



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A DISTANCIA  
MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA**

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER  
MÓDULO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

**“MÉTODOS DE ANÁLISIS DE COMPUESTOS DE  
LA FAMILIA DE LOS NEONICOTINOIDES EN  
PRODUCTOS APÍCOLAS”**

**Autor/a: Laura García Domínguez**

**Tutor/a: Rosa M<sup>a</sup> Garcinuño Martínez**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

**Junio 2022**

# Índice:

---

## ABREVIATURAS

<b>1. Objetivos</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Introducción</b> .....	<b>2</b>
2.1 Pesticidas: neonicotinoides.....	2
2.2 Modos de acción de los neonicotinoides.....	4
2.3 Restricciones en su uso.....	4
2.4 Miel y otros productos apícolas.....	5
<b>3. Métodos analíticos para la determinación de neonicotinoides</b> .....	<b>6</b>
3.1 Extracción en fase sólida (SPE).....	7
3.1.1 Extracción en fase sólida en muestras de miel.....	8
3.1.2 Extracción en fase sólida en muestras de polen.....	13
3.1.3 Extracción en fase sólida en jalea real y propoleo.....	14
3.1.4 Extracción en fase sólida en muestras de cera de abejas.....	15
3.1.5 Extracción en fase sólida magnética (MSPE).....	18
3.2 QuEChERS.....	24
3.2.1 Método QuEChERS y análisis HPLC-MS/MS en muestras de miel.....	25
3.2.2 Método QuEChERS y análisis HPLC-UV en muestras de miel.....	29
3.2.3 Método QuEChERS en muestras de polen, néctar y tejido foliar.....	31
3.2.4 Método QuEChERS en muestras de cera de abeja.....	36
3.3 Microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME).....	41
3.3.1 Microextracción por partición octanol-agua asistida por jeringa (IS-DLLME).....	44
3.3.2 Microextracción líquido-líquido dispersiva in situ con líquidos iónicos.....	45
3.3.3 DLLME y análisis mediante cromatografía líquida capilar (CLC).....	45
3.4. Otros métodos.....	48
3.4.1 Extracción sólido-líquido.....	48
3.4.2 Microextracción de agregación inducida en frío basada en líquidos iónicos.....	48
3.4.3 Pipeta intercambiadora de aniones (DPX).....	49
3.4.4 Inmunoensayos.....	51
3.4.4.1 Inmunoensayo electroquímico.....	52
3.4.5 Extracción líquido-líquido asistida por azúcares (SULLE).....	53
<b>4. Conclusiones</b> .....	<b>55</b>
<b>5. Bibliografía</b> .....	<b>57</b>

## ABREVIATURAS

<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>AChE</b>	Acetilcolinesterasa
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>APCI</b>	Ionización química a presión atmosférica
<b>BDPA</b>	4,4'-bifenildicarboxaldehido
<b>CLC</b>	Cromatografía líquida capilar
<b>COF</b>	Marco orgánico covalente
<b>CR</b>	Reactividad cruzada
<b>CTAB</b>	Bromuro de cetiltrimetilamonio
<b>DAD</b>	Detector Diodo Array
<b>DLLME</b>	Microextracción líquido-líquido dispersiva
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DPX</b>	Pipeta intercambiadora de aniones
<b>dSPE</b>	Extracción en fase sólida dispersiva
<b>EF</b>	Factor de enriquecimiento
<b>EIC</b>	Cromatograma de iones extraído
<b>ESI</b>	Electrospray
<b>GC</b>	Cromatografía de gases
<b>GCB</b>	Negro de carbón grafitizado
<b>HCL</b>	Ácido clorhídrico
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alto rendimiento
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración de inhibición semimáxima
<b>IL</b>	Líquido iónico
<b>IS-DLLME</b>	Microextracción líquida dispersiva en jeringa
<b>LC-MS/MS</b>	Cromatografía de líquidos acoplada con espectrometría de masas en tándem
<b>LD50</b>	Dosis letal 50
<b>LLE</b>	Extracción líquido-líquido
<b>LOD</b>	Límite de detección
<b>LOQ</b>	Límite de cuantificación
<b>MOP</b>	Polímero orgánico magnético
<b>MQW</b>	Agua Milli-Q
<b>MRL</b>	Nivel máximo de residuo
<b>MRM</b>	Monitorización de reacciones múltiples
<b>MSPE</b>	Extracción en fase sólida magnética
<b>nAChR</b>	receptores de nicotina de la acetilcolina
<b>PA</b>	Proantocianidina
<b>POP</b>	Polímero orgánico poroso
<b>PSA</b>	Amina primaria secundaria
<b>PTFE</b>	Politetrafluoroetileno
<b>Q</b>	Cuadrupolo
<b>QqQ</b>	Triple cuadrupolo
<b>QTRAP</b>	Cuadrupolo-trampa de iones
<b>QTOF</b>	Cuadrupolo-tiempo de vuelo

<b>QuEChERS</b>	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe (rápido, fácil, económico, efectivo, robusto y seguro)
<b>Rec.</b>	Recuperación
<b>RSD</b>	Desviación estándar relativa
<b>SALLE</b>	Extracción líquido-líquido asistida por salinidad
<b>SIM</b>	Monitorización de iones seleccionados
<b>SPE</b>	Extracción líquido-sólido
<b>STLLE</b>	Extracción líquido-líquido asistida a temperaturas bajo cero
<b>SULLE</b>	Extracción líquido-líquido asistida por azúcares
<b>TAPA</b>	Tris(4-aminofenil) amina
<b>TBABr</b>	Bromuro de tetra-n-butilamonio
<b>TEA</b>	Trietilamina
<b>UHPLC</b>	Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento
<b>UV/Vis</b>	Espectroscopia de absorción Ultravioleta/Visible

## 1. Objetivos.

Los neonicotinoides son un grupo de insecticidas que han causado un impacto negativo en el medio ambiente debido a algunas características desfavorables como: su potencial de contaminación en aguas superficiales, su persistencia en el suelo y en las plantas, su translocación desde los materiales de recubrimiento de semillas al suelo y la toxicidad en organismos no objetivo, como las abejas melíferas [1]. Los neonicotinoides se encuentran como residuos habitualmente en aguas superficiales, aunque en concentraciones bajas (promedio de ng/L). Las frecuencias de detección y las concentraciones aumentan en regiones con alta producción de cultivos como maíz y soja, y, además su transporte hacia otras zonas se ve favorecido por las precipitaciones [1].

En los últimos años se ha observado una bajada en la población mundial de abejas, fenómeno que se conoce como “trastorno de colapso de las poblaciones de abejas” [2]. Varias investigaciones han demostrado que los neonicotinoides a niveles traza no tienen un efecto letal directo en las abejas, pero sí provocan efectos indirectos, ya que las abejas muestran síntomas de envenenamiento (movimientos descoordinados, temblores y convulsiones), que pueden afectar a la capacidad de las abejas para alimentarse, aprender, o recordar la ruta de regreso a su colmena. Esto puede afectar negativamente al crecimiento de las colonias de abejas y a la reproducción de las reinas. Por lo tanto, aunque no se produce su muerte instantánea, sí que se producen efectos negativos en la salud, alimentación y sentidos de estos insectos, lo que conduce a su muerte prematura [3].

Es necesario poder estimar la exposición que tienen los insectos polinizadores a los compuestos neonicotinoides, así como cumplir con la legislación establecida para estas sustancias. Por ello, el desarrollo de métodos de análisis de neonicotinoides en matrices apícolas, que alcancen bajos límites de detección, es de gran importancia para poder monitorizar y evaluar la presencia de estos compuestos perjudiciales para las abejas y para el medio ambiente.

El objetivo general de este trabajo se centra en la recopilación de los métodos más empleados para el tratamiento de muestra y análisis de neonicotinoides y sus metabolitos en productos apícolas (miel, polen, néctar, etc), en los últimos 10 años, así como sus principales limitaciones y problemáticas. También se exponen los desarrollos más recientes y novedosos, con lo que se podrá obtener una visión de cuáles son las perspectivas y tendencias futuras en el análisis de neonicotinoides para muestras apícolas.

## 2. Introducción.

### 2.1 Pesticidas: Neonicotinoides.

Los pesticidas son un grupo amplio de sustancias químicas que se emplean para el control de plagas y organismos no deseados en la agricultura, en hogares, etc. Se pueden establecer varias clasificaciones de los pesticidas, por ejemplo, según su mecanismo de acción fisiológico, pueden distinguirse los insecticidas de superficie, que contactan con la superficie de la planta y actúan en ella, y los insecticidas sistémicos, que ingresan en el sistema de la planta y se distribuyen por todas sus partes [3]. Otro modo de clasificación de los pesticidas, es según el organismo al que van dirigidos (tabla 1). Según la forma en la que el pesticida entra en contacto con el organismo que pretende eliminar pueden distinguirse dos grupos: los que penetran directamente (a través del exoesqueleto o del sistema respiratorio) o indirectamente (mediante la ingestión de una planta que contenga la sustancia en su sistema) [3].

Tabla 1: Clasificación de pesticidas según su organismo objetivo [4].

<b>Tipo de pesticida</b>	<b>Organismo objetivo</b>
Fungicidas	Hongos
Insecticidas	Insectos
Herbicidas	Plantas
Nematicidas	Nematodos
Rodenticidas	Roedores
Acaricidas	Arañas, ácaros
Molusquicidas	Caracoles, babosas
Bactericidas	Bacterias
Algicidas	Algas
Avicidas	Aves
Piscicidas	Peces

Los compuestos que pertenecen a la familia de los neonicotinoides son un grupo de insecticidas que se emplean en la agricultura para el tratamiento de semillas, suelos, pastos y cultivos. Este grupo de pesticidas presenta propiedades similares a la nicotina, y resultan muy tóxicos para algunos insectos e invertebrados, ya que actúan directamente contra su sistema nervioso, provocándoles la muerte. Los neonicotinoides son compuestos solubles en agua y que se descomponen lentamente en el suelo. Son insecticidas sistémicos, por lo que son absorbidos fácilmente por la planta y le proporcionan protección durante su crecimiento. Por ello, muchos se emplean en el tratamiento de semillas, para proteger a las plantas desde el momento de la siembra [3].

Los compuestos que se encuentran dentro del grupo de los neonicotinoides comparten el mismo mecanismo de acción. Actúan como agonistas sobre los receptores de nicotina de la acetilcolina (nAChR) [3]. En cuanto a su estructura química, los neonicotinoides se

caracterizan por ciertos elementos comunes [5]: presencia de un grupo heterociclo aromático, enlaces elásticos, un hidroheterociclo o grupos guanidina / amidina y grupos atractores de electrones.

Los neonicotinoides se pueden dividir en dos grupos según su estructura: las nitroguanidinas y las cianoamidinas [3,6]. Las nitroguanidinas (figura 1), se caracterizan por poseer grupos N-nitro, por lo que tienen un carácter polar y son reactivas, lo que las convierte en un grupo especialmente tóxico para las abejas. En este grupo se incluyen el imidacloprid, tiametoxam, dinotefuran, nitenpyram y clotianidin. Las cianoamidinas (figura 2), poseen en su estructura grupos de cianoamidina, y tienen un carácter menos polar y menos reactivo. Algunas cianoamidinas son el acetamiprid y tiacloprid.

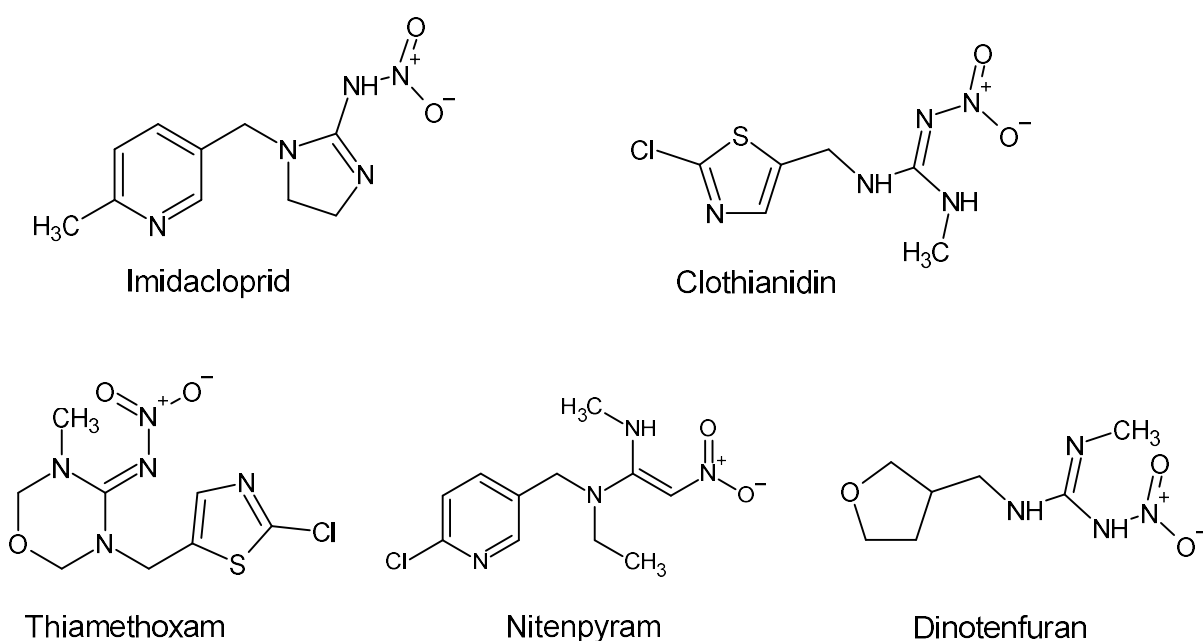


Figura 1: Neonicotinoides de tipo nitroguanidinas.

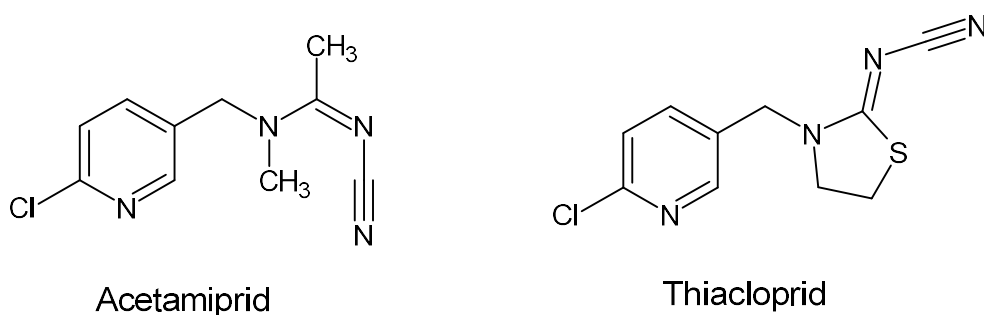


Figura 2: Neonicotinoides de tipo cianoamidinas.

## 2.2 Modos de acción de los neonicotinoides.

Los neonicotinoides son agonistas de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs), receptores que tienen un papel importante en la sinápsis del sistema nervioso central de los insectos. En concreto, los neonicotinoides son agonistas de la subunidad  $\alpha 4\beta 2$  de los nAChRs. Estos receptores están presentes en todos los organismos que tienen un sistema nervioso, pero, mientras que en los vertebrados solo un 8-10% de los nAChRs poseen estas subunidades, en los insectos están presentes en todos los nAChRs. Por este motivo, los insectos son más susceptibles que los vertebrados a esta familia de sustancias [7].

En su funcionamiento normal, estos receptores se activan al unirse el receptor acetilcolina (ACh). Su desactivación tiene lugar cuando la ACh es degradada por la enzima acetilcolinesterasa (AChE), produciendo octano y colina (figura 3A). Los neonicotinoides tienen la capacidad de unirse a la nAChR, pero no son degradados por la AChE, lo que produce una sobreestimulación del sistema nervioso que puede conducir a la muerte celular (figura 3B) [8].

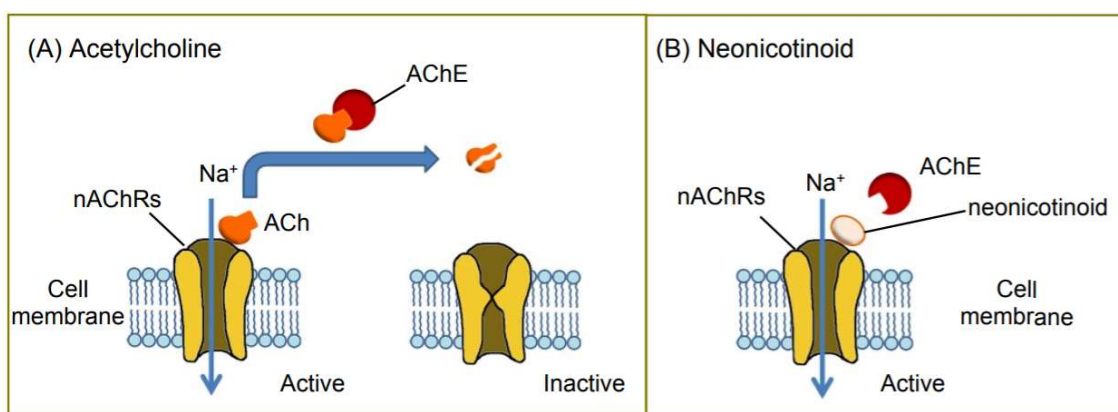


Figura 3: Regulación del receptor nicotínico de acetilcolina en presencia de acetilcolina (A) y un compuesto neonicotinoide (B) [8].

## 2.3 Restricciones en su uso.

Debido a la amenaza que suponen los neonicotinoides sobre las abejas, la Comisión Europea prohibió en 2013 el uso y la venta de semillas tratadas con productos fitosanitarios que contengan como sustancia activa los compuestos clotianidina, tiametoxam e imidacloprid [9]. Posteriormente, en 2018, la Comisión Europea propone los reglamentos 2018/783, 2018/784 y 2018/785, que limitan el uso de estas sustancias (clotianidina, tiametoxam e imidacloprid) en invernaderos y para el tratamiento de semillas para la siembra únicamente en estas instalaciones. En 2018, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) publicó una revisión por pares de la



evaluación del riesgo de estos tres neonicotinoides para las abejas, confirmando el riesgo que suponen estos pesticidas [10,11,12].

La Unión Europea ha establecido límites máximos para la concentración de neonicotinoides en miel y otros productos apícolas. Los niveles máximos de residuos (MRLs) permitidos establecidos por la Comisión Europea para los neonicotinoides acetamiprid, clotianidina, dinotenfuran, flonicamid, imidacloprid, nitenpyram, tiacloprid y tiametoxam en miel y otros productos apícolas se encuentran entre 10-200 µg/kg, dependiendo del tipo de neonicotinoide (tabla 2) [13].

La potencia de un plaguicida para una especie se define como la dosis de producto químico tóxico que es letal para el 50% de los individuos de esa especie (LD50) [14]. Dosis inferiores a la LD50 se consideran subletales, pero también pueden causar la muerte a una parte de la población. Las dosis subletales, aunque no matan a los organismos, causan efectos en ellos que afectan a su funcionamiento normal y salud [14].

Tabla 2: Niveles máximos de residuos (MRLs) establecidos para los neonicotinoides en productos apícolas [13] y toxicidades orales agudas de los neonicotinoides para las abejas expresadas como valores LD50 [15, 16].

<b>NEONICOTINOIDE</b>	<b>MRLs (µg/kg)</b>	<b>LD50 Oral (µg/abeja)</b>
Acetamiprid	50	8,85 [15]
Clotianidina	50	0,004 [16]
Dinotenfuran	10	0,023 [15]
Flonicamid	50	53300 [15]
Imidacloprid	50	0,0037 [15]
Nitenpyram	10	0,138 [15]
Tiacloprid	200	17,32 [15]
Tiametoxam	50	0,005 [16]

## **2.4 Miel y otros productos apícolas.**

La miel es una sustancia dulce producida por las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.). Se produce a partir del néctar de las flores, de secreciones de partes vivas de las plantas o de insectos que las abejas recogen, transforman y combinan con sus propias sustancias, y, que posteriormente almacenan y dejan madurar en el panal de miel [17].

La miel es un producto natural, complejo y dulce, formado por una solución acuosa de azúcar supersaturada, lo que la convierte en una excelente fuente de energía. Tiene

propiedades antibacterianas, prebióticas, antioxidantes y antimutagénicas. Está compuesta por un 80% de azúcares (principalmente glucosa, fructosa y sacarosa) y 20% de agua, además de otros 180 componentes minoritarios [17].

La miel puede contener compuestos perjudiciales para la salud humana como pesticidas, que pueden llegar hasta esta mediante distintas vías. Por un lado, la exposición de las abejas melíferas a los pesticidas agrícolas que se encuentran en el agua, néctar de polen, gotas pulverizadas de polvo o pesticidas empleados en los campos de cultivo para el control de plagas [14].

Los neonicotinoides son insecticidas sistémicos que se aplican normalmente como recubrimiento de semillas. De esta manera son absorbidos por la planta y se transmiten a todas sus partes, incluidas las flores, el tallo, las hojas, el polen y el néctar [14]. La exposición de las abejas se produce mayoritariamente por la ingesta de los residuos presentes en el polen y néctar de plantas contaminadas, que las abejas recolectoras llevan y almacenan en los panales. Las abejas también se exponen a residuos de neonicotinoides mediante el agua que consumen, que puede estar contaminada debido a la pulverización de insecticidas o a los residuos de pesticidas persistentes en el suelo que acaban pasando al agua [14].

