama general de un cromatógrafo de gases.

La cromatografía gas – líquido ha tenido una gran aplicación en el análisis de gran variedad de muestras tales como petroquímicos, aceites, productos alimenticios, farmacéuticos y naturales, entre otros. Para el análisis de plaguicidas en muestras de alimentos la cromatografía de gases se ha convertido en la técnica más usada debido a la volatilidad y termoestabilidad de éstos (Juan, Picó, & Font, 2003).

Para CG también existen distintos tipos de detectores a emplear. En el caso de este trabajo se empleó un detector con captura de electrones. A continuación, a modo informativo se presentan una descripción general de algunos detectores empleados en análisis de mieles:

3.5.3 Detector de ionización de llama (FID)

El FID normalmente utiliza una llama de hidrógeno y aire a la que se transfiere la muestra para oxidar moléculas orgánicas y producir partículas cargadas eléctricamente (iones). Los iones se recogen y producen una señal eléctrica proporcional a la concentración de las especies orgánicas. El flujo de estos iones es conducido a un electrodo tubular donde son detectados por un pico amperímetro de alta impedancia. El detector FID se encuentra entre los detectores más utilizados para la cromatografía de gases, su uso se ha extendido a varios tipos de industrias debido a su poca selectividad lo cual permite hacer estudio de un gran número de compuestos diferentes. Ha sido utilizado para el análisis de diferentes contaminantes ambientales (Klee, 2012), entre ellos, los plaguicidas donde se ha explorado su funcionamiento para diferentes matrices como frutas y vegetales (Dipakshi Sharma, 2010), miel de abejas (Bernal, Jimenez, del Nozal, Higes, & Llorente, 2000), agua y tierra (Naeeni, Yamini, & Rezaee, 2011), entre otros.

3.5.4 Detector de captura de electrones (ECD)

El detector de captura de electrones (ECD) es una técnica utilizada para analizar compuestos halogenados y se usa principalmente en los sectores medioambiental, forense y farmacéutico. Un ECD funciona con dos electrodos y una corriente que pasa entre ellos (fuente de radiación β , ^{63}Ni) (Figura 4). Cuando una muestra pasa entre estos dos electrodos, las moléculas recogen algunos de los electrones, lo que provoca una reducción de la corriente. Esta reducción se registra como un pico positivo en la detección de componentes.

Este es un detector altamente selectivo, y bastante sensible a las moléculas que poseen grupos electronegativos. El ECD permite límites de detección del orden de ng kg^{-1} (Klee, 2012). Es por esto, que ha encontrado una amplia aplicación en el análisis de plaguicidas en diferentes tipos de matrices (Dipakshi Sharma, 2010), alcanzando límites de detección del orden de partes por billón (ppb).

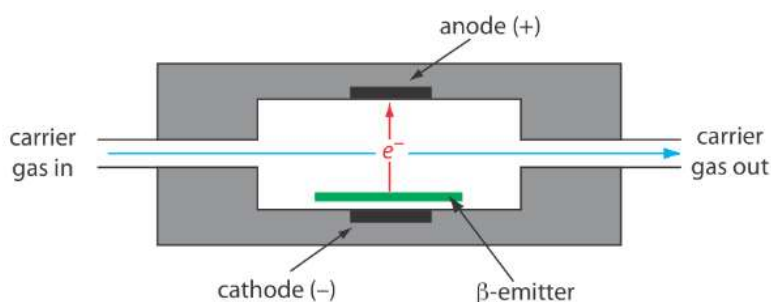


Figura 4: Diagrama esquemático que muestra un detector de captura de electrones.

Como es habitual en otras técnicas de CG, se requiere un gas portador con bajas impurezas de agua y oxígeno. Ambas impurezas podrían interactuar con la fase estacionaria, causando problemas importantes como ruido en la línea de base superior y sangrado de la columna en el cromatograma del gas de salida, lo que da como resultado la reducción de la sensibilidad del analizador y una menor vida útil de la columna. Las impurezas de oxígeno y agua también pueden oxidar la fuente radioactiva de níquel utilizada para generar la corriente de base. Además, el gas portador debe tener niveles excepcionalmente bajos de halocarburos, ya que el ECD es extremadamente sensible a estos compuestos.

El CG-ECD también requiere gas de relleno, en caso de utilizar helio como gas portador, ya que servirá como corriente de base, para proporcionar los electrones que no están contenidos en el helio. Es frecuente calibrar el analizador con una mezcla de calibración.

3.5.6 Espectrómetro de masas

Un espectrómetro de masas es un instrumento que ioniza una molécula gaseosa utilizando suficiente energía para que el ion resultante se descomponga en iones más pequeños. Debido a que estos iones tienen diferentes relaciones de masa/carga, es posible separarlos usando un campo magnético o un campo eléctrico. El espectro de masas resultante contiene información tanto cuantitativa como cualitativa sobre el analito.

La Figura 5 muestra un diagrama de bloques de un instrumento típico de cromatografía de gases-espectrómetro de masas (GC-MS). El efluente de la columna ingresa a la fuente de iones del espectrómetro de masas de manera que elimina la mayoría del gas portador. En la cámara de ionización, las moléculas restantes, una mezcla de gas portador, disolvente y solutos, experimentan ionización y fragmentación. El analizador de masas del espectrómetro de masas separa los iones por su relación masa-carga y un detector cuenta los iones y muestra el espectro de masas. En la Figura 5, se muestra una mezcla de tres componentes que ingresa al GC. Cuando el componente A se eluye de la columna, ingresa a la fuente de iones MS e ioniza para formar el ion parental y varios iones fragmentos. Los iones ingresan al analizador de masas, el cual los separa por su relación masa-carga, proporcionando el espectro de masas que se muestra en el detector.

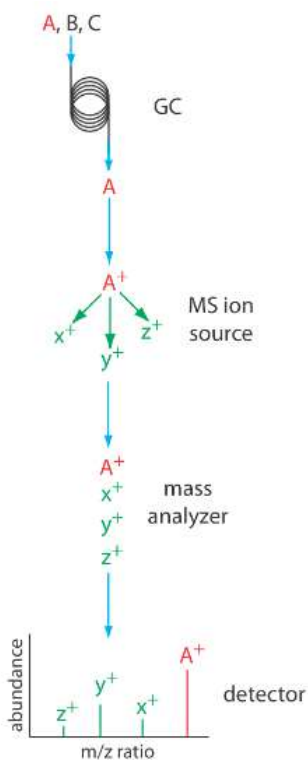


Figura 5: Diagrama de bloques de GC— MS.

Existen varias opciones para monitorear un cromatograma cuando se usa un espectrómetro de masas como detector. El método más común es escanear continuamente todo el espectro de masas y reportar la señal total para todos los iones que llegan al detector durante cada exploración (SCAN). Este escaneo de iones totales proporciona detección universal para todos los analitos. Podemos lograr cierto grado de selectividad monitoreando una o más relaciones específicas de masa/carga, un proceso llamado monitoreo de iones selectivos (SIM). Un espectrómetro de masas proporciona excelentes límites de detección, típicamente de 25 fg a 100 pg, con un rango lineal de 10^5 órdenes de magnitud. Debido a que registramos continuamente el espectro de masas del eluyente de la columna, podemos retroceder y examinar el espectro de masas para cualquier incremento de tiempo. Esta es una clara ventaja para GC-MS porque podemos usar el espectro de masas para ayudar a identificar los componentes de una mezcla.

En el análisis de plaguicidas el espectrómetro de masas ha sido aplicado ampliamente en diferentes tipos de matrices incluida la miel (Fernández, Picó, & Mañes, 2002; Nguyen, Yu, Lee, & Lee, 2008), tanto en la cromatografía de gases como en la cromatografía líquida, donde encuentra una amplia aplicación en el análisis de múltiples tipos de residuos debido a su baja selectividad, la cual permite analizar simultáneamente diversas sustancias con límites de detección del orden de ppb (Blasco, Font, & Picó, 2008; Nguyen, Yu, Lee, & Lee, 2008; Rodríguez Lopez, 2013; Walorczyk & Gnusowski, 2009).

3.6 ¿Qué diferencia hay entre la validación y verificación de un método analítico?

La *validación* de un método analítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados por dicho método son confiables. Cuando se realiza la validación de un método por parte del laboratorio, lo que se busca es poder determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos.

En general, se establece que el laboratorio DEBE validar:

1. *Métodos no normalizados*: Corresponden a métodos desarrollados por el laboratorio o métodos nuevos (ejemplo: publicado en revista científica), o bien, a métodos que tradicionalmente se han utilizado en el laboratorio pero que no están normalizados.

2. *Método normalizado con una modificación significativa*: Cuando se trata de un método empleado tradicionalmente por el laboratorio que no esté normalizado, se puede realizar una *Validación Retrospectiva*, es decir, en base a los datos experimentales que el laboratorio dispone, para la cual se realizará la recopilación de la mayor cantidad de datos históricos disponibles, para luego realizar un proceso de ordenamiento y selección de los datos

recopilados, estos datos pueden ser: curvas de calibración, resultados de ensayos, cartas de control, ensayos de aptitud, etc. A través de estos, se deberán determinar los parámetros de validación, y evaluar si los resultados obtenidos para los fines de la validación son aceptables.

