



Adriana M. Zamudio S.<sup>1,\*</sup>, Nicolás Vanoy V.<sup>1</sup>, Consuelo Díaz-Moreno<sup>2</sup>,  
Diego A. Ahumada F.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Inocuidad Química. Centro de Bio-Sistemas. Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Bogotá D.C.

<sup>2</sup>Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos - ICTA. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C.

<sup>3</sup>Subdirección de metrología Química y Biomedicina. Instituto Nacional de Metrología de Colombia

\*Autor para correspondencia: [adriana.zamudio@utadeo.edu.co](mailto:adriana.zamudio@utadeo.edu.co)

Recibido: 11 de Septiembre de 2016. Aceptado: 25 de Enero de 2017.

## Desarrollo y validación de un método multiresiduo para el análisis de plaguicidas en miel por UFLC-MS

### Resumen

Se desarrolló un método para la determinación de residuos de plaguicidas en miel de abejas mediante cromatografía líquida ultra rápida acoplada a espectrometría de masas (cuádruplo sencillo). Se partió del método QuEChERS, evaluando las siguientes variables: (i) cantidad de muestra, (ii) tipo de sal para el control de pH, (iii) valor de pH del buffer y (iv) mezclas de limpieza. Adicionalmente y con el propósito de demostrar la confiabilidad del método, se evaluaron diferentes parámetros como exactitud, límites de detección y cuantificación, linealidad y selectividad. Los resultados mostraron que, mediante las modificaciones realizadas, se logró obtener un método más selectivo y se mejoró la exactitud de 19 plaguicidas respecto al método QuEChERS original. Por otro lado, mediante el proceso de validación, se encontró que el método es apto para el análisis de 50 plaguicidas (de 56 que se emplearon). Se obtuvieron porcentajes de recuperación entre el 70 y 120% y coeficientes de variación inferiores al 15%

**Palabras clave:** plaguicidas, QuEChERS, miel, validación.

## Development and validation of a multiresidue method for pesticide analysis in honey by UFLC-MS

### Abstract

A method for the determination of pesticide residues in honey by ultra fast liquid chromatography coupled with mass spectrometry was developed. For this purpose, different variations of the QuEChERS method were performed: (i) amount of sample, (ii) type of salt to control pH, (iii) buffer pH, and (iv) different mixtures for cleaning-up. In addition, to demonstrate that the method is reliable, different validation parameters were studied: accuracy, limits of detection and quantification, linearity, and selectivity. The results showed that by means of the changes introduced it was possible to get a more selective method that improves the accuracy of about 19 pesticides selected from the original method. It was found that the method is suitable for the analysis of 50 pesticides, out of 56. Furthermore, with the developed method recoveries between 70 and 120% and relative standard deviation below 15% were found.

**Keywords:** pesticides, QuEChERS, honey, validation.

## Desenvolvimento e validação de um método de resíduos múltiplos para o análise de agrotóxicos em mel por UFLC-MS

### Resumo

Foi desenvolvido um método para a determinação de resíduos de pesticidas no mel por cromatografia líquida ultrarrápida acoplada à espectrometria de massa. Para este efeito, foram realizadas diferentes variações do método QuEChERS: (i) quantidade de amostra, (ii) tipo de sal para o controle do pH, (iii) valor do pH do tampão, (iv) diferentes misturas de limpeza. Além disso, a fim de demonstrar que o método é confiável, diferentes parâmetros foram validados como: precisão, limite de detecção e quantificação, linearidade e seletividade. Os resultados mostraram que, por meio das modificações é possível obter um método mais seletivo que melhora a precisão de cerca de 19 pesticidas selecionados, respeito ao método original. Adicionalmente, foi determinado que a validação do método estabeleceu que este é adequado para a análise de 50 pesticidas (56 foram utilizados). Foram obtidos percentagens de recuperação entre 70 e 120% e coeficientes de variação menores ao 15%.

**Palavras-Chave:** pesticidas, QuEChERS, mel, validação

## Introducción

El sector apícola está relacionado con el desarrollo natural de los ecosistemas y con el avance económico a nivel agrícola y pecuario, puesto que tiene función protagónica en la polinización y, por tanto, en la sustentabilidad de la producción agrícola. Del mismo modo, es importante por el valor nutricional de sus productos. Dada su importancia para la agricultura, su desarrollo es imprescindible para alcanzar la seguridad y soberanía alimentaria que requiere el país (producción de alimentos, cantidad, calidad, inocuidad, trazabilidad y sostenibilidad), pues a medida que se incrementa el desarrollo apícola, se aporta mayor beneficio ambiental, económico y social para todo el sector agrícola. Pese a su importancia, la apicultura enfrenta importantes retos productivos causados, principalmente, por el efecto antrópico en los ecosistemas y el cambio climático (1).

Siguiendo con la importancia de la apicultura, gracias a la polinización entomófila se mantiene aproximadamente un tercio de los cultivos y la mayor parte de la flora silvestre (2). Se calcula que en los últimos años la polinización ha representado un beneficio económico global alrededor de los 265 mil millones de euros, correspondientes al precio de las cosechas que dependen de la polinización natural; se estima que sin esta herramienta se bajaría la productividad agrícola hasta en un 75% (2).

Así bien, para efectuar el proceso de polinización, entre 10000 y 25000 abejas obreras realizan en promedio diez viajes por día, para lo cual exploran aproximadamente un radio de 3 km en los alrededores de su hábitat (3,4). Durante este proceso, microorganismos, sustancias químicas y partículas en el aire entran en contacto con ellas (5). Por lo anterior, las abejas y los productos de la colmena sirven como bioindicadores para el monitoreo de plagas, contaminación de origen industrial o urbano y/o prácticas agrícolas que puedan ser perjudiciales (6).

Entre dichas prácticas agrícolas se encuentra el control químico de plagas, de mayor impacto para el ecosistema, pues trae como principal consecuencia un aumento en la frecuencia y dosis de exposición a pesticidas por parte de las abejas. Por lo anterior, la actual regulación para plaguicidas químicos no solo está orientada a la protección del consumidor, sino que también busca la protección de las abejas como principales polinizadores en la naturaleza (2).

Ahora bien, el análisis de residuos contaminantes orgánicos en productos apícolas se realiza mediante dos tipos de métodos: los presuntivos y los de confirmación. En el primer grupo se encuentran los inmunoensayos y los métodos microbiológicos. En el segundo los métodos de confirmación que, según el Codex Alimentarius, se basan en técnicas instrumentales avanzadas como la electroforesis capilar y la cromatografía líquida de alta eficiencia acopladas a espectrometría de masas (HPLC-MS) (7, 8). Diferentes entes de control como la Administración de medicamentos y alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) y la Unión Europea han establecido la necesidad de contar con métodos que permitan realizar la cuantificación y confirmación de los residuos (7, 8, 21, 22), por lo cual los métodos instrumentales tienen mayor ventaja en este caso (9-11).

En el análisis de muestras de miel, debido a la complejidad de la matriz y a que es necesario realizar exhaustivos procesos de limpieza, se han reportado diversos métodos, entre ellos el QuEChERS modificado (12). Aunque este método resulta ser una excelente alternativa cuando se dispone de analizadores de masas en tándem, al emplear detectores convencionales como fluorescencia, nitrógeno-fósforo, captura de electrones o inclusive un espectrometrómetro de masas con un cuadrupolo sencillo, la cantidad de interferentes limita el uso del método en un número elevado de compuestos o impide la obtención de límites de cuantificación acordes con la legislación (13, 14).

