

Recibido: 05 de Septiembre de 2014. Aceptado: 10 de octubre de 2014

Comparación de dos métodos para el análisis multiresiduo de plaguicidas en polen

Resumen

Se realizó un estudio comparativo entre el método QuEChERS convencional para la determinación de residuos de plaguicidas en polen y un método modificado, con el propósito de seleccionar el método que funciona adecuadamente. Para ello, se analizaron 58 plaguicidas mediante el uso de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas; la comparación de los métodos se realizó utilizando diferentes parámetros de validación como: recuperación, precisión (como repetibilidad) y límites de detección, los cuales fueron estimados mediante diferentes aproximaciones. Sumado a esto, se realizó un diseño experimental factorial que permitió evaluar la eficiencia de ambos métodos en diferentes tipos de polen. Los resultados indicaron, que el método desarrollado es apto para el análisis de residuos de plaguicidas en polen. Asimismo, se encontró que el método desarrollado presenta mejores límites de detección, mejor exactitud y mejor selectividad que el método QuEChERS convencional para el análisis de los plaguicidas en estudio en la matriz de polen apícola. Finalmente, se encontró que el método modificado no es apto para el análisis de tres de los 58 plaguicidas estudiados.

Palabras claves: Plaguicidas, QuEChERS, Polen, Validación.

Comparation of two multiresidue methods for pesticide determination in pollen

Abstract

A comparative study between the conventional and the modified QuEChERS method was performed in order to select the methodology that works better for the determination of pesticide residues in pollen. For this study, 58 pesticides were analyzed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Comparison was made using different validation parameters for each method as recovery, precision (as repeatability), limits of detection, which were estimate using different approaches. In addition, a factorial design was used to evaluate the efficiency of both methods in different types of pollen. The results showed that the modified method is appropriate for the analysis of pesticide residues in pollen. It was also found that this method has better detection limits, better accuracy and better selectivity than the conventional QuEChERS method for pesticide analysis in bee pollen. Finally, it was found that the modified method is not suitable for the analysis of three of the 58 pesticides studied.

Keywords: pesticides, QuEChERS, validation, pollen.

Comparação de duas metodologias para o análise de resíduos múltiplos de agrotóxicos em pólen

Resumo

Com o objetivo de validar o bom funcionamento de uma análise modificada de resíduos de pesticidas no pólen foi realizado um estudo comparativo com o método QuEChERS. Por isso, 58 pesticidas foram analisados usando espectrometria de massa por cromatografia líquida; comparação dos métodos foi realizada utilizando diferentes parâmetros de validação, como a recuperação de precisão (como repetibilidade) e limites de detecção que foram estimadas por diferentes abordagens. Somado a isso, um planejamento fatorial permitiu avaliar a eficiência de ambos métodos em diferentes tipos de pólen. Os resultados indicaram que o método desenvolvido é adequado para a análise de resíduos de pesticidas no pólen. Constatou-se também que o método desenvolvido tem melhores limites de detecção, melhor precisão e maior seletividade do que o método QuEChERS para análise de pesticidas no estudo da matriz de pólen de abelha. Finalmente, verificou-se que o método modificado não é adequado para a análise de 3 dos 58 pesticidas, os quais apresentaram recuperações inferiores ao 70%.

Palavras-chave: QuEChERS, agrotóxicos, polen, validação.

Introducción

El uso de productos químicos para la protección de las colmenas y la presencia de contaminantes en el ambiente como metales pesados, plaguicidas, antibióticos, entre otros, genera una amenaza inminente en la comercialización de productos apícolas, debida, principalmente a los efectos adversos de estas sustancias sobre la salud de los consumidores (1-3). Por ello, la mayoría de los países o comunidades consumidoras de estos productos, como Estados Unidos, Canadá, Japón o la Unión Europea, han establecido reglamentos estrictos para la comercialización de este tipo de alimentos, por lo que la presencia de estas sustancias o elementos, puede llegar a convertirse en una barrera fitosanitaria al momento de exportar productos apícolas a estos países (4-6). Estas legislaciones han inducido a que la comunidad científica produzca un importante desarrollo analítico que permita realizar la detección y cuantificación de este tipo de contaminantes, con el fin de controlar la inocuidad y calidad de este producto (7-9). Las metodologías desarrolladas deben contar con unos requisitos mínimos, tales como tener límites de cuantificación (LC) lo suficientemente bajos para poder determinar los exigentes límites máximos de residuos (LMR) impuestos para los diferentes contaminantes. Adicionalmente, para el caso de residuos de plaguicidas y antibióticos se hace necesario que estas metodologías cuenten con tecnología lo suficientemente selectiva y sensible para evitar tanto los falsos positivos como los falsos negativos (7). Es por ello, que durante la última década se han incrementado el desarrollo e investigación en todo lo relacionado con métodos de detección de contaminantes en productos de la colmena, en especial técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas (8, 10).

En la actualidad, es reconocido que el método QuEChERS es indudablemente uno de los métodos de mayor robustez, simplicidad, reproducibilidad, versatilidad, entre otras bondades (11). El método original fue desarrollado para el análisis de residuos de plaguicidas en frutas y matrices vegetales, por lo cual, en los últimos años se han venido desarrollando diferentes variaciones con el propósito de adaptar el método a matrices o analitos específicos, tal es el caso de análisis de plaguicidas, antibióticos, fenoles u otro tipo de contaminantes en matrices como leches (12), suelos (13), cereales (14), aceites (15), entre otros (16, 17).

Para el caso específico de productos apícolas, y en especial cuando se trabaja con miel, se encuentra que el método original, fue modificado con el propósito de eliminar las interferencias (18). De esta manera, se optó por tomar una menor cantidad de muestra (de 1 a 5 veces menor que el método original), esta modificación implica que se cuente con equipos de última tecnología como cromatógrafos de gases o cromatógrafos líquidos acoplados a equipos de espectrometría de masas con analizadores de tiempo de vuelo, orbitrap, triple cuádruplo, trampa iónica lineal, entre otros, debido principalmente a la selectividad y sensibilidad que se requiere (18, 19). El análisis de residuos de plaguicidas en productos apícolas, es bien conocido por su utilidad como indicador ambiental, sin embargo son pocos los trabajos que realizan análisis de polen (9, 20, 21); esta situación, posiblemente se debe a la complejidad de esta matriz y a que la mayoría de resultados de monitoreo se han realizado a través de técnicas cromatográficas acopladas a espectrómetros de masas en tándem, los cuales no requieren modificaciones del método QuEChERS. Las publicaciones existentes, dentro de nuestro conocimiento, realizan el empleo de otro tipo de métodos (20) o modifican la cantidad de muestra aproximadamente a una tercera parte (22), lo cual ha permitido obtener resultados exitosos, sin embargo ninguna de las publicaciones ha reportado más de 30 plaguicidas usando el mismo instrumento.