En caso de ser un método nuevo (o uno antiguo del que no se dispongan de datos suficientes) se debe realizar una *Validación Prospectiva*, a través de la generación de datos experimentales.

En algunos casos se puede realizar lo que se conoce como *validación menor* o *verificación* cuando se trate de:

1. Métodos normalizados.
2. Métodos normalizados usados fuera de su alcance propuesto. Ejemplo: uso en otra matriz.
3. Ampliaciones y modificaciones menores de métodos normalizados. Ejemplo: uso en otros analitos.
4. Métodos previamente validados, que hayan sufrido alguna alteración significativa por lo cual deben volver a evaluarse. Estas variaciones pueden ser: cambio de equipo, cambio de componentes de equipo como columnas, detectores, cambio analista, cambio de la matriz que contiene la muestra o de nivel de concentración del analito de interés, entre otros.

La *verificación*, tiene generalmente como objetivo, el comprobar que el laboratorio domina el método de ensayo normalizado y lo utiliza correctamente, en caso de tratarse de un método normalizado modificado para la verificación se requiere solo realizar aquellas pruebas que indiquen que la variación realizada no afecta el ensayo.

En ocasiones, lo que se busca a través de una validación es demostrar que un método es equivalente a otro.

El objetivo de la validación y la verificación, es demostrar que el método utilizado por un laboratorio es adecuado para la aplicación en la que se propone utilizar, así, como también demostrar que las modificaciones que pudieron haberse realizado no afectan su desempeño, ni la confiabilidad de los resultados por este entregado.

Para el caso de nuestro estudio, se realizó de forma preliminar la verificación del método de extracción de piretroides en mieles mediante QuEChERS, de la norma BS EN 15662:2008. Se llevó a cabo siguiendo las directrices descritas basadas en el documento "Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed" (SANTE 11312/2021). En donde se analizaron los siguientes parámetros (ver Tabla 3):

Tabla 3: Parámetros de validación o verificación a determinarse de acuerdo al tipo de método.

PARAMETRO A EVALUAR	CARACTERISTICA(S)	METODO CUALITATIVO	METODO CUANTITATIVO		
			NORMALIZADO	MODIFICADO	NUEVO
SELECTIVIDAD	Identificación analito Interferencia de matriz	Sí	No	Sí	Sí
LINEALIDAD	Rango lineal	No	Sí	Sí	Sí
SENSIBILIDAD	Pendiente	No	Sí o No	Sí	Sí
LIMITES	Critico (LC) Detección (LOD) Cuantificación (LOQ)	Sí	Sí o No	Sí	Sí
PRECISION	Repetibilidad Reproducibilidad	No	Sí	Sí	Sí
VERACIDAD	Sesgo (s) Recuperación (R)	No	Sí o No	Sí o No	Sí
ROBUSTEZ	Test de Youden y Steiner	No	No	Sí o No	Sí
APLICABILIDAD	-----	Sí	Sí	Sí	Sí

A continuación, se presentan las definiciones de los parámetros a considerar en una verificación:

Linealidad: La linealidad de un método analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado.

Debe utilizarse un mínimo de 5 puntos de datos para una evaluación adecuada. Inspección visual del gráfico y método estadístico (línea de regresión, mínimos cuadrados).

Efecto Matriz: Variación en las señales cromatográficas inducidas por las matrices de análisis. Influencia de uno o más compuestos coextraídos de la muestra en la medición de la concentración o masa del analito. Puede observarse como una respuesta de detector aumentada o disminuida, en comparación con la producida por soluciones de disolvente del analito.

Se evaluó el efecto matriz, para lo cual se prepararon las curvas de estándares en matriz y se las compararon con las curvas en solvente.

Límite de Detección (LD): La menor concentración del analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones establecidas de la prueba.

Límite de cuantificación (LOQ): Es la más baja cantidad de analito en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con cierta precisión y exactitud predefinida.

Precisión: La precisión de un método de ensayo se expresa cuantitativamente como “imprecisión” a través del cálculo de la desviación estándar de una serie de resultados independientes. Debido al hecho de que el porcentaje de recuperación se evaluó a diferentes niveles de concentración, la expresión relativa de la dispersión facilita la comparación de la precisión entre magnitudes diferentes. La precisión como repetibilidad (RSDr) se denomina como la comparación de mediciones independientes hechas sobre material idéntico y bajo las mismas condiciones (analista, aparatos e instrumentos) y después de intervalos de tiempo cortos. Así mismo, el grado de concordancia entre mediciones independientes con el mismo método, pero bajo condiciones distintas como analistas, equipos o después de intervalos de tiempo más prolongados se denomina precisión intermedia o reproducibilidad (RSDR). Esta última da una idea integral de las variaciones propias del ejercicio en el análisis de rutina. En una validación es conveniente evaluar la precisión tanto en condiciones de repetibilidad como de precisión intermedia. Sin embargo, en este trabajo dado que la finalidad era realizar una verificación de un método normalizado y, además, correspondía a la primera vez que se llevaba a cabo dicha metodología y en forma preliminar, se evaluó la precisión solo en condiciones de repetibilidad (RSDr).

Veracidad: Determina el grado de coincidencia existente entre el valor medio obtenido de una serie de resultados y un valor de referencia aceptado. La veracidad puede ser determinada por sesgo o recuperación. Para nuestro estudio se procederá a determinar la recuperación.

La recuperación (R) es la fracción de la sustancia agregada a la muestra (muestra fortificada) antes del análisis, al ser analizadas muestras fortificadas y sin fortificar. La recuperación permite ver el rendimiento de un método analítico en cuanto al proceso de extracción y la cantidad del analito existente en la muestra original. Por lo cual, la recuperación esta intrínsecamente relacionada a las características de la matriz de la muestra.

4. Metodología

4.1 Alcance:

Se llevó a cabo la verificación del método de la norma de la Unión Europea BS EN 15662:2008 aplicado para la detección de plaguicidas en alimentos, en nuestro caso nos focalizamos en la determinación de piretroides en miel de abeja.

4.2 Parámetros de calidad:

Tabla 4: Parámetros y criterios de verificación (SANTE 11312/2021, 2021).

Parámetro	Qué/Cómo	Criterio
<i>Linealidad</i>	Comprobación de linealidad desde cinco niveles.	Residuales $\leq \pm 20\%$
<i>Efecto matriz</i>	Diferencia de respuesta respecto al estándar. en extracto de matriz y estándar en solvente	(*1)
<i>LOQ</i>	El nivel de pico más bajo que cumple con los criterios de identificación y método de desempeño para la recuperación y precisión	\leq MRL
<i>Precisión (RSDr)</i>	Repetibilidad RSDr (*2)	$\leq 20\%$ (G3-G6)
<i>Veracidad: Recuperación</i>	Recuperación promedio para cada nivel de pico probado	70-120 %

(*1) Cuando la diferencia entre las curvas en matriz y solvente es superior al 20 %, es necesario trabajar con las curvas en matriz para eliminar los efectos de la misma abordado en la calibración (C22-C30).

(*2) Se decidió medir la repetibilidad solamente en las recuperaciones al nivel del LMR ya que consideramos que es el punto más crítico, a la hora de aceptar o rechazar una muestra.

Materiales de referencia utilizados:

Del documento N° SANTE/11312/2021 se tomaron los parámetros y criterios de verificación para este trabajo (Tabla 4).

Conjunto de muestra (submuestras de 1 muestra homogeneizada):

- Blanco de reactivos
- 1 Blanco de matriz (sin enriquecimiento)
- 5 muestras enriquecidas en el LOQ (límite máximo de cuantificación) objetivo
- 5 muestras enriquecidas con un LOQ objetivo de 2-10x

Secuencia de muestras instrumentales:

- Solvente
- Estándares de calibración
- Blanco de reactivo
- Blanco de matriz
- 5 muestras enriquecidas en el LOQ objetivo
- 5 muestras enriquecidas a 2-10 x LOQ objetivo
- Estándares de calibración

4.3 Lugar de trabajo, instrumentos y equipos

Los ensayos se llevaron a cabo en la Universidad Nacional del Comahue, en el laboratorio de Cromatografía de CITAAC/Conicet (Centro de Investigaciones en Toxicología Ambiental y Agrobiotecnología del Comahue). El mismo cuenta con los siguientes equipos:

_ Cromatógrafo de gases AGILENT 6890 N con: Detector de Captura de Electrones (ECD).

Método:

HORNO:

Temperatura inicial: 70 °C

Tiempo inicial: 1.00 min

Tiempo de corrida 50.00 min

Volumen de inyección: 1 µL

Rampas:

Número	Tasa (°C min⁻¹)	Temp. Final (°C)	Tiempo Final
1	20.00	160	0.00
2	4.00	270	17.00
3	0.00 (off)		

Temperatura inyector 250 °C.

Columna: Agilent 19091J-433, HP-5 5% Fenil Metil Siloxano.

Temperatura máxima: 325 °C.

Longitud nominal: 30.0 m

Diámetro nominal: 250.00 µm.

Espesor nominal de film: 0.25 µm.

Detector frontal (µECD)

Temperatura: 300 °C

Tipo de gas auxiliar: Nitrógeno.

