

Nota Técnica**Análisis multiresiduo de 41 pesticidas en miel por LC-MS/MS: evaluación de dos métodos de clean-up**

Niell Silvina¹, Cesio Verónica², Hepperle Julia³, Roux Daniela³, Kirsch Larissa³, Kolberg Diana³, Anastassiades Michelangelo³, Heinzen Horacio²

¹*Polo Agroalimentario y Agroindustrial, Departamento de Química del Litoral, Centro Universitario Paysandú, Universidad de la República. Paysandú, Uruguay.*

²*Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, General Flores 2124, 11800, Montevideo, Uruguay.*

³*CVUA Stuttgart, European Union Reference Laboratory-Single Residue Methods, Fellbach, Alemania. Correo electrónico: heinzen@fq.edu.uy*

Recibido: 23/3/12 Aceptado: 9/5/13

Resumen

El monitoreo de residuos de pesticidas en miel es importante debido al riesgo potencial que estos representan para la salud y porque ambientalmente permite obtener información de los pesticidas que han sido usados en los cultivos alrededor de la colmena. Para que los resultados tengan relevancia real es importante elegir cuidadosamente cuáles pesticidas monitorear. La selección de los 41 pesticidas evaluados se realizó en base a la probabilidad de ser encontrados en miel y productos de la colmena, determinada mediante la frecuencia de aparición de muestras positivas en la bibliografía y en la base de datos pesticides-online. Se consideraron además datos recientes de la importación de pesticidas en Uruguay. Se presenta una simple variación del método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) para la determinación de residuos de pesticidas en miel. Se evaluaron dos métodos de clean-up: *freeze-out* (extracto a -20 °C durante 15 h) y d-SPE (Extracción en Fase Sólida dispersiva) utilizando como sorbente PSA (Primary and Secondary Amine). Los pesticidas fueron determinados por LC-MS/MS (QTrap) en modo positivo y negativo. Las recuperaciones estuvieron entre 81-111% para el clean-up dispersivo con excepción de cinco pesticidas ácidos que si se recuperaron al realizar *freeze-out* (recuperaciones entre 80-114% con excepción de tres pesticidas). Los porcentajes de DER (Desviación Estándar Relativos) fueron menores a 16% en un mismo día y menores a 20% entre distintos días para la mayoría de los pesticidas. Todos los pesticidas presentaron buenas linealidades con $R^2 > 0,99$ en el rango 0,01-0,4 mg/L. La mayoría de los pesticidas presentan límites de cuantificación de 0,01 mg/kg que es el menor límite máximo de residuos establecido por la Unión Europea para miel. Este método se ajusta al doble objetivo de evaluar la calidad de las mieles uruguayas, cumpliendo con conceptos de seguridad alimentaria, facilitar el comercio internacional así como encaminar los intentos de utilizar la colmena como bioindicador de calidad ambiental de una región.

Palabras clave: análisis multiresiduo, pesticidas, miel, LC-MS/MS

Summary**Multiresidue Analysis of 41 Pesticides in Honey by LC-MS/MS: Evaluation of Two Clean-up Methods**

Monitoring of pesticide residues in honey is important due to the risk they pose to human health, but also from an environmental point of view, because they provide relevant data on the pesticides that have been used in the hive surroundings. Which pesticides are monitored is crucial for the real significance of the results obtained. The selection of the 41 pesticides employed in this study was based on their relevance for bee products as reflected by the frequency of residue findings in the literature and

the pesticides-online database. Recent data concerning the import of pesticides in Uruguay were also considered. A simple variation of the QuEChERS method (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) for the pesticide multiresidue analysis of honey is presented. Two clean-up methods were evaluated: freeze-out (extract placed at -20 °C for 15 h) and d-SPE (dispersive Solid Phase Extraction) using PSA (Primary and Secondary Amine) as sorbent. Pesticides were determined by LC-MS/MS (QTrap) in positive and negative mode. Recoveries were between 81-111 % for the dispersive clean-up except for five acidic pesticides which were recovered by freezing-out (recoveries between 80-114% except for three pesticides). RSD percentages (Relative Standard Deviation) were less than 16% in one day and less than 20% between different days for most of the studied pesticides. All pesticides showed good linearity, with $R^2 > 0.99$ in the range 0.01-0.4 mg/L. Most of the studied pesticides have a limit of quantification of 0.01 mg/kg which is the lowest maximum residue limit set by the European Union for honey. This method serves the double purpose of evaluating the quality of Uruguayan honeys, in terms of food safety with commerce exchange parameters, as well as an input provider for the use of the hive as a bioindicator of environmental quality of a region.