En este sentido, este trabajo tuvo como objetivo desarrollar un método para la determinación de 56 plaguicidas de diferentes familias químicas en muestras de miel, mediante el empleo de UFLC (cromatógrafo líquido ultra rápido por sus siglas en inglés) acoplado a un analizador de masas de cuadrupolo simple. De igual modo, se buscó demostrar la aptitud del método mediante una validación de nivel 2 (15).

## Materiales y métodos

### Materiales, reactivos y soluciones

Se trabajó con estándares de plaguicidas de pureza mayor al 95%, provenientes de las casas comerciales Dr Ehrenstorfer y Chemservice. Las soluciones madre fueron preparadas en concentraciones cercanas a 500 µg/mL en acetonitrilo o metanol y almacenadas en frascos ámbar a -20 °C. Los solventes empleados en este estudio fueron J.T. Baker grado HPLC. Para los ensayos de extracción se utilizaron sales de QuEChERS Restek Q-Sep TM y para la limpieza de los extractos se emplearon los adsorbentes Restek dSPE Q-Sep TM. Los detalles de preparación mezclas y del estándar interno se encuentran en trabajos previos (16, 17).

### Mieles de partida

Se emplearon cuatro mieles obtenidas de apiarios experimentales y mieles comerciales provenientes del altiplano cundiboyacense y del departamento del Meta en Colombia. Todo el material fue analizado antes y durante todo el proceso de desarrollo del método analítico, con el propósito de asegurar que no se tuviera presencia de ninguno de los plaguicidas estudiados, así como de controlar los procesos de contaminación cruzada.

### Método de extracción de partida

Se partió del método QuEChERS para mieles (18). En un tubo de centrífuga se pesaron 5 g de muestra, se adicionó TPP (fosfato de trifenilo) y la mezcla de plaguicidas (concentraciones entre 0,1 y 5 µg/mL). Se dejó en reposo por 15 min y, transcurrido ese tiempo, se adicionaron 10 mL de agua y 10 mL de acetonitrilo; se agitó de manera manual por 1 min y, posteriormente, se adicionaron 4 g de MgSO<sub>4</sub> anhidro y 1 g de AcONa; nuevamente se agitó manualmente por 1 min. Después, se centrifugó a 6000 rpm por 5 min y se tomaron 10 mL del sobrenadante, que se transfirió a un tubo de centrífuga de 15 mL.

Para el proceso de limpieza, por cada mililitro de extracto se adicionaron 25 mg de amina primaria/secundaria (PSA, por sus siglas en inglés) y 150 mg de  $MgSO_4$  anhidro, se agitó manualmente por 30 s y se centrifugó por 2 min a 6000 rpm. Se tomaron 5 mL de extracto y se concentraron con un flujo de nitrógeno hasta llevar a casi sequedad, posteriormente se adicionaron 20  $\mu$ L del EI y se reconstituyó con 1 mL de una mezcla Agua-ACN (7:3). Finalmente, el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0,22  $\mu$ m de PTFE y se transfirió a un vial de cromatografía (19). Durante el desarrollo del método, en todos los experimentos se realizó un mínimo de cinco réplicas.

### Estudio de los adsorbentes

Una vez establecidas las mejores condiciones en la etapa de extracción de los compuestos, con el propósito de mejorar la selectividad del método, se procedió a estudiar el empleo de diferentes adsorbentes para la limpieza de los extractos. De acuerdo a la composición química de las mieles, se considera que los principales compuestos que interfieren en el proceso de detección de los plaguicidas pueden ser vitaminas, fenoles, pigmentos, aminoácidos, ácidos orgánicos e inclusive azúcares (28). La reducción de la presencia de ácidos, aminoácidos y azúcares, como se mencionó en la sección experimental, se realizó a través del empleo de PSA y sulfato de magnesio. De esta manera, para mejorar el proceso de limpieza se adicionaron otros adsorbentes: octadecilsilano (C18; 20 mg por cada mL de extracto) y carbón negro grafitizado (CNG; 20 mg por cada mL).

### Calibración analítica y análisis de datos

Se realizó un proceso de evaluación de efecto matriz previo a la cuantificación de cada analito. Se encontraron porcentajes de efecto matriz entre 69% y 130%, resultados que concuerdan con estudios previos (17, 20). Por lo anterior se realizaron también diferentes niveles de calibración en blancos de matriz. Para el caso de los ensayos de recuperación, se cuantificó con un solo punto de calibración, de acuerdo a las recomendaciones del documento SANTE (20). Para la evaluación de la linealidad del sistema, se preparon las curvas de calibración que estaban compuestas por seis puntos de calibración en blanco de matriz, cada uno de ellos se inyectó cuatro veces en el sistema analítico; los puntos se distribuyeron equidistantemente. Todos los análisis estadísticos se realizaron a través del paquete estadístico R Commander a un nivel de confianza del 95% (22).

### Validación del sistema de medición.

Con el fin de demostrar que el sistema de medición funcionaba adecuadamente, se realizó una validación de nivel 2, consistente en evaluar: selectividad, exactitud, linealidad, límites de detección y límites de cuantificación.

Por otro lado, para la evaluación de la exactitud del método, como recuperación y precisión en condiciones de repetibilidad y de precisión intermedia, se fortificaron muestras de miel a tres niveles de concentración. El primer nivel (LC) correspondía al límite máximo de residuos, una concentración inferior a este o en su defecto concentraciones cercanas a 10  $\mu$ g/kg. El segundo y tercer nivel de fortificación correspondieron a 2 y 5 veces el primer nivel (LC).

### Instrumentos y equipos

#### Condiciones cromatográficas

El análisis cromatográfico fue llevado a cabo en un UFLC 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  $\times$  2 mm d.i., tamaño de partícula de 2,1  $\mu$ m 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, se mantiene por 0,3 min, posteriormente llega hasta 55% en 8,5 min y luego aumenta hasta el 100% en los siguientes 1,5 min. Finalmente, se mantiene por 1,5 min (17). El volumen de inyección fue 5  $\mu$ L, la temperatura de columna 40 °C y el flujo de fase móvil 0,3 mL/min.

#### Condiciones de la interfaz y espectrómetro de masas

Con el propósito de obtener una mejor sensibilidad para la identificación y cuantificación de los 56 plaguicidas en estudio, se trabajó con dos métodos de adquisición independientes: un estándar interno (TBP) y un estándar subrogado (TPP) Aunque las condiciones cromatográficas fueron las mismas, las condiciones de la interfaz y del espectrómetro variaron. En este sentido, el equipo operó en modo electrospray, 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 200 °C y 250 °C y a 210 °C y 250 °C para el primer (Grupo 1 de compuestos) y segundo método de adquisición (Grupo 2 de compuestos), respectivamente (16, 17).

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 SIM. La Tabla 1 muestra los iones seleccionados para la cuantificación y el tiempo de retención de cada compuesto: las tres primeras columnas muestran las condiciones para el método de adquisición 1, mientras que las tres últimas columnas son para el método de adquisición 2. Estos compuestos fueron seleccionados acorde con la legislación nacional e internacional (23), el nivel de afectación a las abejas, su uso en Colombia, sensibilidad en el instrumento y la disponibilidad del material de referencia para la calibración del instrumento.