_ Centrifuga 2-16P (sartorius) para tubos falcon 50 mL.

_ Centrifuga G234D (Gelec) para eppendorf.

4.4 Estándares y reactivos

Se emplearon los siguientes estándares de piretroides:

Bifentrin: Sigma-Aldrich, Lote #BCBXO667, 98% de pureza.

Cipermetrina: Sigma-Aldrich, Lote #BCBW1786, 98,4% de pureza.

Deltametrina: Sigma-Aldrich, Lote #BCBS31718v, 99,7% de pureza.

Cipermetrina: Sigma-Aldrich, Lote #BCBV7205, 98% de pureza.

Fenvalerato: Sigma-Aldrich, Lote #5ZBF174XV, 99,4% de pureza.

Para la realización del método de QueChERS se emplearon los siguientes reactivos:

roQTM QueChERS dSPE kit – 2 mL CT 150 mg MgSO₄, 25 mg PSA (phenomenex).

_Acetonitrilo grado H.P.L.C.

_Hexano Normal.

_Agua miliQ (0,055 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$).

4.5 Toma de muestras y selección de plaguicidas

- Se emplearon 6 mieles procedentes del Valle de Río Negro (Alto Valle y Valle Medio) y Neuquén (Figura 6). Algunas muestras fueron otorgadas por productores y otras adquiridas en centros comerciales. Se hizo un análisis inicial y se seleccionó aquella que presentó menor **cantidad de interferencia** y ausencia de plaguicidas bajo análisis para continuar con la metodología de verificación (Tabla 4).

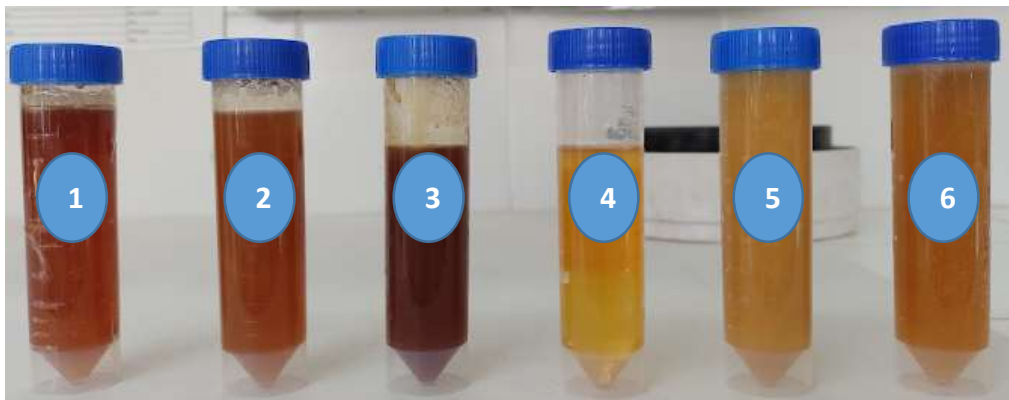


Figura 6: Muestras de mieles seleccionadas para el presente trabajo.

- El criterio de selección de los plaguicidas a analizar se definió en función de búsqueda bibliográfica, consultas con agricultores, apicultores e instituciones vinculadas con dichas actividades, y según la disponibilidad de estándares en el laboratorio de trabajo y equipos habilitados.

4.6 Método de QueChers. Extracción y clean up.

Se llevó a cabo la verificación del método de la norma de la Unión Europea BS EN 15662:2008.

- *Método de extracción de partida*

Se comenzó realizando extracción y clean up de las muestras por método de QuEChERS (Figura 7).

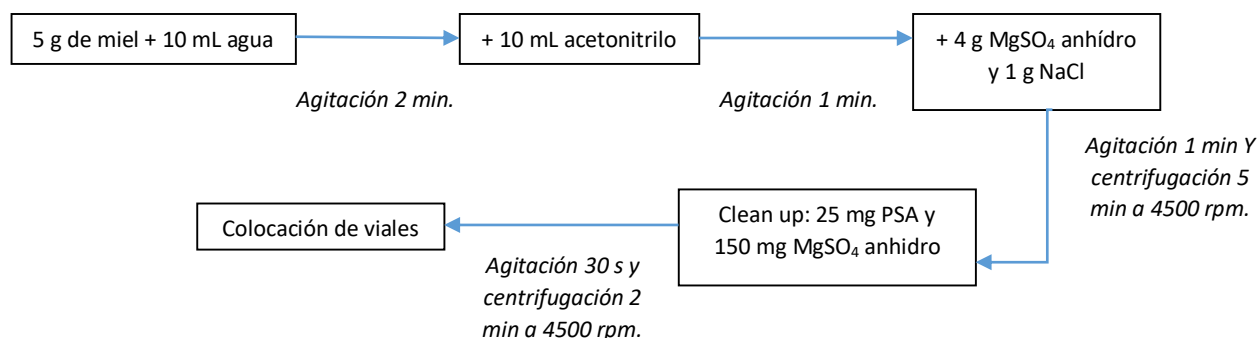


Figura 7: Diagrama de procedimiento realizado en la extracción y clean up de las muestras por método de QuEChERS.

En tubos falcon se colocaron 5 g de cada miel. Luego se adicionó a cada tubo 10 mL de agua miliQ y se llevó a un vortex hasta lograr disolución total de cada muestra (2 min aprox). Esto es porque la técnica de QUECHERS fue pensada originalmente para matrices vegetales de alto contenido acuoso > 80%.

A continuación, se incorporó a cada tubo 10 mL de acetonitrilo (ACN) se agitó 1 min, y luego se adicionó un sobre de sales (4 g MgSO₄ anhidro y 1 g NaCl) de kit QuEChERS, de manera inmediata y en simultáneo se agitaron los tubos durante 1 min. Seguidamente se centrifugaron durante 5 min a 4500 rpm (rotor 12151).

Para llevar a cabo el Clean-up se procedió del siguiente modo: una vez centrifugados, se extrajo 1 mL de cada sobrenadante y se colocaron en tubos eppendorf con sales (25 mg PSA y 150 mg MgSO₄ anhidro). Se agitaron 30 segundos y se centrifugaron a 4500 rpm durante 2 min. Seguidamente se extrajeron los sobrenadantes con pipeta de 200 µL y se colocaron en viales con septum. Se guardaron en heladera.

Finalmente, a modo de aclaración, es importante indicar que se empleó un kit con NaCl en lugar de buffer, porque era el kit con el que contábamos en ese momento en el laboratorio. Además, es necesario usar buffer en aquellos casos en los cuales los compuestos puedan verse afectadas sus estructuras por cambios de pH, hecho que no ocurre con los piretroides analizados.

5. Resultados y discusión

5.1 Verificación del Método Analítico

5.2 Linealidad – Efecto Matriz

Análisis preliminar cualitativo:

Se realizó una inyección de los estándares preparados en solvente y matriz para poder verificar previo a todo el análisis si se podían identificar todos los picos de los piretroides. La Figura 8 muestra algunos cromatogramas tanto en matriz como en solventes obtenidos, a modo de ejemplo:

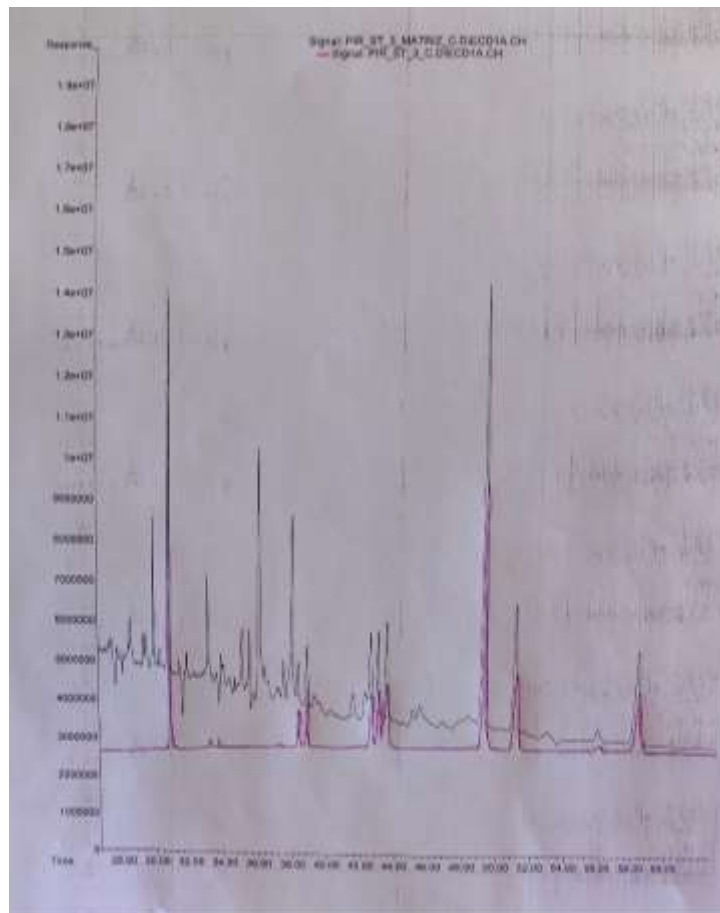


Figura 8: Cromatogramas: Muestra estándar 3 en matriz (negro) y muestra estándar 3 en solvente (rosado).