### **3. Métodos analíticos para la determinación de neonicotinoides.**

Recientemente, debido a los efectos perjudiciales observados que tienen los neonicotinoides en organismos no-objetivo como las abejas, se ha producido un interés creciente en el desarrollo de métodos que permitan detectar y cuantificar estos compuestos en productos apícolas (como la miel, el polen, la cera, etc.) y abejas, para evaluar su presencia y el grado de exposición al que se pueden ver expuestas las abejas a estos compuestos que pueden tener un efecto perjudicial e incluso letal para ellas.

Los métodos tradicionales para el tratamiento de muestra y extracción de neonicotinoides, como la extracción líquido-líquido (LLE) o la extracción líquido-sólido (SPE), conllevan un gran consumo de disolventes orgánicos, lo que implica un alto coste y contaminación del medio ambiente. Además, estas metodologías implican procedimientos laboriosos y largos. Por ello, en los últimos años, ha tenido lugar el desarrollo de técnicas que permiten obtener buenas recuperaciones y limpieza de la matriz de la muestra, empleando metodologías que permitan reducir el consumo de disolventes orgánicos, la complejidad de los procedimientos, el coste, etc.

Los compuestos de la familia de los neonicotinoides se caracterizan por ser poco volátiles y tener alta polaridad. Por ello, para su determinación se ha empleado mayoritariamente la técnica cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), con distintos detectores como UV/Vis, diodo array (DAD), y, principalmente HPLC con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). El empleo de MS para la detección tiene numerosas ventajas, como que permite alcanzar una elevada sensibilidad y facilita la eliminación de compuestos interferentes [3]. Además, se ha empleado para el desarrollo de métodos que llevan a cabo una detección simultánea de varios neonicotinoides junto con otros pesticidas, lo que resulta útil para la monitorización de diversos pesticidas en una misma matriz. Por otro lado, cuenta con inconvenientes como que se trata de una instrumentación compleja y costosa que no está al alcance de todos los laboratorios. Por este motivo, se ha investigado el desarrollo de métodos empleando otros detectores, como, por ejemplo, HPLC-DAD.

### **3.1 Extracción en fase sólida (SPE).**

La extracción en fase sólida es ampliamente utilizada para la extracción y limpieza de la muestra en una gran variedad de matrices. La técnica SPE consta de varias fases: activación del sorbente, retención de los analitos de interés en una fase sólida, lavado de las especies interferentes o no deseadas y posterior elución con un disolvente con el que tengan una elevada afinidad.

La extracción en fase sólida se ve afectada por distintos factores: el pH, la fuerza iónica, la polaridad, el flujo de elución del disolvente y las características fisicoquímicas del adsorbente.

En SPE, es necesario controlar el pH para asegurar la estabilidad y la forma en que se encuentra el analito, evitando que se produzca ionización de los analitos que perjudique la extracción [18]. En el caso de los neonicotinoides, estos se hidrolizan en condiciones ácidas y se degradan en condiciones básicas, por lo que es necesario realizar la extracción a pH neutro [18]. En cuanto a la adición de sales, por un lado, el aumento de la fuerza iónica puede perjudicar a la eficacia de la extracción, ya que pueden aumentar la viscosidad de la disolución [19]. Por otro lado, la adición de sal puede disminuir la solubilidad del analito en la disolución acuosa, produciendo el efecto de desalinización y favoreciendo la extracción [18].

SPE tiene ventajas frente a la LLE, como que requiere un menor tiempo y uso de disolventes tóxicos. Algunas desventajas son que se obtienen altos valores de blanco y la dificultad de tratar grandes volúmenes de muestra.

En algunas matrices complejas, como por ejemplo la miel, que tiene un alto contenido de monosacáridos y una gran variedad de componentes minoritarios (ácidos orgánicos, aceites esenciales, residuos de cera y polen de abejas, etc.) es necesario desarrollar métodos de extracción y limpieza de la muestra que eliminen compuestos interferentes, minimicen las pérdidas de analitos, den buenas recuperaciones y permitan obtener una sensibilidad que alcance los límites establecidos [20].

### **3.1.1 Extracción en fase sólida en muestras de miel.**

Gbylik-Sikorska et al., desarrollaron un método SPE y posterior análisis con HPLC-MS/MS para la determinación de 13 compuestos de la familia de los neonicotinoides: 7 neonicotinoides (imidacloprid, clotianidina, acetamiprid, tiametoxam, tiacloprid, nitenpyram, dinotefuran) y 5 metabolitos (imidacloprid guanidina, imidacloprid olefina, imidacloprid urea clorhidrato de desnitro-imidacloprid, tiacloprid-amida y acetamiprid-N-desmetilo), en abejas y miel [20]. El método de extracción de estos compuestos en miel fue optimizado para lograr mejorar las etapas de extracción y limpieza de la muestra. Para la extracción se descartaron directamente los disolventes orgánicos, ya que en ellos la miel es insoluble, y se evaluó el empleo de agua, tampón formiato de amonio y ácidos acético y fórmico con acetonitrilo, acetato de etilo y acetona, en concentraciones entre 0,1 y 5%. El mejor resultado se obtuvo con una mezcla al 1% de acetonitrilo y acetato de etilo (8:2, v/v) en agua y adición de un 20% de trietilamina (TEA) en acetonitrilo. Para mejorar la limpieza y reducir la presencia de impurezas, que pueden producir superposición de picos en el cromatograma y fondo inclinado, se probaron los cartuchos de extracción: C18, Strata-X, Strata X-CW y Oasis HLB, ya que todos ellos permiten el aislamiento de los analitos en condiciones neutras [20]. La mejor limpieza se obtuvo con el cartucho Strata X-CW y elución con mezcla acetonitrilo-acetato de etilo (8:2, v/v). Las recuperaciones logradas con el método SPE empleado fueron entre 88,6-109,2%. En este estudio, también fue optimizado el método LC-MS/MS. En la separación cromatográfica, se evaluaron distintas fases móviles (agua, ácido acético, formiato de amonio, ácido fórmico y mezclas a concentraciones entre 0,05 y 1%) y distintas columnas con fase estacionaria C18 (Luna C18 (2), Luna C18 (2) 100A, Luna Hilic 200A, Kinetex C18 100A, y InterSustain C18. Finalmente, se empleó la columna Luna C18 (2) 100A con una fase móvil en modo gradiente compuesta por agua (fase acuosa) y acetonitrilo (fase orgánica), logrando alta selectividad e intensidad de la mayoría de compuestos y bajo tiempo de retención. En el análisis MS se empleó el modo de ionización positivo y se llevó a cabo en modo monitorización de reacciones múltiples (MRM). Para cada compuesto se eligió el ion precursor y los dos iones

producto más abundantes y se optimizaron los parámetros (potencial de desglose y energía de colisión). Fue necesario el empleo de patrones internos en el método de calibración para minimizar el efecto de la matriz en la señal del analito. El método desarrollado proporcionó límites de cuantificación entre 0,1-0,5 µg/kg y buena repetibilidad, obteniendo desviaciones estándar relativas (RSDs) entre 2,8-10,9%.

En otro estudio, Sánchez-Hernández et al. evaluaron la presencia de tiametoxam, clotianidina y imidacloprid, así como sus productos de descomposición metabólica en polen y miel de panales de abejas melíferas situados junto a cultivos de girasol y maíz de semillas recubiertas [21]. Para ello, emplearon un método de tratamiento de muestra SPE y posterior análisis mediante cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada con espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS), empleando un analizador de masas cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF). El procedimiento SPE se llevó a cabo empleando cartuchos poliméricos de fase inversa Strata X 33 µm. En el caso de las muestras de miel, 5 g de muestra se disolvieron en 10 mL de agua. El cartucho se acondicionó con 5 mL de metanol y 5 mL de agua. Posteriormente se lavó con 2 mL de metanol/agua (70:30, v/v) y, finalmente, se eluyó con 2 mL de acetonitrilo/agua (45:55, v/v). El tratamiento de las muestras de polen se llevó a cabo empleando un método desarrollado en un estudio anterior [22], que empleaba 2 g de muestra y 10 mL de diclorometano.

En el análisis MS/MS se empleó un analizador QTOF, que ofrece una gran precisión para identificar especies desconocidas y permite obtener una mayor resolución de las señales m/z en comparación con otros analizadores como el cuadrupolo simple (Q) y triple (QqQ), lo que facilita la medición de las masas precisas de los iones y muestra patrones isotrópicos característicos de las especies que contienen cloro [21]. La determinación de los neonicotinoides se llevó a cabo empleando calibración con ajuste matricial, ya que se observó efecto de matriz, y se basó en obtener la composición elemental de las moléculas protonadas en el mismo tiempo de retención que el estándar sintético, y por el análisis MS/MS de sus iones fragmentados. Para los metabolitos que no estaban comercialmente disponibles, la identificación se llevó a cabo siguiendo el criterio: (i) cromatogramas de iones extraídos de la masa exacta del ion precursor; (ii) identificación de los nuevos picos presentes en las muestras tratadas y su ausencia en las muestras blanco; (iii) los espectros de cloro según la relación  $^{35}\text{Cl}:^{37}\text{Cl}$ ; (iv) estudios de fragmentación MS/MS para la confirmación de la molécula o comparación con los iones producto notificados [21]. En las muestras analizadas de polen se detectaron tiametoxam, clotianidina y 6 metabolitos producto del metabolismo de las plantas (3,6-dihidro-3-metil-N-nitro-2H-1,3,5-oxadiazin-4-amina, 3,6-dihidro-3-metil-2H-1,3,5-

oxadiazin-4-amina, 3,6-dihidro-N-nitro-2H-1,3,5-oxadiazin-4-amina, tiazolimetilurea, imidacloprid guanidina y imidacloprid hidrazona). En las muestras de miel se identificaron 4 metabolitos (3,6-dihidro-3-metil-N-nitro-2H-1,3,5-oxadiazin-4-amina, 3,6-dihidro-N-nitro-2H-1,3,5-oxadiazin-4-amina, imidacloprid guanidina y imidacloprid olefina). Con este método, se alcanzaron bajos límites de detección (0,6-1,2 µg/kg para el polen y 1,2-19 µg/kg para la miel), buenas recuperaciones (61-105% para la miel y 88-101% para el polen) y precisión (<8,2% para el polen y <7,5% para la miel).

Valverde et al., compararon dos métodos de tratamiento de muestra (SPE y QuEChERS) y desarrollaron un método de análisis UHPLC-MS/MS para la determinación de siete neonicotinoides (dinotenfuran, nitempyram, tiametoxam, clotianidina, imidacloprid, acetamiprid y tiacloprid) en muestras de miel de diferentes orígenes botánicos (multifloral, romero y brezo) [23]. Los dos métodos desarrollados, SPE y QuEChERS, fueron optimizados y comparados con la finalidad de encontrar el mejor método en términos de eficiencia de extracción, consumo de disolventes orgánicos, tiempo, coste y número de etapas. En el método QuEChERS 5 g de muestra de miel se extrajeron con distintos volúmenes de mezclas de acetonitrilo y agua o acetato de etilo, obteniendo las mejores recuperaciones con 10 mL de acetonitrilo y acetato de etilo (80:20, v/v). También se optimizó la cantidad de sales empleadas en la etapa de partición, obteniendo los mejores resultados con 2,0 g de sulfato de magnesio, 1,0 g de acetato de sodio, 1,5 g de citrato trisódico deshidratado y 0,5 g de citrato de hidrógeno disódico sesquihidratado. En cuanto a la etapa de limpieza, con la finalidad de reducir los compuestos de la matriz, como azúcares, ácidos grasos y compuestos no polares que pueden afectar a la ionización de los analitos, se emplearon amina primaria secundaria (PSA), C18 y una mezcla de ambos. Sin embargo, no se observó reducción del efecto de matriz y se afectó negativamente a la recuperación de dinotenfuran y nitempyram, por lo que este paso fue suprimido. Mediante este método se lograron recuperaciones entre 80-109%, aunque, en las muestras de miel de brezo (mieles oscuras) se observaron efectos de matriz significativos (supresión de iones) en todos los analitos. En las mieles multiflorales y de romero (mieles claras), no se observaron efectos de matriz significativos (excepto acetamiprid en las mieles multiflorales).

En el método SPE se empleó un cartucho Strata X. Como disolventes de extracción se probaron agua y disoluciones acuosas de formiato de amonio 10 mM, hidróxido de amonio 1% (v/v) y ácido fórmico 1%, obteniendo los mejores resultados de extracción con 5,0 g de muestra de miel y 10 mL de disolución acuosa de formiato de amonio (10 mM). Para preacondicionar el cartucho se emplearon 5 mL de metanol y agua y para la etapa de lavado se probaron volúmenes entre 5-15 mL de distintas mezclas agua-

metanol. Dado que en todos los casos se produjeron pérdidas de los neonicotinoides dinotenfuran y nitempyram, y no se observó la eliminación de interferencias debidas a los efectos de matriz, se decidió eliminar la etapa de lavado. Finalmente, para la elución se evaluaron distintas mezclas de acetonitrilo con agua o acetato de etilo, obteniendo los mejores resultados con 4 mL de la mezcla acetonitrilo-acetato de etilo (80:20, v/v). El residuo se reconstituyó en 1 mL de metanol-agua (80:20, v/v). El procedimiento SPE obtuvo recuperaciones ligeramente más bajas que el método QuEChERS, con la diferencia de que para las mieles oscuras se observó una reducción de los efectos de matriz, lo que lo convierte en un procedimiento más óptimo para esta variedad de mieles. Para las mieles claras, el método QuEChERS proporciona mejores recuperaciones y es una alternativa más rápida y simple. Además, la minimización de los efectos de matriz gracias a estos procedimientos de tratamiento de muestra, permite el empleo de curvas de calibración estándar para la cuantificación. El análisis se realizó mediante UHPLC-MS/MS, comparando el rendimiento de dos sistemas de MS/MS (triple cuadrupolo y QTOF). La conclusión del estudio fue que el método UHPLC-MS/MS (QqQ) obtuvo el mejor rendimiento global, debido a su mejor sensibilidad y a la menor influencia de la matriz. La adquisición en MS se realizó en modo MRM, eligiendo el ion molecular protonado  $[M+H]^+$  como ion precursor. El ion producto más abundante de cada analito se empleó para la cuantificación y un ion producto adicional para la confirmación. La buena sensibilidad que se obtuvo mediante el analizador triple cuadrupolo, permite llevar a cabo análisis de neonicotinoides donde es posible detectar concentraciones de estos, a niveles mucho más bajos que los MRLs establecidos.

Mrzlikar et al., también desarrollaron y compararon dos técnicas de extracción (SPE y QuEChERS) para el análisis de cinco neonicotinoides en miel (acetamiprid, clotianidina, imidacloprid, tiacloprid y tiametoxam) mediante LC-MS/MS [24]. En este estudio, se compararon dos métodos de tratamiento de muestra distintos, SPE y QuEChERS. El método QuEChERS empleado fue adaptado de otro estudio [25]. Consistió en diluir 10 g de muestra en 10 mL de agua, y, posteriormente, añadir una mezcla de sales (4 g  $MgSO_4$ , 1g NaCl, 1 g de citrato trisódico dihidratado y 0,5 g de hidrogeno citrato disódico sesquihidratado), para la partición, seguido de 10 mL de ACN como disolvente de extracción. Tras centrifugar, 6 mL del sobrenadante se transfirieron a un tubo con 0,9 g  $MgSO_4$  anhidro y 0,15g PSA. Las recuperaciones obtenidas mediante este método QuEChERS fueron elevadas, entre 68,2 y 107,0%. Los límites de detección y cuantificación obtenidos fueron de 0,06-0,85  $\mu g/kg$  y 0,19-2,84  $\mu g/kg$ , respectivamente. Por otro lado, el método SPE fue desarrollado por estos autores, optimizando el cartucho empleado y las disoluciones de lavado. Los cartuchos evaluados fueron C18, HLB y

MCX. Con todos ellos se obtuvieron buenas recuperaciones, pero no se logró eliminar parte de las sustancias interferentes. La manera más efectiva para lograr una buena eficiencia de extracción y eliminar compuestos interferentes fue mediante el cartucho HLB y una disolución de amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) con metanol (MeOH) al 10% ( $\text{pH}=11$ ). Las recuperaciones obtenidas fueron de 70,7-113,6%, los límites de detección de 0,05-0,97  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y los de cuantificación de 0,15-3,25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Ambos métodos obtuvieron bajos límites de detección y cuantificación, alta especificidad y buenas recuperaciones y repetibilidades para los analitos. No obstante, el método QuEChERS es ligeramente más preciso, rápido, económico y muestra un efecto de matriz menor. Con el método QuEChERS, el efecto de matriz observado fue casi dos veces menor que mediante el método SPE, lo que puede deberse a la limpieza mediante PSA. Mediante este método, se evita la necesidad de filtrar la muestra a través de un filtro de politetrafluoroetileno (PTFE) antes del análisis, paso que sí se lleva a cabo habitualmente mediante SPE [24]. Por lo tanto, el método QuEChERS fue el empleado para el análisis de muestras de miel de Eslovenia. En estas muestras, solo se encontraron residuos de acetamiprid (concentración máxima de 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) y tiacloprid (concentración máxima de 9,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), por debajo de sus valores MRL, 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente.

En un estudio reciente, Liu et al. sintetizaron un sorbente orgánico covalente con una estructura esférica y uniforme (TAPA-BPDA-COF) para la extracción mediante SPE de cuatro neonicotinoides (acetamiprid, tiacloprid, imidacloprid y tiametoxam) y posterior análisis mediante HPLC-DAD en muestras de miel y agua [26]. Los materiales de marco orgánico covalente (COF), son polímeros cristalinos y porosos, que, a partir de unidades orgánicas, forman un esqueleto predeterminado y nanoporos, de manera que cuenta con ventajas como una gran superficie, tamaño de poro ajustable, buena estabilidad térmica y fácil funcionalización [26]. En este estudio se sintetizó un nuevo COF (TAPA-BDPE-COF) empleando como bloques tris(4-aminofenil) amina (TAPA) y 4,4'-bifenildicarboxaldehído (BDPA). Se estudió el posible mecanismo de extracción de los analitos, concluyendo que la adsorción de los neonicotinoides puede darse gracias a enlaces de hidrógeno e interacciones  $\pi$ - $\pi$  electrodonador-aceptor entre los anillos aromáticos del sorbente (donadores) y los grupos nitro de los neonicotinoides (aceptores) [26]. Las condiciones de SPE fueron optimizadas. En el método, se emplearon 30 mg de sorbente TAPA-BDPA-COF. El cartucho se acondicionó empleando 1 mL metanol + 3 mL agua, y, posteriormente, 100 mL de muestra se cargaron a una velocidad de 4 mL/min. El pH ácido podría perjudicar la eficiencia de la extracción, ya que, en el caso de los analitos acetamiprid, imidacloprid y tiacloprid, los anillos de piridina débilmente básicos se ionizan en condiciones ácidas. Dado que el pH



de la disolución de muestra de miel es en torno a 6, no fue necesario ajustar el pH en el procedimiento. En cuanto al disolvente de elución, se evaluaron metanol, acetonitrilo y acetona. La mayor eficiencia de elución se obtuvo con acetonitrilo, con 0,6 mL. No obstante, debido a la disminución de la sensibilidad debido a la dilución, se emplearon 0,3 mL, con lo que también se obtuvieron recuperaciones razonables. Tras la limpieza del cartucho con 0,3 mL de ACN y 0,3 mL de agua, se evaluó la reutilizabilidad del mismo cartucho, concluyendo que se podía emplear hasta al menos en 10 extracciones de muestras de miel. Las recuperaciones obtenidas mediante este procedimiento fueron de 80,0-121,9% con RSDs < 7,6%. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna CenturySIL C18-BDS con una fase móvil acetonitrilo-agua (v/v 21:79). Se empleó un detector de diodo array (DAD), seleccionando para la cuantificación de tiametoxam, imidacloprid, acetamiprid y tiacloprid, las longitudes de onda a 253 nm, 270 nm, 244 nm y 244 nm, respectivamente [26]. El método SPE-HPLC-DAD desarrollado obtuvo límites de detección entre 2,6-3,3 µg/kg y límites de cuantificación entre 7,8 y 9,9 µg/kg y RSDs entre 3,2 y 6,4%.

### **3.1.2 Extracción en fase sólida en muestras de polen.**

López-Fernández et al, desarrollaron un método SPE y análisis HPLC-MS/MS para la determinación de siete neonicotinoides (dinotefuran, nitenpyram, tiametoxam, clotianidina, imidacloprid, acetamiprid y tiacloprid) en muestras de polen [27]. En el método SPE desarrollado fueron optimizados distintos parámetros: el disolvente de extracción, el tiempo y los sorbentes de extracción en fase sólida para la etapa de purificación. En el método desarrollado, en una alícuota con 5 g de muestra se añadieron 10 mL de agua, 10 mL de hexano, 10 mL de acetonitrilo, 6 g de sulfato de magnesio y 3 g de acetato de sodio. El empleo de agua y hexano en lugar de solo hexano, resultó en una disminución de compuestos coextraídos y una mejora de la sensibilidad [27]. Para la purificación de la muestra y lograr buenas recuperaciones, se evaluaron los cartuchos: sílica, C18 y Supelclean Envi-Carb II/PSA. Los sorbentes C18 y sílica obtuvieron bajas recuperaciones para nitenpyram y imidacloprid, mientras que el cartucho Envi-Carb II/PSA obtuvo recuperaciones entre 75-100% para todos los analitos, por lo que fue seleccionado para el método. El cartucho se acondicionó con 6 mL de acetonitrilo y se lavó con otros 3 mL. El extracto final se reconstituyó en 0,75 mL de agua. El método desarrollado logró recuperaciones entre 81-99% y repetibilidades por debajo del 8,8%. Se observaron fuertes efectos de matriz (supresión iónica del analito), por lo que fue necesario emplear una calibración con ajuste matricial. En la separación por HPLC se seleccionó una fase móvil formada por acetonitrilo-agua, y, en

el análisis MS, para cada neonicotinoide, el ion precursor fue el ion molecular protonado  $[M+H]^+$ . Además, se optimizaron dos transiciones de monitorización de reacción múltiple, la de mayor intensidad para la cuantificación, y, la segunda, para la confirmación. Los límites de detección y cuantificación fueron de 0,2-2,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 0,4-4,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente.