Key words: multiresidue analysis, pesticides, honey, LC-MS/MS

Introducción

Del monitoreo de residuos de pesticidas en miel es posible coleccionar datos relevantes con relación al riesgo potencial que representan para la salud de los consumidores, pero además se obtiene información de los pesticidas que han sido usados en los cultivos alrededor de las colmenas de donde esta proviene (Porrini *et al.*, 2002, 2003; Rissato *et al.*, 2007; Balayiannis y Balayiannis, 2008). Recientemente se han realizado distintos monitoreos y estudios en Europa y Estados Unidos encontrándose residuos de pesticidas en productos de la colmena (Porrini *et al.*, 2003; Fell y Cobb, 2009; Johnson *et al.*, 2010; Mullin *et al.*, 2010), lo que ha motivado el establecimiento de medidas rígidas de control para-arancelario que regula la entrada de productos apícolas en esos mercados. La determinación de residuos de pesticidas en miel se realiza empleando métodos multi-residuo, donde un número elevado de pesticidas es monitoreado en una sola determinación analítica. El problema que se presenta muchas veces en un método multiresiduo es cuáles pesticidas pueden o no ser analizados para que los resultados tengan relevancia real. Esta selección define el alcance del método y su aplicabilidad y generalmente se hace en base a la disponibilidad instrumental para realizar estas determinaciones. Existen distintos métodos analíticos para el análisis de residuos en miel donde se utiliza, para la determinación instrumental de los pesticidas, tanto cromatografía líquida como gaseosa acoplada a detectores clásicos como arreglo de diodos, detector fotométrico de llama, de nitrógeno y fósforo, así como detectores de última generación como masas en tándem (Fernandez *et al.*, 2002a, 2002b; Herrera *et al.*, 2005; Pirard *et al.*, 2007; Rissato *et al.*, 2007; Bargańska y Namieczenik, 2010; Bonzini *et al.*,

2011; Tomasini *et al.*, 2011; Wiest *et al.*, 2011). Las ventajas de los detectores de masa en tándem comparados con los detectores clásicos son su exactitud en la determinación del compuesto, y su capacidad para detectar concentraciones de pesticidas mucho más bajas (Fernandez *et al.*, 2002a; Wiest *et al.*, 2011).

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

Materiales y métodos

Reactivos y estándares

Se utilizó acetonitrilo (MeCN) y metanol de calidad HPLC de Merck (Darmstadt, Germany). El agua fue desionizada en el laboratorio con un purificador de agua Millipore (Billerica, MA, USA) Direct-Q 3. Se utilizó formiato de amonio de Sigma-Aldrich Buchs, sulfato de magnesio anhidro ppa de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) y ácido fórmico pa (98–100%) de Merck. El sorbente amina primaria y secundaria (Bondesil-PSA, 40 μ m) utilizada es de Varian (Palo Alto, CA, USA). Los estándares analíticos de pureza $\geq 95\%$ son de Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany), Riedel-de Haen (Seelze, Germany) y LGC Promochem (Wesel, Germany). Las soluciones stock de estándares de 1 mg/mL se prepararon en acetonitrilo, considerando la pureza del estándar, pesando cada estándar analítico individualmente en matraces aforados disolviendo y llevando a volumen.