En este contexto, el presente trabajo tiene como objetivo comparar una versión modificada de QuEChERS con el método original, con el propósito de evaluar si las modificaciones realizadas permiten ampliar el alcance del método. Además, se pretende evaluar la eficacia del mé-

todo modificado en la recuperación de residuos de plaguicidas en diferentes tipos de polen.

Materiales y métodos

Materiales, reactivos y soluciones

En este estudio se trabajó con los mismos reactivos, calidad, condiciones de preparación y almacenamiento de estudios previos (23, 24).

Material de partida

Se emplearon diferentes tipos de polen que provenían de apiarios de diferentes regiones del altiplano cundiboyacense. Para los estudios de selectividad se trabajaron con 5 diferentes muestras de polen, para los ensayos de recuperación se trabajó con solo un tipo de polen. Todas las muestras fueron recolectadas por el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia, durante 2013 y 2014. Para realizar los ensayos de recuperación se trabajó con muestras fortificadas, las cuales fueron analizadas previamente a la fortificación con el propósito de asegurar que no tuvieran ninguno de los plaguicidas en estudio.

Condiciones cromatográficas

El análisis cromatográfico fue llevado a cabo en un cromatógrafo líquido ultra rápido (UFLC por sus siglas en inglés Ultra Fast Liquid Chromatograph) Shimadzu Prominence (Maryland, CA, EUA), acoplado a un detector selectivo de masas LCMS-2020.

Los análisis fueron llevados a cabo en una columna Shim Pack (6 cm × 2 mm d.i., tamaño de partícula de 2,1 μm y fase estacionaria C18), se trabajó en modo de gradiente con ácido fórmico al 0,1% (*p/v*) y acetato de amonio 5 mM en agua Milli-Q (A), la fase orgánica empleada fue acetonitrilo (B). El programa de elución utilizado expresado como porcentaje de B, inicia a 0 % (0 min) aumenta a 20 % en 0,01 min, posteriormente llega hasta 25 % a los 0,30 min y luego aumenta hasta el 100 % en los siguientes 10 min, finalmente se mantiene por 0,20 min. Para restituir la fase móvil a la condición inicial del análisis se pasa de 100 % a 0 % de B en 2 min donde se mantiene por 5 min para equilibrar la columna. La adquisición de los datos se realizó durante los primeros 8 min. El volumen de inyección fue 5 μL, la temperatura de columna 40 °C y el flujo de fase móvil 0,3 mL/min.

Condiciones de la Interfaz y espectrómetro de masas

El equipo cuenta con una interfaz tipo DUIS (ESI, APCI), que se operó en modo ESI, con un flujo de gas de secado de 10 L/min y un flujo de gas nebulizador de 1,5 L/min. Las temperaturas del bloque de calentamiento y de la línea de eliminación del solvente correspondieron a 190 °C y 250 °C respectivamente.

Los análisis fueron llevados de manera simultánea en modo positivo y negativo, el voltaje aplicado en el capilar correspondió a 4500 V y -4500 V, respectivamente. Todos los análisis fueron realizados en modo de monitoreo de ion selectivo (SIM, de sus siglas en inglés). La Tabla 1 muestra los iones seleccionados para la cuantificación y el tiempo de retención de cada compuesto. Estos compuestos fueron seleccionados teniendo en cuenta la legislación internacional (5), el nivel de afectación a las abejas (3), su uso en Colombia, entre otras consideraciones.

Tabla 1. Iones (*m/z*) de cuantificación (T) para los compuestos estudiados y tiempos de retención.

Compuesto	<i>t</i> _{retención} (min)	Ion T	Compuesto	<i>t</i> _{retención} (min)	Ion T
Acefato	2,56	201	Metamidofos	2,54	142
Monocrotofos	2,78	241	propamocarb	2,63	189
Oxamil	2,91	237	dinotefuran	2,70	203
Metomil	3,06	163	Linuron	2,70	-247
Carbendazim	3,15	192	Nitenpiram	2,79	271
Imidacloprid	3,52	-254	thiametoxan	2,99	292
Dimetoato	3,63	230	dazomet	3,03	163
Tiabendazol	3,24	202	mevinphos	3,17	225
Cimoxanil	3,86	-197	3-OH carbofuran	3,17	255
Tiodicarb	4,83	355	Acetamiprid	3,30	223
Carbofuran	4,81	222	Tiacloprid	3,71	-297
Atrazina	5,19	216	dinotefuran	2,70	203
Metalaxyl	5,34	280	simazina	4,08	202
Pirimicarb	4,81	239	carbaryl	4,57	219
Imazalil	4,66	297	isoprocarb	5,90	235
3,4-dicloropropilanilida	5,89	-216	ametrina	6,17	269
Pirimetanil	6,03	200	tridemoprh	6,62	298
Dimetomorf	5,93	390	epoxiconazole	6,70	330
Azoxistrobin	6,49	404	fenexhamid	7,81	-300
Tebuconazol	6,79	308	etoprofos	7,81	284
Metoxyfenozida	6,86	369	flusilazole	7,94	357
Hexaconazol	7,00	-358	penconazol	8,07	325
Espinosad a	6,33	733	piraclistrobin	9,80	388
Benalaxil	7,73	326	trifloxistribina	9,17	409
Difenoconazol	7,69	408	Lufenuron	9,41	-509
Azinfos metil	7,78	368	buprofezin	9,91	306
Espinosad d	6,49	747	Clorfenaprid	7,74	-349
Indoxacarb	8,27	528	Temefos	9,66	467

El signo negativo del número indica que estos compuestos se detectaron mediante modo negativo.

Método QuEChERS sin modificar

Para la extracción de los plaguicidas mediante el método QuEChERS sin modificar, se pesaron 10 g de muestra en un tubo de centrifuga, luego se adicionó TPP (fosfato de trifenilo) y 200 µL de una mezcla de plaguicidas para obtener las concentraciones que se presentan en la Tabla 2 la mezcla se dejó en reposo por 10 min y, transcurrido ese tiempo, se adicionaron 10 mL de acetonitrilo, 4 g de MgSO₄ anhidro y 1 g de AcONa y se agitó la mezcla por 1 min de manera manual. Posteriormente, se cen-

trifugó a 4500 rpm por 5 min y, con ayuda de una pipeta, se tomaron 10 mL del sobrenadante, los cuales se transfirieron a un tubo de centrifuga de 15 mL. Para el proceso de limpieza, se adicionaron 25 mg de amina primaria/secundaria (PSA, de sus siglas en inglés) y 150 mg de MgSO₄ anhidro por cada mililitro de extracto, luego se agitó manualmente por 30 s y se centrifugó por 2 min a 4500 rpm. Después se tomaron 5 mL del sobrenadante y se concentraron con nitrógeno hasta sequedad, para luego ser reconstituídos a 1 mL con acetonitrilo. Finalmente, el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0,22 µm de PTFE y se transfirió a un vial de cromatografía (27).