### **3.1.3 Extracción en fase sólida en jalea real y propóleo.**

Hou et al., desarrollaron un método para la determinación simultánea de 10 neonicotinoides y dos metabolitos en miel y jalea real mediante SPE y posterior determinación por LC-MS/MS [28]. Estas muestras requieren una limpieza efectiva ya que se trata de matrices complejas compuestas por proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales. Para la jalea real se probaron como disolventes de extracción acetonitrilo, metanol y ácido tricloroacético, obteniéndose las mejores recuperaciones con metanol. Para la limpieza de la muestra se evaluaron distintos cartuchos (C18, MCX y Oasis HLB) y distintos disolventes de extracción (disoluciones neutras, ácidas y alcalinas de acetonitrilo o metanol), lográndose las mejores recuperaciones con los cartuchos HLB y elución con metanol. Por lo tanto, los cartuchos HLB probaron una alta capacidad, buena recuperación, y reproducibilidad para compuestos polares y no polares, y sin pérdida de recuperación debido a la sequedad del cartucho [28]. Las muestras de jalea real se extrajeron con 10 mL de agua, y, posteriormente, se añadieron 20 mL de metanol. El procedimiento de SPE consistió en una etapa de acondicionamiento del cartucho con 5 mL de metanol y 5 mL de agua, posterior limpieza con 5 mL de metanol/agua (1:9, v/v), y, por último, elución con 5 mL de etanol.

La determinación mediante LC/MS-MS se empleó con el espectrómetro de masas con ionización por electrospray positiva y operando en modo MRM, monitoreando dos transiciones de masa precursor/producto para cada compuesto. Para paliar los efectos de matriz se emplearon patrones internos marcados con isótopos y calibración con ajuste de matriz. En la separación cromatográfica, se obtuvieron mejores resultados empleando metanol frente a acetonitrilo, y se determinó que modificadores de fase móvil como acetato de amonio 5 mM, mejoran la señal de MS. Las recuperaciones obtenidas para las muestras de jalea real fueron de 72,8-105,3%, la precisión (RSD) obtuvo valores por debajo de 13,8% y los límites de cuantificación entre 0.25–5.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Recientemente, Tomšić et al., desarrollaron y validaron un método para la determinación de acetamiprid, clotianidina, imidacloprid, tiacloprid y tiametoxam en propóleo, siendo el primero que se centra únicamente en el análisis de neonicotinoides en esta matriz. El

propóleo es una matriz compleja, debido a su contenido en resinas, flavonoides, fenoles y ceras, por lo que requiere de un tratamiento de muestra que reduzca los efectos de matriz [29]. En este estudio se evaluaron dos métodos distintos de extracción (SPE y QuEChERS) para determinar cual tenía las mejores recuperaciones y analizar las concentraciones de neonicotinoides en muestras reales de propóleo. Para la extracción SPE se emplearon muestras acuosas con 10% de etanol (EtOH). El cartucho Oasis HLB se acondicionó con 5 mL de metanol, se limpió con 10 mL de una disolución acuosa de NH<sub>3</sub> (25%) y MeOH (9:1; pH=11), y, por último, se eluyó con 5 mL de acetonitrilo.

El método QuEChERS empleado fue una versión modificada de otro método [25]. La muestra se disolvió en 10 mL de acetonitrilo, y, posteriormente, se transfirió a un tubo con 10 mL de agua Milli-Q (MQW), 6g de MgSO<sub>4</sub>, 1g NaCl, 1g de citrato de sodio y 0,5 g de citrato disódico sesquihidratado. Por último, a 6 mL de sobrenadante se añadieron 900 mg de MgSO<sub>4</sub> anhidro y 150 mg de sorbente PSA. Aunque ambos métodos obtuvieron recuperaciones similares, el método QuEChERS no eliminaba compuestos interferentes que obstruyen la fuente de iones del espectrómetro de masas. El método SPE obtuvo extractos más limpios, por lo que fue el método validado finalmente. Mediante el método de extracción SPE descrito, las recuperaciones logradas para acetamiprid, imidacloprid y tiacloprid fueron del 91-101%, para tiametoxam, del 61%, y, para clotianidina, fueron de un 10-20%. Clotianidina y tiametoxam son compuestos más polares, y, por lo tanto, se ven afectados negativamente por el contenido en etanol de la muestra [29]. Clotianidina se retiene pobremente en el cartucho HLB, incluso con bajos porcentajes de etanol. El análisis mediante LC-MS/MS proporcionó bajos límites de detección y cuantificación (0,2-4,4 µg/kg y 0,7-14,7 µg/kg, respectivamente). Los efectos de matriz fueron bajos para los compuestos polares (clotianidina y tiametoxam) pero altos para el resto de compuestos, por lo que se empleó calibración con ajuste matricial y se estudió el efecto de la matriz. El analizador de masas se empleó en el modo SRM (monitorización de la reacción seleccionada).

#### **3.1.4 Extracción en fase sólida en muestras de cera de abejas.**

P. Yáñez et al., desarrollaron un método para la determinación simultánea de siete neonicotinoides (acetamiprid, clotianidina, dinotenfuran, imidacloprid, nitenpyram, tiacloprid y tiametoxam) en muestras de cera de abeja [30]. Para la preparación de la muestra, se realizó una optimización de un procedimiento SPE. Se seleccionaron 2 g de muestra de cera de abeja, y, como disolventes, se evaluaron diclorometano, cloroformo y n-hexano. Se seleccionó hexano para la disolución y se añadió isopropanol, para

mejorar la extracción de los analitos y favorecer su disolución. Las mejores recuperaciones se obtuvieron con 15 mL de una mezcla de n-hexano/isopropanol 8:2 (v/v). Como extractante, se evaluaron 3 disolventes inmiscibles con n-hexano: acetonitrilo, metanol y agua. La mejor separación de fases y eficiencia de extracción de todos los analitos se obtuvo con 10 mL de agua. Para mejorar la preconcentración de la muestra y eliminar las interferencias de la matriz, se llevó a cabo una etapa de limpieza de muestra evaluando distintos cartuchos: Florisil®, Oasis® HLB, Strata® C18-E y Isolute® HM-N relleno con un material diatómico macroporoso. Los cartuchos basados en diatomeas tienen algunas ventajas frente a los cartuchos SPE convencionales, como que requieren de menos etapas, menor tiempo, y, además, mejoran la repetibilidad [30]. Para el acondicionamiento del cartucho se emplearon 5 mL de metanol y 5 mL de agua, y, para la elución, se probaron 5 mL de cuatro disolventes distintos (cloroforno, acetato de etilo, diclorometano, acetona y acetonitrilo). Las mejores recuperaciones se obtuvieron con el cartucho Isolute® HM-N y con 20 mL de acetona como disolvente de elución, que, además de proporcionar buenas recuperaciones, tiene la ventaja de evaporarse más fácilmente que el acetonitrilo. En la última etapa de reconstitución de la muestra, también se evaluaron distintos disolventes, seleccionando finalmente una mezcla de agua y acetonitrilo (50:50, v/v). Las recuperaciones obtenidas mediante este procedimiento fueron del 85 al 105%.

Los parámetros cromatográficos (composición de la fase móvil, temperatura y volumen de inyección), también fueron optimizados en este estudio. Se empleó una columna en fase inversa Kinetex® C18, que cuenta con una tecnología de partículas de núcleo fundido que permite mejorar la eficiencia y velocidad de separación sin reducir el tamaño de las partículas [30]. En cuanto a la fase móvil, se empleó 0,1% de ácido fórmico en agua y acetonitrilo (90:10, v/v). El ácido fórmico no afecta a la separación, pero se adiciona a la fase móvil para facilitar la protonación de las moléculas cuando se emplea electrospray (ESI) en modo positivo como fuente de ionización [30]. La temperatura óptima de la columna fueron 35°C y el volumen de inyección 15 µL.

En el análisis MS, se probaron dos fuentes de ionización, ESI y ionización química a presión atmosférica (APCI), obteniendo los mejores resultados con ESI en modo positivo. En modo SIM, se seleccionó el ion molecular protonado  $[M+H]^+$  para la cuantificación, y, los dos iones siguientes con mayor intensidad, para la confirmación. En el análisis MS se observaron efectos de matriz, que afectan a la ionización de los analitos produciendo supresión de la señal. Por lo tanto, es necesario el empleo de patrones para la calibración. Mediante este método se lograron límites de detección y cuantificación de 0,4-2,3 µg/kg y 1,5-7,0 µg/kg, respectivamente. El método desarrollado

se aplicó para el análisis de 30 muestras de cera, encontrando tiametoxam en 8 de las muestras, en concentraciones entre 25-153  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , acetamiprid en 4, entre 11-61  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , y, imidacloprid en una, en 39  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Cabe destacar que en el caso de tiametoxam y acetamiprid, algunas de las concentraciones encontradas superan los MRLs establecidos por la Unión Europea, 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para ambos.

Jabot et al. desarrollaron un método para la determinación simultánea de 5 neonicotinoides (acetamiprid, clotianidina, imidacloprid, tiacloprid y tiametoxam), 2 metabolitos (imidacloprid-olefina, 5-hidroxi-imidacloprid), además de otros pesticidas de la familia de los piretroides y carboxamidas en muestras de cera de abeja [31]. En este estudio se plantearon varios métodos distintos de preparación de muestra (extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida y extracción en fase sólida dispersiva), con el objetivo de evaluarlos en cuanto a las recuperaciones obtenidas y eliminación de la matriz de la muestra, pero también de otros factores como el consumo de disolventes orgánicos, que puede tener un impacto significativo en el medio ambiente, el tiempo necesario de análisis y el coste. Uno de los factores que dificulta el procedimiento de extracción en este estudio es la variedad de propiedades fisicoquímicas de los compuestos que se analizan. Por un lado, los neonicotinoides son hidrofílicos, mientras que los piretroides son lipofílicos y las carboxamidas moderadamente hidrofílicas [31]. En la optimización de la extracción líquido-líquido se evaluaron varios disolventes (cloroformo, ACN, diclorometano, heptano, MeOH, acetona, tolueno, acetato de etilo) y mezclas de ellos (50:50, v/v). No obstante, no se logró extraer con buenas recuperaciones todos los compuestos, en particular los piretroides debido a su naturaleza lipofílica. El procedimiento de extracción en fase sólida (SPE) se realizó con un cartucho EXTrelut. El protocolo consistió en disolver 0,5 g de cera enriquecida en 20 mL de heptano, seguido de agitación. La muestra se depositó en un cartucho lleno de tierras diatomeas y se eluyó con 10 volúmenes de 10 mL de acetonitrilo. Se probaron como disolventes de elución acetonitrilo, MeOH y una mezcla de los dos. Para los neonicotinoides no se observó una mejora significativa con el uso únicamente de acetonitrilo, mientras que los compuestos de la familia de los piretroides obtuvieron una mejor recuperación, por lo que este fue el disolvente empleado. Además, en este método se llevó a cabo una etapa adicional de purificación con PSA, PSA + C18 y PSA + C18 + C. Sin embargo, esto no supuso una mejora en la señal obtenida, por lo que se descartó esta etapa. El método SPE desarrollado logró un buen rendimiento, pero cuenta con varios inconvenientes: alto consumo de disolventes, elevado tiempo de análisis, y alto coste debido al cartucho. Por último, se desarrolló un método d-SPE empleando cartuchos EXTrelut y tierras diatomeas. Las tierras diatomeas presentan un

tamaño de partícula pequeño, lo que permite aumentar la superficie de intercambio con el disolvente y mejorar las recuperaciones [31]. Se emplearon 2,4 g de tierras diatomeas para los 0,5 g de muestra de cera. El disolvente empleado fue acetonitrilo con 0,1% de ácido fórmico para mantener el pH, y el volumen óptimo fueron 30 mL. Tras la evaporación, se añadieron 0,2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), que es un disolvente aprótico de baja volatilidad, para evitar la pérdida de compuestos volátiles durante esta etapa y disolver los compuestos hidrofóbicos y hidrofílicos [31]. Por último, la muestra se reconstituyó en 1,8 mL de una mezcla H<sub>2</sub>O/MeOH (80/20) para su posterior análisis por UHPLC-MS/MS. Las recuperaciones logradas mediante este método para los compuestos de la familia de los neonicotinoides fueron de 73-97%. Además, los efectos de matriz no fueron demasiado elevados (entre -2 y -22%). Los límites de detección y cuantificación fueron de 1-5 µg/kg y de 1-20 µg/kg, respectivamente.

El método desarrollado se aplicó al análisis de 60 muestras de cera de abejas recolectadas durante dos años. El análisis se llevó a cabo empleando un método con ajuste matricial para compensar los efectos de matriz de la muestra. En las muestras analizadas se encontraron únicamente cuatro analitos, entre ellos dos neonicotinoides (imidacloprid y tiacloprid). El pesticida encontrado con mayor frecuencia fue tiacloprid, en una concentración máxima de 3,4 µg/kg.

### **3.1.5 Extracción en fase sólida magnética (MSPE).**

La extracción en fase sólida magnética (MSPE), es una técnica novedosa con un funcionamiento sencillo, que requiere poco tiempo y proporciona un alto rendimiento [18]. En esta técnica, un adsorbente magnético se dispersa uniformemente en la matriz de la muestra en fase acuosa, de manera que el contacto con los analitos es amplio, lo que mejora la eficiencia de extracción y permite acortar el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio [18,19]. Por lo tanto, en MSPE, el tipo de adsorbente magnético es el parámetro principal que determina la eficiencia de la extracción [18]. En MSPE, el sorbente se separa de la muestra mediante un imán, evitando realizar pasos como la centrifugación o filtración [19].

Recientemente, An et al. desarrollaron un polímero orgánico magnético nanoporoso basado en la proantocianidina (PA-MOP), para aplicarlo como sorbente en MSPE y llevar a cabo la extracción de cuatro neonicotinoides (tiametoxam, imidacloprid, acetamiprid) y posterior análisis mediante HPLC-DAD en muestras miel, agua y zumo de melocotón [19]. Los polímeros orgánicos porosos (POPs) son materiales que se forman mediante la unión de monómeros orgánicos a través de enlaces covalentes y se

caracterizan por tener una alta porosidad [19]. Los POPs orgánicos ofrecen ventajas como una separación de fases sencilla y una elevada capacidad de adsorción [19]. En este estudio se elaboró un POP magnético (PA-MOP) mediante reacción de diazo-acoplamiento entre proantocianidina y bencidina en disolución acuosa en presencia de nanopartículas magnéticas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ ). La proantocianidina es un polifenol natural presente en las plantas, por lo que tiene la ventaja de ser un recurso ecológico y respetuoso con el medio ambiente. El PA-MOP contiene abundantes anillos bencénicos y grupos  $-\text{OH}$ , e interacciona con los neonicotinoides mediante enlaces de hidrógeno, interacciones de apilamiento  $\pi\text{-}\pi$  e interacciones electrostáticas [19]. En el desarrollo del método MSPE, se optimizaron parámetros como el tiempo de extracción, cantidad de PA-MOP, pH de la disolución y las condiciones de desorción. Se seleccionaron 30 mg de sorbente PA-MOP, que se añadieron a una disolución acuosa de 100 mL de muestra donde se agitó durante 5 minutos, tiempo que se consideró suficiente para la adsorción de los analitos. No fue necesario ajustar el pH, ya que la disolución de las muestras de miel tiene pH en torno a 6 (en condiciones básicas los neonicotinoides sufren degradación) [19]. En cuanto a la adición de sales, pueden tener una influencia beneficiosa (reducir la solubilidad del analito en la disolución) o una influencia negativa (aumentar la viscosidad de la disolución) [19]. En este estudio se evaluó la adición de NaCl, sin observar una mejora en las recuperaciones, por lo que no se añadió en el método final. Como disolvente de elución se evaluaron metanol, acetonitrilo y acetona, seleccionando finalmente 0,3 mL de acetonitrilo, una cantidad que, aunque no es la óptima en cuanto a recuperaciones obtenidas, permite obtener una buena sensibilidad en el método evitando la excesiva dilución. Mediante el método MSPE-HPLC-DAD desarrollado, se obtuvieron recuperaciones entre 80,0 y 114%. Los límites de detección y cuantificación para las muestras de miel fueron de 0,05-0,16  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 0,15-0,50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente. Las repetibilidades fueron buenas, los valores de RSDs estuvieron entre 1,2 y 4,2%.

En otro estudio, Jiang et al. desarrollaron un sorbente magnético, un polímero orgánico poroso magnético, para aplicarlo a MSPE y extraer simultáneamente 4 neonicotinoides (tiametoxam, imidacloprid, acidacloprid y tiametacloprid) en muestras de miel y zumo de limón [18]. El polímero sintetizado (Rut-MOP) se obtuvo a partir de un monómero precursor natural y renovable (rutin), mediante una reacción de diazo-acoplamiento en presencia de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$  y 4,4'-diaminobifenil. Esta reacción de diazo-acoplamiento cuenta con las características de ser simple y ambientalmente sostenible, ya que se emplea agua como disolvente, en lugar de disolventes orgánicos

contaminantes [18]. La figura 4 muestra de manera esquemática la preparación del sorbente Rut-MOP.

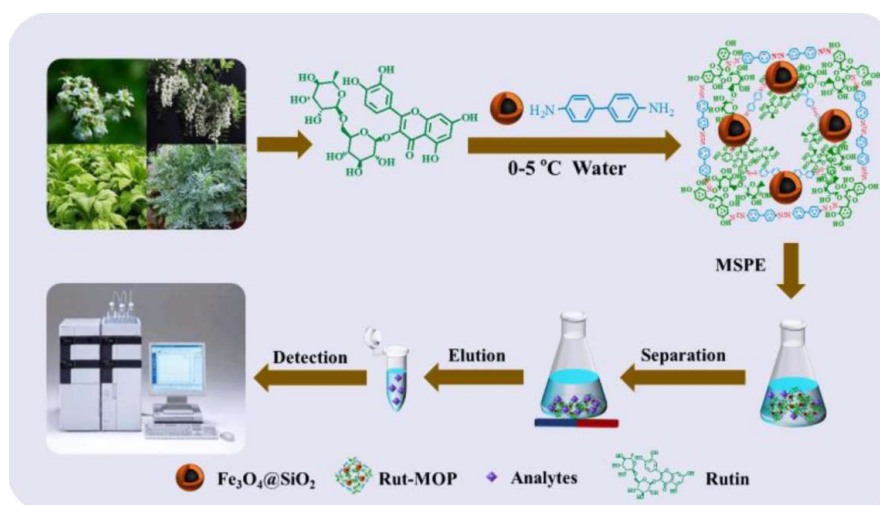


Figura 4: Preparación del sorbente Rut-MOP para MSPE [18].

El polímero adsorbente magnético Rut-MOP permite la extracción de los neonicotinoides gracias a las interacciones que establece con ellos, que son de tipo enlace de hidrógeno e interacciones de apilamiento  $\pi$ - $\pi$  (con los grupos hidroxilo fenólicos y anillos de benceno del Rut-MOP) e interacciones ácido-base (de los grupos nitro y ciano de los neonicotinoides, que son aceptores de electrones, con los anillos bencénicos del Rut-MOP, que son donadores de electrones) [18]. Para mejorar la eficiencia de la extracción MSPE se optimizaron los parámetros: tipo y volumen de eluyente, cantidad de adsorbente, tiempo de extracción, cantidad de sal añadida y pH de la disolución. Se añadieron 30 mg del sorbente Rut-MOP a una disolución de 100 mL de muestra, y, durante 25 minutos se puso en agitación para dispersar el adsorbente y acelerar la extracción. Una vez finalizada la extracción se recogió el Rut-MOP de la disolución y se desechó el sobrenadante. Para eluir los neonicotinoides adsorbidos en el Rut-MOP, se evaluaron los disolventes metanol, acetona y acetonitrilo, obteniendo las mejores recuperaciones con 0,8 mL de acetonitrilo. No obstante, en el método final emplearon 0,2 mL, que, aunque perjudica a la eficiencia de extracción, permite obtener una buena sensibilidad. También fue estudiada la influencia de otros parámetros como el pH y la salinidad. Es necesario controlar el pH para asegurar la estabilidad y la forma en que se encuentra el analito. Ya que el pH de la muestra de miel es de 6, no fue necesario ajustar el pH. En cuanto a la adición de sales, en este estudio, se añadieron diferentes cantidades de NaCl y no se observó mejoría en las recuperaciones, por lo que finalmente no se añadió en el método. Otro factor que cabe destacar de este método es la reutilización de los adsorbentes Rut-MOP, un factor importante para la aplicabilidad del método. Se demostró que el sorbente puede ser reutilizado hasta 20 veces sin



perder sus propiedades y capacidad de adsorción [18]. El método MSPE desarrollado, se acopló a HPLC-DAD para la detección de los analitos. Mediante este método se obtuvieron recuperaciones entre 81,6 y 118% en las muestras de miel. Los límites de detección del método fueron de 2,5-3,0 µg/kg y los límites de cuantificación de 8-10 µg/kg.