Las soluciones mezcla de estándares de trabajo se prepararon mezclando y diluyendo exacta y apropiadamente múltiples soluciones stock con acetonitrilo. Todas las soluciones se conservaron en la oscuridad por debajo de 4 °C. La solución stock del estándar interno (EI) Clorpirifos deuterado se preparó de la misma forma que las soluciones stock de pesticidas. La solución de trabajo del EI se preparó a una concentración de 10 mg/L en acetonitrilo y se agregó a las muestras al inicio de la preparación de muestras. Una dilución apropiada de esta solución a 1 mg/L en acetonitrilo se utilizó para la preparación de los estándares de calibración.

Instrumentos

Se trabajó con pipetas automáticas adecuadas para volúmenes de 10-100 μL , 200-1000 μL y 1-10 mL de Eppendorf (Hamburg, Germany), balanzas analíticas con capacidad de medir hasta 0,1 mg o hasta 0,01 g de Mettler-Toledo (Greifensee, Switzerland), dispensador automático OPUS model (20 o 50 mL) de Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, Germany), tubos de centrifuga de 50 mL PP descartables con tapa rosca, 114×28 mm, de Sarstedt (Nümbrecht, Germany) y de 10 mL PP descartables con tapa rosca, 17×84 mm, de Simport (Beloeil, QC, Canada), dispensador de solvente de 10 mL para acetonitrilo de Eppendorf, centrifuga capaz de alcanzar al menos 3000 \times g, Rotana 460 model de Hettich (Tuttlingen, Germany), viales de autosampler de 1,5 mL y viales con tapa rosca de 20-mL de Ziemer GmbH (Mannheim, Germany), potes de plástico (apilables) para almacenar las sales de partición ya pesadas y mezcladas utilizados de Juro-Labs (Henfenfeld, Germany). Un divisor de muestras Repro highprecision de Bürkle (Bad Bellingen, Germany) se empleó para repartir los sólidos necesarios para la d-SPE. LC-MS/MS se realizó con un equipo de Waters (Milford, USA) Acquity UPLC system acoplado a un API 4000 Qtrap MS/MS de Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). La separación se realizó en una columna Phenomenex (Torrance, CA, USA) Aqua 150 mm×2 mm, 3 μm particle size, C18.

Análisis por LC-MS/MS: se empleó un gradiente con una fase móvil compuesta por A: formiato de amonio 5 mM en agua; B: formiato de amonio 5 mM en metanol. Se utilizó un flujo de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ comenzando con 100% A al momento de la inyección y se cambia gradualmente a 30% A (70% B) durante 3 min, luego se cambia a 15% A (85% B) durante 3 min a 300 $\mu\text{L}/\text{min}$, siguiendo a 10% A (90% B) durante 3 min. Esta composición de eluyente se mantuvo durante 3 min y luego se cambió en 0,5 min a las condicio-

nes iniciales (100% componente A) hasta completar 22 min post inyección. El volumen de inyección fue 5 μL . La detección en MS/MS se realizó en modo monitoreo de reacción múltiple (MRM) usando una interfase de ionización por electrospray (ESI) en modo de ionización positiva y negativa. El voltaje de ionización fue 4500 V, el gas de nebulización fue aire a 70 psi, y el *curtain gas* fue nitrógeno a 30 psi. La evaporación por solvente en la fuente fue asistida por un gas para secado (aire calentado a 425 °C/50 psi). Se realizaron numerosos experimentos utilizando soluciones de analitos por separado para determinar los modos de ionización y transiciones MRM óptimas, energías de colisión y potenciales de *declustering* para cada compuesto individualmente. Para esto se utilizó una bomba de jeringa a flujo constante para la inyección directa al equipo de MS/MS de la solución de estándar. Los parámetros del MS/MS utilizados en este estudio están listados en el Cuadro 1.

Preparación de muestras

Se probó la metodología de análisis multiresiduo denominada QuEChERS (Anastassiades *et al.*, 2007) y se compararon dos opciones (a y b) de purificación del extracto:

Extracción

En un tubo de centrifuga se pesa 5,00 \pm 0,01 g miel, se agrega 10 mL H_2O , 10 mL MeCN y 100 μL de Clorpirifos deuterado 10 mg/L (estándar interno) y se agita manualmente durante 1 minuto. Agregar la mezcla de sales previamente preparada: 4 g MgSO_4 anhidro, 1 g NaCl, 1 g $\text{Na}_3\text{citrato}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g $\text{Na}_2\text{Hcitrato}\cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$, agitar manualmente durante 1 minuto, centrifugar durante 5 min a 3000 \times g, tomar 6 mL sobrenadante.