**Tabla 1.** Iones de cuantificación (T) para los compuestos estudiados y tiempos de retención para los dos métodos de adquisición empleados

MÉTODO 1			MÉTODO 2		
Compuesto	t <sub>retención</sub> (min)	Ion T (m/z)	Compuesto	t <sub>retención</sub> (min)	Ion T (m/z)
Acefato	2,56	201	Metamidofos	2,54	142
Monocrotofos	2,78	241	propamocarb	2,63	189
Oxamil	2,91	237	Tiociclam	2,68	182
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-dicloropropilanolida	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	Piraclostrobin	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

NOTA: los signos negativos en los iones representan que se realizó la detección en modo negativo

## Resultados y discusión

### Estudio de la relación cantidad de muestra/solvente de extracción

Con el propósito de obtener límites de cuantificación acordes con la legislación existente para mieles (23), se partió del método europeo (citratos) y se realizaron ensayos en los que se incrementó la cantidad de muestra desde 3 g hasta 10 g y otros en los que se disminuyó la cantidad de solvente de 10 mL a 5 mL.

Se encontró que los porcentajes de recuperación de varios compuestos como el metalaxil, acefato, oxamilo, entre otros, disminuyeron notablemente. Asimismo, la cantidad de interferencias que se obtuvieron al incrementar la relación muestra/solvente de extracción impidió la detección adecuada de varios compuestos. En este sentido, como parte del desarrollo del método y en vista de los resultados obtenidos en esta primera etapa se decidió trabajar con 5 g de muestra y 10 mL de solvente orgánico e incluir una etapa de concentración de la muestra.

## Selección del sistema de amortiguación de pH

Debido a que el método QuEChERS presenta dos versiones, reconocidas como métodos oficiales para el análisis de residuos de plaguicidas, se evaluaron las dos con el propósito de determinar cuál es la más adecuada. La primera corresponde al método AOAC 2007.01 (19) (Método A), en la que se usa acetato de sodio para realizar el control de pH en el proceso de extracción. La segunda versión del método considera el uso de sales de citrato y corresponde a la versión europea del método EN 15662 (26), (método B).

Los resultados mostraron que, mediante el método A, 14 compuestos presentaron interferencias que impidieron realizar la integración de las señales cromatográficas; para el método B se presentaron 13 interferencias. Lo anterior supone que, debido a una baja selectividad de los métodos, no es posible la cuantificación de cerca del 24% de los compuestos bajo estudio. La Figura 1 muestra los compuestos que presentaron interferencias y una recuperación inferior al 70% en al menos uno de los métodos. Por otro lado, los compuestos restantes presentaron recuperaciones entre el 70% y el 120%, recuperación que se considera aceptable para este tipo de determinaciones (21).

Se realizó un análisis de varianza con el propósito de evaluar si existen diferencias significativas ( $\alpha = 0,05$ ) entre las medias de los porcentajes de recuperación. Los resultados no fueron del todo concluyentes, pues para la mayoría de los casos no se presentaron diferencias significativas entre los sistemas evaluados. Sin embargo, al comparar con los criterios de la Unión Europea, se encuentra que sí se observan diferencias, por ejemplo, para dinotefuran se encontró una probabilidad de aceptar  $H_0$  mayor a 0,05. No hay diferencias significativas, pero en la Figura 1 se encuentra que, con el método B, este compuesto cumple con lo establecido por la Unión Europea. Por este motivo, los análisis estadísticos se omitieron en este estudio y todos los resultados y discusión se centran en lo establecido en los criterios de la Unión Europea para este tipo de métodos analíticos.

Como se observa en la Figura 1, existen casos críticos en los que la recuperación se encuentra por debajo del 50%, por ejemplo espinosad (A y D) y carbendazim; los demás compuestos presentan valores de recuperación muy cercanos al 70%. Por otro lado, en la evaluación de las precisiones de cada uno de los métodos, se encontró que mediante el método A, se presentaron coeficientes de variación superiores al 15% en 11 casos, mientras que para el método B se encontraron 8 casos.

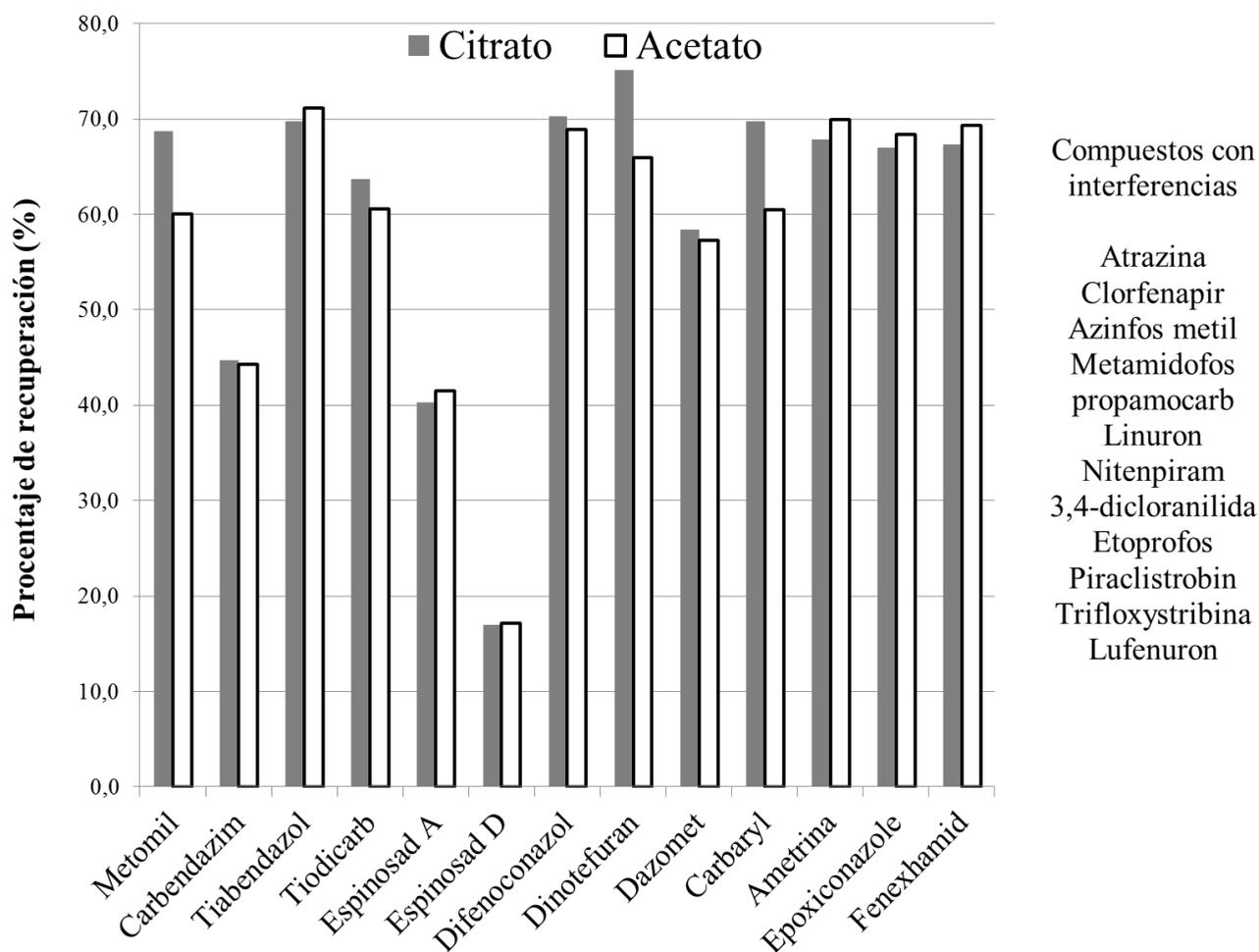


Figura 1. Comparación de los porcentajes de recuperación al emplear acetato o citrato como sal de control de pH

El método B mostró una mejor exactitud, reflejada en mejor selectividad, mayor número de compuestos con recuperación aceptable y menor dispersión en los resultados.