La tabla 3 recoge un resumen de los métodos comentados.

Tabla 3: Principales parámetros de los métodos que emplean extracción en fase sólida y extracción en fase sólida magnética.

Métodos extracción en fase sólida (SPE) y extracción en fase sólida magnética (MSPE)												
Compuesto	Matriz	Disolvente de extracción	Etapas de extracción	Cartucho	Rec. (%)	Método de análisis	Tipo de columna / fase móvil	Fuente de ionización	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	RSDr (%)	Ref.
Acetamiprid, clotianidina, dinotefuran, imidacloprid, nitenpyram, tiacloprid y tiametoxam + 5 metabolitos	Miel	10 mL 1% ACN-acetato de etilo (8:2, v/v) y 200 µL de 20% TEA en ACN	Acondicionamiento: 3 mL metanol y agua. Lavado: 5 mL de agua. Elución: 3mL ACN-acetato de etilo 8:2, v/v)	Strata X-CW	88,6-109,2	LC-MS/MS (QqQ)	Columna: Luna C18(2) 100A Fase móvil (gradiente): (A) ACN; (B) Agua	ESI (modo positivo)	-	0,1-0,5	2,8-10,9	20
Clotianidina, imidacloprid y tiametoxam + metabolitos	Miel y polen	Miel: 5 g muestra + 10 mL agua  Polen: 2g muestra +10 mL diclorometano	Acondicionamiento: 5ml metanol, 5 mL agua Lavado: 2 mL metanol/agua (70:30, v/v) Elución: 2 mL acetonitrilo/agua (45:55, v/v)	Strata X	Polen: 88-101  Miel: 61-105	HPLC-MS/MS (QTOF)	Columna: Kinetex 2.6 µm + C18 (Phenomenex) Fase móvil (gradiente): (A) agua; (B) acetonitrilo, ambos con 0,1% ácido fórmico	ESI (modo positivo)	Miel:1,2-19,0 Polen:0,6-1,2	Miel:4,1-50 Polen:2,0-4,0	Polen: <8,2 Miel:<7,5	21
Acetamiprid, clotianidina, dinotefuran, imidacloprid, nitenpyram, tiacloprid y tiametoxam	Miel	5g de muestra en 10 mL de disolución acuosa de formiato de amonio 10 mM	Acondicionamiento: 5mL metanol y 5 mL de agua Lavado: No Elución: 4 mL ACN-acetato de etilo (80:20, v/v)	Strata X	80-108	UHPLC-MS/MS (QTOF) y UHPLC-MS/MS (QqQ)	Columna: Kinetex EVO C18 Fase móvil (gradiente): (A) ACN; (B) Agua, ambas con 0,1% (v/v) ácido fórmico	ESI (modo positivo)	QTOF: 0,7-2,0 QqQ: 0,02-0,2	QTOF: 2,3-6,8 QqQ: 0,04-0,8	<10	23
Acetamiprid, clotianidina, imidacloprid, tiacloprid y tiametoxam	Miel	5 g muestra + 100 mL agua	Acondicionamiento: 5 mL metanol + 5 mL agua Lavado: 10 mL disolución acuosa NH <sub>3</sub> (25%) y MeOH (9:1; pH=11) Elución: 5 mL acetato de etilo	HLB	70,7-113,6	LC-MS/MS (QqQ)	Columna: Agilent C8 Fase móvil (gradiente): (A) 0,1% ácido fórmico; (B) ACN	ESI (modo positivo)	0,05-0,97	0,15-3,25	0,9-7,2	24
Acetamiprid, imidacloprid, tiacloprid y tiametoxam	Miel	-	Acondicionamiento: 1 mL metanol + 3 mL agua Carga: 100 mL muestra Elución: 0,3 mL ACN Lavado: 0,3 mL ACN + 0,3 mL Agua	Sorbente TAPA-BPDA-COF	80,0-121,9	HPLC-DAD	Columna: CenturySIL C18-BDS Fase móvil (elución isocrática): acetonitrilo-agua (21:79 v/v)	-	2,6-3,3	7,8-9,9	3,2-6,4	26
Acetamiprid, clotianidina, dinotefuran, imidacloprid, nitenpyram,	Polen	5 g de muestra en 10 mL de agua, 10 mL de hexano, 10 mL de ACN, 6 g MgSO <sub>4</sub> , 3 g acetato de sodio	Acondicionamiento: 6 mL ACN Elución: 3 mL de ACN	Supelclean Envi-Carb II/PSA	81,5-98,9	UHPLC-MS/MS (QqQ)	Columna: Hypersil GOLD Fase móvil (gradiente): (A) ACN; (B) Agua	ESI (modo positivo)	0,2-2,2	0,4-4,3	≤8,8	27

tiacloprid y tiametoxam													
Acetamiprid, clotianidina, dinotenfuran, flonicamid, imidacloprid, imidaclothiz, nitenpyram, pimetrozina, tiacloprid y tiametoxam + 2 metabolitos	Miel y jalea real	Miel: 2g en 20 mL agua + 15 mL agua Jalea real: 2 g + 10 mL agua, 10 mL metanol.	Acondicionamiento: 5mL metanol, 5 mL agua Lavado: 5 mL metanol/agua 1:9 (v/v) Elución: 5 mL metanol	Oasis HLB	Miel: 75,8-106,5 Jalea real: 72,8-105,3	LC-MS/MS (QqQ)	Columna: ZORBAX Eclipse XDB-C18. Fase móvil (gradiente): (A) metanol; (B) 5mmol/L acetato de amonio	ESI (modo positivo)	-	0,25–5,0	<13,8	28	
Acetamiprid, clotianidina, imidacloprid, tiacloprid y tiametoxam	Propoleo	0,5g de muestra con 50 mL disolución acuosa de EtOH 10%	Acondicionamiento: 5mL metanol, 5 mL agua Lavado: 10mL NH <sub>3</sub> (25%) y MeOH (9:1; pH = 11) Elución: 5 mL acetonitrilo	Oasis HLB	61-101 (excepto clotianidina 10-20%)	LC-MS/MS (QqQ)	Columna: Agilent C8 Fase móvil (gradiente): (A) 0,1% HCOOH (B) acetonitrilo	ESI (modo positivo)	0,2-4,4	0,7-14,7	3-29	29	
Acetamiprid, clotianidina, dinotenfuran, imidacloprid, nitenpyram, tiacloprid y tiametoxam	Cera de abejas	2g muestra + 15 mL n-hexano/isopropanol (8:2, v/v) + 10 mL agua	Acondicionamiento: 5 mL metanol + 5 mL agua Elución: 20 mL acetona	Isolute HM-N relleno con tierras diatomeas	85-105	LC-ESI-MS (Q)	Columna: Kinetex C18 Fase móvil (gradiente): (A) 0,1% ácido fórmico en agua; (B) ACN	ESI (modo positivo)	0,4-2,3	1,5-7,0	<8	30	
Acetamiprid, clotianidina, imidacloprid, tiacloprid y tiametoxam + 2 metabolitos	Cera de abeja	dSPE: 0,5 g de muestra + 2,4 g tierras diatomeas + 4 mL de pentano + 30 mL de ACN con 0,1% ácido fórmico + 0,2 mL DMSO  SPE: 0,5 g + 20 mL pentano	SPE: Elución: 100 mL ACN	EXtrelut + tierras diatomeas	73-97	UHPLC-MS/MS (QqQ)	Columna: Kinetex Phenyl-Hexyl Fase móvil (gradiente): (A) Agua con 0,01% de ácido fórmico y 0,04 mM de acetato de amonio; (B) MeOH	ESI (modo positivo)	1-5	1-20	9-45	31	
Acetamiprid, imidacloprid, tiacloprid y tiametoxam	Miel	11 g muestra en 110 mL agua	Extracción 30 mg sorbente PA-MOP + 100 mL de muestra. Elución: 0,3 mL ACN	Sorbente PA-MOP	95,1-114	HPLC-DAD	Columna: fase inversa C18 Fase móvil (elución isocrática): acetonitrilo-agua (20:80 v/v)	-	0,05-0,16	0,15-0,50	1,2-4,2	19	
Acetamiprid, imidacloprid, tiacloprid y tiametoxam	Miel	Disolución muestra en agua (1:10)	Extracción: 30 mg sorbente Rut-MOP + 100 mL de muestra. Elución: 0,2 mL ACN	Sorbente Rut-MOP	81,6-118	HPLC-DAD	Columna: CenturySIL C18-BDS Fase móvil: acetonitrilo/agua (22:78 v/v)	-	2,5-3,0	8-10	4,0-7,6	18	

### 3.2 QuEChERS

QuEChERS es un método de preparación de muestra, acrónimo en inglés de Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe (rápido, fácil, económico, efectivo, robusto y seguro). Se trata de un método desarrollado en base a la extracción líquido-líquido asistida por sal y la extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE), cuyo procedimiento se divide en tres pasos [32]: el primer paso consiste en una extracción mezclando ACN y agua. Posteriormente, se añaden sales para provocar la separación del ACN de la mezcla (normalmente cloruro de sodio y sulfato de magnesio). Por último, una alícuota con la fase ACN se limpia mediante d-SPE para reducir las interferencias [33].

El acetonitrilo como disolvente de extracción es ampliamente utilizado, ya que se trata de un disolvente de polaridad media que permite la extracción de compuestos con diferentes propiedades fisicoquímicas. Además, se trata de un disolvente respetuoso con el medio ambiente y que no es persistente [34].

La etapa de pretratamiento de muestra es esencial para evitar el deterioro del equipo analítico y eliminar la interferencia de la matriz en el analizador de masas. Los métodos QuEChERS y dSPE tienen la ventaja de ser técnicas simples y robustas, adecuadas para la extracción y limpieza de analitos en distintas matrices, como tejidos biológicos, alimentos, muestras medioambientales, etc [35].

La matriz de las muestras de miel, es una matriz compleja compuesta por azúcares (fructosa, glucosa, sacarosa, maltosa...), agua, sustancias nitrogenadas, proteínas, ácidos orgánicos, polifenoles y otras sustancias como polen, esporas, etc [36]. En análisis de este tipo de muestras, debido a su complejidad el efecto de matriz puede ser importante. Los efectos de matriz provocan una supresión o aumento de la ionización de los analitos en el espectrómetro de masas, lo que produce una disminución o aumento de la señal de los analitos, afectando a la exactitud y la precisión [34]. Por ello, es necesario el desarrollo de métodos que sean capaces de eliminar estas sustancias interferentes y proporcionen buenas recuperaciones de los analitos objetivo.

El método QuEChERS es ampliamente utilizado por sus ventajas respecto a los métodos tradicionales: se logran altas recuperaciones con pesticidas de distinta polaridad y volatilidad, alto rendimiento de las muestras, se requiere bajas cantidades de solventes, es económico y requiere un reducido y sencillo equipamiento. Su principal desventaja es que se obtienen límites de cuantificación (LOQs) más altos, debido a que el factor de enriquecimiento es menor. Además, el acetonitrilo tiene un elevado volumen de expansión de vaporización, lo que tiende a limitar el volumen de inyección en cromatografía de gases (GC) [37].

### 3.2.1 Método QuEChERS y análisis HPLC-MS/MS en muestras de miel.

El procedimiento de tratamiento de muestra QuEChERS se ha empleado para la extracción simultánea de un alto número de pesticidas, entre ellos distintos neonicotinoides, en muestras de miel [38, 39, 34, 42, 21].

L. Wiest et al., desarrollaron un método para el análisis simultáneo de 80 compuestos diferentes, entre los que se encontraban tres de la familia de los neonicotinoides (clotianidina, imidacloprid, tiametoxam) en muestras de miel, polen y abejas [38]. Cabe destacar que los compuestos analizados, que fueron distintos contaminantes ambientales, pesticidas y medicamentos veterinarios, tienen propiedades fisicoquímicas muy variadas, lo que hace necesario el empleo de dos técnicas de separación diferentes: cromatografía de gases y de líquidos. Para la extracción y limpieza de las muestras se optimizó un método QuEChERS. Para las muestras de miel, 5 g de muestra se extrajeron con 10 mL de agua y 10 mL de acetonitrilo. La etapa de partición se llevó a cabo con 4 g de  $MgSO_4$  anhidro, 1 g de cloruro de sodio, 1 g de citrato de sodio dihidratado y 0,5 mg de citrato disódico sesquihidratado. Tras agitación y centrifugación, para la etapa dSPE, 6 mL del sobrenadante se adicionaron a un tubo con 900 mg de  $MgSO_4$  anhidro y 150 mg de PSA. El procedimiento de tratamiento de muestras de polen se describe en el apartado 3.2.3. Las condiciones del análisis mediante LC-MS/MS también fueron optimizadas. La separación cromatográfica es una etapa crucial que presenta cierta complejidad cuando se quieren separar un elevado número de compuestos con propiedades fisicoquímicas muy diferentes. En este estudio se empleó una columna C18 denominada "Nucleodur Sphinx RP", cuya fase contiene C18 y ligandos propilfenilo que permiten interacciones  $\pi$ - $\pi$  con compuestos aromáticos para mejorar su retención [38]. La composición de la fase móvil fue de (A) agua con 0,3 mM de formiato de amonio y 0,05% de ácido fórmico y (B) metanol. El disolvente de inyección empleado para el extracto de miel fue una mezcla de 90% agua y 10% acetonitrilo, ya que con un 100% de acetonitrilo se observó una mala resolución para los compuestos más polares que eluyen primero. El método desarrollado logró, para las muestras de miel, recuperaciones entre 88 y 104%, así como límites de detección entre 0,2 y 0,3  $\mu g/kg$  y límites de cuantificación entre 3,9 y 4,3  $\mu g/kg$ . En cuanto al efecto de matriz, se observaron fuertes efectos (supresión o aumento de la señal de los analitos) tanto por LC-ESI-MS/MS como por GC-EI-MS. Para evitar errores en la cuantificación, fue necesario elegir una calibración por patrón interno, adiciones patrón o calibración con ajuste matricial. La calibración por patrón interno es la más eficaz corrigiendo el efecto de matriz, con la desventaja de que requiere del uso de patrones marcados isotópicamente de los analitos, los cuales pueden no estar disponibles comercialmente

para algunos compuestos [38]. La calibración por adiciones patrón también es un método eficiente, pero resulta muy laborioso y consume mucho tiempo, especialmente cuando se analizan un gran número de muestras [38]. Por ello, se empleó la calibración con ajuste matricial, un método que resulta eficaz cuando se dispone de una matriz en blanco (sin analitos) y que presente los mismos efectos que las muestras analizadas [38].

Barganska et al., desarrollaron un método para la determinación simultánea de 30 residuos de pesticidas, entre ellos dos neonicotinoides (imidacloprid y tiametoxam), en muestras de miel, y, posteriormente lo aplicaron para el análisis de muestras de miel recolectadas en Polonia [39]. Para el tratamiento de muestra, emplearon un método QuEChERS. Primero, 1 g de muestra se mezcló con 10 mL de acetonitrilo y 10 mL de agua. Posteriormente, para la etapa de partición se empleó un kit de sales (4 g de sulfato de magnesio anhidro, 1 g de cloruro de sodio, 1 g de citrato de sodio y 0,5 g de hidrogenocitrato de sodio sesquihidratado). De la fracción de acetonitrilo, se transfirió 1 mL a un tubo dSPE con 150 mg de sulfato de magnesio anhidro y 25 mg de PSA. Para la separación cromatográfica se empleó una columna Poroshell 120 EC-C18 y una fase móvil con una mezcla de (A) agua y (B) metanol, ambos con 10 mM de acetato de amonio. El análisis MS/MS, se llevó a cabo empleando en modo MRM y con un analizador de masas de triple cuadrupolo. El método desarrollado obtuvo recuperaciones entre 84,9-95,0% para los dos neonicotinoides, así como límites de detección de 1,28 µg/kg para imidacloprid y 1,14 µg/kg para tiametoxam. El método validado se aplicó para el análisis de 30 pesticidas en 45 muestras de miel recolectadas en Polonia. Los neonicotinoides imidacloprid y tiametoxam, se encontraron en un 11% de las muestras, en una concentración máxima de 15,2 µg/kg y 20,0 µg/kg, respectivamente.

Orso et al., desarrollaron un método rápido y eficiente para la determinación simultánea de 79 pesticidas de distintas clases y 13 antibióticos en muestras de miel mediante UHPLC-MS/MS [34]. Entre los pesticidas analizados, se encuentran 5 del grupo de los neonicotinoides (acetamiprid, clotianidina, imidacloprid, tiametoxam y tiacloprid). Para el pretratamiento de muestra, se evaluó el método QuEChERS de citrato [40] adicionando a 2 g de miel 0,1 mol/L de tampón McIlvaine (pH 4) para homogeneizar la muestra antes de añadir acetonitrilo como disolvente de extracción. No se llevó a cabo etapa de partición. En la etapa de limpieza, a 1 mL de sobrenadante se le añadieron 150 mg de MgSO<sub>4</sub> y distintas combinaciones de sorbentes: C18/PSA, florisil/C18, florisil/PSA, C18, Oasis HLB, PSA y florisil. Los mejores resultados se obtuvieron mediante la adición de 50 mg de florisil (sorbente con una superficie polar que interacciona con azúcares [41]),

logrando recuperaciones entre 70-120% y RSD<20% para 86 compuestos. El método de tratamiento de muestra descrito no fue capaz de extraer eficazmente los antibióticos (los porcentajes de recuperación fueron de un 40-60%). Cabe destacar que la mayoría de compuestos mostraron efectos de matriz, por lo que se llevó a cabo una calibración mediante ajuste matricial. En MS se empleó un analizador de triple cuadrupolo operando en modo SRM. Se seleccionaron dos transiciones, una para la cuantificación y otra para la confirmación con la energía de colisión. El método desarrollado presenta ventajas como la determinación simultánea de un gran número de pesticidas, la simplicidad, el bajo coste y bajo consumo de solventes, además de una buena selectividad y sensibilidad, lo que lo convierte en una buena opción para análisis rutinarios de laboratorio [34]. Los límites de cuantificación de los neonicotinoides analizados fueron de 0,1-2,0 µg/kg, todos ellos por debajo de sus valores MRLs.

Hrynko et al., desarrollaron un método analítico para el análisis de más de 130 pesticidas de 29 clases diferentes, entre ellos, 7 de la familia de los neonicotinoides (acetamiprid, clotianidina, dinotenfuran, nitenpyram, tiacloprid y tiametoxam), en muestras de miel [42]. En este estudio se realizó una optimización del método QuEChERS (cantidad de muestra, tipo y volumen de disolvente de extracción, tiempo de mezcla y sorbentes de extracción), para obtener buenas recuperaciones y eliminar en la medida de lo posible las sustancias interferentes que provocan los efectos de matriz. La cantidad óptima de muestra de miel (5 g) se disolvió en 10 mL de agua, y, posteriormente, en 10 mL de acetonitrilo adiccionado con 0,1, 0,5 o 1% de ácido fórmico, 4 g de sulfato de magnesio anhidro, 1g de cloruro sódico, 1g de citrato trisódico deshidratado y 0,5g de citrato de hidrógeno disódico sesquihidratado. El ácido fórmico se añade con la finalidad de mantener un pH constante, en torno a 5, para obtener buenas recuperaciones de compuestos sensibles a los ácidos evitando degradar compuestos sensibles a las bases [42]. Las mejores recuperaciones se obtuvieron con 1% de ácido fórmico en acetonitrilo. Para la etapa de limpieza se hicieron pruebas con distintos sorbentes de d-SPE: óxido de aluminio, quitosano, gel de sílice, C18, C8, florisil, mezcla quitosano/óxido de aluminio/C8, mezcla quitosano/óxido de aluminio/C18, mezcla quitosano/florisil y mezcla PSA/C18/MgSO<sub>4</sub>. El mejor resultado se logró con la mezcla quitosano/óxido de aluminio/C18, obteniendo recuperaciones entre 70-120% para 116 de los 132 compuestos. Con esta combinación no se observaron efectos de matriz para 119 analitos, no obstante, en el caso de los neonicotinoides, un 37% de los compuestos mostraron un efecto de matriz negativo.

Gawel et al., desarrollaron un método para la determinación de 207 residuos de pesticidas en miel, entre ellos 6 neonicotinoides (acetamiprid, clotianidina, imidacloprid,

nitenpyram, tiacloprid y tiametoxam) y dos metabolitos (imidacloprid-olefina, imidacloprid-urea), empleando un método QuEChERS modificado y LC-MS/MS o GC-MS/MS, dependiendo del tipo de pesticida [43].

El método QuEChERS fue optimizado con la finalidad de mejorar la eficiencia del proceso. Para la extracción de las muestras, se evaluaron acetonitrilo con tampón de citrato, de acetato y acetonitrilo sin tampón. Para la limpieza mediante d-SPE, se probaron cuatro mezclas de sorbentes: 25 mg PSA + 150 mg MgSO<sub>4</sub>; 50 mg PSA + 50 mg C18 + 150 mg MgSO<sub>4</sub>; 50 mg PSA + 50 mg Florisil + 150 mg MgSO<sub>4</sub>; 50 mg PSA + 50 mg Z-Sep+ + 150 mg MgSO<sub>4</sub>). Se observó una mejora de la eliminación de la matriz al añadir sorbentes al PSA, en el orden C18 < florisil < Z-Sep+ (independientemente del disolvente de extracción utilizado).