Purificación

Opción a:

Freeze-out: Colocar el extracto en freezer a -20 °C durante 15 h. Filtrar inmediatamente al sacar del freezer por embudo con algodón. Tomar alícuota para inyectar en LC-MS/MS.

Opción b:

Extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE): colocar el extracto en un tubo de 10 mL conteniendo PSA (25 mg/mL) y MgSO_4 (150 mg/mL), agitar 30 segundos en vortex, centrifugar durante 5 min a 3000 \times g, tomar sobrenadante y colocar en vial de 20 mL, agregar Ácido Fórmico 5% en MeCN (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$), homogeneizar. Tomar alícuota para inyectar en LC-MS/MS.

Cuadro 1. Parámetros instrumentales del API 4000 Qtrap MS/MS utilizados en este estudio. DP: Declustering Potential; CE: Collision Energy; CXP: Cell Exit Potential,

Pesticida	Primera Transición m/z>m/z	DP	CE	CXP	Segunda Transición m/z>m/z	DP	CE	CXP	Tercera Transición m/z>m/z	DP	CE	CXP
Azoxistrobin	404,2>329	46	41	18	404,2>344,1	46	35	20	404,2>372,3	46	21	10
Boscalid	343,1>139,9	76	29	12	343,1>306,8	76	29	18				
Carbaril	202,2>127,1	46	39	8	202,2>145,1	46	13	10				
Carbendazim	192,2>132	56	43	22	192,2>160,1	51	25	10				
Carboxin	236,1>143,1	46	23	8	236,1>87	46	35	14	236,1>93,1	46	47	16
Clorpirifos-etil	351,9>200	61	25	1	351,9>97,1	61	53	4				
Clodinafop-propargil	350,1>238,2	41	31	4	350,1>266,1	41	23	4	352,1>268,2	41	23	4
Cihalotrina-lambda	467,1>225,1	51	23	12	467,1>450,1	51	15	6	469,1>452,1	56	13	6
Dimetoato	230,1>124,9	46	29	10	230,1>170,9	46	21	14	230,1>198,8	46	15	12
Epoxiconazol	330,1>121,1	51	29	8	330,1>75	51	101	6				
Hexitiazox	353,1>168	66	37	14	353,1>227,7	61	23	14	355,1>229,8	56	23	14
Imazalil	297,2>159,1	56	31	14	297,2>200,9	56	25	16	299,1>160,9	46	29	10
Imidacloprid	256,1>175	51	19	10	256,1>209	51	21	12	258,1>210,9	46	23	12
Iprodione	330,1>244,9	61	21	14	330,1>287,9	61	19	16	332,1>246,9	61	21	14
Linuron	249>159,9	61	25	10	249>182	61	23	12	251,1>161,9	61	27	14
Metalaxil	280,2>192,1	61	25	10	280,2>220,1	61	21	12	280,2>248,1	61	15	12
Metomilo	163,1>105,9	46	15	18	163,1>107,1	46	11	8	163,1>87,9	46	13	14
Metoxifenozone	369,3>149,1	21	23	4	369,3>313,2	21	15	6	369,3>91	21	61	4
Metolaclor	284,1>176,1	46	35	10	284,1>252	51	21	16	286,1>254	46	21	14
Metribuzin	215,2>187,1	66	25	12	215,2>74,1	66	49	12	215,2>84,1	61	31	14
Miclobutanil	289,2>125	61	49	8	289,2>70	61	37	12	291,2>70,1	56	43	12
Ometoato	214,1>124,9	51	31	8	214,1>154,8	51	23	14	214,1>182,9	51	17	12
Profenofos	373,1>128,1	41	55	4	373,1>302,9	41	25	4	375,0>304,9	41	25	4
Piraclostrobin	388,1>163	51	35	14	388,1>194	51	19	16				
Tebuconazol	308,1>125	51	55	4	310,1>70	51	43	4				
Tebufenozide	353,3>133	16	25	4	353,3>297,2	16	15	4				
Tetraconazole	371,9>159	61	49	10	371,9>70	61	51	4	372>159	81	39	14
Tiacloprid	253,1>126	41	29	4	255,1>128	41	27	4				
Tiametoxam	292>131,9	26	29	4	292>181,2	26	29	4	292>211,1	26	19	4
Tiodicarb	355>107,9	61	21	20	355>87,9	56	33	14				
Triflumuron	359,1>139	31	47	4	359,1>156,2	31	23	4	361,1>158	46	29	4
Amitraz	294,3>163,2	51	21	14	294,3>121,9	51	43	8	294,3>107,0	51	59	18
Flutriafol	302>70	41	45	12	302>123,1	41	43	8	302>95,1	41	73	6
Cumafos	336>227	81	37	12	336>306,9	81	25	18	363>334,9	81	23	20
Haloxifop	362,1>315,9	81	25	18	362,1>91	81	47	6	364,1>318	71	27	6
Imazapir	262,2>217	46	29	12	262,2>220	46	25	12	262,2>149	46	37	8
Metsulfuron metil	382,1>167	61	23	10	382,1>199	61	31	12	382,1>77,1	61	81	4
Dicamba	219>174,9	-40	-10	-9	220,9>176,9	-40	-10	-9				
Picloram	240,9>196,8	-50	-14	-11	238,9>194,9	-45	-14	-9	238,9>122,9	-45	-32	-7
Imazetapir	288,1>244,0	-55	-20	-1	288,1>200,9	-55	-32	-11	288,1>185,9	-55	-50	-9
Teflubenzuron	378,9>339	-25	-16	-12	378,9>195,9	-25	-32	0	381>197,8	-25	-30	0