Los cromatogramas mostraron una buena separación en los picos lo cual permitió la identificación segura de los compuestos encontrados.

A continuación, se presentan los tiempos de retención de cada compuesto (Tabla 5):

Tabla 5: Tiempos de Retención (CG- μ ECD).

Piretroide	Tiempo de retención (min)
Bifentrin	30.8
Permetrina	38.3 (Cis)- 38.8 (Trans)
Cipermetrina	43,3 - 43,7 - 44,1 - 44,3
Fenvalerato	49.1 y 50.9
Deltametrina	57.9

_ Análisis cuantitativo: Curva de calibración

Para realizar las curvas de calibración se realizaron diluciones sucesivas del patrón a 0.5000, 0.2500, 0.0500, 0.0250 y 0.0125 ppm. Las mismas se llevaron a cabo tanto en solvente como en matriz. Dado que la diferencia de respuesta respecto al estándar en extracto de matriz y estándar en solvente fue superior al 20% (Figura 9), fue que se optó por el empleo de las curvas en matriz para realizar las cuantificaciones (SANTE 11312/2021).

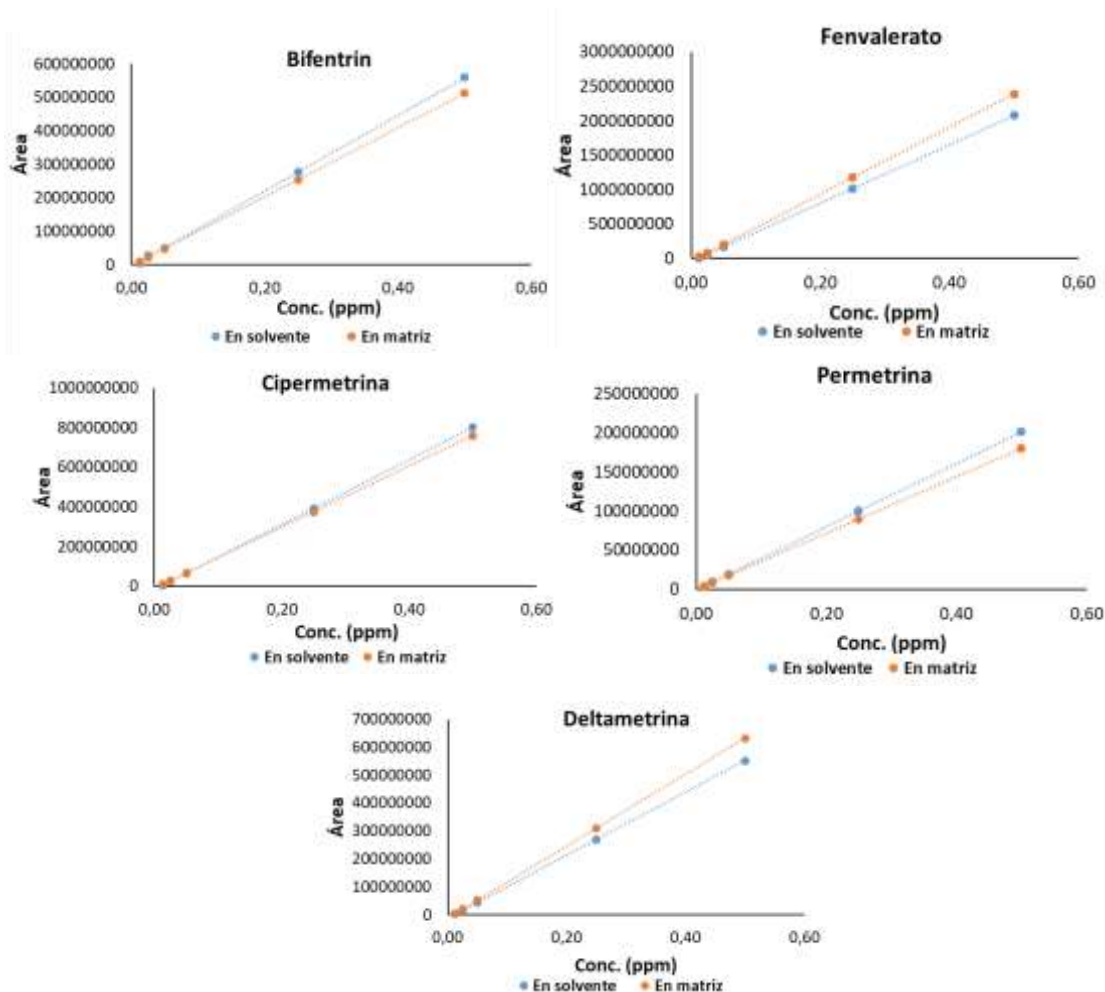


Figura 9: Comparación de curvas de calibración en solvente y matriz para los piretroides analizados. Efecto matriz.

A continuación, en la Figura 10 se presentan los criterios de aceptación considerados para el análisis de linealidad en la verificación del método.



Figura 10: A) Criterios de aceptación para Cumplimiento de supuesto estadísticos para la regresión lineal. B) Criterios de aceptación de las curvas de calibración.

Para las curvas de calibración obtenidas (tanto en solvente como en matriz) se cumplieron los supuestos de linealidad. Como se mencionó previamente, se decidió emplear las curvas en matriz para realizar los cálculos de cuantificación, y a continuación, se presentan tabulados los resultados obtenidos (Tabla 6).

A modo de aclaración, se presentan en detalle las salidas de Infostat para los cálculos realizados para el Bifentrin en el Anexo, y del resto se presentan los resultados en forma resumida por cuestión de espacio.

Tabla 6: Curvas de calibración obtenidas de los piretroides analizados.

Bifentrin	
Ecuación Lineal	$y = -3087912,49 + 1030771927,71x$
Criterios de Aceptación	
Coefficiente de Correlación (R^2)	1.00
$F_{\text{modelo}} > F_{\text{tabla}}$	$339750,86 > F_{\text{tabla}}$
Valores de P de la ordenada (intercepción) $> 0,05$	$< 0,0001$
Valores de P de la pendiente (CONC) $\llll 0,05$	$< 0,0001$
%CV Residuales	$< \pm 10\%$
Permetrina	
Ecuación Lineal	$y = -372097,94 + 361364124,88x$
Criterios de Aceptación	
Coefficiente de Correlación (R^2)	1.00
$F_{\text{modelo}} > F_{\text{tabla}}$	$658647,54 > F_{\text{tabla}}$
Valores de P de la ordenada (intercepción) $> 0,05$	0,0018
Valores de P de la pendiente (CONC) $\llll 0,05$	$< 0,00001$
%CV Residuales	$< \pm 10\%$
Cipermetrina	
Ecuación Lineal	$y = -9032029,86 + 1536022647,81x$
Criterios de Aceptación	
Coefficiente de Correlación (R^2)	1.00
$F_{\text{modelo}} > F_{\text{tabla}}$	$1050139,57 > F_{\text{tabla}}$
Valores de P de la ordenada (intercepción) $> 0,05$	$< 0,0001$

Valores de P de la pendiente (CONC)<<<<0,05	<0,0001
%CV Residuales	<±10%
Fenvalerato	
Ecuación Lineal	$y = -35480028,57 + 4854334907,07x$
Criterios de Aceptación	
Coefficiente de Correlación (R ²)	1.00
F _{modelo} >F _{tabla}	220980,62>F _{tabla}
Valores de P de la ordenada (intercepción) >0,05	<0,0001
Valores de P de la pendiente (CONC)<<<<0,05	<0,0001
%CV Residuales	>±10%(*)
Deltametrina	
Ecuación Lineal	$y = -11004007,99 + 1286351779,78x$
Criterios de Aceptación	
Coefficiente de Correlación (R ²)	1.00
F _{modelo} >F _{tabla}	2444313,28>F _{tabla}
Valores de P de la ordenada (intercepción) >0,05	<0.0001
Valores de P de la pendiente (CONC)<<<<0,05	<0.0001
%CV Residuales	<±10%
(*) En estos casos se observaron algunos resultados de %CV>10%.	

Como puede observarse, en ninguna de las curvas se obtuvo $p > 0.05$ para la ordenada al origen. En nuestro caso, dada la matriz empleada consideramos que no sería realmente posible en ausencia de analito no tener ningún tipo de señal. Por lo que, aceptamos estos resultados, aunque no cumplieran estrictamente el criterio planteado.

Por otro lado, respecto a los resultados que presentaron $\%CV > 10\%$ ($\%CV$: coeficiente de variación porcentual), es importante aclarar que sólo fueron pocas réplicas puntuales, correspondientes a las concentraciones más bajas de una de las curvas de calibración. Cabe aclarar que la concentración más baja de la curva de calibración es de 12.5ppb, por cual se podría sugerir para ese nivel ampliar el criterio de aceptación a un valor de $\%CV < 20\%$. Por lo cual, consideramos no desestimar dichos resultados, ya que el resto de los $\%CV$ obtenidos se encuentran muy por debajo del valor de aceptación (Tabla 7).

Tabla 7: Resultados de %CV promedios para las distintas curvas de calibración en matriz.