La limpieza d-SPE con PSA + MgSO<sub>4</sub>, PSA + MgSO<sub>4</sub> + C18 y PSA + Florisil + MgSO<sub>4</sub>, cuando se emplea acetonitrilo con tampón citrato, proporciona un mayor número de compuestos con recuperaciones entre 70-120%. Por otro lado, la extracción con el tampón acetato y limpieza con PSA + Z-Sep+ + MgSO<sub>4</sub> muestra un mayor número de compuestos con recuperaciones óptimas que la extracción con citrato. En el caso de extracción con citrato y limpieza con PSA + Z-Sep+ + MgSO<sub>4</sub>, incrementa el número de compuestos con recuperaciones inferiores al 70%, pasando de ser de 10 compuestos con la limpieza PSA + MgSO<sub>4</sub>, a 63 con la mezcla PSA + Z-Sep+ + MgSO<sub>4</sub>. Por lo tanto, el método optimizado empleado en este estudio fue la extracción con acetonitrilo y tampón acetato y posterior limpieza d-SPE con PSA + Z-Sep + MgSO<sub>4</sub>.

En cuanto a los efectos de matriz, el 68% mostró un efecto de supresión de la señal y el 32% un aumento. El 56% mostraron un efecto de matriz insignificante ( $\pm 20\%$ ), el 23% mostraron un efecto matricial medio y, el 19%, un efecto fuerte. Para compensar los efectos de matriz fue necesario llevar a cabo una calibración con ajuste matricial.

El método desarrollado se empleó para monitorizar los residuos de pesticidas en muestras de miel durante tres años (2015-2017), analizando un total de 155 muestras. Los nenocotinoides ciano-sustituidos, tiacloprid y acetamiprid, fueron los que se encontraron con mayor frecuencia, 68% y 55%, respectivamente. En el caso de acetamiprid, en dos muestras de miel se encontraron concentraciones de 120  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 130  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , que superan el MRL establecido (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Los neonicotinoides nitro-sustituidos como clotianidina, tiametoxam, imidacloprid y sus metabolitos, no fueron detectados en este estudio.

Recientemente, Kammoun et al. desarrollaron un método para determinar simultáneamente 9 neonicotinoides (dinotefuran, nitenpyram, tiametoxam, clotianidina,



imidacloprid, acetamiprid, flupiradifurano, sulfoxaflor y tiacloprid) a niveles de ultra-traza en muestras de miel [44]. El método se basó en un procedimiento QuEChERS seguido de la determinación mediante UHPLC-MS/MS, lográndose límites de cuantificación entre 2 pg/g y 20 pg/g dependiendo del compuesto. Además, se empleó el método ya optimizado para evaluar la estabilidad a largo plazo de los neonicotinoides en miel.

El procedimiento de preparación de muestra basado en QuEChERS se adaptó de otro estudio anterior [45]. El método se adaptó empleando una masa menor de miel (0,5g), ya que esto demostró una reducción significativa de los efectos de matriz. Primero, se realizó una etapa de extracción en 0,5g de muestra con 9 mL de H<sub>2</sub>O:ACN (50:50, v/v). Posteriormente, se llevó la separación de fases mediante la adición de 2 g de MgSO<sub>4</sub>, 0,5g de NaCl, 0,5 g de citrato de sodio dihidratado y 0,25 g de citrato de sodio sesquihidratado. Para la extracción por dispersión en fase sólida se emplearon 0,15 g MgSO<sub>4</sub>, 0,1g de PSA y 0,1g de fase C18. Mediante este método, las recuperaciones logradas se encontraron en un rango del 73 al 95% dependiendo del compuesto. Con la finalidad de comparar las capacidades de extracción de distintos métodos, se llevó a cabo una extracción líquido-líquido (LLE) basada en dos extracciones con acetato de etilo, que logró buenas recuperaciones (en el rango de 86 a 95%), excepto para el dinotefurano (58%) y para el nitepiram (16%). Estas bajas recuperaciones obtenidas en LLE se deben a la naturaleza polar de estos pesticidas, factor que se logra superar con la metodología QuEChERS [44].

Para la separación por HPLC se empleó una columna Cortecs C18+, ya que observaron una gran disminución de los efectos de matriz respecto a la columna Cortecs C18. En MS se empleó ESI en modo de ionización positivo y un analizador de triple cuadrupolo en modo MRM. Además, se observó que mediante la adición de formiato de amonio en la fase móvil mejoraban las señales de MS. El método desarrollado alcanzó unos niveles altos de sensibilidad y una buena precisión y exactitud, lo que lo convierten en un método adecuado para estudios ecológicos sobre insectos, ya que estos son afectados por concentraciones mucho más bajas que las que se consideran seguras para los humanos [44].

### **3.2.2 Método QuEChERS y análisis HPLC-UV en muestras de miel.**

Jovanov et al., desarrollaron un método analítico para la detección de siete neonicotinoides (dinotefurano, nitenpyram, thiametoxam, clotianidina, imidacloprid, acetamiprid y tiacloprid) en muestras de miel mediante HPLC-DAD [46]. A pesar de que un detector MS/MS proporciona una mejor sensibilidad y selectividad que DAD para la

determinación de neonicotinoides en matrices complejas, este tiene un precio más económico, por lo que puede resultar una mejor opción para algunos laboratorios de control. En este estudio, el tratamiento de muestra se llevó a cabo mediante dos procedimientos desarrollados anteriormente por los mismos autores para análisis con HPLC-MS/MS: microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) [47] y un procedimiento QuEChERS [40].

En DLLME se llevó a cabo la extracción de 5 mL de muestra con acetonitrilo y diclorometano (0,5:2,0 mL), y los extractos de diclorometano fueron reconstituídos con 0,5 mL de fase móvil.

Para el método QuEChERS, 15 mL de una disolución de 50 g/L enriquecida de miel se mezclaron con 4 g de sulfato de magnesio, 1,0 g de cloruro de sodio, 0,5 g de citrato de sodio dibásico sesquihidratado, 1,0 g de citrato de sodio tribásico deshidratado y 10 mL de acetonitrilo. Para la limpieza de la muestra, el extracto de acetonitrilo se transfirió a viales con 0,9 g de sulfato de magnesio y 0,15 g de amina primaria secundaria (PSA).

El empleo de un método de calibración con ajuste matricial fue necesario para compensar los efectos de la matriz, que no se eliminaron con ninguno de los dos métodos de preparación de muestra. Los efectos de la matriz se calcularon para los procedimientos DLLME y QuEChERS, observándose un efecto mayor en el procedimiento de limpieza mediante QuEChERS. Esto puede deberse a la mayor polaridad del disolvente de extracción empleado en este procedimiento (ACN), que provoca una mayor concentración de compuestos polares de la miel coextraídos [46]. Dinotenfuran y imidacloprid fueron los más afectados por los efectos de matriz. Las recuperaciones en el caso de DLLME fueron bajas para nitenpyram y dinotenfuran, lo que puede deberse a la alta polaridad de estos analitos. El método analítico empleado fue HPLC-UV con un detector DAD. Los neonicotinoides son compuestos polares con una elevada absorptividad molar en la región ultravioleta, lo que convierte a DAD en una técnica adecuada para el análisis de neonicotinoides. Los neonicotinoides nitenpyram, thiamethoxam, acetamiprid y thiacloprid mostraron la absorción UV óptima a 244 nm y clothianidin, dinotenfuran y imidacloprid a 266 nm. Se obtuvieron límites de detección comprendidos entre 1,5-2,5 µg/kg, todos ellos por debajo de sus respectivos MRLs, lo que indica que el empleo de un detector DAD puede ser una alternativa más económica al habitual MS/MS.

Recientemente, Ligor et al. desarrollaron un método para el análisis de residuos de neonicotinoides en miel, mediante tratamiento de muestra por un método QuEChERS y determinación por cromatografía líquida de ultra rendimiento con detección ultravioleta

(UHPLC-UV) [36]. En este estudio, el método se aplica a mieles de distintos orígenes, de las que además se investigan las propiedades fisicoquímicas (pH, acidez, conductividad eléctrica y valor Pfund). También se lleva a cabo una caracterización de granos de polen de distintas plantas, para confirmar el tipo de miel.

Primero, 5 g de muestra de miel se extrajeron con 10 mL de agua y, posteriormente, 10 mL de acetonitrilo. La etapa de partición se llevó a cabo con 4 g de  $MgSO_4$  anhidro y 1 g de NaCl. Por último, se realizó la etapa de purificación, aunque no fue necesaria para todas las muestras. En ella, se emplearon 0,15 g de  $MgSO_4$  anhidro, 0,05 g de PSA y 0,05 g de C18. PSA resulta útil para la eliminación de azúcares, ácidos grasos, ácidos orgánicos, lípidos y pigmentos. Combinada con C18, permite eliminar lípidos y esteroides. Además, C18 permite eliminar compuestos grasos de cadena larga, esteroides y otros compuestos interferentes no polares [36]. Mediante este método de tratamiento de muestra, se lograron elevadas recuperaciones (entre 86,2-101,7%). En cuanto a la metodología cromatográfica, se evaluaron 5 columnas (Acquity UPLC BEH C18, Sunshell PFP, Sunshell Phenyl, Discovery C18 y Discovery C8), obteniendo mejores resultados con la columna Sunshell Phenyl. Este tipo de columnas tienen una superficie inerte debido a los grupos silanol inactivados y una alta estabilidad. El cromatógrafo estaba equipado con un detector DAD. El método obtuvo límites de detección y cuantificación, entre 63,1-81,0  $\mu g/kg$  y 184,3-245,4  $\mu g/kg$ , respectivamente. En cuanto a las muestras de miel analizadas de distintas variedades, a pesar de la ausencia de neonicotinoides en muchas de ellas, se detectó una elevada concentración de neonicotinoides en mieles procedentes de Tasmania, Australia. Tiametoxam fue el neonicotinoide encontrado en una mayor concentración ( $\geq 1395,6 \mu g/kg$ ). Acetamiprid, clotianidina, imidacloprid y tiacloprid se encontraron en concentraciones máximas de 1340,3  $\mu g/kg$ , 598,8  $\mu g/kg$ , 624,9  $\mu g/kg$  y 608,4  $\mu g/kg$ , respectivamente.

### **3.2.3 Método QuEChERS en muestras de polen, néctar y tejido foliar.**

L. Wiest et al., desarrollaron un método (descrito en el apartado 3.2.1) para el análisis simultáneo de 80 compuestos diferentes en muestras de miel, polen y abejas [38]. Para el procedimiento de tratamiento de muestras de polen, se emplearon 2 g de muestra con 10 mL de acetonitrilo, 8 mL de agua y 3 mL de hexano. La adición de hexano para la extracción en las muestras de polen se realizó con la finalidad de eliminar los ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos que están presentes en la matriz de la muestra y provocan una fuerte supresión de iones en LC-MS/MS y saturación del detector en GC-TOF. Para la partición, se empleó la misma mezcla de sales que para la extracción en

las muestras de miel, y, por último, en la etapa dSPE, 6 mL de la fracción de acetonitrilo se añadieron en un tubo con 900 mg de MgSO<sub>4</sub> anhidro, 150 mg de PSA y 150 mg de C18. En HPLC, para las muestras de polen, se necesitaron dos inyecciones, una con 90% de agua para los compuestos más polares y otra con 100% acetonitrilo para los compuestos apolares que eluyen en último lugar. Las recuperaciones obtenidas mediante el método desarrollado fueron de 74 a 94%, y los límites de detección y cuantificación fueron de 1,4-2,6 µg/kg y 8,5-17 µg/kg, respectivamente.

Chen et al., desarrollaron por primera vez un método para la determinación simultánea de 8 neonicotinoides (acetamiprid, clotianidina, dinotefuran, flonicamid, imidacloprid, nitenpyram, tiacloprid y tiametoxam) en polen y en jarabe de maíz de alta fructosa [48]. La etapa de preparación de la muestra consistió en la optimización de un método QuEChERS, con la finalidad de lograr el aislamiento de los analitos de interés y eliminación de los componentes de la matriz. En la primera etapa del procedimiento, a 2 g de polen se añadieron 8 mL de agua, 10 mL de ACN y 3 mL de n-hexano. El hexano es un disolvente de naturaleza apolar y con menor densidad que el acetonitrilo. Dado que el polen tiene un importante contenido de lípidos, la adición de hexano se realiza para disolver los lípidos en el extracto de acetonitrilo y eliminarlo tras la centrifugación [48]. Además, dado que los neonicotinoides tienen una naturaleza polar, no se disolverán en hexano y permanecerán en la fase de acetonitrilo. La adición de 3 mL de hexano en este método, demostró proporcionar extractos más limpios, menor fondo en los cromatogramas de las muestras de blanco y mayor sensibilidad [48]. Tras agitar la muestra con acetonitrilo y hexano para asegurar la eficiencia de extracción, se añadieron las sales: 4 g de MgSO<sub>4</sub>, para separar el agua de la muestra, 1 g de NaCl, para reducir los compuestos co-extractores polares, 1 g de citrato de sodio y 0,5 g de citrato disódico sesquihidratado. El tampón de citrato (pH = 8) se seleccionó en lugar del tampón acetato (pH = 5) para mejorar el rendimiento de extracción y proporcionar un pH óptimo para el sorbente en d-SPE, ya que los neonicotinoides contienen grupos básicos débiles y fuertes [48]. En este método, cabe destacar la adición de un homogeneizador de cerámica durante esta etapa, para facilitar la rotura de los aglomerados de sal, reducir el tiempo de extracción y mejorar la repetibilidad. En la última etapa del método QuEChERS, la limpieza mediante d-SPE, se evaluaron dos sorbentes: PSA + C18 y PSA + C18 + GCB. La finalidad de esta etapa es eliminar los compuestos co-extraídos con los analitos, como algunos compuestos ácidos y azúcares, con el sorbente PSA, y, los compuestos grasos que no se diluyeron en el hexano, con los sorbentes C18 o GCB [48]. Dado que se obtuvieron buenas recuperaciones con ambas combinaciones de

sorbentes, finalmente se seleccionó para la limpieza mediante d-SPE la mezcla PSA+C18, debido a su coste más económico.

Posteriormente se optimizó el análisis mediante LC-MS/MS. En MS se empleó la fuente de ionización ESI en modo positivo, y la cuantificación se llevó a cabo en modo MRM, seleccionando el ion molecular protonado  $[M+H]^+$  como ion precursor y dos iones producto, el más abundante para la cuantificación y el segundo más abundante para la confirmación. En el análisis cromatográfico se estudiaron varias columnas de fase inversa convencionales y la columna YMC ODS-AQ. Las columnas convencionales tienen una mayor densidad de cadenas C18, por lo que pierden sus propiedades lipofílicas y no son capaces de retener compuestos polares en fases móviles que tienen un alto contenido acuoso [48]. Esto perjudica a la retención de compuestos como dinotenfuran y nitenpyran, que tienen una solubilidad mayor que el resto de neonicotinoides, por lo que eluyeron pronto y como un pico ancho en este tipo de columnas [48]. Sin embargo, la columna YMC ODS-AQ es una columna de fase inversa basada en sílice, que cuenta con una superficie relativamente hidrofílica que facilita la retención de compuestos polares en fases móviles acuosas [48]. Esta columna permitió obtener una buena forma de pico y un tiempo de retención adecuado para cada analito. En la fase móvil (A) agua y (B) acetonitrilo/agua (95:5, v/v), se añadió 0,1% de ácido fórmico, para promover la protonación de los analitos en la ionización ESI en modo positivo, lo que mejoró la sensibilidad. Además, se añadieron 5 mM de formiato de amonio ya que se observó una mejora de la respuesta para los analitos y se obtuvieron picos más nítidos.

Los efectos de matriz, causados por la competición entre los analitos y los compuestos co-eluyentes para la ionización en la fuente ESI, así como las recuperaciones, fueron investigadas para dos enfoques distintos en el último paso del método QuEChERS. Se evaluaron los pasos de dilución y secado, previos a la reconstitución e inyección de la muestra en LC-MS/MS. La inyección directa de disolventes puros como acetonitrilo, puede causar la precipitación de la muestra en la columna o antes de ella y producir problemas cromatográficos [48]. Por ello, por un lado, se prepararon diluciones de acetonitrilo en agua para reducir el contenido de disolvente orgánico, y, por otro, se evaporó el extracto de acetonitrilo y se reconstituyó agua con un 15% de ACN. Comparando ambos métodos, la dilución obtuvo mejores recuperaciones y menores efectos de matriz, con la desventaja de perjudicar a la sensibilidad del método debido a la dilución de las muestras. En el enfoque de secado, la concentración de la muestra compensó el efecto de supresión de la señal por la matriz y mejoró la sensibilidad para algunos neonicotinoides. Por ello, finalmente se empleó este paso en la última etapa del

método QuEChERS. Los efectos de matriz en las muestras de polen hacen necesario el empleo de una calibración con ajuste matricial para la cuantificación de los analitos. Con este método se lograron recuperaciones entre 78-120% para las muestras de polen. Los límites de detección en las muestras de polen fueron de 0,03 a 0,1 µg/kg y los de cuantificación fueron de 0,1 a 0,5 µg/kg. Además, se obtuvo una buena precisión intra e inter diaria ( $RSD \leq 13\%$ ).

Valverde et al., desarrollaron un método rápido, robusto, sencillo y sensible para el análisis de neonicotinoides (acetamiprid, clotianidina, dinotenfuran, imidacloprid, nitenpyram, tiacloprid y tiametoxam), en muestras de polen [49]. Para ello, emplearon un tratamiento QuEChERS optimizado que logró buenas recuperaciones y reducir el efecto de matriz, y determinación por UHPLC-MS/MS con un detector QTOF. Para desarrollar el método QuEChERS, se optimizaron los distintos parámetros del método (peso de la muestra, volúmenes de disolventes de extracción, cantidad de sales, tiempo de extracción y centrifugación y etapa de limpieza). Finalmente, se empleó 1 g de muestra de polen que se extrajo con una mezcla de 2 mL de agua y 6 mL de ACN. El ACN se empleó por su capacidad de precipitar proteínas y disminuir la solubilidad de lípidos. La capacidad del ACN y de las mezclas ACN-agua de producir la desnaturalización de proteínas provoca un incremento de la eficiencia de extracción [16x]. En la etapa de partición se emplearon 1g de  $MgSO_4$  (para separar el agua de la muestra), 0,5g de NaCl (para reducir los compuestos coextractores polares) y 0,8g de citrato trisódico dihidratado (empleado para tamponar la extracción líquido-líquido y para proporcionar un medio adecuado para la extracción) [49]. Además, en este método se emplearon homogeneizadores cerámicos con la finalidad de mejorar la eficiencia de extracción, aunque no se lograron mejoras significativas. La etapa de limpieza se optimizó con la finalidad de limitar la extracción de componentes de matriz que afecten negativamente a la ionización del analito. Se emplearon 150 mg de  $MgSO_4$ , 25 mg de PSA y 25 mg de C18. Posteriormente, se añadió una etapa de congelación para eliminar los lípidos. Por último, para reconstituir la muestra se empleó una mezcla de solventes metanol-agua 80:20 (v/v). Las recuperaciones obtenidas con este procedimiento fueron elevadas (91-105%), con la ventaja añadida de que se demostró la minimización de los efectos de matriz, lo que supone la posibilidad de emplear curvas de calibración estándar para la cuantificación de los neonicotinoides.

La separación se realizó con una columna Kinetex EVO C18 (columna de tecnología core-shell). Este tipo de columnas permite obtener picos más definidos para productos básicos, proporciona una estabilidad de pH entre 1 y 12, y disminuye la supresión de señal causada por compuestos polares básicos, ya que estos quedan retenidos con más

fuerza en la columna [49]. Como fase móvil se empleó 0,1% (v/v) de ácido fórmico en ACN y 0,1% (v/v) de ácido fórmico en agua. Con estas condiciones, se logró un tiempo de elución de todos los analitos en 6,5 minutos. En el análisis MS/MS se emplearon los iones precursores  $[M+H]^+$ , mediante EIC (cromatogramas de iones extraídos), para obtener la mejor sensibilidad para el análisis cuantitativo. Los iones producto más significativos obtenidos de los iones precursores, se emplearon para análisis MS/MS en modo MRM con la finalidad de confirmar la presencia de los analitos en polen. El método desarrollado logró bajos límites de detección y cuantificación, 0,6-1,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 2,1-4,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente, además de buenas recuperaciones, minimización del efecto de matriz, y rapidez de ensayo. Además, la buena separación cromatográfica de los siete neonicotinoides analizados, todos ellos separados de la línea de base, podría permitir la adaptación de este método a un análisis con un detector UV o de diodo array, que son una alternativa más económica [49].