Resultados y discusión

Para el presente estudio, la selección de los 41 pesticidas evaluados se realizó en base a la probabilidad de ser encontrados en miel y productos de la colmena, determinada mediante la frecuencia de aparición de muestras positivas en la bibliografía y en la base de datos pesticides-online (CVUA Stuttgart, 2007). Se consideraron además datos recientes de la importación de pesticidas en Uruguay (DGSA, 2010).

El método desarrollado es una simple variación del método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) (Anastassiades *et al.*, 2007) para la determinación de residuos de pesticidas en miel. Se evaluaron dos métodos de clean-up: *freeze-out* (extracto a -20°C durante 15 h) y d-SPE (Extracción en Fase Sólida dispersiva) utilizando como sorbente PSA (Primary and Secondary Amine). Los pesticidas fueron determinados por LC-MS/MS cromatografía líquida acoplada a masas en tándem (QTrap) en modo positivo y negativo.

La comparación entre las dos opciones de purificación se realizó evaluando cuál de los dos procedimientos permite alcanzar un valor más cercano al valor teórico que se debería obtener cuando se adiciona una cantidad preestablecida del pesticida a monitorear a la muestra blanco (previamente analizada para verificar que no contenga los pesticidas a estudiar). Este valor llamado recuperación es uno de los parámetros establecidos por las guías europeas para la validación de una metodología para análisis de residuos de pesticidas en alimentos de la Dirección General de Sanidad y de los Consumidores (DG-SANCO) (Pihlström, 2011). El parámetro «recuperación» se obtiene calculando

el porcentaje para cada pesticida que es posible determinar efectivamente luego de haber realizado todos los pasos del método analítico en una muestra blanco a la que se le adicionó previamente una cantidad exactamente conocida de pesticida. Estos resultados se resumen en la Figura 1. Se tomó para la evaluación y comparación el criterio establecido en la DG-SANCO que define como aceptables las recuperaciones que se encuentran entre 70 y 120%. Las recuperaciones para el clean-up dispersivo fueron aceptables para un método multiresiduo (81-111%) con excepción de los cinco pesticidas ácidos de los cuales Haloxifop e Imazapir fueron analizados con ionización positiva y Dicamba, Picloram e Imazetapir con ionización negativa (Figura 2).