Tabla 2. Concentraciones de fortificación y resultados de prueba de Levene.

NOMBRE	Fortificación ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	p-LEVENE		NOMBRE	Fortificación ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	P- LEVENE	
		Q	M			Q	M
Acefato	9,79	0,24	0,42	Metamidofos	5,75	0,50	0,52
Oxamilo	5,74	0,15	0,60	Propamocarb	7,95	0,38	0,75
Monocrotofos	12,94	0,54	0,40	Dinotefuran	17,03	0,16	0,43
Metomil	9,69	0,47	0,85	Linuron	6,44	0,20	0,40
Carbendazin	17,07	0,55	0,31	Nitenpiram	17,17	0,19	0,49
Tiabendazol	14,33	0,34	0,02	Thiametoxan	6,11	0,41	0,27
3OH-carbofuran	2,65	0,41	0,21	Dazomet	14,78	0,34	0,71
Dimetoato	6,1	0,12	0,02	Mevinfos	7,08	0,50	0,01
Cymoxanyl	5,18	0,42	0,24	Imidacloprid	12,88	0,12	0,22
Carbofuran	5,66	0,30	0,44	Acetamiprid	19,08	0,07	0,32
Tiodicarb	4,44	NC	0,40	Tiacloprid	6,93	0,56	0,33
Pirimicarb	10,19	0,35	0,71	Simazina	11,62	0,53	0,04
Atrazina	6,44	0,15	0,07	Carbaril	9,48	0,23	0,92
Metalaxil	5,55	0,40	0,17	Isopocarb	13,29	0,30	0,14
Imazalil	5,94	0,42	0,53	Ametrina	9,41	0,10	0,62
Dimetomorf	12,4	0,48	0,83	3,4-dicloropropinalidina	8,58	0,17	0,15
Pirimetanil	5,93	0,59	0,54	Tridemoprh	9,15	0,31	0,22
Azoxistrobina	6,84	0,47	0,25	Epoxiconazole	9,75	0,38	0,19
Espinosad	4,73	0,29	0,42	Fenexamid	9,04	0,41	0,36
Tebuconazol	4,38	NC	0,12	Etoprofos	9,99	0,55	0,21
Metoxifenozida	5,37	0,46	0,30	Flusilazole	8,03	0,35	0,50
Hexaconazol	5,97	0,44	0,48	Penconazol	7,71	0,27	0,21
Espinosad D	3,76	0,45	0,66	Piraclistrobin	8,75	0,51	0,31
Difenoconazol	5,20	NC	0,36	Trifloxystribina	9,98	0,32	0,77
Benalaxil	5,70	0,23	0,03	Lufenuron	1,19	0,55	0,31
Clorfenapyrid	3,01	NC	0,22	Befuracarb	11,9	0,54	0,25
Indoxacarb	8,51	0,54	0,37	Temefos	12,43	0,57	0,15

p-LEVENE: probabilidad de aceptar la hipótesis nula. Q: QuEChERS. M: Modificado NC: No cuantificado.

Método QuEChERS modificado

Para la extracción mediante el método QuEChERS modificado, se pesaron 10 g de muestra en un tubo de centrifuga, luego se adicionó TPP y 200 μL de una mezcla de plaguicidas para obtener las concentraciones de la Tabla 2. La solución resultante se dejó en reposo por 10 min y, transcurrido ese tiempo, se adicionaron 10 mL de una solución amortiguadora de citratos a un pH de 6,2. Después se agitó el tubo suavemente para que la solución entrara en contacto con el polen. Posterior a ello, se adicionaron 10 mL de acetonitrilo, se tapó el tubo y se agitó por cerca de 10 min en un vórtex, después de este tiempo el tubo se llevó a un baño de ultrasonido por 10 min. Paso seguido, se adicionaron 4

g de MgSO_4 anhidro, se agitó vigorosamente por 1 min y se llevó a la centrifuga por un tiempo de 3 min a 7000 rpm.

Con ayuda de una pipeta, se tomaron 8 mL del sobrenadante, los cuales se transfirieron a un tubo de centrifuga de 15 mL. Para el proceso de limpieza, se adicionaron 25 mg de PSA (amina primaria/secundaria), 25 mg de C_{18} , y 150 mg de MgSO_4 anhidro por cada mililitro de extracto, se agitó manualmente por 30 s y se centrifugó por 2 min a 4500 rpm. Posteriormente, se tomaron 5 mL del sobrenadante y se concentraron con nitrógeno hasta sequedad, para luego ser reconstituidos y aforados a 1 mL con una mezcla de ACN:Agua 7:3 (v/v). Finalmente, la muestra se filtró a través de una membrana de 0,22 μm de PTFE, y se transfirió a un vial de cromatografía.

Comparación de métodos

La comparación de los métodos se realizó a través de la evaluación de diferentes parámetros de validación, entre ellos: (i) límites de detección, los cuales fueron estimados y confirmados a partir del método de la IUPAC y el método t_{99} (27); (ii) selectividad, la cual fue evaluada con 5 diferentes blancos de diferente procedencia (iii) precisión, evaluada como desviación estándar relativa a tres diferentes niveles de concentración en condiciones de repetibilidad. Finalmente, para realizar una comparación más objetiva de los plaguicidas para los que ambos métodos eran selectivos y precisos, se realizó un diseño experimental con estructura factorial 2x3, en el cual se evaluó la recuperación de los plaguicidas en estudio a dos diferentes niveles de concentración (factor 1) y en tres diferentes tipo de polen (factor 2), los cuales se diferenciaban por el cultivo y la región de donde provenían. Para este estudio, se fortificaron muestras de polen exentas de plaguicidas, lo cual se verificó mediante un análisis antes de la fortificación.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados a un nivel de confianza del 95 % con el programa estadístico SPSS v22 (2013). El número mínimo de réplicas para los experimentos correspondió a cuatro. Las concentraciones de fortificación para los ensayos se presentan en la Tabla 2

Resultados y discusión

Selectividad de los métodos

Para el método QuEChERS se encontró que para difenoconazol, indoxacarb, buprofezin, espinosad A, benfuracarb, lufenuron, clorfenaprid, temefos, benalaxil y trifloxtribina presentaron señales cromatográficas que impedían la detección de los compuestos (interferencias), las cuales eran superiores a la respuesta cromatográfica del analito a una concentración equivalente al límite máximo de residuos (10 µg/kg); la cual es la concentración que se adopta por defecto en la legislación europea para el caso en que no existan LMR establecidos para un compuesto (5). Por su parte, para el caso del método QuEChERS modificado, se encontró una adecuada selectividad para todos los compuestos y aunque se presentaron algunas interferencias en algunos blancos estas nunca superaron el 30 % del valor de la respuesta cromatográfica para la concentración de referencia (28).