Moreno-González et al., desarrollaron para la determinación de 8 pesticidas (entre ellos los neonicotinoides nitenpyram, tiametoxam, clotianidina, imidacloprid y acetamipid) en muestras de polen y néctar, mediante extracción por un método modificado micro-QuEChERS y análisis basado en LC de nanoflujo con MS de alta resolución (analizador cuadrupolo-Orbitrap y fuente de iones nanospray) [50]. El empleo de nanoLC-MS presenta ventajas como una mejora de la sensibilidad (ya que el nanospray es un proceso más eficaz que el electrospray) y mejor tolerancia a la supresión de señal. Esto es debido a que los efectos de matriz se relacionan con el tamaño de la gota que se produce en el cono de Taylor. El flujo menor del nanospray genera un tamaño de gota menor, lo que significa un menor número de especies interferentes que puedan competir por la ionización. La disminución de los efectos de matriz y la mejora de la sensibilidad permiten la dilución de la matriz para reducir su efecto, o, la obtención de elevados LOQs [50]. Para el pretratamiento en las muestras de polen, 100 mg se colocaron en un tubo Eppendorf con 0,5 mL de agua Mili-Q y 1 mL de ACN. Para la etapa de partición se emplearon 50 mg NaCl y 50 mg  $\text{MgSO}_4$  anhidro. Por último, a 0,8 mL de la fase orgánica (sobrenadante) se le añadieron 20 mg PSA, 20 mg C18 y 20 mg  $\text{MgSO}_4$  anhidro. Las recuperaciones en las muestras de polen estuvieron entre 85,0% y el 97,2%. El efecto de matriz, que afecta a la ionización del analito (provocando supresión o aumento de la señal), logró reducirse de manera que se evita el empleo de estándares de matriz, lo que permite emplear el método de patrón externo [50]. Aunque esta metodología alcanza una sensibilidad equivalente a métodos UHPLC, la principal desventaja es el gradiente más largo requerido y la retención pobre de compuestos polares [50].

Hall et al. desarrollaron un método para la determinación de tres neonicotinoides (imidacloprid, clotianidina y tiametoxam) y dos metabolitos (5-OH-imidacloprid y olefina de imidacloprid) en muestras de polen y tejido foliar [35]. El desarrollo de métodos de análisis en este tipo de matrices es necesario para poder estimar la exposición que tienen los insectos polinizadores a los compuestos neonicotinoides, ya que estos se han empleado en el recubrimiento de semillas y son sistemáticos, es decir, absorbidos por las raíces y translocados al tallo, las hojas, las flores y el polen [35]. En las muestras de tejidos vegetales y polen la etapa de limpieza supone un desafío debido a la presencia de pigmentos y lípidos. Hall et al., optimizaron un método de extracción QuEChERS para el tratamiento de muestras de tejido vegetal y polen. Para las muestras de tejido vegetal se evaluaron dos métodos, el que obtuvo mejores recuperaciones consistía en una etapa de extracción en 5 g de muestra con 4g MgSO<sub>4</sub>, 1g NaCl, 1g citrato trisódico deshidratado y 0,5g de citrato de sodio. Las muestras se extrajeron y limpiaron mediante dSPE empleando 150 mg MgSO<sub>4</sub>, 25 mg de amina primaria secundaria (PSA) y 7,5 mg de negro de humo grafitizado (GCB). Este método, que, a diferencia del otro incluía 1g de citrato trisódico deshidratado y 0,5 g de citrato de sodio, permitió mantener el pH durante la extracción, lo que supuso un incremento de las recuperaciones. Para las muestras de polen el método se adaptó para emplear bajas cantidades de muestra (0,2 g o menos). La técnica dSPE se llevó a cabo empleando 150 mg MgSO<sub>4</sub>, 50 mg PSA, 50 mg C18 y 50 mg GCB y evaluando la influencia de estos dos últimos. Aunque el uso de GCB supuso una disminución en la recuperación, finalmente se empleó para minimizar los compuestos interferentes. Además, se emplearon patrones internos marcados isotópicamente, para corregir la recuperación a lo largo de los procesos de extracción y análisis. Las recuperaciones logradas para el tejido foliar fueron del 78,4-93,6% y del 89,4-101% para el polen. Posteriormente mediante la determinación por UHPLC-MS/MS se lograron límites de detección entre 0,04-0,3 µg/kg en el tejido foliar y entre 0,04-1,0 µg/kg en polen. Como método de ionización se empleó ESI, con las técnicas de ionización positiva y negativa, obteniéndose la mayor sensibilidad y selectividad en modo de ionización positivo. Se empleó el modo MRM y se eligieron dos transiciones para cada analito (una para la cuantificación y la segunda para la confirmación).

### **3.2.4 Método QuEChERS en muestras de cera de abeja.**

Valverde et al., desarrollaron un método analítico para la determinación simultánea de siete neonicotinoides (dinotenfuran, nitenpyram, tiametoxam, clotianidina, imidacloprid, acetamiprid y tiacloprid) en muestras de cera de abeja mediante UHPLC-MS/MS [51].



La cera de abejas puede considerarse un reservorio de contaminantes, ya que se recicla cuando se establece una nueva colmena, por lo que puede dar lugar a una acumulación de pesticidas [51]. El tratamiento de muestra se llevó a cabo por un método QuEChERS. Primero, 1 g de muestra se añadió a 10 mL de una disolución de metanol y acetato de tilo (70:30, v/v). Tras agitación, centrifugación y congelación, el sobrenadante se transfirió a un tubo dSPE con un sorbente EMR-Lipid (para la eliminación de lípidos en matrices complejas), seguido de evaporación y reconstitución en un 1mL de metanol:agua (80:20, v/v). El sorbente EMR-Lipid consiste en un material con poros que se une selectivamente a cadenas largas no ramificadas de hidrocarburos, de manera que las cabezas polares quedan expuestas al disolvente y los analitos polares no interactúan con el sorbente y permanecen en la disolución [51]. Las recuperaciones logradas con dicho método fueron del 93 al 106%. Además, se logró minimizar el efecto de matriz, comprobando que no afectaba significativamente a la ionización ESI de los analitos, lo que permite el empleo del método de patrón externo para la cuantificación. En el análisis mediante UHPLC-MS/MS se empleó una columna Kinetex EVO C18 con una fase móvil compuesta por ácido fórmico en acetonitrilo 0,1% (v/v) y ácido fórmico en agua 0,1% (v/v). Las condiciones óptimas fueron un volumen de inyección de 5 µL y una temperatura de 35°C, logrando un tiempo de elución de todos los componentes en 10,5 minutos. En MS/MS se empleó un analizador QTOF y ionización ESI en modo positivo. Los límites de detección y cuantificación alcanzados con este método fueron de 0,4-1,4 µg/kg y 1,2-4,9 µg/kg, respectivamente.

La tabla 4 recoge un resumen de los métodos comentados.

Tabla 4: Principales parámetros de los métodos que emplean el método QuEChERS.

Métodos QuEChERS												
Compuesto	Matriz	Extracción	Partición	Limpieza (dSPE)	Rec. (%)	Método de análisis	Tipo de columna / fase móvil	Fuente de ionización	LOD µg/kg	LOQ µg/kg	RSDs (%)	REF
Clotianidina, imidacloprid y tiametoxam	Miel Polen Abejas	Miel: 5 g muestra en 10 mL agua + 10 mL ACN Polen: 2 g + 10 mL ACN + 8 mL agua + 3 mL hexano	Miel y polen: 4 g de MgSO <sub>4</sub> anhidro, 1 g de NaCl, 1 g de citrato de sodio dihidratado y 0,5 g de citrato disódico sesquihidratado	Miel: 0,9g de MgSO <sub>4</sub> anhidro y 0,15 g de PSA Polen: 0,9 g de MgSO <sub>4</sub> anhidro, 0,15 g de PSA y 0,15 g de C18	Miel: 88-104 Polen: 74-94	LC-MS/MS (QqQ)	Columna: Nucleodur Sphinx RP-C18 Fase móvil (gradiente): (A) Agua con formiato de amonio 0,3 mM y 0,05% ácido fórmico; (B) Metanol	ESI (modo positivo)	Miel: 0,2-0,3 Polen: 1,4-2,6	Miel: 3,9-4,3 Polen: 8,5-17,0	Miel: 10-25 Polen: 9-37	38
Imidacloprid y tiametoxam	Miel	1 g de muestra + 10 mL agua + 10 mL ACN	4 g de MgSO <sub>4</sub> anhidro, 1 g NaCl, 1 g de citrato de sodio y 0,5 g de hidrogenocitrato de sodio sesquihidratado	0,15 g de MgSO <sub>4</sub> anhidro y 25 mg de PSA	84,9-95,0	LC-MS/MS (QqQ)	Columna: Poroshell 120 EC-C18 Fase móvil (gradiente): (A) agua; (B) metanol, ambos con 10 mM de acetato de amonio	ESI (modo positivo)	1,14-1,28	3,42-3,84	0,3-1,5	39
Acetamiprid, clotianidina, dinotefuran, imidacloprid, nitenpyram, tiacloprid y tiametoxam	Miel	10 g de muestra en 15mL agua y 10 mL de ACN	50 mL con 4,0 g MgSO <sub>4</sub> , 1,0 g NaCl, 0,5 g de citrato de sodio dibásico sesquihidratado y 1,0 g de citrato de sodio tribásico deshidratado	0,9 g MgSO <sub>4</sub> , 0,15 g PSA	73,8-97,3	HPLC-DAD	Columna: ZORBAX Eclipse XDB-C18 Fase móvil (gradiente): (A) ACN; (B) Agua con 0,2% ácido fórmico	-	2,0-2,5	5-10	3,99-10,22	46
Acetamiprid, clotianidina, imidacloprid, tiacloprid y tiametoxam	Miel	2 g de muestra en 2 mL tampón McIlvaine 0,1 mol/L (pH=4) y 2 mL ACN	-	0,15 g MgSO <sub>4</sub> + 0,05 g florisil	67-130	UHPLC-MS/MS (QqQ)	Columna: Acquity UPLC BEH C18 Fase móvil (gradiente): (A) Agua; (B) metanol (ambos con ácido fórmico 0,1% (v/v) y formiato de amonio 5mmol/L)	ESI (modo positivo)	-	0,1-2,0	<20	34
Acetamiprid, clotianidina, dinotefuran, nitenpyram, tiacloprid y tiametoxam	Miel	5 g de miel en 10 mL de agua y 10 mL de ACN con 1% ácido fórmico	4 g MgSO <sub>4</sub> , 1 g NaCl, 1 g citrato de sodio deshidratado, 0,5 g de citrato de hidrógeno disódico sesquihidratado	6 mL con 0,2 g de quitosano, 0,2 g de óxido de aluminio, 0,2 g C8	62-104	LC-MS/MS (QTRAP)	Columna: KINETEX XB Fase móvil (gradiente): (A) Agua; (B) metanol (ambos con 5mmol/L formiato de amonio y 0,2% ácido fórmico)	-	-	-	4-19	42

Acetamiprid, clotianidina, dinotefuran, imidacloprid, nitenpyram, tiacloprid y tiametoxam	Miel	5 g de muestra en 10 mL de ACN-agua (80:20, v/v)	2,0 g de MgSO <sub>4</sub> , 1,0 g de acetato de sodio, 1,5 g de citrato trisódico deshidratado y 0,5 g de citrato de hidrógeno disódico sesquihidratado	No necesaria	85-109	UHPLC-MS/MS (QTOF) y UHPLC-MS/MS (QqQ)	Columna: Kinetex EVO C18 Fase móvil (gradiente): (A) ACN; (B) Agua, ambas con 0,1% (v/v) ácido fórmico	ESI (modo positivo)	QTOF: 0,1-0,6 QqQ: 0,01-0,1	QTOF: 0,3-2,2 QqQ: 0,03-0,5	<10	23
Acetamiprid, clotianidina, flonicamid, imidacloprid, nitenpyram, tiacloprid y tiametoxam + metabolitos	Miel	5 g de miel con 10 mL de agua. Extracción con 10 mL de ACN con 1% ácido acético	4 g MgSO <sub>4</sub> anhidro y 1 g acetato de sodio	1,05 g MgSO <sub>4</sub> , 0,35 g PSA y 0,35 g Z-Sep+	72-118	LC-MS/MS (QTRAP)	Columna: Luna 3 µm Phenyl-Hexyl 150x2,0 mm Fase móvil (gradiente): (A) Agua con 5 mM formiato de amonio (pH=6, ajustado con ácido fórmico); (B) ACN	ESI (positivo y negativo)	0,001-0,01	0,001-0,01	≤19	43
Acetamiprid, clotianidina, imidacloprid, tiacloprid y tiametoxam	Miel	10 g de muestra con 10 mL agua + 10 mL ACN	4 g MgSO <sub>4</sub> , 1g NaCl, 1 g de citrato trisódico dihidratado y 0,5 g de de hidrogeno citrato disódico sesquihidratado	0,9 g MgSO <sub>4</sub> anhidro 0,15 g PSA	68,2-107,0	LC-MS/MS (QqQ)	Columna: Agilent C8 Fase móvil (gradiente): (A) 0,1% ácido fórmico; (B) ACN	ESI (modo positivo)	0,06-0,85	0,19-2,84	2,7-8,0	24
Acetamiprid, clotianidina, dinotefuran, flupyradifuron, imidacloprid, nitenpyram, sulfoxaflor tiacloprid y tiametoxam	Miel	0,5 g de muestra con 9 mL H <sub>2</sub> O:ACN (50:50, v/v)	2g de MgSO <sub>4</sub> , 0,5g de NaCl, 0,5 g de citrato de sodio dihidratado 0,25 g de citrato de sodio sesquihidratado	0,15 g MgSO <sub>4</sub> , 0,1g de PSA y 0,1 g de fase C18	73-95	UHPLC-MS/MS (QqQ)	Cortecs UPLC C18+ Fase móvil (gradiente): (A) Agua con 0,05% ácido fórmico y 5 mM formiato de amonio (B) Acetonitrilo con 0,05% ácido fórmico	ESI (modo positivo)	0,0005-0,01	0,002-0,02	1-22	44
Acetamiprid, clotianidina, imidacloprid, tiacloprid y tiametoxam	Miel	5 g de miel en 10 mL de agua y 10 mL de ACN	4 g MgSO <sub>4</sub> anhidro y 1 g NaCl	1 mL con 0,15 g MgSO <sub>4</sub> anhidro, 0,05 g PSA y 0,05 g C18	86,17-101,71	UHPLC-DAD	Columna: Sunshell Phenyl Fase móvil (gradiente): (A) Agua; (B) ACN	-	63,1-81,0	184,3-245,4	0,90-8,77	36
Acetamiprid, clotianidina, dinotefuran, flonicamid imidacloprid, nitenpyram, tiacloprid y	Polen	2 g de muestra + 8 mL agua + 10 mL ACN + 3 mL n-hexano	4 g de MgSO <sub>4</sub> , 1 g de NaCl, 1 g de citrato de sodio y 0,5 g de citrato disódico sesquihidratado + Homogeneizador de cerámica	2 mL extracto + 0,05 g PSA, 0,05 g C18, y 0,15 mg MgSO <sub>4</sub>	78-120	LC-MS/MS	Columna: YMC ODS-AQ Fase móvil (gradiente): (A) Agua; (B) Acetonitrilo/agua (95:5, v/v), ambas con 5 mM formiato de amonio + 0,1% ácido fórmico	ESI (positivo)	0,03-0,1	0,1-0,5	3-13	48

tiametoxam												
Acetamiprid, clotianidina, dinotefuran, imidacloprid, nitenpyram, tiacloprid y tiametoxam	Polen	1 g con 2 mL agua y 6 mL de ACN	1g de MgSO <sub>4</sub> , 0,5 g de NaCl y 0,8 g de citrato trisódico dihidratado	2 mL de extracto + 0,15 g de MgSO <sub>4</sub> , 0,025 g de PSA y 0,025 g de C18	91-105	UHPLC-MS/MS (QTOF)	Columna: Kinetex EVO C18 Fase móvil (gradiente): (A) Agua; (B) ACN, ambas con 0,1% ácido fórmico	ESI (modo positivo)	0,6-1,3	2,1-4,0	<7	49
Acetamiprid, clotianidina, imidacloprid, nitenpyram y tiametoxam	Polen y néctar	Polen: 1 g muestra con 0,5mL Agua, 1 ml ACN	0,05 g NaCl, 0,05 g MgSO <sub>4</sub> anhidro	0,02 g PSA, 0,02 g C18, 0,02 g MgSO <sub>4</sub> anhidro	Polen: 85,0-97,2	NanoLC-MS/MS (Q-Orbitrap)	Columna: Thermo EASY-Spray C18 PepMap Fase móvil (gradiente): (A) agua; (B) ACN, ambas con 0,1% de ácido fórmico	Nanospray (modo positivo)	Polen: 0,05 Néctar: 0,04	Polen: 0,5 Néctar: 0,4	Polen: 2,6-4,9 Néctar: 1,6-3,5	50
Clotianidina, imidacloprid y tiametoxam + 2 metabolitos	Tejido vegetal, polen	Tejido vegetal: 5 g muestra con 10 mL ACN Polen: 0,2 g muestra con 0,3 mL agua y 1,2mL de ACN	Tejido vegetal: 4 g MgSO <sub>4</sub> , 1g NaCl, 1g citrato trisódico deshidratado y 0,5 g de citrato de sodio	Tejido vegetal: 0,15 g MgSO <sub>4</sub> , 0,025 g PSA y 7,5 mg GCB Polen: 0,15 g MgSO <sub>4</sub> , 0,05 g PSA, 0,05 g C18 y 0,05 g GCB	Tejido vegetal: 78,4-93,6 Polen: 89,4-101	UHPLC-MS/MS (QqQ)	Columna: Accucore aQ Fase móvil (gradiente): (A) agua:metanol (95:5 v/v); (B) metanol:agua (95:5 v/v), ambas con 0,1% ácido fórmico y 5 mM formiato de amonio	ESI (modo positivo/negativo)	Tejido vegetal: 0,04-0,3 Polen: 0,04-1,0	-	≤15	35
Acetamiprid, clotianidina, dinotefuran, imidacloprid, nitenpyram, tiacloprid y tiametoxam	Cera de abejas	1 g muestra en 10 mL de metanol y acetato de etilo (70:30, v/v)	-	15 mL dSPE EMR-Lipid tube	93-106	UHPLC-MS/MS (QTOF)	Columna: Kinetex EVO C18 Fase móvil: (A) ACN; (B) agua, ambos con ácido fórmico 0,1% (v/v)	ESI (modo positivo)	0,4-1,4	1,2-4,9	≤10	51

### **3.3 Microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME).**

La extracción líquido-líquido (LLE) es un método utilizado ampliamente para la preparación de muestras. Sin embargo, cuenta con algunos inconvenientes importantes, como que es una técnica que consume mucho tiempo y emplea volúmenes grandes de disolventes orgánicos, que no son respetuosos con el medio ambiente [52]. Por este motivo, a lo largo de los últimos años se han desarrollado técnicas de microextracción en fase líquida como la microextracción de gota única (SDME) y la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME), entre otras [52].

La microextracción líquido-líquido dispersiva es una técnica de pre-tratamiento de muestra, para la extracción y pre-concentración de analitos que cuenta con ventajas como que requiere pequeños volúmenes de disolvente, al contrario que la extracción líquido-líquido tradicional (LLE) [53].

En DLLME, la extracción de analitos se lleva a cabo en una dispersión del disolvente de extracción en agua, que se logra con ayuda de un disolvente de dispersión. El disolvente de extracción es inmisible en agua, mientras que el disolvente de dispersión debe ser miscible en las dos fases [54]. El proceso se realiza en 2 etapas [53]: primero, se mezclan los disolventes de extracción y dispersión y se inyecta en una muestra de agua. Se forma una dispersión que permite la extracción rápida de los analitos de la muestra de agua. La alta superficie de contacto que tiene lugar entre las dos fases inmiscibles, permite alcanzar una elevada eficiencia de extracción en poco tiempo [47]. Después, la dispersión se elimina por centrifugación, y el disolvente de extracción con los analitos se toma con una microjeringa.

La selección de los disolventes de extracción y dispersión es importante para lograr un alto factor de enriquecimiento (EF). El factor de enriquecimiento se define como la relación entre la concentración de analito en la fase sedimentada con respecto a la concentración inicial en la muestra [53]. También es necesario optimizar otros parámetros como los volúmenes de disolventes, la adición de sales a la muestra y el pH, un parámetro importante en la extracción de analitos polares, empleado para disminuir la solubilidad del analito en la fase acuosa [53].

Las principales ventajas de la técnica DLLME son su sencillo funcionamiento, bajo coste, rapidez, elevada preconcentración y que requiere bajos volúmenes de disolventes. Por otro lado, sus principales desventajas son su baja selectividad y el empleo de disolventes clorados, que pueden tener un impacto negativo en el medio ambiente [47]. Una de las limitaciones de la técnica DLLME, es en cuanto a los requisitos del disolvente

de extracción. Se necesita un disolvente de alta densidad, por lo que se emplean disolventes clorados peligrosos como el clorobenceno, cloroformo y el tetracloruro de carbono, que se deben evaporar antes del análisis mediante HPLC [52].

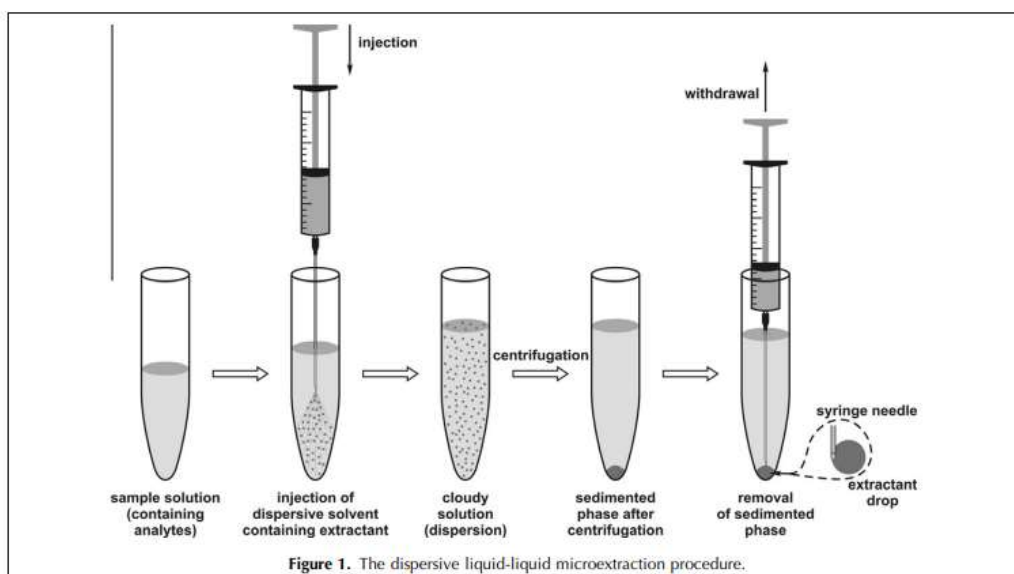


Figura 5: Esquema de la microextracción líquido-líquido dispersiva [53].