Conc. (ppm)	%CV residuos promedio				
	Bifentrin	Permetrina	Cipermetrina	Fenvalerato	Deltametrina
0,0125	2,78	5,51	6,97	12,86	9,05
0,0250	2,23	4,17	4,39	8,56	3,01
0,0500	1,47	1,63	1,61	4,53	1,14
0,2500	0,36	0,41	0,31	0,67	0,21
0,5000	0,14	0,12	0,16	0,32	0,10

Teniendo en cuenta las aclaraciones recientemente expuestas y que el resto de los criterios de aceptación se cumplieron, asumimos que el análisis de linealidad fue aceptable. Además, es importante señalar que se verificó el efecto matriz.

5.3 Límites

En cuanto a los criterios asumidos para definir el rango de trabajo, se tomó como referencia los LMR de los piretroides analizados (Tabla 8). Dado que para la mayoría se informa un valor de 0.050 µg g⁻¹ es que consideramos preparar las curvas de calibración en un rango de concentraciones que incluyan este valor, y tomar dos valores más por encima y por debajo del mismo.

Tabla 8: LMR de los piretroides analizados (Codex).

Piretroide	LMR (µg g⁻¹)
Bifentrin	0.05
Permetrina	*
Cipermetrina	0.05
Fenvalerato	0.05
Deltametrina	0.05

*Para los compuestos que no se ha fijado un valor de LMR específico, según Reglamento (CE) 396/2005 se debe asumir un valor por defecto de 0.01 mg Kg⁻¹.

A continuación, se desarrollan los cálculos aplicados para determinar el Límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LOQ) a partir del blanco en matriz por quintuplicado, considerando el ruido verificado en el rango de análisis.

5.3.1 Límite de detección LD: Método de la desviación estándar de blancos

$$LD = 3 * \frac{Sd}{P}$$

Donde,

Sd= desvío estándar.

P= pendiente de la curva.

$$y = -372097,94 + 361364124,88x$$

$$LD = 0,00028097 \mu\text{g piretroide/g miel}$$

5.3.2 Límite de cuantificación LOQ: Método de la desviación estándar de blancos

$$LC = 10 * \frac{Sd}{P}$$

Donde,

Sd= desvío estándar.

P= pendiente de la curva.

$$y = -372097,94 + 361364124,88x$$

$$LC = 0,00093657 \mu\text{g piretroide/g miel}$$

Como se observa los valores obtenidos, tanto de LD y LOQ, están por debajo del LMR, por lo que se pueden considerar aceptables.

5.4 Precisión: Repetibilidad (RSDr).

Como se indicó anteriormente, se decidió medir la Repetibilidad solamente en las recuperaciones al nivel del LMR, ya que consideramos que es el punto más crítico, a la hora de aceptar o rechazar una muestra.

Estas pruebas se llevaron a cabo por dos analistas, de manera de poder ampliar el análisis de Repetibilidad: por analista y para el laboratorio.

Por analista:

*) Comenzamos buscando outliers. Para este análisis se procede a aplicar el Test de Grubbs.

Bifentrina	G _{cal}	Permetrina	G _{cal}	Cipermetrina	G _{cal}	Fenvalerato	G _{cal}	Deltametrina	G _{cal}
0,0463	0,25	0,0422	0,81	0,0370	0,54	0,0480	0,14	0,0543	0,78
0,0464		0,0429		0,0373		0,0481		0,0562	
0,0464		0,0435		0,0375		0,0482		0,0562	
0,0467		0,0438		0,0376		0,0482		0,0568	
0,0468	0,41	0,0440	0,58	0,0391	1,06	0,0483	0,10	0,0595	1,00
0,0475	0,75	0,0442	0,73	0,0405	0,46	0,0483	0,99	0,0759	0,77
0,0475		0,0443		0,0406		0,0487		0,0760	
0,0477		0,0447		0,0407		0,0488		0,0774	
0,0479		0,0459		0,0410		0,0511		0,0774	
0,0486	1,55	0,0469	1,22	0,0416	0,84	0,0511	1,18	0,0800	1,41

G _{crítico} =	1,715	No hay outliers					$r_{(pool)} = t_{(n-1, 1-\alpha)} * \sqrt{2} * sd_{(r)} =$
n=5							
		Bifentrina	Permetrina	Cipermetrina	Fenvalerato	Deltametrina	
n-1=(5-1)=4	t _(n-1, 1-α)	2,132					
una colas	t _{cal}	0,002	0,004	0,004	0,004	0,009	Analista 1
		0,001	0,004	0,003	0,004	0,006	Analista 2

Verificamos que no hay datos outliers.

Luego, realizando los cálculos de %CV para cada piretroide, procedemos a realizar la comparación con los valores límites de aceptabilidad (Tabla 9 y Tabla 10):

Tabla 9: %CV obtenidos para cada piretroide analizado.

Piretroide	Bifentrin		Permetrina		Cipermetrina		Fenvalerato		Deltametrina	
Analista	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Media	0,048	0,047	0,045	0,044	0,041	0,038	0,049	0,049	0,078	0,057
Sp	0,001	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,003	0,002
%CV	1,442	1,027	2,952	3,241	3,263	2,214	2,572	2,627	3,744	3,318
Mediana	0,048	0,046	0,044	0,044	0,041	0,038	0,048	0,048	0,077	0,056

Tabla 10: LÍMITES DE ACEPTABILIDAD DE HORWITZ

LÍMITES DE ACEPTABILIDAD DE HORWITZ

Repetibilidad $CV(r) \% < 0.67 [2^{(1-0.5 \log C)}]$ Reproducibilidad $CV(R) \% < [2^{(1-0.5 \log C)}]$

Analito (%)	Relación	Unidad	Horwitz RSD _R %	Calcd RSD _r %
100	1		2	1.3
10	10 ⁻¹		2.8	1.9
1	10 ⁻²		4	2.7
0.1	10 ⁻³		5.6	3.7
0.01	10 ⁻⁴		8	5.3
0.001	10 ⁻⁵		11	7.3
0.0001	10 ⁻⁶	1 ppm; 1 ug/g	16	11
0.00001	10 ⁻⁷	100 ppb; 0.1 ug/g	23	15
0.000001	10 ⁻⁸	10 ppb; 0.01 ug/g	32	21
0.0000001	10 ⁻⁹	1 ppb; 1 ug/kg	35	30

Dado que la unidad de concentración empleada es el “µg piretroide/g miel”, ingresando a la tabla de límites de aceptabilidad de Horwitz (Tabla 10), puede observarse que, para todos los plaguicidas, por cada analista, presentan valores de %CVr < 11% (Horwitz en condiciones de repetibilidad), con los cual, estarían dentro de límites aceptables. (Incluso es un valor menor al 20% establecido en el documento Sante 2021).

Para el laboratorio

*) Comenzamos buscando outliers. Para este análisis se procede a aplicar el Test de Grubbs.

Bifentrin	G _{cal}	Permetrina	G _{cal}	Cipermetrina	G _{cal}	Fenvalerato	G _{cal}	Deltametrina	G _{cal}
0,0463	1,08	0,0422	1,47	0,0370	1,29	0,0480	0,75	0,0543	1,14
0,0464		0,0429		0,0373		0,0481		0,0562	
0,0464		0,0435		0,0375		0,0482		0,0562	
0,0467		0,0438		0,0376		0,0482		0,0568	
0,0468		0,0440		0,0391		0,0483		0,0595	
0,0475		0,0442		0,0405		0,0483		0,0759	
0,0475		0,0443		0,0406		0,0487		0,0760	
0,0477		0,0447		0,0407		0,0488		0,0774	
0,0479		0,0459		0,0410		0,0511		0,0774	
0,0486	1,83	0,0469	1,94	0,0416	1,28	0,0511	1,86	0,0800	1,18
Promedio 0,0472		Promedio 0,0443		Promedio 0,0393		Promedio 0,0489		Promedio 0,0670	
Desvest 0,0008		Desvest 0,0014		Desvest 0,0018		Desvest 0,0012		Desvest 0,0111	
Desvest ponderado 0,0241		Desvest ponderado 0,0370		Desvest ponderado 0,0330		Desvest ponderado 0,0356		Desvest ponderado 0,0490	

G _{crítico} =	2,29	No hay outliers				
n=10		$r_{(pool)} = t_{(n-1, 1-\alpha)} * \sqrt{2} * sd_{(r)} =$				
		Bifentrin	Permetrina	Cipermetrina	Fenvalerato	Deltametrina
n-1=(10-1)+(10-1)=18	t _(n-1, 1-α)	1,734				
Dos colas	t _{cal}	0,059	0,091	0,081	0,087	0,120

Verificamos que no hay datos outliers.

Luego, realizando los cálculos de %CV para cada piretroide, procedemos a realizar comparación con los valores límites de aceptabilidad (Tabla 10).

	Bifentrin	Permetrina	Cipermetrina	Fenvalerato	Deltametrina
Media	0,047	0,044	0,039	0,049	0,067
Sp	0,001	0,001	0,002	0,001	0,011
%CV	1,606	3,131	4,555	2,451	16,513
Mediana	0,047	0,044	0,040	0,048	0,068

Dado que la unidad de concentración empleada es el “µg piretroide/g miel”, ingresando a la tabla de límites de aceptabilidad de Horwitz (Tabla 10), puede observarse que para todos los plaguicidas los %CVr < 11% (Horwitz en condiciones de repetibilidad), con los cual, estarían dentro de límites aceptables. (Incluso es un valor menor al 20% establecido en el documento Sante 2021).