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

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

Se observaron diferencias entre ambos clean-up para los pesticidas ácidos marcados en la Figura 2. Estos quedan retenidos al realizar el clean-up con PSA, pero sí se obtienen buenas recuperaciones con el *freeze-out*.

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

Estos métodos han sido desarrollados en un equipo LC MS/MS (Qtrap) similar al disponible en el Polo Agroalimentario y Agroindustrial de Paysandú de la Universidad de la República donde ya han sido reevaluados y validados

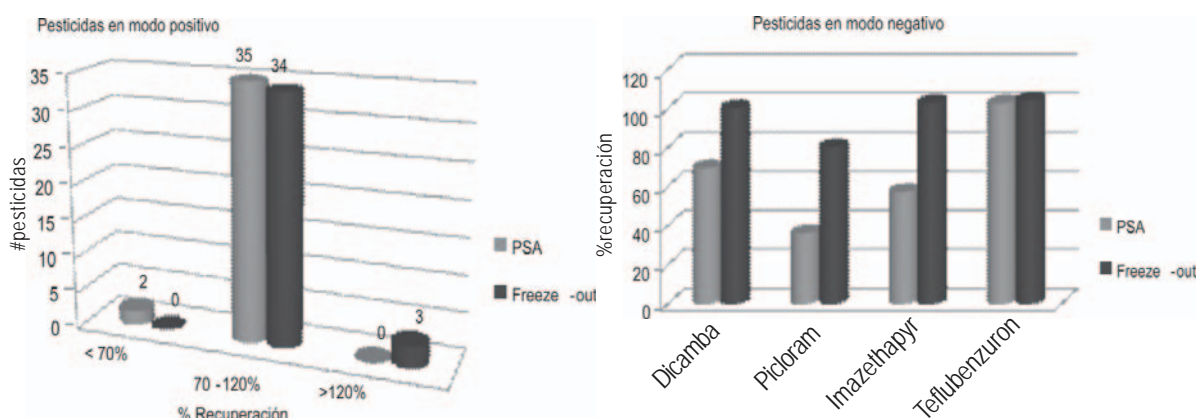


Figura 1. Recuperaciones de los pesticidas para las opciones de purificación y modos de ionización del estudio.

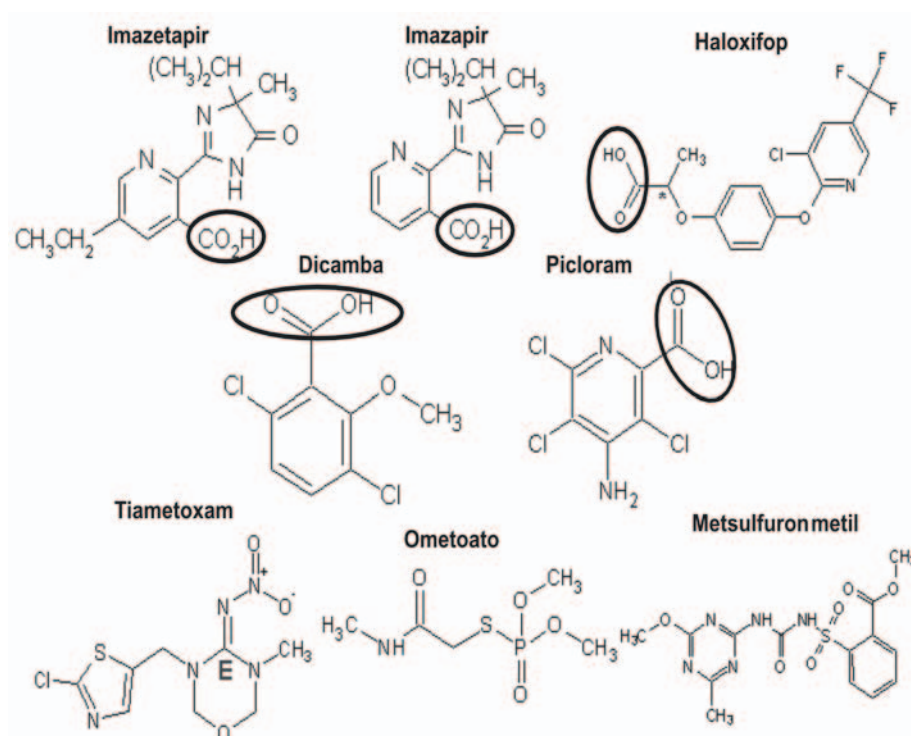


Figura 2. Estructuras químicas de pesticidas con diferencias entre las opciones de purificación del estudio.