Jovanov et al., desarrollaron un método empleando la técnica DLLME como pretratamiento de muestra y posterior análisis mediante LC-MS/MS para la determinación de siete neonicotinoides (acetamiprid, clotianidina, tiametoxam, imidacloprid, dinotenfuran, tiacloprid y nitenpyram) en muestras de miel [47]. Para el método DLLME, se empleó una concentración de miel de 50 g/L. Como disolvente de extracción se evaluaron dos disolventes con mayor densidad que el agua, cloroformo y diclorometano, obteniéndose mejores recuperaciones con cloroformo. El volumen de disolvente de extracción empleado fueron 2 mL, para asegurar buenas recuperaciones y suficiente volumen de fase sedimentada para el posterior análisis [47]. El disolvente de dispersión, que debe ser miscible en las dos fases, también influye en la tensión superficial del disolvente de extracción, por lo que determina el tamaño de las microgotas, y, por lo tanto, afecta a la eficacia de extracción [47]. En este estudio se emplearon 0,5 mL de ACN, ya que un volumen superior disminuía la recuperación, posiblemente debido a una mayor solubilidad de los neonicotinoides en agua [47]. Los últimos parámetros optimizados del método fueron el tiempo de extracción (10 minutos) y la velocidad de centrifugación (2500 rpm). Las recuperaciones obtenidas con el método DLLME optimizado fueron de 74,3-113,9%. Para la separación cromatográfica se empleó una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 y una fase móvil en elución isocrática y con un ratio ACN/agua (0,1% ácido fórmico) 20:80. La adición de ácido fórmico favorece la formación del ion precursor  $[M+H]^+$ , lo que implica una mayor

sensibilidad, mejor resolución y forma de los picos [47]. En cuanto a los efectos de matriz, para todos los analitos se observaron efectos de supresión o incremento de la señal debido a los compuestos coeluyentes interferentes de la matriz. Por ello, resulta necesario el empleo de patrones de calibración para compensar los efectos de matriz. El método desarrollado alcanzó límites de detección de 0,5-1,0 µg/kg y límites de cuantificación de 1,5-2,5 µg/kg.

Campillo et al., desarrollaron un método combinando SPE con DLLME para la preparación de muestra y análisis mediante LC-DAD y LC-APCI-IT-MS/MS para la determinación de cinco neonicotinoides (acetamiprid, clotianidina, imidacloprid, tiacloprid y tiametoxam) en muestras de miel [54]. La técnica DLLME se empleó debido a que permite obtener buenas recuperaciones, pero, debido a la complejidad de la matriz, fue necesario añadir un procedimiento SPE para mejorar el aislamiento y la purificación de las muestras. En el método SPE, se emplearon cartuchos DSC-18Lt, que se acondicionaron con 3 mL de ACN y 2 mL de ácido fórmico 0,1% (v/v). La muestra (2 g de miel disuelta en 10 mL de agua) fue eluida con el volumen óptimo de ACN, 1,5 mL. Para el desarrollo del método DLLME, se optimizaron el tipo de disolvente de extracción y volumen necesario del mismo, la influencia de la fuerza iónica y del pH. Los disolventes de extracción evaluados fueron: tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>), cloroformo (CHCl<sub>3</sub>), diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) y 1,1,2,2-tetracloroetano (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>). Las mejores recuperaciones se obtuvieron con 100 µL de CHCl<sub>3</sub> como extractante y 1,5 mL de ACN como disolvente de dispersión. La influencia de la fuerza iónica se investigó añadiendo distintas concentraciones de NaCl en la fase acuosa, concluyendo que la mejor respuesta para los cinco analitos se daba adicionando 10% (w/v) de NaCl. En este estudio además se comprobó que el pH no afectaba a la señal analítica, por lo que no fue necesario añadir un tampón para ajustarlo. Las recuperaciones obtenidas con el método SPE-DLLME fueron óptimas (entre 91 y 103%). Para la caracterización se emplearon dos detectores distintos, DAD y MS/MS. Con ambos se estudió el efecto de la matriz, concluyendo que, mientras para DAD la matriz no interfiere y se puede realizar la calibración sin necesidad de emplear patrones, en MS/MS existen compuestos de matriz coeluyentes que suprimen la ionización de los analitos (provocando una disminución de la señal). Por lo tanto, para la cuantificación fue necesario realizar una calibración mediante ajuste matricial. Los límites de detección fueron de 0,02-0,13 µg/kg para el método SPE-DLLME-LC-MS/MS y 0,2-1,0 µg/kg para el método SPE-DLLME-LC-DAD.

### **3.3.1 Microextracción por partición octanol-agua asistida por jeringa (IS-DLLME).**

Recientemente, se ha empleado la microextracción líquida dispersiva en jeringa (IS-DLLME), que emplea una jeringa de vidrio para la extracción, separación y preconcentración de la muestra [52]. Mediante una jeringa, se inyecta una mezcla del disolvente de extracción y de dispersión. Se produce un aumento de la superficie de interacción, lo que permite la transferencia de masa del analito en el disolvente de extracción disperso en gotas [52].

Vichapong et al., desarrollaron un método de microextracción por partición octanol-agua asistida por jeringa combinado con HPLC, para el análisis de neonicotinoides (imidacloprid, acetamiprid, clotianidina, tiacloprid, tiametoxam, dinotenfuran y nitenpyram) en muestras de miel [52]. Como disolvente de extracción emplearon un disolvente de baja densidad, y, mediante la jeringa acoplada, aumentaron la dispersión del disolvente de extracción en la disolución acuosa. Se trata de un método sencillo y eficaz para la preconcentración de neonicotinoides. En el método, se optimizaron parámetros como la adición de sales y su concentración, el tipo y volumen de disolventes de extracción y dispersión, el tiempo de extracción y el número de inyecciones. Para observar el efecto de la fuerza iónica en la disminución de la solubilidad de los analitos en la disolución de muestra y aumento de la distribución en la fase orgánica, se añadieron distintas cantidades de NaCl, sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y yoduro de potasio (KI). Se observó un aumento de la eficiencia de extracción mediante la adición de un 10% (w/v) de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . En cuanto al disolvente de dispersión, que ayuda a la distribución del disolvente de extracción inmiscible en agua, se probaron acetonitrilo, metanol, etanol y el proceso sin emplear disolvente de dispersión. Se observó que la mayor extracción se produjo en ausencia de disolvente de dispersión, por lo que finalmente no se añadió. Como disolvente de extracción, se probaron cuatro disolventes orgánicos de baja densidad (1-octanol, 1-dodecanol, tolueno y acetato de etilo). La mayor eficiencia se obtuvo con 0,1 mL de 1-octanol. El número óptimo de inyecciones de dos jeringas (empujando los émbolos hacia adelante y hacia atrás), que afecta a la dispersión y a la transferencia de masa, fue de cuatro. En cuanto al tiempo de extracción, se establecieron 2 minutos. Las recuperaciones obtenidas mediante este procedimiento de extracción fueron de 96,93-107,70%. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna Atlantes dC18, empleando una fase móvil con 25% acetonitrilo en agua. En el sistema HPLC se inyectaron directamente 20  $\mu\text{L}$  de la fase orgánica. La detección se realizó con un detector DAD a una longitud de onda de 254 nm. El método desarrollado obtuvo límites de detección entre 0,25 y 0,50 ng/mL y límites de cuantificación entre 0,80 y 2,00 ng/mL.



### **3.3.2 Microextracción líquido-líquido dispersiva in situ con líquidos iónicos.**

Yang et al., desarrollaron un método de microextracción líquido-líquido dispersiva in situ con líquidos iónicos (IL-DLLME), seguido de análisis UHPLC-UV para la determinación de cuatro neonicotinoides en muestras de miel [55]. La técnica DLLME tiene la ventaja de permitir una elevada superficie de contacto entre el extractante y la muestra acuosa, lo que permite obtener buenas recuperaciones y eficiencia de extracción. Los líquidos iónicos (ILs), son sales compuestas por cationes orgánicos e inorgánicos que se encuentran en estado líquido por debajo de 100°C [55]. Los ILs cuentan con ventajas respecto a los disolventes orgánicos tradicionales, como su buena estabilidad química y térmica, baja inflamabilidad y volatilidad, y propiedades físicas, como su miscibilidad en agua y capacidad de disolución [55]. En este estudio, se empleó por primera vez un método IS-DLLME para la extracción de compuestos neonicotinoides en muestras de miel, con la ventaja, frente a la técnica DLLME convencional, de que se evita la utilización de un disolvente orgánico de dispersión. El líquido orgánico hidrofóbico, se formó en una reacción in situ entre el IL hidrofílico ( $[C_4MIM][Br]$ ) y un reactivo aniónico ( $K[PF_6]$ ) con un radio molar 1:2. Se evaluó el efecto de la adición de sales añadiendo cloruro de sodio, sulfato de sodio y carbonato de sodio, observando una mejora en eficiencia de la extracción mediante la adición de 1 g de  $Na_2SO_4$ . En cuanto al pH, el valor óptimo fue de 5, por lo que se ajustó el pH de la disolución de la muestra. El tiempo de extracción fue de 4 minutos, ya que tiempos superiores pueden provocar la redisolución de los analitos en la fase acuosa, disminuyendo la eficiencia de extracción [55]. Por último, se centrifugó 4 min a 8000 rpm y se añadieron 100  $\mu L$  de ACN para disminuir la viscosidad. El análisis se llevó a cabo mediante UHPLC-UV, empleando una columna XR-OCS II RP-C18 y una fase móvil mezcla de (A) acetonitrilo y (B) agua con 0,1% de ácido fórmico. Como longitud de onda se seleccionó 254 nm para todos los analitos. El método desarrollado obtuvo recuperaciones entre 81,0 y 103,4% y límites de detección y cuantificación de 0,30-0,62  $\mu g/L$  y 1,20-2,50  $\mu g/L$ , respectivamente.

### **3.3.3 DLLME y análisis mediante cromatografía líquida capilar (CLC).**

Carbonell-Rozas et al., desarrollaron por primera vez un método basado en cromatografía líquida capilar con detección de diodo array para la determinación simultánea de siete neonicotinoides (acetamiprid, clotianidina, imidacloprid, dinotenfuran, nitenpyran, tiacloprid y tiametoxam) en muestras de miel, empleando como tratamiento de muestra un método DLLME optimizado [56]. La cromatografía líquida capilar (CLC), permite obtener un tiempo de análisis corto, alta sensibilidad, y

emplear volúmenes reducidos de muestras y fases móviles respecto a la cromatografía de líquidos convencional, por lo que se considera una alternativa más ecológica [56]. Para la separación CLC, se empleó una columna capilar Zorbax Eclipse XDB-C18, que permite obtener una buena forma de pico, elevada eficiencia y reproducibilidad, debido a su superficie altamente desactivada que evita interacciones indeseables entre los solutos polares y la superficie de sílice [56]. Los parámetros de la separación cromatográfica (composición de la fase móvil, programa de gradiente, flujo de la fase móvil y temperatura de la separación), fueron estudiados y optimizados. Las condiciones óptimas fueron una fase móvil empleando (A) agua y (B) acetonitrilo, con una velocidad de flujo de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  y temperatura de la columna de 25°C, condiciones mediante las cuales se logró la separación total de los analitos en menos de 19 minutos. La detección mediante UV se realizó a 254 y 270 nm, dependiendo del analito. En el método DLLME, se optimizó el tipo y volumen de disolventes de extracción y de dispersión, el tiempo necesario, el pH de la disolución de la muestra y el efecto de la salinidad. Como disolvente de extracción, que debe ser más denso que el agua e inmisible en ella, se evaluaron 5 disolventes clorados:  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_4$  y  $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$  (1,2-dicloroetano). Las mejores recuperaciones se obtuvieron con 2 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . En cuanto al disolvente de dispersión, que tiene la función de dispersar el disolvente de extracción en pequeñas gotas en la fase acuosa, se probaron MeOH, ACN y EtOH, obteniéndose las mejores recuperaciones con 3 mL de ACN. El estudio del pH de la muestra concluyó que no tenía un efecto significativo en la eficiencia de extracción, por lo que se empleó agua ultrapura para diluir las muestras. Por otro lado, mediante la adición de diferentes sales (sulfato de amonio, cloruro de sodio y sulfato de magnesio anhidro), se evaluó su influencia en la separación de las fases y mejora de la eficacia de extracción. Se concluyó que la adición de 1 g de  $\text{MgSO}_4$  tenía un impacto positivo, mejorando las recuperaciones de todos los analitos, especialmente de dinotenfuran y nitenpyram. También se observó que la agitación mecánica favorecía la eficiencia de extracción frente al baño de ultrasonidos, mejorando la dispersión del disolvente de extracción, y, por lo tanto, aumentando la superficie de contacto entre las dos fases [56]. Mediante el método DLLME-CLC-UV desarrollado, se obtuvieron recuperaciones entre 80,4 y 96,7%, límites de detección entre 3,1 y 6,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , límites de cuantificación entre 14,1 y 22  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y RSDs menores al 6,3%.

La tabla 5 recoge un resumen de los métodos comentados.

Tabla 5: Principales parámetros de los métodos que emplean microextracción líquido-líquido dispersiva.

Métodos microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME)											
Compuesto	Matriz	Preparación de muestra	Etapas de extracción	Rec. (%)	Método de análisis	Tipo de columna / fase móvil	Fuente de ionización	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	RSDs (%)	Ref.
Acetamiprid, clotianidina, dinotefuran, imidacloprid, nitenpyram, tiacloprid y tiametoxam	Miel	DLLME	5 mL de muestra con acetonitrilo (ACN) y diclorometano (DHM) (0,5:2,0 mL)	74,3-113,9	LC-MS/MS (QqQ)	Columna: ZORBAX Eclipse XDB-C18 Fase móvil (elución isocrática): ACN/agua (0,1% ácido fórmico) (20:80, v/v)	ESI (modo positivo)	0,5-1,0	1,5-2,5	2,74-11,8	47
Acetamiprid, clotianidina, imidacloprid, tiacloprid y tiametoxam	Miel	SPE-DLLME	SPE (cartucho DSC-18Lt): 2 g de muestra en 10 mL de agua. Codicionamiento: 3 mL ACN + 2 mL de ácido fórmico 0,1% (v/v); Lavado: 10 mL agua; Elución: 1,5 mL ACN DLLME: 100 µL de CHCl <sub>3</sub> + 1,5 mL de ACN +10% (w/v) de NaCl	91-103%	LC-DAD LC-MS/MS (Trampa de iones)	Columna: Spherisorb ODS2 Fase móvil (gradiente): (A) ACN; (B) Agua y 0,1% (v/v) ácido fórmico	APCI (modo positivo)	MS/MS: 0,02-0,13 DAD: 0,2-1,0	MS/MS: 0,07-0,43 DAD: 0,7-3,3	DAD: 3,2-6,8 MS/MS: 2,8-7,1	54
Acetamiprid, clotianidina, dinotefuran, imidacloprid, nitenpyram, tiacloprid y tiametoxam	Miel	DLLME	5 mL de muestra con acetonitrilo y diclorometano (0,5:2,0 mL)	73,4-116,1	HPLC-DAD	Columna: ZORBAX Eclipse XDB-C18 Fase móvil (gradiente): (A) ACN; (B) Agua con 0,2% ácido fórmico	-	1,5-2,5	5-7,5	3,28-10,40	46
Acetamiprid, clotianidina, dinotefuran, imidacloprid, nitenpyram, tiacloprid y tiametoxam	Miel	IS-DLLME	10 mL disolución de muestra + 10% (w/v) Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 100 µL octanol, 2 jeringas, 4 ciclos.	96,93-107,70	HLPC-DAD	Columna: Atlantis dC18 Fase móvil (elución isocrática): 25% acetonitrilo en agua	-	0,25-0,50	0,80- 2,00	2,59-6,38	52
Acetamiprid, imidacloprid, imidaclothiz, tiacloprid	Miel	DLLME	10 mL de disolución de muestra (pH = 5) + 1g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 150 mg [C <sub>4</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ] + 250 mg K[PF <sub>6</sub> ]. Adición 100 µL ACN.	81,0-103,4	UHPLC-UV	Columna: XR-ODS II RP-C18 Fase móvil (elución isocrática): (A) acetonitrilo; (B) agua + 0,1% ácido fórmico	-	0,30-0,62	1,20-2,50	0,82-3,05	55
Acetamiprid, clotianidina, dinotefuran, imidacloprid, nitenpyram, tiacloprid y tiametoxam	Miel	DLLME	5 mL de disolución de muestra + 1g MgSO <sub>4</sub> + 3 mL ACN + 2 mL de diclorometano	80,4-96,7	DLLME-CLC-UV	Columna capilar: Zorbax Eclipse XDB-C18 Fase móvil (gradiente): (A) Agua; (B) ACN	-	3,1-6,6	14,1-22,0	0,6-4,5	56

### **3.4 Otros métodos.**

#### **3.4.1 Extracción sólido-líquido.**

P. Yáñez et al., desarrollaron por primera vez, un método para la determinación simultánea de siete neonicotinoides (acetamiprid, clotianidina, dinotenfuran, imidacloprid, nitenpyram, tiacloprid y tiametoxam) en muestras de polen. Para ello, emplearon un método de extracción sólido-líquido para la preconcentración de la muestra y análisis mediante LC-ESI-MS [22]. Para la extracción se emplearon 2 g de muestra y se evaluaron distintos disolventes: agua, metanol, acetona, acetato de etilo, acetonitrilo, diclorometano, y una mezcla acetato de etilo-diclorometano (50:50). Las mejores recuperaciones se obtuvieron con 10 mL de diclorometano. Posteriormente se realizaron dos etapas de agitación y centrifugación de 10 minutos, y el extracto se evaporó en un rotavapor. La reconstitución se realizó con 1 mL de una mezcla de agua y acetonitrilo (50:50, v/v). Mediante este método las recuperaciones fueron de 86-106%. El análisis mediante MS se realizó en modo SIM, y empleando ESI como fuente de ionización. Se emplearon los modos positivo y negativo para comparar, logrando un mejor rendimiento en modo positivo. También se evaluó como afectaba la matriz a la ionización ESI, observando supresión de la señal para todos los analitos, lo que indica la presencia de compuestos interferentes de la matriz y hace necesario el empleo de un método de calibración con ajuste matricial. El método desarrollado en este estudio, obtuvo límites de detección entre 0,4 y 2,8 µg/kg y límites de cuantificación entre 1,2 y 9,1 µg/kg. Este método fue aplicado al análisis de 27 muestras de polen, encontrando en dos de ellas residuos de acetamiprid y tiacloprid, en concentraciones de 5,8 µg/kg y 5,2 µg/kg, respectivamente.

#### **3.4.2 Microextracción de agregación inducida en frío basada en líquidos iónicos.**

Vichapong et al., desarrollaron un método de preconcentración de neonicotinoides (acetamiprid, clotianidina, imidacloprid y tiacloprid) en muestras de miel mediante microextracción de agregación inducida en frío basada en líquidos iónicos [57]. Emplearon líquidos iónicos a temperatura ambiente para la preconcentración de analitos, como alternativas a los disolventes de extracción convencionales. Esto es debido a sus propiedades, como su baja presión de vapor, buena estabilidad térmica, buena capacidad de extracción para compuestos orgánicos e iones metálicos, viscosidad y miscibilidad con agua y disolventes orgánicos [57]. En el método desarrollado se optimizaron los parámetros que influyen en la recuperación de los analitos: tipo y volumen de tensioactivo, tipo y volumen de disolvente de extracción, adición de sales, agitación y centrifugación. El tensioactivo tiene la función de

emulsionante en el líquido iónico y en la muestra acuosa. En este estudio, se evaluaron cinco tensioactivos distintos. Dos de ellos catiónicos (bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), bromuro de tetra-n-butilamonio (TBABr)), uno aniónico (dodecilsulfato sódico (SDS)) y dos no iónicos (Triton X-114, Triton X-100). La concentración de tensioactivo también puede afectar a la extracción ya que influye en el grado de dispersión del disolvente de extracción en la fase acuosa. El mejor resultado en cuanto a eficiencia de extracción se logró con 0,05 M de SDS. El disolvente de extracción, que debe cumplir con ciertas características (mayor densidad que el agua, buen comportamiento en la cromatografía, buena capacidad de extracción del analito de interés y baja solubilidad en agua), fue otro parámetro optimizado [57]. Se emplearon 200  $\mu$ L hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio ( $[C_4MIM][PF_6]$ ), un líquido iónico de baja temperatura con baja viscosidad. Otro parámetro estudiado fue la influencia de la fuerza iónica. Para ello, se añadieron distintos tipos de sales (NaCl,  $Na_2SO_4$ , carbonato de sodio ( $Na_2CO_3$ ) y acetato de sodio ( $CH_3COONa$ )) para evaluar su efecto en la recuperación. Se determinó que la adición de 0,75g  $Na_2CO_3$  mejoraba la eficiencia de extracción, pero cantidades superiores tenían un efecto negativo debido al incremento del volumen de la fase de extracción. En cuanto a la agitación para conseguir una buena dispersión del disolvente de extracción en la disolución acuosa, se empleó un agitador de vórtice a una velocidad de 1800 rpm durante 30 segundos. Para lograr una buena separación de fases mediante centrifugación, se optimizó la velocidad y el tiempo, seleccionando 3500 rpm durante 10 minutos. Por último, se extrajeron 10 mL de fase acuosa y se añadieron 50 mL de acetonitrilo (para disolver la fase de líquido iónico). El método optimizado, fue aplicado para la determinación de neonicotinoides en muestras de miel mediante HPLC con detección de foto-diodos array. Los límites de detección y cuantificación alcanzados fueron de 0,01  $\mu$ g/L y 0,03  $\mu$ g/L, respectivamente. Las precisiones obtenidas fueron buenas (RSDs < 5,38%) y las recuperaciones estuvieron entre el 86 y el 100%.