De acuerdo a los resultados de selectividad del método QuEChERS sin modificar, se evidencia que existe un número relativamente elevado de compuestos que presentan interferencias significativas; estos equivalen a cerca del 21 % del total de compuestos analizados en el presente estudio. Los compuestos que se mencionaron con anterioridad, tienen en común que ninguno eluye a tiempos de retención inferiores a 6 min (Tabla 1), lo que indica que son retenidos en la columna y por consiguiente se presume son de naturaleza lipofílica o presentan un momento dipolar bajo. Lo anterior plantea la posibilidad de tener interferentes de baja polaridad que coeluyen con los analitos de interés. En este sentido, se entiende que el método modificado presenta, probablemente, mejor selectividad por dos razones. En primer lugar, el empleo de adsorbentes tipo octadecilsilano (C_{18}) en el proceso de limpieza permite eliminar algunas de las interferencias lipofílicas que producen un aumento en los tiempos de retención. Por otro lado, el uso de carbón negro grafitizado (GCB, de sus siglas en inglés) también puede contribuir a la eliminación de este tipo de interferencias, pues, este tipo de adsorbente es conocido por reducir la presencia de compuestos planares, como las clorofilas y algunos pigmentos, los cuales se encuentran en este tipo de material debido a su origen vegetal (29). La segunda razón por la

que se cree mejoró la selectividad del método corresponde al cambio de solvente que se realiza para reconstituir la muestra una vez esta es concentrada a través de un flujo de nitrógeno. Durante el desarrollo del método, se observó que al realizar la reconstitución con una mezcla de acetonitrilo-agua (7:3) se lograba obtener un extracto con una coloración menor a la que se obtiene cuando se realiza la reconstitución con acetonitrilo. Lo anterior sugiere que algunos compuestos de la matriz (pues ninguno de los plaguicidas a esas concentraciones originan ese tipo de coloración), no están disueltos y por consiguiente los extractos cuentan con un menor número de interferentes en el proceso de detección. Por otro lado, la naturaleza de estos compuestos debería ser lipofílica, de lo contrario la coloración no dependería de la polaridad del disolvente en el cual se realiza la reconstitución.

Límites de detección de los métodos

La Tabla 3 presenta los resultados de la confirmación de los límites de detección estimados para algunos compuestos seleccionados. Los compuestos restantes no se presentan debido a que los resultados, entre los métodos, son similares en magnitud.

Los resultados de la Tabla 3 muestran que para todos los casos los límites de detección (LD) obtenidos mediante el método QuEChERS modificado son más bajos, es decir a través de esta metodología se tiene una mayor capacidad de detección (menores LD). Por otro lado, para compuestos como indoxacarb, espinosad, difenoconazol y clorfenaprid que presentaron problemas de selectividad mediante el método QuEChERS, se presentaron límites de detección mayores (hasta 10 veces), respecto al método modificado. Asimismo, para estos compuestos se encuentra que a través del método modificado se obtienen mejores relaciones señal/ruido, incluso cuando se usan concentraciones menores de analito.

La obtención de límites de detección mayores cuando se utiliza el método QuEChERS sin modificar, se atribuye a su baja selectividad; la cual ocasiona que se obtenga un mayor ruido, una mayor desviación estándar de los blancos y una menor relación señal/ruido. Por otro lado, aunque varios compuestos como carbofuran, metalaxil y hexaconazol no presentaron problemas de selectividad a través del método QuEChERS, se puede observar que presentaron un mayor límite de detección y una menor relación señal/ruido (Tabla 3), lo cual indica que se tiene posiblemente un mayor ruido de fondo, que aunque no resulta ser significativo (menor a un 30 % de la respuesta de la concentración más baja) es mayor que para el caso del método modificado. Además, se encontró que por el método QuEChERS modificado, ninguno de los compuestos presentados en la tabla tiene relaciones señal/ruido inferiores a 3, mientras que para el método QuEChERS sin modificar se encuentran varios compuestos con relaciones señal/ruido inferiores a 3, lo cual confirma que la capacidad de detección del método modificado es superior.

Repetibilidad de los métodos

Se evaluó la repetibilidad de los métodos a tres concentraciones diferentes, la Tabla 2 muestra la concentración más baja de fortificación, la cual es la concentración que se adopta como límite de cuantificación (LC), las otras fortificaciones se realizaron a dos veces el LC y a cinco veces el LC.

Con el propósito de evaluar si la concentración influenciaba la repetibilidad del método, se analizó la varianza de los residuales por el método de Levene (30). Los resultados de esta prueba son presentados en la Tabla 2. Cabe resaltar que en esta prueba, una probabilidad inferior a 0,05 indica que existen diferencias significativas entre los residuales a las diferentes concentraciones de fortificación, es decir que la precisión cambia en función de la concentración. En este sentido, los resultados

Tabla 3. Límites de detección (LD) estimados y promedio de relación señal ruido (S/R) en la confirmación de estos límites (N=4).

Compuesto	QuEChERS		QuEChERS modificado	
	LD (µg/kg)	S/R	LD (µg/kg)	S/R
Acefato	2,53	10,51	2,36	12,00
Oxamilo	2,78	3,38	2,05	4,50
Monocrotofos	1,84	3,47	1,23	4,50
Metomil	3,02	3,21	2,62	3,60
Carbendazim	3,58	3,42	2,68	4,20
Tiabendazol	1,78	26,12	1,71	26,00
Dimetoato	2,22	3,46	1,69	4,50
Cimoxanil	2,15	2,84	1,52	3,40
Carbofuran	0,96	4,35	0,85	5,70
Tiodicarb	4,68	10,90	3,25	10,90
Pirimicarb	2,32	31,24	1,50	38,10
Atrazina	5,22	2,95	3,40	3,50
Metalaxilo	2,05	11,86	1,35	16,60
Imazalil	2,24	6,27	2,06	6,60
Azosxitrobina	1,07	9,49	1,04	9,40
Espinosad A	9,39	2,79	2,06	5,00
Tebuconazol	7,13	3,02	4,71	3,00
Hexaconazol	1,85	3,59	1,65	3,80
Difenoconazol	255,86	5,19	41,32	7,40
Benalaxilo	4,61	82,95	2,33	89,80
Clorfenaprid	143,35	16,41	36,40	3,70
azinfos metil	10,64	2,60	1,15	3,10
Indoxacarb	24,77	19,22	4,12	19,20
Metamidofos	3,23	6,08	2,20	8,60
propamocarb	1,74	100,66	1,46	132,10
dinotefuran	0,45	3,67	0,32	4,70
Linuron	1,07	3,40	0,69	4,30
Nitenpiram	3,34	8,98	0,24	12,60
thiametoxan	1,62	2,94	1,02	3,20
dazomet	3,80	2,98	2,92	3,30
mevinfos	2,09	2,82	1,88	3,40
Imidacloprid	39,07	2,47	32,73	3,30
Acetamiprid	4,87	37,17	4,78	43,80
Tiacloprid	0,96	3,15	0,74	3,20
simazina	1,21	15,48	0,87	16,30
carbaril	3,19	12,98	2,78	14,80
Lufenuron	4,19	10,66	1,40	12,80
buprofezin	1,19	4,24	1,00	5,70
temefos	22,04	3,50	14,72	4,20