Los resultados indicaron que, para el caso de los plaguicidas estudiados y la matriz de interés, resulta más conveniente realizar la extracción con las sales de citrato, es decir empleando el método B. Sin embargo, es de resaltar que la versión europea del método, además de las sales de citrato, incluye NaCl, lo cual incrementa la fuerza iónica y, por consiguiente, mejora la transferencia de los analitos a la fase orgánica. Por lo anterior, se decidió trabajar con este sistema amortiguador de pH.

### Adición de las sales

El método original indica que las sales de citrato, el NaCl y el  $MgSO_4$ , se adicionan una vez se agrega el agua a la miel y se homogeniza esta mezcla. Durante este proceso, se observó que las sales se aglomeraban y su dispersión a través de la mezcla de extracción (miel-agua-acetonitrilo) no era sencilla de realizar. Adicionalmente, hubo un calentamiento significativo, debido a la hidratación del  $MgSO_4$ , por lo cual se decidió disolver las sales de citrato y NaCl para realizar su adición junto con el agua. Entonces, en lugar de adicionar sólo agua para el proceso de homogenización de la sal, se adicionaron 10 mL de una solución amortiguadora de citratos (pH = 6,8), la cual tenía la cantidad de sales equivalente al método QuEChERS, a excepción del  $MgSO_4$ .

Posterior a esta adición, se realizó una homogenización de la mezcla, se adicionó el acetonitrilo y se realizó la extracción con agitación por 10 min en un vórtex, luego se destapó el tubo y se realizó la adición del  $MgSO_4$ ; se agitó manualmente. Algunos de los resultados obtenidos a través de estas modificaciones se presentan en la Figura 2. Se encontró que las modificaciones realizadas al método mejoran los resultados en la exactitud del método de manera notable.

La Figura 2 muestra que, para 8 de los 12 compuestos que no se recuperaron con el método tradicional, se obtuvieron porcentajes superiores al 70%, lo cual indica que el sesgo del método disminuyó. Sin embargo, de acuerdo a estos resultados, carbendazim, tiodicarb, dazomet y espinosad (A y D) siguen presentando porcentajes de recuperación bajos.

La mejora en la recuperación se atribuye a varios factores: por un lado, el proceso de extracción se realizó sin la presencia del  $MgSO_4$  en la mezcla de la miel, puesto que este se adiciona hasta el final de este proceso; adicionalmente, al realizar la extracción con solo la disolución amortiguadora y el acetonitrilo, se obtiene un sistema más homogéneo (no hay aglomeraciones) y no se dan procesos de calentamiento por la adición del  $MgSO_4$  en el momento de la extracción. Por otro lado, posiblemente se tenga un mejor control del pH al adicionar la disolución amortiguadora, de lo contrario, solo hasta que se disolviera la totalidad de las sales de citrato en la mezcla, se lograría el control del pH debido a la viscosidad de la miel.

Sumado a lo anterior, cuando se realiza la adición del  $MgSO_4$  a la mezcla (al final de la extracción), el calor liberado parece disiparse más rápidamente pues, si bien se forma la aglomeración del método original, esta es más fácil y rápida de disolver a través de la agitación manual. Se cree que el uso del vórtex también contribuye al aumento de los porcentajes de recuperación pues facilita la transferencia de masa del analito hacia la fase orgánica y se aplica durante un mayor tiempo, lo que garantiza que exista un equilibrio mayor. Finalmente, las modificaciones realizadas al método no redujeron la cantidad de compuestos con interferencias, es decir, con este método se obtuvo el mismo número de compuestos que no se pudieron determinar debido a problemas de selectividad. Incluso, en los perfiles cromatográficos obtenidos para los blancos con el uso de este método, se observó una mayor cantidad de ruido en comparación con el método original. Lo anterior es atribuido a las modificaciones realizadas, pues junto con los analitos existe una mayor cantidad de compuestos de la matriz que se coextraen.

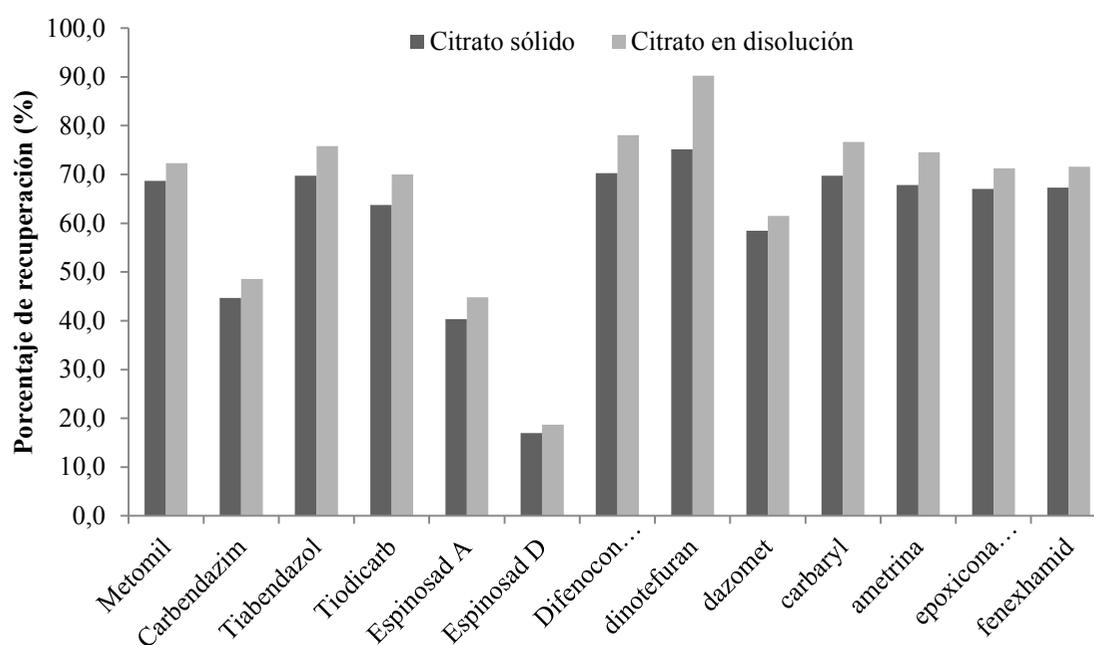


Figura 2. Comparación del modo de adición de las sales de citrato para el control del pH en la extracción de plaguicidas en miel

### pH de disolución amortiguadora

En diferentes trabajos se encuentran estudios relacionados con la influencia del pH sobre la recuperación de algunos compuestos (26, 27). Sin embargo, en todos los estudios se menciona el término *pH aparente*, pues esta magnitud es medida en acetonitrilo y no en una solución acuosa. En este sentido y acorde con la instrumentación y materiales de referencia con los que se cuenta para la calibración de los instrumentos de pH, se optó por evaluar la influencia del pH de la disolución de amortiguación sobre la exactitud de los analitos. Para ello se ajustaron las disoluciones con ácido fórmico a 4 diferentes valores de pH; la Figura 3 muestra un resumen de los resultados obtenidos. Allí se presenta el promedio de recuperación de todos los compuestos, el número de compuestos que tienen porcentajes de recuperación inferiores a 70% y el número de compuestos para los que el método no es preciso, es decir, porcentajes de coeficiente de variación superiores al 15%.