5.5 Veracidad: Recuperación

Para este análisis se realizaron mediciones de 5 réplicas por cada nivel. Se consideró al elegir estos niveles, que estuvieran dentro del rango de las curvas de calibración del método y el LMR establecido. De manera que los niveles seleccionados permitan entregar la mejor información posible respecto a la capacidad de recuperación del método.

Las recuperaciones se calcularon de la siguiente manera:

$$R = \left(\frac{C_e - C_0}{C_a} \right)$$

Siendo:

R= Recuperación

C_e = es la concentración de analito de la muestra enriquecida.

C₀ = es la concentración de analito medida en la muestra sin adicionar.

C_a = es la concentración de analito adicionado a la muestra enriquecida.

Se puede igualmente expresar en porcentaje de recuperación (%R): se calcula de la siguiente manera:

$$\%R = [R] * 100$$

A continuación, se presentan los resultados obtenidos:

Fortificaciones ($\mu\text{g g}^{-1}$)												
%R	0,050			0,100			0,200			0,400		
	Promedio (%)	Desvest	%CV	Promedio (%)	Desvest	%CV	Promedio(%)	Desvest	%CV	Promedio (%)	Desvest	%CV
<i>Bifentrin</i>	94,957	0,990	1,043	90,793	1,169	1,287	86,701	1,459	1,683	88,395	1,596	1,806
<i>Permetrina</i>	98,854	3,606	3,648	99,775	3,502	3,510	95,197	2,357	2,476	93,853	0,672	0,716
<i>Cipermetrina</i>	103,511	2,502	2,417	93,990	1,972	2,098	88,791	2,225	2,506	92,038	3,147	3,419
<i>Fenvalerato</i>	88,769	3,051	3,436	83,247	3,402	4,087	81,439	3,033	3,724	88,937	2,784	3,130
<i>Deltametrina</i>	93,196	5,473	5,873	89,771	4,800	5,347	89,119	4,257	4,777	98,689	3,984	4,037

Como puede observarse todas las recuperaciones se hallan dentro del rango de aceptación de 70-120%.

6. Conclusiones

Una vez analizados los distintos parámetros para la verificación del método analítico y corroborar que los criterios de aceptación se cumplieron:

- ✓ Se confirmó la linealidad en las curvas de calibración en un rango 0.0125-0.5000 mg L⁻¹.
- ✓ Se verificó que tanto los LD y LOQ < que LMR.
- ✓ Los resultados del análisis de precisión en condiciones de repetibilidad fueron aceptables (%Cv < %CV_{Horwitz} en condiciones de repetibilidad).
- ✓ Las recuperaciones obtenidas se encontraron dentro del rango de 70-120%.

En base a los resultados obtenidos, podemos afirmar que el método normalizado de la Unión Europea BS EN 15662:2008 fue verificado y podría ser aplicable para el análisis de Bifentrin, Permetrina, Cipermetrina, Fenvalerato y Deltametrina en mieles de abejas en el rango de concentraciones 0.0125-0.5000 µg mL⁻¹.

Es importante además señalar, que se observó efecto matriz, lo cual era esperable debido a la complejidad de la matriz analizada.

7. Recomendaciones

Entre las posibles sugerencias de mejora que hemos analizado podemos señalar:

- Si bien la robustez en una verificación no es un parámetro estrictamente a analizar, luego de realizar nuestras pruebas pensamos que sería interesante probar el método sin clean-up, ya que el PSA es un insumo de alto costo. O bien, pensar otras alternativas de clean-up. Esto último sería para seguir investigando.
- Por otro lado, en la etapa de extracción se podría aplicar una etapa de enfriamiento (en freezer) para optimizar la separación de ceras y verificar si realmente sería necesario.
- Se podría pensar en ampliar la aplicación del método para el análisis de plaguicidas clorados.

8. Bibliografía

- Albero, Sánchez-Brunete, & Tadeo. (2004). Analysis of Pesticides in Honey by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5828–5835.
- Anastassiades, M., & Lehotay, S. J. (2003). Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC International*.
- Araceli, S. M., Soberón, J. R., Sampietro, D. A., & Vattuone, M. A. (2010). CROMATOGRFÍA: CONCEPTOS Y APLICACIONES. *Revista Arakuku*, 1-6.
- Argentina.gob.ar. (20 de Mayo de 2021). *Arrancó la Campaña federal "Más miel todo el año"*. Obtenido de <https://www.argentina.gob.ar/noticias/arranco-la-campana-federal-mas-miel-todo-el-ano>
- ATSDR, e. E. (2023). *Resúmenes de Salud Pública - Piretrinas y piretroides (Pyrethrins and Pyrethroids)*. Obtenido de https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs155.html#bookmark2
- Balbuena, M. S. (2015). Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. *The Company of Biologists Ltd*, 2799-2805.
- BBC-News. (3 de Septiembre de 2019). *Por qué han muerto 500 millones de abejas en Brasil en* . Obtenido de <https://www.bbc.com/mundo/noticias-49421206#:~:text=La%20principal%20causa%20de%20muerte,los%20neonicotinoides>
- Belinato, J. R. (2021). Overcoming matrix effects in the analysis of pyrethroids in honey by a fully automated direct immersion solid-phase microextraction method using a matrix-compatible fiber. *Food Chemistry*.
- Benuszak, J. (2017). The exposure of honey bees (*Apis mellifera*; Hymenoptera: Apidae) to pesticides: Room for improvement in research. *Science of the Total Environment*.
- Bernal, J. L., Jimenez, J. J., del Nozal, M. ..., Higes, M., & Llorente, J. (2000). Gas chromatographic determination of acrinathrine and 3-phenoxybenzaldehyde residues in honey. *Journal of Chromatography A*, 239-243.
- Biddinger, D. J. (2013). Comparative Toxicities and Synergism of Apple Orchard Pesticides to *Apis mellifera* (L.) and *Osmia cornifrons* (Radoszkowski). *PLOTS one*.
- Blasco, C., Font, G., & Picó, Y. (2008). Solid-phase microextraction-liquid chromatography-mass spectrometry applied to the analysis of insecticides in honey. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 59-69.
- Brutscher, L. M. (2016). The Buzz about Honey Bee Viruses. *PLOS Pathogens*.
- Calatayud-Vernich. (2018). Pesticide residues in honey bees, pollen and beeswax: Assessing beehive exposure. *Environmental Pollution*, 106-114.
- CASAFE. (2023). *Guía online de productos fitosanitarios*. Obtenido de <https://www.casafe.org/publicaciones/guia-de-productos-fitosanitarios/>

- Chen, W., Poon, K.-F., & Lam, M. H. (1998). The Application of Solid Phase Microextraction in the Analysis of Organophosphorus Pesticides in a Food Plant. *Environmental Science and Technology*, 3816–3820.
- Chen, Y. (2008). Review: Sample preparation. *Journal of chromatography A*, 191–219.
- Christodoulou, D. L. (2015). Pesticide residues analysis in honey using ethyl acetate extraction method: validation and pilot survey in real samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 894-910.
- Ciatej. (14 de Agosto de 2017). *El impacto de los plaguicidas en el sector apícola*. Obtenido de <https://ciatej.mx/el-ciatej/comunicacion/Noticias/El-impacto-de-los-plaguicidas-en-el-sector-apicola/34>
- Cichón, L. (2017). *PRODUCTOS FITOSANITARIOS PARA CULTIVOS HORTÍCOLAS DE LA NORPATAGONIA*. Obtenido de Ediciones INTA: file:///C:/Users/usuario/Desktop/Miel/Trabajo%20Final%20Definitivo/Bibliograf%C3%ADa/inta_productos_fitosanitarios_para_cultivos_hortícolas_de_la_norpatagonia_0.pdf
- Codex, A. (2022). *International Food Standards. Pesticide Index*. Obtenido de Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization.: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticides/en/>
- Codex, A. (2022). *Normas Internacionales de los Alimentos*. Obtenido de <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/maximum-residue-limits/es/>
- Copati, E. J. (2023). *Informe de precampaña. Panorama Agrícola Semanal (PAS). 2018-2019*. Obtenido de <https://www.bolsadecereales.com/datasets>
- Cresswell, J. E., & Thompson, H. M. (2012). Comment on “A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees”. *SCIENCE*, 1453.
- Dipakshi Sharma. (2010). Analytical methods for estimation of organophosphorus pesticide residues in fruits and vegetables: A review. *Talanta*, 1077–1089.
- eCFR. (2022). *Code of Federal Regulations*. Obtenido de TOLERANCES AND EXEMPTIONS FOR PESTICIDE CHEMICAL RESIDUES IN FOOD. eCFR :: 40 CFR Part 180 -- Tolerances : <https://www.ecfr.gov/current/title-40/chapter-I/subchapter-E/part-180?toc=1>
- European-Commission. (2022). https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en.
- FAOSTAT. (2023). *Organización de las Naciones Unidas - Datos sobre alimentación y agricultura para la alimentación y la agricultura*. Obtenido de <https://www.fao.org/faostat/es/?#home>
- Fernández, M., Picó, Y., & Mañes, J. (2002). Rapid screening of organophosphorus pesticides in honey and bees by liquid chromatography—Mass spectrometry. *Springer Link*, 577–583.
- Gill, R. J. (2012). Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature*, 105–108.