que se muestran en la Tabla 2 indican que la mayoría de los compuestos no cambian su precisión en función de la concentración, de hecho en el método QuEChERS ninguno de los compuestos presenta diferencias significativas (en todos los casos $p > 0,05$). En el caso del método modificado, se encuentra que para compuestos como simazina, tiabendazol y mevinfos se tienen cambios en la precisión del método ($p < 0,05$), sin embargo como se observará posteriormente ninguno de estos cambios excede los criterios de aceptación de repetibilidad (28).

Las Figuras 1 y 2 muestran los coeficientes de variación máximos obtenidos para cada uno de los analitos en las diferentes concentraciones de fortificación. En estas figuras se observa que para la mayoría de los casos se tienen coeficientes de variación inferiores al 15 % (umbral establecido por la unión europea para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos (28)), sin embargo, en algunos casos (p.e. monocrotofos, metomil, pirimicarb, indoxacarb, entre otros) los analitos presentan coeficientes de variación superiores a este umbral, es decir el método no resulta ser lo suficientemente preciso para estos compuestos. Este hecho puede ser atribuido a diferentes causas: (i) el aumento de los procesos de adsorción de algunos analitos a las concentraciones de fortificación (ver Tabla 2), (ii) heterogeneidad de la mezcla de extracción (acetoni-trilopolen), (iii) cambios de temperatura en el momento de la adición del $MgSO_4$, (iv) estabilidad de los analitos en el polen y en la mezcla de extracción, (v) efecto matriz en la interfaz del espectrómetro de masas, (vi) coelución de compuestos de la matriz, (vii) baja selectividad del método, entre otros. Finalmente, cabe destacar que el método modificado

resultó ser preciso pues se obtuvieron coeficientes de variación inferiores al 15 % (a excepción de temefos y carbendazim), en condiciones de repetibilidad.

En las Figuras 1 y 2 se aprecia que en general para la mayoría de los compuestos se obtuvieron mejores coeficientes de variación usando el método modificado, esto se debe a una mejor homogenización y un mejor control de pH (dado que se adiciona el buffer disuelto en el agua y no en estado sólido). Adicionalmente, otra causa que contribuye a obtener mejores coeficientes de variación con este método es el uso del vórtex, el cual homogeniza la muestra mejor y de manera más eficiente que la mano. Además, el empleo de ultrasonido para asistir el proceso de extracción mejora la transferencia de masa que se da desde el polen hasta la fase extractante (31).

Las Figuras 1 y 2 muestran que algunos compuestos (p.e. tiabendazol e imazalil), presentaron mejores coeficientes de variación con el método QuEChERS, lo cual se atribuye a la presencia de GCB en el método modificado, pues es bien conocido que este adsorbente afecta la recuperación de estos compuestos. Del mismo modo, se observa que para algunos compuestos la precisión es la misma en los dos métodos (p.e. cimoxanil, dinotefuran, piraclostrobina, entre otros) lo cual indica que, posiblemente, no se ven afectados de manera significativa por los factores mencionados con anterioridad.

Se aplicó nuevamente la prueba de Levene (30) con el objetivo de evaluar si existen diferencias significativas entre las precisiones (i.e. coeficientes de variación) de los métodos. Los resultados para los compues-

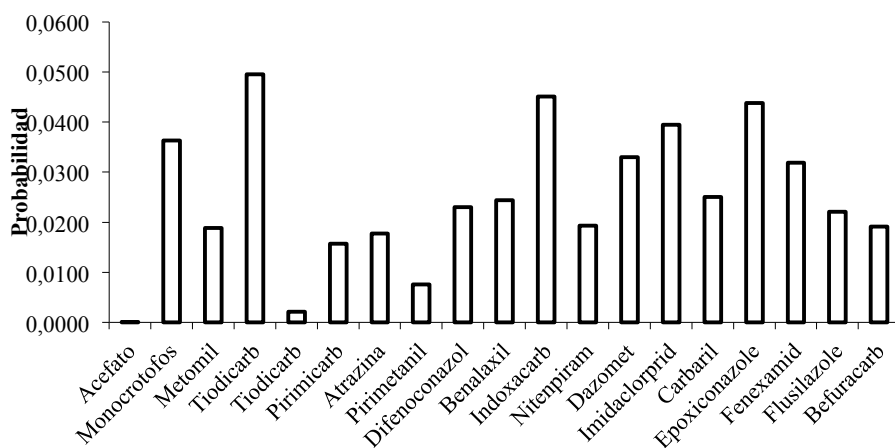


Figura 1. Máximo coeficiente de variación obtenido para cada uno de los compuestos empleando los dos métodos.

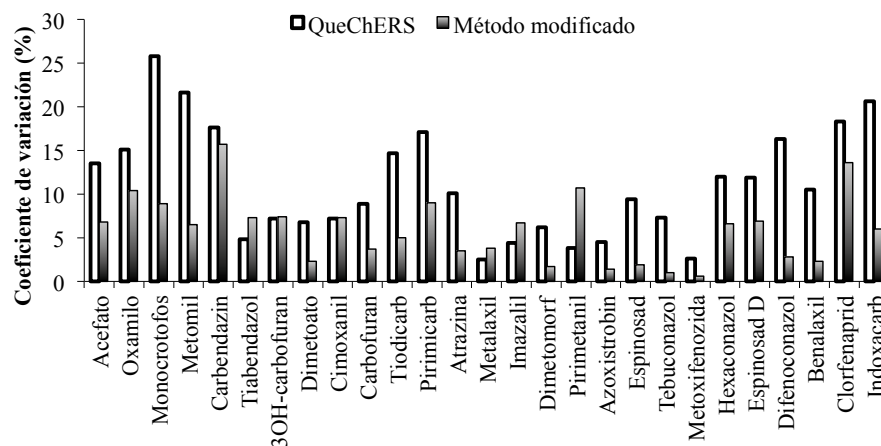


Figura 2. Máximo coeficiente de variación (%) obtenido para cada uno de los compuestos empleando los dos métodos.

tos con precisiones significativamente diferentes ($p < 0,05$) se consignan en la Figura 3.