La Figura 3 muestra que al comparar los tres valores más altos de pH, se encuentra que estos no varían de manera considerable, igual que el número de compuestos con recuperaciones bajas o dispersiones altas. Sin embargo, para los dos valores de pH más bajos se observa que, tanto la recuperación como la precisión del método, es incrementada, pues tienen solo 6 y 2 compuestos con % CV mayores al 15%; para el valor de pH más bajo se tienen solo 3 compuestos con recuperaciones inferiores al 70%.

El incremento de la precisión y de la recuperación de los compuestos a pH bajos, se atribuye a una mayor estabilidad de los compuestos a estos valores de pH (25). En diferentes reportes se encuentra que el valor de "pH aparente" (en acetonitrilo), donde la extracción de los plaguicidas fue más eficiente, se encuentra entre 5,5 y 5,8. Esto indica que, posiblemente, el resultado de la mezcla de la miel con las disoluciones amortiguadoras de valores de pH más bajos (5 y 5,5) proporcionan valores de pH en el sistema de extracción (miel + disolución) similar a este valor de pH aparente, reportado en otros estudios (19).

La estabilidad de los compuestos no solo puede originar errores sistemáticos (como menores porcentajes de recuperación), sino también puede originar errores aleatorios: pequeños cambios en otras magnitudes de influencia como la temperatura o el tiempo de extracción suponen un aumento de estos errores. En este sentido, el mejor promedio en los porcentajes de recuperación de los compuestos se logra con el pH más bajo, valor al que la mayoría de los compuestos presentan los menores errores sistemáticos.

Sin embargo, en este valor de pH, cualquier mínimo cambio en otra variable de influencia genera un aumento en los errores aleatorios, por lo cual se presentan mayores coeficientes de variación que para el valor de pH de 5,5. De esta manera, al realizar la extracción a un pH de 5,5 se tiene un punto de equilibrio entre el control del error sistemático y el error aleatorio, pues, como se puede observar en la Figura 3, es donde se tiene una mejor exactitud. Por lo tanto, a partir de este ensayo se concluye que, dentro de los valores de pH evaluados, la mejor condición corresponde a 5,5.

Finalmente, los compuestos que presentaron porcentajes de recuperación menores al 70% a pH 5 correspondieron a los isómeros del espinosad y carbendazim. Para el caso de los primeros no fue posible encontrar los valores de pKa, por lo cual se cree que estos compuestos sufren algún tipo de hidrólisis o descomposición que impide una adecuada extracción. Para el caso del carbendazim, el pKa es 4,48, por tanto, es posible que al encontrarse la molécula ionizada la extracción por parte de un solvente orgánico no sea eficiente (19).

### Adsorbentes de limpieza

La Tabla 2 muestra un resumen de los resultados obtenidos a través del uso de diferentes sistemas de limpieza. Es de aclarar que para este estudio se partió de blancos de miel, se obtuvieron extractos libres de plaguicidas, se mezclaron y fueron fortificados antes del proceso de limpieza, lo cual buscaba reducir la variación producida por el proceso de extracción (29).

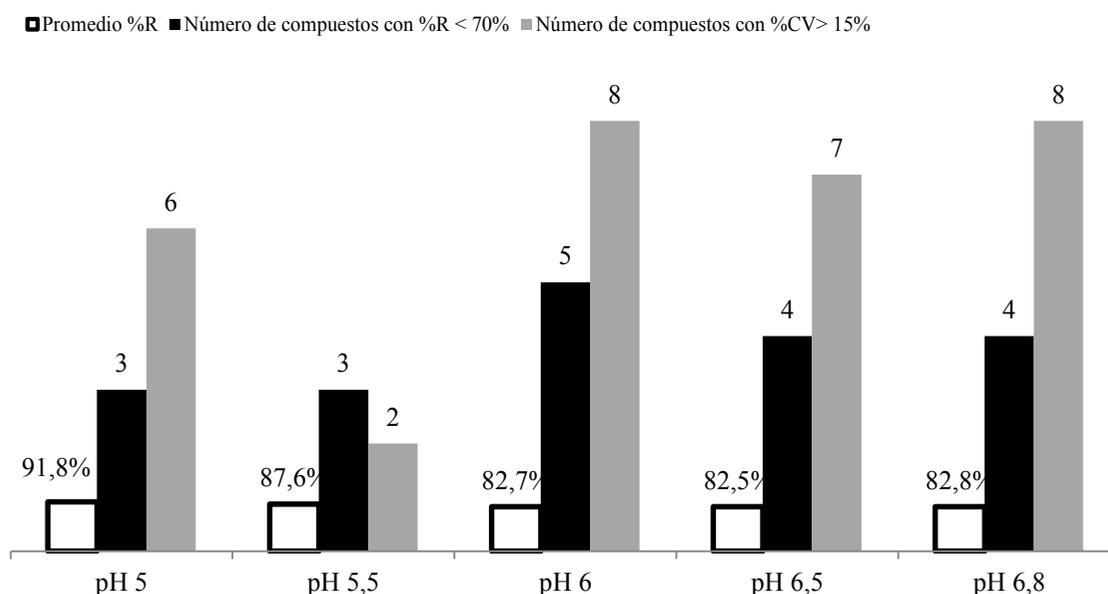


Figura 3. Porcentajes de recuperación promedio (%R), número de compuestos con %R inferiores a 70% y con coeficientes de variación (%CV) mayores al 15% para los diferentes valores de pH evaluados

**Tabla 2.** Porcentajes de recuperación obtenidos en la evaluación de diferentes sistemas de limpieza

Nombre del compuesto	Promedio % de recuperación			
	PSA	PSA + CNG	PSA + C18	PSA + C18 + CNG
Metamidofos	I	I	87,6	80,2
Propamocarb	I	I	93,5	90,2
Linuron	I	I	100,9	96,8
Nitempiram	I	I	100,3	95,3
3,4-dicloropropinalidina	I	I	97,3	99,2
Etoprofos	I	I	98,2	90,2
Piraclostrobin	I	94,4	97,4	92,3
Trifloxtribina	I	I	100,3	98,3
Lufenuron	I	94,0	103,4	92,7
Tiociclam	I	I	I	I
Atrazina	I	I	100,1	91,2
Clorfenapyrid	I	I	96,8	92,9
Azinfos metil	I	I	I	I

I: Compuesto con interferencia que no permitió determinar el porcentaje de recuperación

La Tabla 2 evidencia que el empleo de otro tipo de adsorbentes mejora la selectividad de los compuestos, pues se observa un descenso en el número de compuestos con interferentes, respecto a la limpieza únicamente con PSA para cualquiera de los sistemas evaluados. También se observa que la mejor alternativa para la limpieza de los extractos es el C18, pues mejoró la selectividad para casi la totalidad de los compuestos en los dos conjuntos de ensayos en los que se usó.