- Gill, R. J. (2012). Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature*, 105–108.
- Gill, R. J. (2014). Chronic impairment of bumblebee natural foraging behaviour induced by sublethal pesticide exposure. *Functional Ecology*, 1459–1471.
- Gill, R. J. (2014). Chronic impairment of bumblebee natural foraging behaviour induced by sublethal pesticide exposure. *Functional Ecology*, 1459–1471.
- Grecia Stefanía de Groot, M. A. (2021). Large-scale monoculture reduces honey yield: The case of soybean expansion in Argentina. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 1-8.
- Hasibur Rehman, A. T. (2014). Systematic review on pyrethroid toxicity with special reference to deltamethrin. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 60-70.
- Heudorf, U. (2001). Metabolites of Pyrethroid Insecticides in Urine Specimens: Current Exposure in an Urban Population in Germany. *Research Articles*, 213-217.
- INDEC. (Abril de 2021). *Censo Nacional Agropecuario 2018. Resultados definitivos*. Obtenido de file:///C:/Users/usuario/Desktop/Miel/Trabajo%20Final%20Definitivo/Bibliograf%C3%ADa/cna2018_resultados_definitivos.pdf
- Iqbal Sayeed, S. P.-H. (2003). Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 295-301.
- Johnson, R. M. (2013). Acaricide, Fungicide and Drug Interactions in Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLOS ONE*, e54092.
- Juan, A., Picó, Y., & Font, G. (2003). Revisión de los métodos de determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en alimentos. *Revista de Toxicología*, 166-175.
- Klee, M. S. (2012). Chapter 12 - Detectors. In C. F. B. T.-G. C. Poole (Ed.). En *Gas Chromatography (1st ed)* (págs. 307–347). Amsterdam: Elsevier.
- LAPRW. (18-19 de Mayo de 2021). *Book of Abstracts*. Obtenido de <https://www.laprw2021.com/>
- López, F., Martínez, G., & Segovia, F. (2015). Procedimiento de extracción en fase sólida dispersiva QuEChERS para el análisis de plaguicidas. *Procedimiento (Universitat Politècnica de València)*.
- Lozano, A. (2018). Identification and measurement of veterinary drug residues in beehive products. *Food Chemistry*.
- Lu, C. (2014). Sub-lethal exposure to neonicotinoids impaired honey bees winterization before proceeding to colony collapse disorder. *Bulletin of Insectology*, 125-130.
- M.W. Kujawski & J.Namieśnik. (2008). Challenges in preparing honey samples for chromatographic determination of contaminants and trace residues. *Trends in Analytical Chemistry*.
- Mondino, M. (2020). *INTA_ Daños del herbicida 2,4 D en el cultivo de algodón*. Obtenido de https://inta.gob.ar/sites/default/files/dano_del_herbicida_24-d.pdf.

- Mueller-Beilschmidt, D. (1990). Toxicology and Environmental Fate of Synthetic Pyrethroids. *Journal of Pesticide Reform*, 32-37.
- Murcia-Morales, M. (2020). APIStrip, a new tool for environmental contaminant sampling through honeybee colonies. *Science of the Total Environment*.
- Naeeni, M. H., Yamini, Y., & Rezaee, M. (2011). Combination of supercritical fluid extraction with dispersive liquid–liquid microextraction for extraction of organophosphorus pesticides from soil and marine sediment samples. *Journal of Supercritical Fluids*, 219-226.
- Nguyen, T. D., Yu, J. E., Lee, D. M., & Lee, G.-H. (2008). A multiresidue method for the determination of 107 pesticides in cabbage and radish using QuEChERS sample preparation method and gas chromatography mass spectrometry. *Food Chemistry*, 207–213.
- O’Neal, S. T. (2018). Interactions between pesticides and pathogen susceptibility in honey bees. *Current Opinion in Insect Science*.
- Ollerton, J. (2017). Pollinator Diversity: Distribution, Ecological Function, and Conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 353-376.
- Palmer, M. J. (2013). Cholinergic pesticides cause mushroom body neuronal inactivation in honeybees. *Nature Communications*, 1-8.
- PIMPÃO, C. T. (2012). TOXICOLOGICAL EFFECTS OF PYRETHROIDS (CYPERMETHRIN AND DELTAMETHRIN) IN FISH - REVIEW. *REVISTA CIENTÍFICA ELETRÔNICA DE MEDICINA VETERINÁRIA*.
- Puraire. (2022). *Intoxicación con piretrinas y piretroides*. Obtenido de <https://www.casadeinsectidas.com.ar/g/74/intoxicacion-con-piretrinas-y-piretroides>
- ResoluciónNº559/2011. (s.f.). Apruébense los Límites de Residuos en alimentos de origen animal. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.
- Retana, A. R., C, E. E., & Aguilera, C. M. (9 de Enero de 2008). *Determinación de insecticidas y estudio nutricional de las mieles de las abejas nativas sin aguijón, Melipona Beecheii y Tetragonisca angustula (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae)*. Obtenido de <https://digi.usac.edu.gt/bvirtual/informes/prunian/INF-2007-018.pdf>
- Rial-Otero, R., Gaspar, E., Moura, I., & Capelo, J. (2007). Review/ Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: An overview. *Talanta*, 503–514.
- RíoNegro. (17 de Septiembre de 2021). *Obtenido de Preocupa la mortandad de abejas en el Alto Valle de Río Negro*. Obtenido de <https://www.rionegro.com.ar/preocupa-la-mortandad-de-abejas-en-el-alto-valle-1964536/>
- RíoNegro. (16 de Enero de 2022). *La apicultura avanza en el Valle y esperan una buena cosecha*. Obtenido de <https://www.rionegro.com.ar/region/la-apicultura-avanza-en-el-valle-y-esperan-una-buena-cosecha-2108508/>
- Rissato, S. R., Galhiane, M. S., Knoll, F. R., & Apon, B. M. (2004). Supercritical fluid extraction for pesticide multiresidue analysis in honey: determination by gas chromatography with

- electron-capture and mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 153–159.
- Rodríguez Lopez, D. (2013). Evaluation of pesticide residues in honey from different geographic regions of Colombia. *Food Control*.
- Rodríguez, A., Martínez, Y., & Henry., P. (2017). Desarrollo y validación de un método para cuantificación de acetaminofén en supositorios mediante HPLC-DAD utilizando una variación del método QuEChERS. *Portal de la Ciencia*.
- SAGPyA. (2023). *Apicultura - Políticas públicas para fortalecer el desarrollo de la cadena apícola*. Obtenido de <https://magyp.gob.ar/apicultura/>
- Salizzi, E. (2014). Reestructuración económica y transformaciones en el agro pampeano: la expansión del cultivo de la soja y sus efectos sobre la apicultura bonaerense en los inicios del siglo XXI. *ESTUDIOS SOCIOTERRITORIALES. Revista de Geografía*, 13-46.
- Sánchez-Bayo. (2016). Are bee diseases linked to pesticides? — A brief review. *Environment International*, 7-11.
- SANTE 11312/2021. (2021). ANALYTICAL QUALITY CONTROL AND METHOD VALIDATION PROCEDURES FOR PESTICIDE RESIDUES ANALYSIS IN FOOD AND FEED.
- Santos, M. A. (2007). PIRETRÓIDES – UMA VISÃO GERAL. *Alim. Nutr., Araraquara*, 339-349.
- SENASA. (2022). *Miel argentina de alta calidad endulza al mundo*. Obtenido de <https://www.senasa.gob.ar/senasa-comunica/infografias/miel-argentina-de-alta-calidad-endulza-al-mundo#:~:text=La%20miel%20producida%20en%20nuestro,del%20producto%20en%20el%20mund>
- Simon-Delso, N. (2014). Honeybee Colony Disorder in Crop Areas: The Role of Pesticides and Viruses. *PLOS ONE*.
- Simplicio, A. L., & Boas, L. V. (1999). Validation of a solid-phase microextraction method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and fruit juice. *Journal of Chromatography A*, 35-42.
- Soderlund, D. M. (2002). Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, 3-59.
- Tosi, S. (2016). Effects of a neonicotinoid pesticide on thermoregulation of African honey bees (*Apis mellifera scutellata*). *Journal of Insect Physiology*, 56-63.
- Traynor. (2016). In-hive Pesticide Exposome: Assessing risks to migratory honey bees from in-hive pesticide contamination in the Eastern United States. *Nature*.
- Walorczyk, S., & Gnusowski, B. (2009). Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in honeybees using acetonitrile-based extraction and gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.*, 6522-6531.
- Wilmart, O. (2016). Residues in beeswax: a health risk for the consumer of honey and beeswax? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

- Wu, J. Y. (2011). Sub-Lethal Effects of Pesticide Residues in Brood Comb on Worker Honey Bee (*Apis mellifera*) Development and Longevity. *PLoS ONE*, e-14720.
- Zhu, Y. C. (2017). Synergistic toxicity and physiological impact of imidacloprid alone and binary mixtures with seven representative pesticides on honey bee (*Apis mellifera*). *PLOS one*, 1-16.