Al relacionar los resultados que se muestran en la Figura 3 con los presentados en las Figuras 1 y 2, se encuentra que para la mayoría de los casos, la precisión obtenida con el método modificado es mejor que la del método original. Sin embargo en algunos casos (p.e pirimetanil, dazomet y epoxiconazol), se obtienen mejores precisiones con el método QuEChERS; aunque es de resaltar que la precisión del método modificado se cumple con el criterio de precisión (28).

Evaluación de la recuperación de los métodos

Se realizó un diseño experimental factorial que buscaba determinar si se presentaban diferencias significativas en los porcentajes de recuperación de cada uno de los métodos, para ello, se recreó un escenario más real empleando tres tipos de polen. Las Figuras 4 y 5 muestran los porcentajes de recuperación obtenidos por cada uno de los métodos, para un único tipo de polen.

Las Figuras 4 y 5 muestran que los porcentajes de recuperación de la mayoría de los compuestos son similares entre sí y se encuentra dentro del intervalo de aceptación que plantea la Unión Europea (28). Sin embargo, la recuperación de algunos analitos mediante los dos métodos (p.e. piraclostrobin, carbendazim y espinosad D) es muy baja, lo cual sugiere que el polen impide su extracción; pues a diferencia de otras matrices (p.e. frutas) no es posible una recuperación adecuada de los

analitos utilizando el método QuEChERS (11, 13). En este sentido, la baja recuperación de estos compuestos se atribuye a la matriz, pues es posible que exista un proceso de adsorción irreversible o se lleve a cabo algún tipo de reacción que impida su determinación, en especial con estructuras químicas tan complejas como la de espinosad D.

Las modificaciones que se realizaron al método QuEChERS facilitaron la determinación de varios compuestos como tiodicarb y el grupo de los neonicotinoides (Figura 5), pues a través del método modificado se logran obtener porcentajes de recuperación aceptables (entre 70 % y 120 %) que no pueden ser alcanzados con el método QuEChERS sin modificar.

En las Figuras 4 y 5 se puede observar que solo siete compuestos presentan mejores recuperaciones mediante el método QuEChERS sin modificar, los compuestos restantes tienen una mejor recuperación mediante el método modificado. Lo anterior implica que posiblemente las etapas de sonicación, de limpieza o tal vez el mayor tiempo en el proceso de extracción afectan la estabilidad de estos siete compuestos. Sin embargo, al observar las Figuras 1 y 2 se encuentra que para estos mismos siete compuestos se tienen mejores coeficientes de variación, lo que indica que en esos casos el método modificado, aunque es de menor veracidad presenta una mejor exactitud (teniendo en cuenta la actual definición de este término (32)).

Finalmente, la Tabla 4 muestra las probabilidades de aceptar cada una de las hipótesis nulas que se exponen a continuación:

H_{01} : Existe una interacción significativa entre los métodos y el tipo de polen.

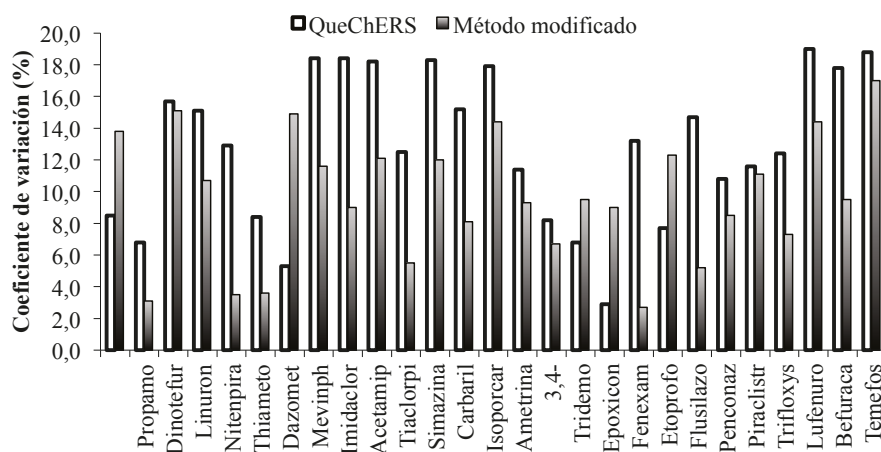


Figura 3. Probabilidades de aceptar la hipótesis nula en la prueba de Levene realizada para la comparación de la precisión de los métodos.

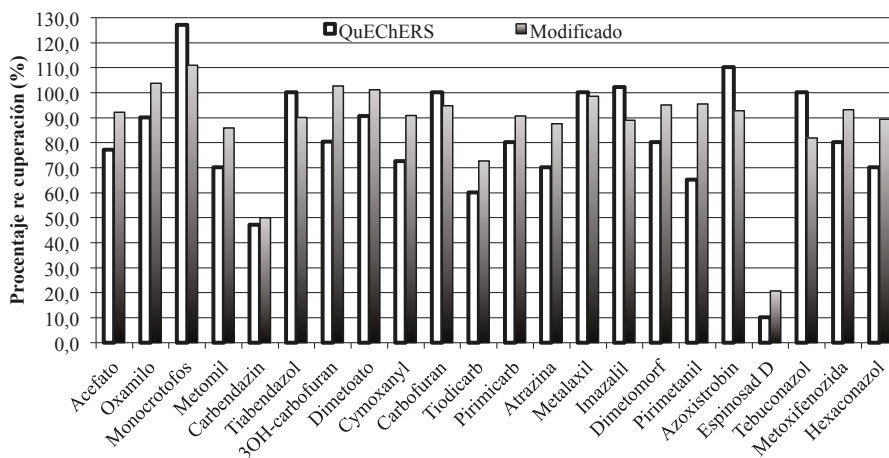


Figura 4. Porcentajes de recuperación obtenidos mediante los dos métodos.

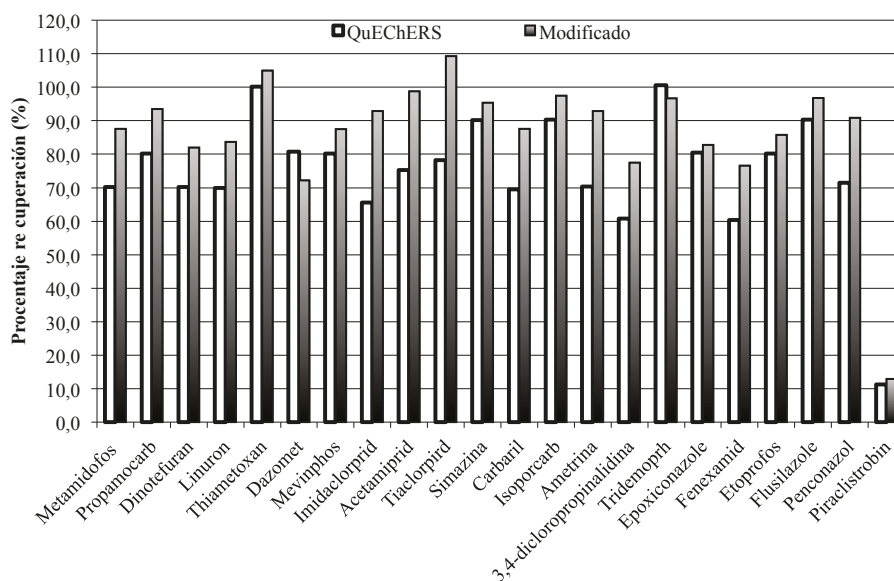


Figura 5. Porcentajes de recuperación obtenidos mediante los dos métodos.