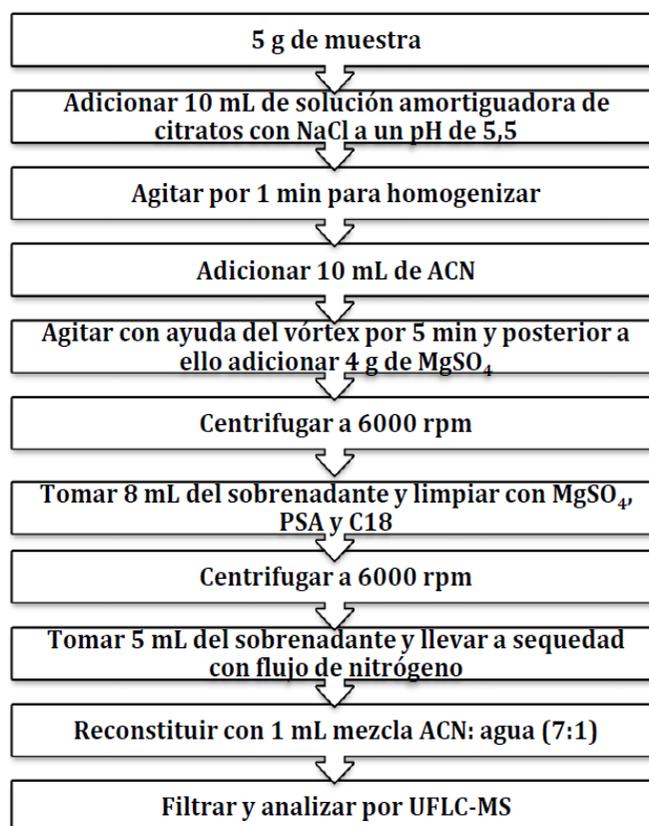
Para el caso de tiociclam y de metil azinfos, no se pudo mejorar la selectividad del método, a pesar de que se realizaron algunos experimentos adicionales en los que se aumentó la cantidad de adsorbentes usados; en su lugar se obtuvieron porcentajes de recuperación menores para algunos compuestos.

Para el caso específico del Tiociclam, debido a su naturaleza polar (ver tiempos de retención en la Tabla 1), se cree que es necesario realizar otro tipo de limpieza como cromatografía de intercambio iónico, de columna en fase normal o la adición de otro adsorbente más polar como la sílica, pues el interferente debe ser de la misma naturaleza. Para el caso del metil azinfos se considera que la interferencia de origen tiene una estructura muy similar a este compuesto.

Por otra parte, se encuentra que el uso de CNG no contribuye de manera significativa a la mejora de la selectividad del método, pues los resultados indican que permite la reducción de interferentes para sólo tres compuestos. Asimismo, al observar el último sistema que incluye C18 y PSA, se encuentra que el carbón no aporta de manera significativa, al contrario, para algunos compuestos los porcentajes de recuperación son inferiores, lo cual se debe posiblemente a la adsorción de los analitos generada por la mayor área superficial que se tiene.

El acetonitrilo es un solvente conocido por no extraer demasiados compuestos de naturaleza lipídica así como compuestos de elevada polaridad como el caso de los azúcares.

Sin embargo, el aumento de la fuerza iónica en el sistema de extracción a través del  $MgSO_4$  y del  $NaCl$ , inducen a que se extraigan este tipo de compuestos junto con los analitos. En este sentido, se considera que el empleo de C18 reduce notablemente la cantidad de interferentes, debido a la adsorción de este tipo de compuestos que tienen baja solubilidad en acetonitrilo. Adicionalmente, es posible que exista un efecto sinérgico al hacer uso de PSA y C18, pues las señales producidas por los interferentes químicos se redujeron a lo largo de todo el cromatograma. Finalmente, la Figura 4 describe el esquema general del método desarrollado.

**Figura 4.** Esquema general del método desarrollado para el análisis de residuos de plaguicidas en miel a través de UFLC-MS

### Validación del sistema de medición

La selectividad del método se evaluó a través del uso de cuatro diferentes tipos de miel, los cuales se diferenciaban por su origen. Los resultados obtenidos en esta evaluación mostraron resultados idénticos a los reportados en la Tabla 2 (sistema PSA + C18), es decir, el método es selectivo para todos los analitos de interés excepto para metil azinfos y tiociclam.

En las Tablas 3 y 4 se presentan las concentraciones de fortificación, los resultados de exactitud y los límites de detección del método. Los límites de detección reportados, fueron estimados a partir de diferentes aproximaciones (30) y para todos los casos en el proceso de confirmación se encontró que la relación señal/ruido era superior a 3.

Tabla 3. Resultados obtenidos en la validación del método desarrollado. Grupo de compuestos 1- Método de adquisición 1

Compuesto	Concentración de fortificación más baja ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	%Recuperación al LC	%Recuperación a 5 x LC	%Recuperación del método*	%CV máximo en condiciones de precisión intermedia	LD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Acefato	13,17	85,1	87,3	86,2	15,52	4,93
Oxamilo	9,96	91,6	88,0	80-103,8**	10,41	4,24
Monocrotofos	9,78	103,2	90,5	80,4-111	11,58	4,12
Metomil	10,07	87,2	78,6	82,9	6,48	2,81
Carbendazim	8,21	49,8	47,1	18,8-70,1	17,55	ND
Tiabendazol	12,55	94,5	84,2	72,3-97,9	12,28	6,12
3OH-carbofuran	11,34	98,7	88,0	85-105,2	7,36	3,19
Dimetoato	10,70	97,1	83,2	90,2	8,09	1,36
Cimoxanil	79,75	92,5	88,4	90,4	11,29	23,58
Carbofuran	8,92	97,3	95,9	96,6	9,62	2,51
Tiodicarb	8,32	86,5	83,2	84,9	16,18	2,23
Pirimicarb	5,87	93,2	83,0	72,8-94,9	14,02	2,05
Atrazina	5,95	93,9	91,0	92,5	11,84	1,19
Metalaxilo	5,94	99,0	96,9	98	10,16	1,15
Imazalil	8,21	94,0	83,7	73,8-100,7	6,95	2,19
Dimetomorf	13,13	100,9	102,3	101,6	11,60	5,66
Pirimetanil	8,70	91,0	78,5	84,8	11,43	3,83
Azosxitroquina	6,01	102,1	104,5	103,3	10,08	1,63
Espinosad A	14,69	51,7	49,6	32,4-58,5	6,52	ND
Tebuconazol	15,95	93,5	93,7	81,9-102,5	12,80	1,98
Metoxifenozida	13,24	100,6	100,1	93,2-104,5	8,54	2,51
Hexaconazol	10,93	95,0	99,3	87,1-108,4	13,03	2,85
Espinosad D	14,69	37,1	39,7	38,4	6,91	ND
Difenoconazol	88,36	90,5	88,6	75,4-102,4	7,80	14,63
Benalaxilo	6,47	97,1	97,3	97,2	10,86	1,37
Clorfenapir	198,94	95,0	87,5	72,8-98	13,62	61,20
azinfos metil	6,99	281,1	411,9	80,9-1033,4	81,99	ND
Indoxacarb	28,75	91,9	95,7	82,1-99	8,36	6,15

\*Estimado a partir de los resultados de precisión intermedia. Para los casos en los que se presentó heterocedasticidad entre las diferentes concentraciones evaluadas se presenta el intervalo de porcentajes de recuperación.

ND: No determinado para este compuesto.