los métodos. De ahí su importancia, ya que se ajustan al triple objetivo de evaluar la calidad de las mieles uruguayas, cumpliendo con conceptos de seguridad alimentaria, de facilitar de comercio internacional, y de comenzar los estudios para utilizar la colmena y sus productos como bioindicadores de la calidad ambiental de agroecosistemas uruguayos.

Validación del método

Para realizar la validación del método se estudiaron los niveles 0,01 mg/kg y 0,05 mg/kg que son los niveles que la Unión Europea establece como límites máximos de residuos tolerables en miel. La exactitud del método fue estudiada mediante los porcentajes de recuperación de cinco réplicas, obtenidas como se detalló anteriormente. La precisión fue estudiada mediante el porcentaje de Desviación Estándar Relativa (%DER) de las mismas cinco réplicas (Figura 3). Estas se encontraron por debajo de 16%, lo cual es aceptable según la guía SANCO que establece un 20% como máximo permitido, con excepción de Imazapir que presentó un 26% DER. La reproducibilidad intermedia o también llamada precisión entre-días, evaluada mediante el %DER de estudios realizados distintos días, también fue aceptable (<20%) con excepción de Imazapir.

Se obtuvieron límites de cuantificación o límites de reporte, como se denominan en la guía SANCO de 0,01 mg/kg, para la mayoría de los pesticidas en estudio, con excepción

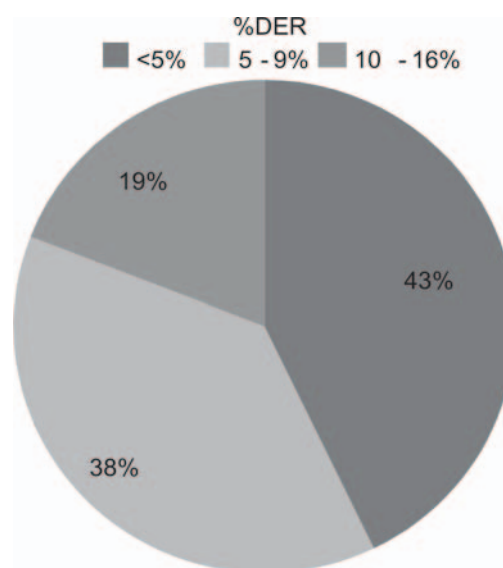


Figura 3. Porcentajes de Desviación Estándar Relativa obtenidos de la validación del método.

de Boscalid (0,05 mg/kg), Metsulfuron metil, Imazapir y Amitraz (0,2 mg/kg).

Se realizaron curvas de calibración en solvente y en matriz, que consiste en adicionar los pesticidas en cantidades conocidas a un extracto de miel blanco. Todos los pesticidas estudiados presentan buena linealidad, $R^2 > 0,99$ en el rango 0,01 a 0,4 mg/L. Se calculó además el efecto matriz como el porcentaje de la diferencia entre las pendientes de las curvas de calibración en matriz y en solvente respecto a la pendiente de la curva de calibración en solvente, (pendiente curva calibración en matriz - pendiente curva calibración en solvente) / pendiente curva calibración en solvente * 100. Los pesticidas estudiados presentaron un efecto matriz moderado (<11%) excepto Amitraz (-48%), Clorpirifos (17%) e Imazapir (43%) por lo que se utilizaron las curvas de calibración preparadas en matriz para la cuantificación de todos los experimentos. Este parámetro es importante porque se debe al aumento o supresión de la señal del analito que pueda ocasionar la matriz y su subestimación al emplear curvas de calibración en solvente lleva a errores en la cuantificación.