Tabla 4. Probabilidades (p) obtenidas en la evaluación de cada una de las hipótesis nulas (H_{0i}).

NOMBRE	p- H_{01}	p- H_{02}	p- H_{03}	NOMBRE	p- H_{01}	p- H_{02}	p- H_{03}
Acefato	0,174	0,044	0,2881	Metamidofos	0,058	0,014	0,1584
Oxamilo	0,046	0,535	0,007	Propamocarb	0,354	0,407	0,7534
Monocrotofos	0,399	0,025	0,0043	Dinotefuran	0,465	0,205	0,0489
Metomil	0,444	0,534	0,4342	Linuron	0,057	0,465	0,0003
Carbendazín	<0,0001	0,039	<0,0001	Thiametoxan	0,471	0,266	0,3408
Tiabendazol	0,399	0,024	0,0053	Dazomet	0,168	0,531	0,0078
3OH-carbofuran	0,161	0,592	0,0021	Mevinphos	0,316	0,497	0,0025
Dimetoato	0,417	0,123	<0,0001	Imidacloprid	0,056	0,043	0,8184
Cymoxanyl	0,105	0,031	0,1534	Acetamiprid	0,092	0,018	0,0017
Carbofuran	0,479	0,54	0,1832	Tiacloprid	0,287	<0,0001	0,353
Tiodicarb	0,143	0,126	0,2649	Simazina	0,381	0,360	0,2444
Pirimicarb	0,276	0,223	0,0194	Carbaril	0,282	<0,0001	0,0056
Atrazina	0,450	<0,0001	0,0608	Isoporcab	0,408	0,34	0,0505
Metalaxil	0,135	0,464	0,1694	Ametrina	0,147	0,039	0,0544
Imazalil	0,078	0,101	0,0032	3,4-dicloropropinalidina	0,495	0,541	0,0076
Dimetomorf	0,342	0,408	0,3429	Tridemoprh	0,119	0,367	0,0006
Pirimetanil	0,276	<0,0001	<0,0001	Epoxiconazole	0,345	0,578	0,046
Azoxistrobin	0,185	0,022	0,0397	Fenexamid	0,347	0,359	0,1436
Espinosad D	<0,0001	0,049	0,0004	Etoprofos	0,392	0,199	0,5222
Tebuconazol	0,271	0,049	0,1406	Flusilazole	0,405	0,353	0,0074
Metoxifenozida	0,322	0,408	0,0207	Penconazol	0,413	0,030	0,0913
Hexaconazol	0,336	<0,0001	0,0252	Piraclostrobin	0,332	0,162	0,0397

H_{02} : Existen diferencias significativas entre los porcentajes de recuperación de los métodos.

H_{03} : Existen diferencias significativas entre los porcentajes de recuperación en los diferentes tipos de polen.

Los resultados de la Tabla 4 muestran que solo para carbendazim y espinosad D se rechaza H_{01} ($p < 0,05$), lo cual indica que la recuperación de estos compuestos depende tanto del tipo de polen como del método que se emplee. Por otro lado, probabilidades para H_{02} , inferiores a 0,05, indican que se rechaza la hipótesis nula y se concluye que la recuperación es estadísticamente diferente entre los dos métodos evaluados. Al observar detalladamente estos resultados y compararlos con las Figuras 4 y 5, se puede concluir que la recuperación del método modificado es mejor ($p < 0,05$) para compuestos como acefato, tiabendazol, cimoxanil, azoxistrobina, hexaconazol, neonicotinoides, entre otros, pues sus porcentajes de recuperación son mayores (ver Figuras 4 y 5) y son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$). Asimismo, se encuentra que sólo para tebuconazol se tiene un porcentaje de recuperación estadísticamente mejor ($p < 0,05$), para el caso del método sin modificar.

Las probabilidades obtenidas para H_{03} indican que para los compuestos que presentaron valores inferiores a 0,05, se tienen diferencias en la recuperación dentro de los diferentes tipos de polen. Sin embargo, al realizar una prueba de Tukey se encontró que sólo para dimetoato se tiene una recuperación estadísticamente diferente para el método modificado; los compuestos restantes las diferencias se dieron en el método QuEChERS. Lo anterior implica que el método modificado presenta mejores porcentajes de recuperación y estos no varían de manera significativa ($\mu = 0,05$) al usar otros tipos de polen.

Conclusiones

En este estudio se encontró que el método QuEChERS modificado, en general, tiene mejores límites de detección, mejores porcentajes de recuperación, mejor selectividad y mejores precisiones. Por otro lado, se evidenció que para 16 de los 58 plaguicidas del presente estudio, se presentaron porcentajes de recuperación mejores usando el método modificado y solo para tebuconazol, se presentó un porcentaje de recuperación inferior, aunque no menor al 70 %. Finalmente, se encontró que solo para dimetoato, carbendazim y espinosad D se tiene que los porcentajes de recuperación dependen del tipo de polen en el método modificado y sólo para tres compuestos se encontraron porcentajes de recuperación inferiores al 70 %.

Agradecimientos

Expresamos nuestros agradecimientos al Centro de Bio-Sistemas y a la Dirección de Investigación, Creatividad e Innovación de la Universidad Jorge Tadeo Lozano por su apoyo y financiación a través del proyecto 009-2012: "Evaluación de residuos de contaminantes químicos en productos apícolas como indicador ambiental". De Igual manera agradecemos a Andrea Paola Ahumada por la revisión en la traducción y la revisión realizada.