Tabla 3. Resultados obtenidos en la validación del método desarrollado. Grupo de compuestos 2- Método de adquisición 2

Compuesto	Concentración de fortificación más baja ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	%Recuperación al LC	%Recuperación a 5 x LC	%Recuperación del método*	%CV máximo en condiciones de precisión intermedia	LD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Metamidofos	41,70	88,9	96,5	92,7	13,85	6,15
Propamocarb	12,48	92,4	103,3	97,9	15,53	4,20
Dinotefuran	10,99	89,5	88,7	80-106,6	15,09	3,17
Linuron	18,96	91,8	85,1	73,6-99,5	15,12	7,20
Nitenpiram	13,46	85,6	102,9	94,3	12,94	2,95
Thiametoxan	16,67	97,3	97,3	97,3	4,43	4,75
Dazomet	52,03	84,4	83,9	70,1-111	14,85	18,02
Mevinphos	16,97	92,5	87,8	73,5-111	11,64	7,77
Imidacloprid	169,95	93,8	105,8	99,8	16,54	57,03
Acetamiprid	66,45	102,9	95,9	88,7-105,8	12,12	11,13
Tiacloprid	16,71	111,0	110,4	110,7	9,15	2,65
Simazina	5,87	98,5	97,3	97,9	12,02	0,85
Carbaryl	38,95	96,2	103,9	87,6-112,9	9,32	7,13
Isoprocarb	44,11	93,7	86,2	90	14,95	9,53
Ametrina	13,26	91,6	98,1	94,9	9,35	1,36
3,4-dicloranilida	9,03	92,6	104,7	77,5-115,8	10,35	0,95
Tridemoprh	74,91	99,7	79,9	74,5-101,2	19,46	17,17
Epoxiconazole	85,22	97,4	105,8	81,1-119,1	14,30	24,26
Fenexhamid	41,48	78,4	94,9	86,7	13,20	9,32
Etoprofos	30,08	86,8	91,3	89,1	12,28	8,70
Flusilazole	14,88	99,7	111,1	96,8-115,3	7,52	4,92
Penconazol	12,42	94,6	110,5	102,6	11,09	2,41
Piraclistrobin	11,31	38,6	21,9	12,9-68,6	21,14	ND
Trifloxystribina	8,46	89,3	102,8	81,3-113,5	10,27	1,46
Lufenuron	8,57	31,5	32,7	32,1	34,59	ND
Benfuracarb	7,76	100,9	102,2	84,1-111,9	13,77	2,28
Temefos	65,46	88,8	94,7	75,2-112,8	16,98	29,00
Buprofezin	11,44	79,2	94,0	86,6	14,30	4,71

\*Estimado a partir de los resultados de precisión intermedia. Para los casos en los que se presentó heterocedasticidad entre las diferentes concentraciones evaluadas se presenta el intervalo de porcentajes de recuperación.  
 ND: No determinado para este compuesto.

Las Tablas 3 y 4 muestran que para la mayoría de los compuestos se presentaron porcentajes de recuperación entre el 70% y 120%, por lo cual se puede concluir que el método presenta un error sistemático aceptable, a excepción de carbendazim, espinosad (A y D), lufenuron y piraclostrobina, cuyos porcentajes de recuperación fueron inferiores al 70%.

Por otro lado, se encontró que el máximo %CV para cada uno de los analitos, en general, es inferior al 15%, lo cual cumple con el criterio de la Unión Europea (21). Sin embargo, para algunos compuestos se observa que este %CV supera el 15%, pero debe tenerse en cuenta que el criterio de la Unión Europea se establece para compuestos en condiciones de repetibilidad, y que el %CV presentado en las Tablas 3 y 4 se obtiene para condiciones de precisión intermedia (interanalistas). Por lo tanto, se considera que para todos los casos el método es preciso, a excepción de los casos en los que el método no es selectivo (tiociclám y metil azinfos) o presenta una recuperación inadecuada (menor al 70%).

La evaluación de la linealidad del sistema de medición se realizó a través de diferentes pruebas como: ANOVA, falta de ajuste, significancia de la pendiente y del intercepto, entre otras (16). Todos los resultados indicaron que el sistema es lineal en el intervalo de concentraciones presentadas en la Tabla 5.

## Conclusiones

Se logró desarrollar y validar un método para el análisis de residuos de plaguicidas en mieles, basado en una extracción líquido-líquido con acetonitrilo y posterior limpieza a través de extracción en fase sólida dispersiva. En el proceso de desarrollo del método, se encontró que la homogenización de la miel con una solución amortiguadora a un pH de 5,5 incrementa la exactitud del método.

**Tabla 5.** Intervalo lineal del método analítico

Compuesto	Intervalo lineal (ng/mL)	Compuesto	Intervalo lineal (ng/mL)
Acefato	18,8-188,2	Metamidofos	59,6-595,7
Oxamil	14,2-142,3	Propamocarb	17,8-178,2
Monocrotofos	14-139,7	Dinotefuran	15,7-157
Metomil	14,4-143,9	Linuron	27,1-270,8
Carbendazim	11,7-117,2	Nitenpiram	19,2-192,2
Tiabendazol	17,9-179,3	Thiametoxan	23,8-238,1
3OH-carbofuran	16,2-161,9	Dazomet	74,3-743,2
Dimetoato	15,3-152,9	Mevinphos	24,2-242,4
Cymoxanyl	113,9-1139,3	Imidacloprid	242,8-2427,8
Carbofuran	12,7-127,4	Acetamiprid	94,9-949,3
Thiodicarb	11,9-118,8	Tiacloprid	23,9-238,8
Pirimicarb	8,4-83,9	Simazina	8,4-83,8
Atrazina	8,5-84,9	Carbaril	55,6-556,4
Metalaxil	8,5-84,9	Isopocarb	63-630,1
Imazalil	11,7-117,2	Ametrina	18,9-189,5
Dimetomorf	18,8-187,6	3,4-dicloropropinalidina	12,9-129
Pirimetanil	12,4-124,3	Tridemoprh	107-1070,1
Azoxistrobin	8,6-85,8	Epoxiconazole	121,7-1217,5
Spinosad	21-209,8	Fenexamid	59,3-592,6
Tebuconazol	22,8-227,8	Etoprofos	43-429,7
Metoxifenozida	18,9-189,2	Flusilazole	21,3-212,6
Hexaconazol	15,6-156,1	Penconazol	17,7-177,4
Spinosad	21-209,8	Piraclostrobina	16,2-161,5
Difenoconazol	126,2-1262,2	Trifloxystribina	12,1-120,8
Benalaxil	9,2-92,4	Lufenuron	12,2-122,4
Clorfenapyrid	284,2-2841,9	Befurcarb	11,1-110,9
Azinfos metil	10-99,8	Temefos	93,5-935,1
Indoxacarb	41,1-410,7	Buprofezin	16,3-163,4

Por otro lado, la selectividad del método mejoró notablemente al realizar uso de una mezcla de octadecilsilano (C18) y sílica funcionalizada con aminas (PSA). Por su parte, el proceso de validación indicó que el método es selectivo, preciso, lineal y exacto para 50 de los 56 plaguicidas empleados. Finalmente, se encontró que el método no es selectivo para 2 de los compuestos estudiados y no es exacto para 4.

## Agradecimientos

Expresamos nuestros agradecimientos al Centro de Bio-Sistemas y a la Dirección de Investigación, Creatividad e Innovación de la Universidad de Bogotá 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*; al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos - ICTA. Universidad Nacional de Colombia y al Proyecto de investigación de CORPOICA “Efecto de factores genéticos, medio ambientales y de manejo sobre la calidad y la producción de miel y polen en cinco cultivos frutícolas promisorios exportables de Colombia”, financiado por Colciencias.