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó durante una pasantía co-financiada por el Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) Química y Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) de la Universidad de la República, Uruguay.

Bibliografía

- Anastassiades M, Tasdelen B, Scherbaum E, Stajnbaher D. 2007. Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. En: Ohkawa H, Miyagawa H, Lee PW. [Eds.]. Pesticide chemistry: Crop protection, public health, environmental safety. Weinheim: Wiley-VCH. pp. 439 - 458.
- Balayiannis G, Balayiannis P. 2008. Bee honey as an environmental bioindicator of pesticides' occurrence in six agricultural areas of Greece. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 55: 462 - 470.
- Bargańska [†], Namieceniak J. 2010. Pesticide analysis of bee and bee product samples. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 40: 159 - 171.
- Bonzini S, Tremolada P, Bernardinelli I, Colombo M, Vighi M. 2011. Predicting pesticide fate in the hive (part 1): experimentally determined δ -fluvinate residues in bees, honey and wax. *Apidologie*, 42: 378 - 390.
- CVUA Stuttgart. 2007. Pesticides Online website [En línea]. Consultado 13 mayo 2013. Disponible en: www.pesticides-online.com.
- DGSA. 2010. Prod. Fitosanitarios: Importaciones del año 2010 según toxicidad [En línea]. Consultado 13 mayo 2013. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/>
- DGSSAA/DivAnálisisDiagnostico/documentosDAYD/estadisticas/Importacion%20categoria%20toxicologica2010.pdf.
- Fell R, Cobb J. 2009. Miticide residues in Virginia honeys. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 83: 822 - 827.
- Fernandez M, Picó Y, Manes J. 2002a. Rapid screening of organophosphorus pesticides in honey and bees by liquid chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia*, 56: 577 - 583.
- Fernández M, Picó Y, Mañes J. 2002b. Analytical methods for pesticide residue determination in bee products. *Journal of Food Protection*, 65: 1502 - 1511.
- Herrera A, Pérez-Arquillué C, Conchello P, Bayarri S, Lázaro R, Yagüe C, Ariño A. 2005. Determination of pesticides and PCBs in honey by solid-phase extraction cleanup followed by gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381: 695 - 701.
- Johnson R, Ellis M, Mullin C, Frazier M. 2010. Pesticides and honey bee toxicity — USA. *Apidologie*, 41: 312 - 331.
- Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, vanEngelsdorp D, Pettis JS. 2010. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS ONE*, 5: e9754.
- Pihlström T. 2011. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed [En línea]. 40p. (Document No. SANCO/12495/2011). Consultado 13 mayo 2013. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf.
- Pirard C, Widart J, Nguyen BK, Deleuze C, Heudt L, Haubruge E, de Pauw E, Focant JF. 2007. Development and validation of a multi-residue method for pesticide determination in honey using on-column liquid-liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1152: 116 - 123.
- Porrini C, Sabatini AG, Girotti S, Ghini S, Medrzycki P, Grillenzoni F, Bortolotti L, Gattavecchia E, Celli G. 2003. Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination. *Apiacta*, 38: 63 - 70.
- Porrini C, Ghini S, Girotti S, Sabatini A, Celli G, Gattavecchia E. 2002. Use of honey bees as bioindicators of environmental pollution in Italy. En: Honey Bees: Estimating the environmental impact of chemicals. London: CRC Press. pp. 186 - 247.
- Rissato SR, Galhiane MS, de Almeida MV, Gerenutti M, Apon BM. 2007. Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography-mass spectrometry and application in environmental contamination. *Food Chemistry*, 101: 1719 - 1726.
- Tomasini D, Sampaio MRF, Cardoso LV, Caldas SS, Prímel EG. 2011. Comparison of dispersive liquid-liquid microextraction and the modified QuEChERS method for the determination of fipronil in honey by high performance liquid chromatography with diode-array detection. *Analytical Methods*, 3: 1893 - 1900.
- Wiest L, Buleté A, Giroud B, Fratta C, Amic S, Lambert O, Pouliquen H, Arnaudguilhem C. 2011. Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1218: 5743 - 5756.