Bibliografía

- Pettis, J. Overview of the Honey Bee. En: Pesticide Risk Assessment for Pollinators. Ed. Wiley Online Library, New York: Wiley. pp. 3–4. 2014
- Mullin, CA; Frazier, M; Frazier JL; Ashcraft, S; Simonds, R., High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health. *PLoS ONE*. 2010 5(3): e9754
- Bogdanov, S. Contaminants of Bee Products. *Apidologie*. 2006. 37(1):1–18.
- Johnson, RM.; Ellis, MD.; Mullin, CA.; Frazier, M. Pesticides and honey bee toxicity–USA. *Apidologie*. 2010.41(3): 312–331.
- Commission, E. Commission regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Off J Eur Union. L*. 2010. 15(1): 1-12.
- Codex Alimentarius Commission. Colombia 2001. Disponible en: http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/310/cxs_012e.pdf [Consultado el 10 de Agosto de 2015]
- Fernández, M.; Picó, Y. Analytical methods for pesticide residue determination in bee products. *Journal of Food Protection*. 2002. 65(9): 1502–1511.
- Bargańska, Z.; Olkowska, E.; Dymerski, T.; Namiesnik, J. Determination of Pesticide Residues in Honey using the GC× GC-TOFMS Technique. *J Bioprocess Biotech*. 2001. 4(182):2-10.
- Kasiotis, KM.; Anagnostopoulos, C.; Anastasiadou, P.; Machera, K. Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC–MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees. *Science of The Total Environment*. 2014. 485:633–642.
- Masia, A.; Blasco, C.; Picó, Y. Last trends in pesticide residue determination by liquid chromatography–mass spectrometry. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*. 2014. 2:11–24.
- Lehotay, S. J.; Maštovská, K.; Lightfield, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *Journal of AOAC International*. 2005 88(2): 615-629.
- Karageorgou, EG.; Samanidou, VF. Development and validation according to European Union Decision 2002/657/EC of an HPLC-DAD method for milk multi-residue analysis of penicillins and amphenicols based on dispersive extraction by QuEChERS in MSPD format. *J. Sep. Sci*. 2011. 34(15):1893–1901.
- Ahumada, DA.; Arias, LA.; Bojacá, CR. Multiresidue determination and uncertainty analysis of pesticides in soil by ultrafast liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2013. 24(7):1188–1197.
- Mastovska, K.; Dorweiler, KJ.; Lehotay, SJ.; Wegscheid, JS.; Szpylka, KA. Pesticide Multiresidue Analysis in Cereal Grains Using Modified QuEChERS Method Combined with Automated Direct Sample Introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS Techniques. *J. Agric. Food Chem*. 2009. 58(10):5959–5972.
- Moreno-González, D.; Huertas-Pérez, JF.; García-Campaña, AM.; Gámiz-Gracia, L. Determination of carbamates in edible vegetable oils by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a new clean-up based on zirconia for QuEChERS methodology. *Talanta*. 2014. 128:299–304.
- Padilla-Sánchez, J.; Plaza-Bolaños, P.; Romero-González, R.; Garrido-Frenich, A.; Martínez Vidal, J. Application of a QuEChERS based method for the simultaneous extraction of chlorophenols, alkylphenols, nitrophenols and cresols in agricultural soils, analyzed by using gas chromatography-triple quadrupole-mass spectrometry/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2010. 1217(36):5724–5731.
- Pinto, C.; Laespada, M.; Martín, S.; Ferreira, A.; Pavún, J.; Cordero, B. Simplified QuEChERS approach for the extraction of chlorinated compounds from soil samples. *Talanta*. 2010. 81(1-2):385–391.
- Gómez-Pérez, ML.; Plaza, BP.; Romero-González, R.; Martínez Vidal, JL.; Garrido-Frenich, A. Comprehensive qualitative and quantitative determination of pesticides and veterinary drugs in honey

- using liquid chromatography–Orbitrap high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2012. **1248**:130–138.
19. Romero-González, R.; Aguilera-Luiz, MM.; Plaza-Bolaños, P.; Frenich, AG.; Vidal, JLM. Food contaminant analysis at high resolution mass spectrometry: Application for the determination of veterinary drugs in milk. *Journal of Chromatography A*. 2011. **1218**(52):9353–9365.
 20. García-Chao, M.; Agruña, MJ.; Calvete, GF.; Sakkas, V.; Llopart, M.; Dagnac, T. Validation of an off line solid phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of systemic insecticide residues in honey and pollen samples collected in apiaries from NW Spain. *Analytica Chimica Acta*. 2010. **672**(1-2):107–113.
 21. Wiest, L.; Buleté, A.; Giroud, B.; Fratta, C.; Amic, S.; Lambert, O.; et al. Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*. 2011. **1218**(34):5743–5756.
 22. Rodríguez, D.; Díaz, C.; Zamudio, A.; Ahumada, DA. Evaluation of pesticide residues in pollen from Cundiboyacense high-plateau (Colombia). *VITAE*. 2012. **19**(1):S303–S305.
 23. Ahumada, D A.; Zamudio, A.; Análisis de residuos de plaguicidas en tomate mediante el uso de QuEChERS y cromatografía líquida ultrarrápida acoplada a espectrometría de masas. *Rev Col Quim*. 2011. **40**(2):227–246.
 24. Ahumada, D A.; Zamudio, AM.; España, JC. Matrix Effect in Pesticide Analysis by Ultra Fast Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry. *Journal of Chemical Brazilian Society*. 2012. **23**(4): 661-669.
 25. Blacquiere, T.; Smagghe, G.; Van Gestel, C. A.; Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 2012. **21**(4):973-992.
 26. Anastassiades, M.; Lehotay, SJ. 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*. 2003. **86**(2):412–431.
 27. Ahumada, DA.; Rodríguez, D.; Zamudio, A.; Mojica A. Comparison of different approaches to estimate limits of detection for pesticide residues analysis in food. *Rev Col Quim*. 2012. **41**(2):227–242.
 28. European Commission. Unión Europea. 2011. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/guidance_documents/docs/qualcontrol_en.pdf [Consulta 10 de Agosto de 2015]
 29. Hasegawa, Y.; Suyama, Y.; Seiwa, K. Variation in Pollen-Donor Composition among Pollinators in an Entomophilous Tree Species, *Castanea crenata*, Revealed by Single-Pollen Genotyping. *PLoS ONE*. 2015. **10**(3): 111-120.
 30. Montgomery, D. Design and analysis of experiments. 7a ed. New York, Wiley. Pp 239-146.2009
 31. Mojica, A.; Guerrero, JA. Extracción de residuos de plaguicidas en suelos asistida por ultrasonido. *Rev Col Quim*. 2010. **39**(3):371–387.
 32. BIPM, I., IFCC, I., IUPAC, I., & ISO, O. Francia.2008.. Disponible en: <http://www.bipm.org/en/publications/guides/vim.html> [Consulta 10 de Agosto de 2015].

Article citation:

Ahumada-F, D. A.; Mojica-C., A.; Vanoy, M. N.; Zamudio-S., A. Comparación de dos métodos para el análisis multiresiduo de plaguicidas en polen. *Rev Colomb Quim*. 2014. **43**(3): 24-34.