## Referencias

- Verde, M. M. Apicultura y seguridad alimentaria. *Cuban J. Agric. Sci.* **2014**, *48*, 25-31.
- Greenpeace. El declive de las abejas. Peligros para los polinizadores y la agricultura de Europa [Internet]. 1st ed. Amsterdam: Greenpeace; p. 45. Report No.: 1. [http://www.greenpeace.org/espana/Global/espana/report/Agricultura-ecologica/el\\_declive\\_de\\_las\\_abejas.pdf](http://www.greenpeace.org/espana/Global/espana/report/Agricultura-ecologica/el_declive_de_las_abejas.pdf) [Consultado 27 de marzo de 2016].
- Przybylowski, P.; Wilczynska A. Honey as an environmental marker. *Food Chemistry*. **2001**, *74*, 3, 3289–291. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00153-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00153-4).
- Balayiannis, G.; Balayiannis, P. Bee Honey as an environmental bioindicator of Pesticides' Occurrence in Six Agricultural Areas of Greece. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2008**, *55* (3), 462–470. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-007-9126-x>.
- Anderson, J.; Wojtas, M. Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) contaminated with pesticides and polychlorinated biphenyls. *J. Econ. Entomol.* **1986**, *79*, 1200–1205. DOI: <https://doi.org/10.1093/jee/79.5.1200>.
- Rissato, R.; Galhiane, M.; Knoll, F.; de Andrade, R. Método multiresiduo para monitoramento de contaminação ambiental de pesticidas na região de Bauru (SP) usando mel como bio-indicador. *Quim. Nova*. **2006**, *29* (5), 950-961. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000500012>.
- OMS F. Programa conjunto fao/oms sobre normas alimentarias comité del codex sobre métodos de análisis y toma de muestras 29.ª reunión Budapest (Hungria), 10–14 de marzo de 2008 [Internet]. 1st ed. Budapest; p. 20. Report No.: CX/CF 08/2/10. [ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/CCCF/cccf2/cf02\\_10s.pdf](ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/CCCF/cccf2/cf02_10s.pdf) (Consultado 27 de Agosto de 2016).
- OMS F. Programa conjunto fao/oms sobre normas alimentarias comité del codex sobre aditivos alimentarios y contaminantes 38ª reunión La Haya, Países Bajos, 24-28 de abril de 2006. ALINORM 06/29/12 Mayo de 2006 [www.fao.org/input/download/report/657/al29\\_12s.pdf](http://www.fao.org/input/download/report/657/al29_12s.pdf) (Consultado 27 de Agosto de 2016).
- Cháfer-Pericás, C.; Maquieira, A.; Puchades, R. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *TRAC, Trends Anal. Chem.* **2010**, *29* (9) 1038–1049. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2010.06.004>.
- Tette, P.; Guidi, L.; Abreu, G.; Fernandes, C. Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods. *Talanta*. **2016**, *149*, 124-141. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.11.045>.
- Niell, S.; Jesús, F.; Pérez, C.; Mendoza, Y.; Díaz, R.; Franco, J. et al. QuEChERS adaptability for the analysis of pesticide residues in beehive products seeking the development of an agroecosystem sustainability monitor. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 4484-4492. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00795>.
- Rial-Otero, R.; Gaspar, E.; Moura, I.; Capelo, J. Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: An overview. *Talanta*. **2007**, *71* (2), 503–514. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2006.05.033>.
- Rodríguez, D.; Díaz, A.; Ahumada-Forigua D.; Guerrero J. Desarrollo y optimización de una metodología multiresiduo por método Simplex para el análisis de plaguicidas en miel de abejas *Rev. Colomb. Quim.* **2013**, *42* (1), 16–30.
- Orso, D.; Martins, M.; Donato, F.; Rizzetti, T.; Kemmerich, M.; Adaime, M. Multiresidue determination of pesticide residues in honey by modified QuEChERS method and gas chromatography with electron capture detection. *J. Braz. Chem. Soc.* **2014**, *25* (8), 355–1364. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20140117>.
- Peters, F.; Drummer, O.; Musshoff, F. Validation of new methods. *Forensic Sci. Int.* **2007**, *165*, 2, 216–224. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.forciint.2006.05.021>.
- Ahumada-Forigua, D.; Zamudio A. Análisis de residuos de plaguicidas en tomate mediante el uso de QuEChERS y cromatografía líquida ultrarrápida acoplada a espectrometría de masas. *Rev. Colomb. Quim.* **2011**, *40* (2), 227–246.
- Ahumada-Forigua, D.; Zamudio, A.; España, J. Matrix Effect in Pesticide Analysis by Ultra Fast Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry. *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 661-669. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532012000400011>.
- Blasco, C.; Vazquez-Roig, P.; Onghena, M.; Masia, A.; Picó, Y. Analysis of insecticides in honey by liquid chromatography–ion trap-mass spectrometry: Comparison of different extraction procedures. *J. Chromatogr. A*. **2011**, *1218*, 4892–4901. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.045>.
- Anastasiades, M.; Lehotay, S. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *J. AOAC Int.* **2003**, *86* (2), 412–431.
- Ahumada-Forigua, D.; Guerrero, J. Estudio del Efecto Matriz en el Análisis de Plaguicidas por Cromatografía de Gases. *VITAE*, **2010**, *17* (1), 51–58.
- SANTE/11945. Method Validation and quality Control Procedures for pesticide residues analysis in food and feed. [http://ec.europa.eu/food/plant/docs/plant\\_pesticides\\_mrl\\_guidelines\\_wrkdoc\\_11945\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/docs/plant_pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945_en.pdf) (Consultado 28 de Agosto de 2016)

22. The R Project for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/> (Consultado 28 de Agosto de 2016).
23. Unión Europea. Reglamento (CE) No 396/200. Límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal. <http://eur-lex.europa.eu/lexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:070:0001:0016:es:PDF> (Consultado 28 de Agosto de 2016)
24. García, C.; Herrero, S.; Pérez, J.; Moreno, B. A simplified Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe approach for the determination of trihalomethanes and benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in soil matrices by fast gas chromatography with mass spectrometry detection. *Anal. Chim. Acta.* **2011**, *689* (1), 129–136. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.01.023>
25. Payá, P.; Anastassiades, M.; Mack, D.; Sigalova, I.; Tasdelen, B.; Oliva, J. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 1697–1714. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1610-7>.
26. Anastassiades, M.; Tasdelen, B.; Scherbaum, E.; Stajnbaher, D. (eds). *Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis*. Pesticide chemistry: crop protection, public health, environmental safety; Wiley-VCH, Weinheim, 2007; pp. 89-101.
27. Kole, P.; Venkatesh, G.; Kotecha, J.; Sheshala, R. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomedical Chromatography*. **2011**, *25*, 199–217. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/bmc.1560>.
28. White, J. Composition of honey, In: *Honey, A Comprehensive survey*; Crane, R., Ed.; Wiley: New York, 1975; pp 157–206.
29. Ahumada-Forigua, D.; Aparicio, L.; Fuentes, J.; Guerrero, J.; Checa, B. Comparación de dos aproximaciones para la estimación de la incertidumbre en análisis de residuos de plaguicidas mediante cromatografía de gases. *Rev. Colomb. Quim.* **2012**, *41* (3), 377–394.
30. Ahumada-Forigua, D.; Rodríguez, D.; Zamudio, A.; Mojica, A. Comparison of different approaches to estimate limits of detection for pesticide residues analysis in food. *Rev. Colomb. Quim.* **2012**, *41* (2), 227–242.

**Article citation:**

Zamudio, A. M.; Vanoy, N.; Díaz-Moreno, C.; Ahumada, D. A. Desarrollo y validación de un método multiresiduo para el análisis de plaguicidas en miel por UFLC-MS *Rev. Colomb. Quim.* **2017**, *46* (2), 24-36. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v46n2.63014>