Anexo

- **Linealidad:**

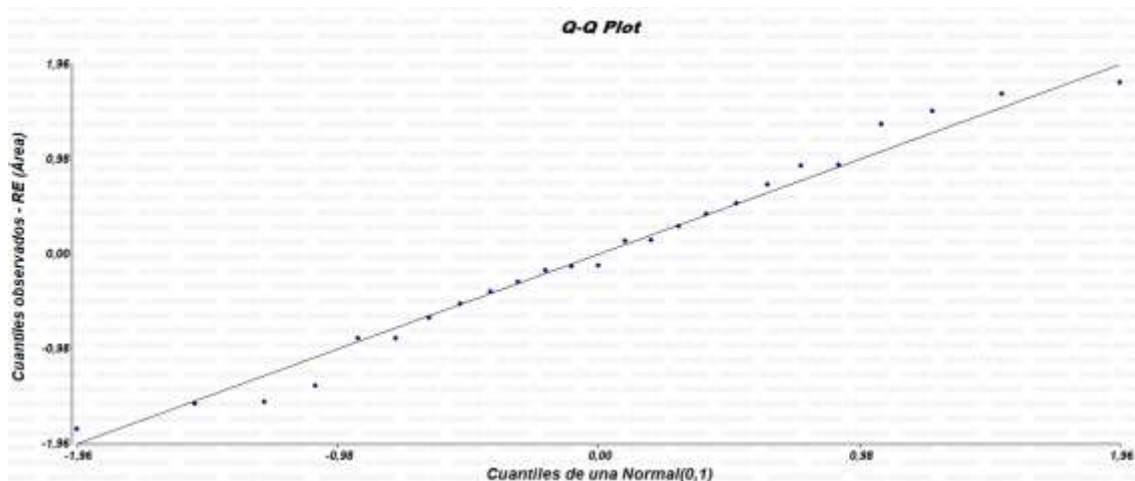
Salidas de Infostat de resultados del Bifentrin:

*) Verificación de supuestos: Análisis de residuos

Verificación de supuesto de independencia de error: Cada dato leído corresponde a muestras diferentes, por lo que se puede afirmar que son independientes.

Verificación de supuesto de normalidad:

Prueba gráfica: QQPlot Residuales ordenados de menor a mayor. Si la distribución es normal, deberían estar muy próximos a la recta que representa a los residuales. Se aprecia una especie de zigzag de los valores de residuos. Sin embargo, se puede afirmar que todos los puntos están próximos a la recta identidad con algunos casos particulares. Podemos concluir que se cumple el supuesto de normalidad.



Prueba formal:

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Área	25	3,4E-08	776540,45	0,95	0,5056

La hipótesis planteada es:

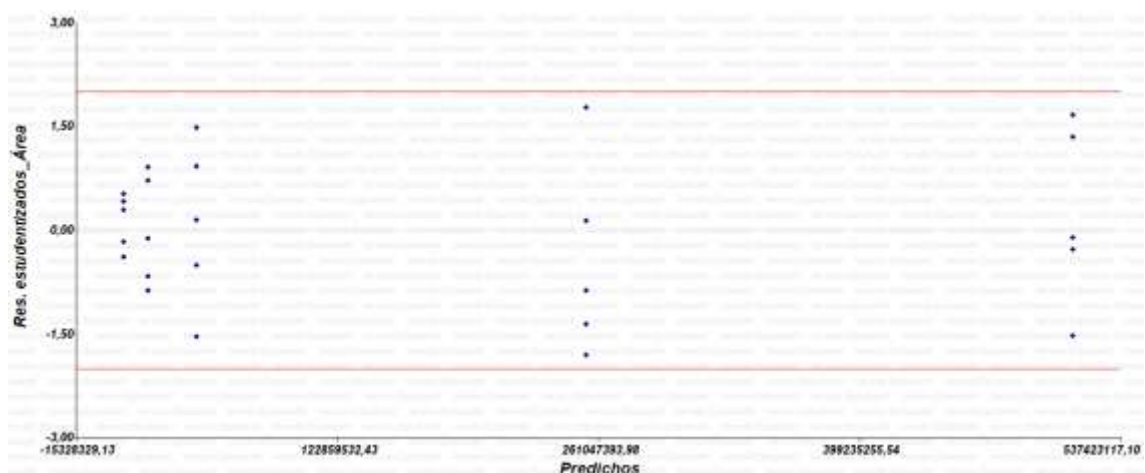
H0: los residuales tienen distribución normal.

H1: Los residuales no tienen distribución normal.

Como el valor de prueba p es mayor a $\alpha=0.05$, no se rechaza la hipótesis nula. Es decir, cumple el supuesto de normalidad.

Verificación de supuesto de igualdad de varianza: (gráfico de predichos vs residuales)

Los residuales se distribuyen aleatoriamente alrededor del cero. Se puede decir que hay homocedasticidad.



***) Análisis de los criterios de aceptación para la regresión lineal:**

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP	AIC	BIC
Área	25	1,00	1,00	753650415265,95	754,06	757,71

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	T	p-valor	CpMallows	VIF
const	-3087912,49	212809,19	-3528141,78	-2647683,20	-14,51	<0,0001		
Conc. (ppm)	1030771927,71	846802,67	1029020183,19	1032523672,22	1217,25	<0,0001	1481701,51	1,00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	932335647996767000,00	1	932335647996767000,00	1481701,51	<0,0001
Conc. (ppm)	932335647996767000,00	1	932335647996767000,00	1481701,51	<0,0001
Error	14472361520588,00	23	629233109590,78		
Total	932350120358288000,00	24			

Medidas resumen

Conc. (ppm)	Variable	n	Media	D.E.	Var(n-1)	Var(n)	E.E.	CV	Min	Máx
0,0125	Área	5	8899768,80	300066,56	90039941625,70	72031953300,56	134193,85	3,03	9501315,00	10196817,00
0,0250	Área	5	22677131,00	616193,88	379694891829,00	303755913463,20	275570,28	2,72	22009426,00	23383006,00
0,0500	Área	5	48527471,00	919375,85	845251954403,50	676201563522,80	411157,38	1,89	47259643,00	49595374,00
0,2500	Área	5	254274023,80	1106096,56	1223449607984,70	978759686387,76	494661,42	0,44	253200554,00	255978749,00
0,5000	Área	5	512453533,40	944343,44	891784532818,30	713427626284,64	422323,23	0,18	511185508,00	513501890,00

Conc. (ppm)	Área	RDUO Área	RE Área	PRED Área	ICON(LI) Área	ICON(LS) Área	% CV residuos
0,0125	10196817	400080,39	0,52	9796736,61	9370788,84	10222684,37	4,08
0,0125	9501315	-295421,61	-0,39	9796736,61	9370788,84	10222684,37	- 3,02
0,0125	10017616	220879,39	0,29	9796736,61	9370788,84	10222684,37	2,25
0,0125	10114184	317447,39	0,41	9796736,61	9370788,84	10222684,37	3,24
0,0125	9668912	-127824,61	-0,17	9796736,61	9370788,84	10222684,37	- 1,30
0,025	23235478	554092,3	0,72	22681385,7	22269050,75	23093720,65	2,44
0,025	22172690	-508695,7	-0,66	22681385,7	22269050,75	23093720,65	- 2,24
0,025	23383006	701620,3	0,91	22681385,7	22269050,75	23093720,65	3,09
0,025	22585055	-96330,7	-0,13	22681385,7	22269050,75	23093720,65	- 0,42
0,025	22009426	-671959,7	-0,88	22681385,7	22269050,75	23093720,65	- 2,96
0,05	48564338	113654,11	0,15	48450683,89	48063289,84	48838077,95	0,23
0,05	49595374	1144690,11	1,49	48450683,89	48063289,84	48838077,95	2,36
0,05	49165125	714441,11	0,93	48450683,89	48063289,84	48838077,95	1,47
0,05	48052875	-397808,89	-0,52	48450683,89	48063289,84	48838077,95	- 0,82
0,05	47259643	-1191040,89	-1,55	48450683,89	48063289,84	48838077,95	- 2,46
0,25	254712677	107607,56	0,14	254605069,4	254246469,5	254963669,3	0,04
0,25	255978749	1373679,56	1,77	254605069,4	254246469,5	254963669,3	0,54
0,25	253200554	-1404515,44	-1,81	254605069,4	254246469,5	254963669,3	- 0,55
0,25	253926958	-678111,44	-0,88	254605069,4	254246469,5	254963669,3	- 0,27
0,25	253551181	-1053888,44	-1,36	254605069,4	254246469,5	254963669,3	- 0,41
0,5	513273534	975482,64	1,35	512298051,4	511629499,2	512966603,6	0,19
0,5	512214989	-83062,36	-0,11	512298051,4	511629499,2	512966603,6	- 0,02
0,5	512091741	-206310,36	-0,28	512298051,4	511629499,2	512966603,6	- 0,04
0,5	513501890	1203838,64	1,66	512298051,4	511629499,2	512966603,6	0,23
0,5	511185508	-1112543,36	-1,54	512298051,4	511629499,2	512966603,6	- 0,22