### **3.4.3 Pipeta intercambiadora de aniones (DPX).**

Song et al., desarrollaron un método de extracción con una pipeta desechable con intercambiador de aniones (DPX) y posterior análisis mediante LC-MS/MS para la detección de concentraciones residuales de ocho neonicotinoides (dinotefuran, acetamiprid, clotianidina, tiacloprid, imidacloprid, imidaclothiz, nitenpyram y tiametoxam), además de ocho reguladores del crecimiento de insectos, en muestras de miel recolectadas en distintas regiones de China [33]. Para la extracción y purificación de las muestras de miel se desarrolló y optimizó un método basado en una columna DPX. Para ello 10 mL de agua se añadieron a 5 g de muestra de miel. Tras agitación y centrifugación, 5 mL se transfirieron a un tubo donde se añadió 1 mL de NaCl. En la

columna DPX se introdujeron 2 mL de la mezcla, 2 mL de amoníaco al 0,1%, y, por último, 1 mL de acetonitrilo y 0,1 mL de ácido clorhídrico (HCl) 0,1M. De la elución, 1 mL fue destinado al análisis cromatográfico. En el método DPX desarrollado, un factor importante es el sorbente empleado para obtener buenas recuperaciones. En la optimización del método se evaluaron dos sorbentes intercambiadores de iones distintos, QAE Sephadex A-25 Y SP Sephadex C-25. El intercambiador de cationes SP Sephadex C-25 obtuvo recuperaciones bajas (entre 6-74%), mientras que con el intercambiador aniónico QAE Sephadex A-25 las recuperaciones fueron del 72 al 111%, por lo que se seleccionó como sorbente para el método DPX. El método intercambiador de aniones-DPX desarrollado, logró eliminar la mayoría de los compuestos interferentes (sustancias hidrosolubles como el azúcar, pigmentos, sales inorgánicas, y sustancias neutras o catiónicas). No obstante, algunos aniones no fueron completamente eliminados. Aun así, el método eliminó eficazmente los azúcares de las muestras de miel de diferentes fuentes florales, como la sacarosa y la glucosa, logrando que el efecto de matriz fuese bajo (<2,5%) o incluso indetectable. Debido a ello, fue posible emplear una calibración de patrón estándar en la calibración con ajuste matricial. Este método tiene ventajas respecto a otros convencionales, ya que es un método simple que no requiere de pasos adicionales ni de un gasto excesivo de disolventes orgánicos [33].

En la separación cromatográfica se evaluaron dos columnas distintas: Xbridge C18 y Zorbax Eclipse SB C18. La primera resultó eficaz para los compuestos reguladores del crecimiento de insectos, mientras que para los neonicotinoides únicamente logró detectar siete de los ocho compuestos analizados y con baja sensibilidad y separación. Por el contrario, la columna Zorbax Eclipse SB C18 mejoró la forma de pico, la sensibilidad y separación de los neonicotinoides, pero empeoró la de los compuestos reguladores del crecimiento. Por ello, cada familia de compuestos se separó con la columna que logró mejores resultados.

En cuanto a la espectrometría de masas, se empleó ESI en modo positivo como fuente de ionización y un analizador de masas de triple cuadrupolo. Se seleccionó el ion  $[M+H]^+$  como ion precursor, y la adquisición de parámetros (transición iónica, voltaje de fragmentación y energía de colisión) se llevó a cabo en modo MRM, con dos transiciones de masa (el ion producto de mayor intensidad para la confirmación y el segundo en intensidad para la identificación). Mediante el método desarrollado, los límites de detección y cuantificación para los 16 compuestos fueron de 0,3 y 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y de 1 y 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente. Los autores que desarrollaron y validaron este método, lo aplicaron posteriormente al análisis de 30 muestras de miel recogidas de distintas regiones de China. Residuos de neonicotinoides fueron encontrados con una frecuencia

del 13-33% y en unas concentraciones de 11-120  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Las concentraciones encontradas para cada neonicotinoide fueron: dinotefuran (24-102  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), nitenpyram (13-41  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), tiametoxam (11-120  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), clotianidina (32-113  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), imidacloprid (28-72  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), imidaclothiz (41-112  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) acetamiprid (28-68  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), thiacloprid (24-42  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Todos los compuestos, excepto thiacloprid, superaron los MRLs establecidos por la unióon europea [13], lo que pone de manifiesto la exposicióon de las abejas a neonicotinoides en concentraciones que pueden resultar perjudiciales para los polinizadores.

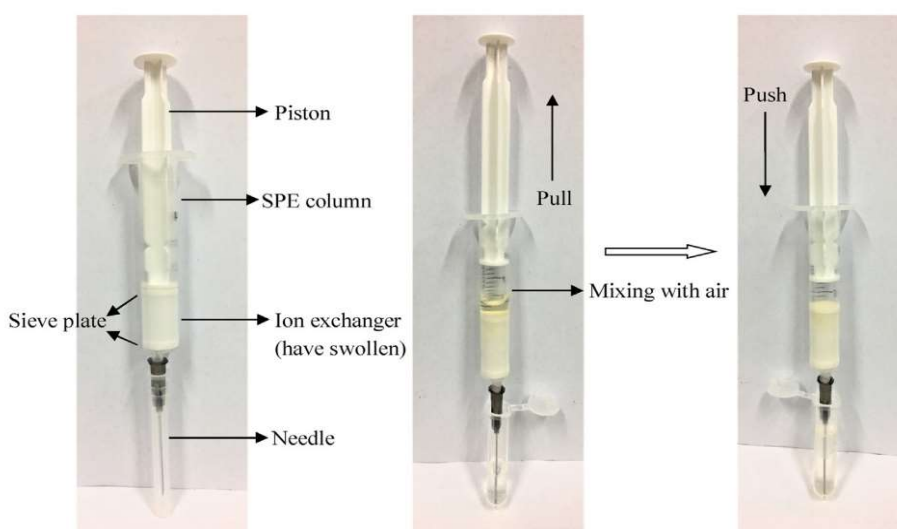


Figura 6 [33]: Mecanismo de funcionamiento paso a paso de una columna DPX.

#### 3.4.4 Inmunoensayos.

Los métodos empleados convencionalmente para el análisis de neonicotinoides tienen bajos límites de detección y una buena selectividad y precisión. Sin embargo, tienen inconvenientes como la necesidad de utilizar instrumentos de análisis de coste elevado, así como procedimientos analíticos laboriosos que requieren un tiempo considerable y deben llevarse a cabo por personal capacitado.

En la actualidad, surge la necesidad de desarrollar métodos analíticos de screening que permitan un monitoreo masivo y se puedan realizar directamente sobre el terreno [58]. Las características de los métodos de screening son su sencillez, rapidez, bajo coste, alto rendimiento y sensibilidad y bajas tasas de falsos negativos [58]. No obstante, sigue siendo necesario emplear métodos de confirmación en el caso de que se den resultados positivos.

Dentro de las técnicas de screening, el empleo de biosensores tiene ventajas como su simplicidad técnica, bajo coste e idoneidad para transportarse y ser llevados a los sitios de muestreo para obtener resultados en tiempo real [58].

Los biosensores basados en anticuerpos o inmunosensores, son un tipo de biosensores de afinidad, que se basan en una interacción específica entre un antígeno y un anticuerpo [58]. Los inmunosensores basados en anticuerpos tienen como ventajas la alta afinidad y especificidad de la unión entre el anticuerpo y su analito correspondiente. Una desventaja que pueden tener los inmunosensores es la necesidad de que los anticuerpos necesarios se encuentren disponibles comercialmente. Además, a pesar de la especificidad característica de la unión anticuerpo-antígeno, es posible la existencia de reacciones cruzadas con moléculas similares al analito, que pueden provocar falsos positivos [58].

#### **3.4.4.1 Inmunoensayo electroquímico.**

Un inmunoensayo, en este caso un ensayo ELISA competitivo indirecto biotinilado para la detección de acetamiprid, fue desarrollado por Fang et al. para la determinación de este neonicotinoides en muestras de polen [59]. En este método se llevó a cabo la preparación de los antígenos de recubrimiento, la biotinilación del anticuerpo monoclonal antiacetamiprid, la eliminación de la matriz del polen mediante un método QuEChERS y la optimización de las condiciones experimentales (el hapteno empleado, la concentración de antígeno de recubrimiento y del antiacetamiprid mAB biotinilado, la fuerza iónica y el pH). El marcaje con biotina se lleva a cabo para la detección y cuantificación por espectroscopía de absorción UV-VIS a 450 nm. Con este método, se logró un límite de detección de 0,17 ng/mL, un rango lineal de 0,25-25 ng/mL. Fue necesario llevar a cabo un tratamiento de muestra para eliminar la matriz del polen. Para ello, 1 g de muestra se extrajo con 2,5 mL de agua y 2,5 mL de acetonitrilo. Posteriormente se añadieron 0,85 g de las sales MgSO<sub>4</sub> anhidro:NaOAc (4:1). Tras agitación y centrifugación, 1 mL del sobrenadante se transfirió a un tubo con 0,75 g de MgSO<sub>4</sub> anhidro, negro de humo grafitizado: amina secundaria primaria: sílice enlazada con octadecilo (3:0,15:1:1). Posteriormente, se añadieron 2,5 mL de ACN, se agitó y centrifugó. 2 mL del extracto final se evaporaron y la muestra se reconstituyó en 1 mL de disolución tampón con 10% de metanol para el análisis Bic-ELISA. Con el método empleado de tratamiento de muestra se lograron unas recuperaciones en extractos de polen entre el 81,1 y el 108,0%. También se evaluó la reactividad cruzada, para los compuestos: acetamiprid, tiacloprid, tiametoxam, imidacloprid, dinotenfuran, nitenpyram, clotianidina y ácido 2,4-diclorofenoxiacético. El valor de reactividad cruzada se calculó siguiendo la fórmula:  $CR\% = (IC_{50} \text{ acetamiprid} / IC_{50} \text{ análogo}) \times 100$ . IC<sub>50</sub> (ng/L), IC<sub>50</sub> donde es la concentración de inhibición semimáxima. La reactividad cruzada fue <0,5% para todos los compuestos con la excepción del tiacloprid, que obtuvo un 1,66%.



### 3.4.5 Extracción líquido-líquido asistida por azúcares (SULLE).

En un estudio reciente, Chen et al. desarrollaron un método de preparación de muestra simple, rápido y económico para la determinación de neonicotinoides (imidacloprid, acetamiprid y tiacloprid) en miel [60]. El método desarrollado se basa en la extracción líquido-líquido asistida por azúcares (SULLE). Este método consiste en la adición de azúcares monoméricos o disacáridos (glucosa, fructosa, sacarosa, etc.) en una disolución acuosa de acetonitrilo, para lograr la separación de una fase de ACN del agua. El empleo de ACN como solvente de extracción tiene las ventajas de permitir una separación de fase rápida, buena compatibilidad con LC, y alta recuperación de componentes polares [60]. Dado que la miel es una matriz con un elevado contenido de azúcares (alrededor de 70% w/w de glucosa y fructosa), se logra una rápida separación cuando se mezcla con una disolución ACN-agua. En este método se optimizaron la concentración inicial de muestra de miel y de ACN, ya que estos dos parámetros influyen en el proceso de separación de fases, aumentando el volumen de fase ACN obtenida al aumentar las concentraciones de azúcares y de ACN en la disolución ACN-H<sub>2</sub>O. Los parámetros óptimos del método fueron 2 g de muestra extraídos con una disolución ACN:H<sub>2</sub>O (60:40 v/v). El método SULLE desarrollado se comparó con otros dos métodos de extracción líquido-líquido homogénea basados en ACN-H<sub>2</sub>O: Extracción líquido-líquido asistida por salinidad (SALLE) y extracción líquido-líquido asistida a temperaturas bajo cero (STLLE). En SALLE la separación de fases se logra mediante adición de NaCl, mientras que en STLLE se consigue mediante la congelación. Las recuperaciones con estos métodos fueron algo mayores, pero la sensibilidad disminuyó. Mediante el método SULLE se lograron altas recuperaciones, entre 91,49-97,78%. Para el análisis se empleó HPLC-DAD, obteniéndose límites de detección y cuantificación entre 21-27 µg/kg y 70-90 µg µg/kg, respectivamente. El método SULLE, comparado con otros métodos de preparación de muestra ampliamente utilizados (QuEChERS, SPE o DLLME) supone una alternativa más sencilla (debido a que la separación es inducida por la propia muestra y se evita el empleo de agentes de separación adicionales), aunque menos sensible (no obstante, el límite de detección del método desarrollado permite alcanzar los límites establecidos por la regulación: 0,05 mg/kg para imidacloprid y acetamiprid y 0,2 mg/kg para tiacloprid [13]) [60].

La tabla 6 recoge un resumen de los métodos comentados.

Tabla 6: Principales parámetros de otros métodos de análisis.

Otros métodos												
Compuesto	Matriz	Preparación de muestra	Etapas de extracción	Cartucho SPE	Rec. (%)	Método de análisis	Tipo de columna / fase móvil	Fuente de ionización	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	RSDs (%)	Ref.
Acetamiprid, clotianidina, dinotefuran, imidacloprid, nitenpyram, tiacloprid y tiametoxam	Polen	Extracción sólido-líquido	Extracción: 2 g de polen + 10 mL de diclorometano	-	86-106	LC-ESI-MS (Q)	Columna: Kinetex 2,6 µm C18 Fase móvil (gradiente): (A) Agua con 0,1% ácido fórmico; (B) ACN	ESI (positivo)	0,4-2,8	1,2-9,1	1,5-7,1	22
Acetamiprid, clotianidina, imidacloprid y tiacloprid	Miel	Microextracción de agregación inducida en frío basada en líquidos iónicos	10 mL de muestra con 0,75 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> . Extracción: 0,2 mL RTIL [C4MIM][PF6] + 0,05 M SDS. Agitación y centrifugación. Fase RTIL + 50 mL de ACN	-	86-100	HPLC-foto-diodo array	Columna: LiChrospher 100 RP-18 endcapped Fase móvil (elución isocrática): 25% (v/v) de ACN en agua	-	0,01	0,03	<5,38	57
Acetamiprid, clotianidina, dinotefuran, imidacloprid, imidaclothiz, nitenpyram, tiacloprid y tiametoxam	Miel	Intercambiador de aniones-DPX	5g en 10 mL de agua + 1mL NaCl Lavado: 2 mL NH <sub>3</sub> 0,1% Elución: 1mL ACN y 0,1mL de HCl 0,1M	QAE Sephadex A-25 (intercambiador de aniones)	72-111	LC-MS/MS (QqQ)	Columna: Zorbax SB-C18 Fase móvil (gradiente): (A) Agua con acetato de amonio 5mM; (B) ACN	ESI (modo positivo)	0,3-3	1-10	1-10	33
Acetamiprid	Polen	QuEChERS	Extracción: 1g de muestra + 2,5 mL de agua y 2,5 mL de ACN Partición: 0,85g de MgSO <sub>4</sub> anhidro: NaOAc (4:1) Limpieza (dSPE): 0,75g de MgSO <sub>4</sub> anhidro, negro de humo grafitizado:PSA: sílice con octadecilo (3:0,15:1:1)	-	81,1-108,0	Inmunoensayo Bic-ELISA  Espectroscopía UV	-	-	0,17	0,25	4,8-10,9	59
Acetamiprid, imidacloprid y tiacloprid	Miel	SULLE	2 g de muestra. Extracción con ACN 60:40 (v/v, ACN:H <sub>2</sub> O)	-	91,49-97,73	HPLC-DAD	WondaSil (Shimadzu-GL) C18 Fase móvil (elución isocrática): ACN / Agua (30:70, v/v)	-	21-27	70-90	1,29-4,37%	60

#### 4. Conclusiones.

Las conclusiones más relevantes de este trabajo son las siguientes:

- Los neonicotinoides son pesticidas sistémicos que se distribuyen por todas las partes de la planta y resultan perjudiciales para las abejas y para el medio ambiente. El análisis de estos compuestos en muestras apícolas permite evaluar la exposición de los polinizadores a estos compuestos, así como cumplir con la legislación vigente. En los últimos años, se han desarrollado técnicas más limpias que disminuyen el uso de disolventes contaminantes, como SPE, MSPE, DLLME y la metodología QuEChERS.

- La extracción por SPE permite lograr un alto rendimiento y sensibilidad, empleando un bajo volumen de disolventes tóxicos. Las distintas matrices apícolas tienen propiedades fisicoquímicas distintas, lo que hace que sea necesario desarrollar distintos procedimientos de preparación de muestra. Para muestras de miel, se han empleado cartuchos como Strata X-CW, Strata X, HLB y un sorbente orgánico covalente, y, en cera de abejas, destaca el empleo de cartuchos (Isolute HM-N y EXtrelut) rellenos con tierras diatomeas. Una técnica novedosa es MSPE, que permite obtener altos rendimientos con un procedimiento sencillo. En ella se emplea un adsorbente magnético (y reutilizable), que establece interacciones con los analitos.

- El método QuEChERS ha sido ampliamente utilizado por sus ventajas: requiere bajas cantidades de disolventes, es económico, su equipamiento es sencillo y permite alcanzar buenas recuperaciones de pesticidas con propiedades fisicoquímicas variadas, por lo que se ha empleado para el análisis simultáneo un gran número de analitos en una misma matriz.

- La técnica DLLME tiene ventajas como que emplea bajos volúmenes de disolventes, permite alcanzar una elevada preconcentración, tiene bajo coste, es rápida y sencilla. Su inconveniente es que requiere un disolvente de extracción inmisible en agua y de alta densidad, por lo que se emplean disolventes clorados. Una alternativa a los disolventes clorados ha sido el empleo de líquidos iónicos o el método IS-DLLME, que empleó 1-octanol y evitó el uso de un disolvente de dispersión.

- En los últimos años han surgido nuevas estrategias para mejorar la eficiencia del tratamiento de muestra, como una pipeta desechable con un intercambiador aniónico o una técnica de microextracción de agregación inducida en frío que empleaba líquidos iónicos. Otra estrategia novedosa en el análisis de neonicotinoides son las técnicas de screening, entre las que se encuentran los biosensores, que tienen ventajas como su sencillez, rapidez, bajo coste, buena sensibilidad y especificidad de unión con el analito.

- Para la determinación de neonicotinoides, LC-MS/MS ha sido la técnica más empleada, debido su naturaleza poco volátil y de elevada polaridad, y los bajos LODs y buena sensibilidad que permite alcanzar la detección mediante MS. Como alternativa a LC se ha empleado la CLC, que tiene tiempo de análisis corto, elevada sensibilidad y emplea pequeños volúmenes de muestras y fases móviles, por lo que puede considerarse una opción más ecológica.

Una alternativa a HPLC-MS/MS que se ha desarrollado en los últimos años, es HPLC con detector DAD. Este tipo de detección resulta más económico, por lo que puede ser una buena alternativa para el control rutinario de residuos de neonicotinoides.

Las metodologías tratadas en este trabajo, son las que se han investigado en los últimos años, lo que permite observar la tendencia a desarrollar métodos que proporcionen una buena eficiencia de extracción, bajos LODs, bajo consumo de disolventes tóxicos, que sean sencillos y económicos. Dentro de las matrices apícolas, la miel ha sido objeto del mayor interés, contándo con un mayor número de desarrollos. No obstante, es importante destacar la importancia de otras matrices apícolas como el polen, que es una fuente de intoxicación para las abejas, ya que entra en contacto directo con ellas, o la cera de abeja, que puede ser un reservorio de contaminantes. Los métodos desarrollados en el futuro, deberán también centrarse en la limpieza de compuestos interferentes de la matriz, hecho que supone un reto en este tipo de matrices complejas.

## 5. Bibliografía.

1. Mörtl, M.; Vehovszky, Á; Klátyik, S.; Takács, E.; Győri, J.; Székács, A. Neonicotinoids: Spreading, Translocation and Aquatic Toxicity. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 2006.
2. Sánchez-Bayo, F.; Desneux, N. Neonicotinoids and the prevalence of parasites and disease in bees. *Bee world* **2015**, *92*, 34-40.
3. Buszewski, B.; Bukowska, M.; Ligor, M.; Staneczko-Baranowska, I. A holistic study of neonicotinoids neuroactive insecticides—properties, applications, occurrence, and analysis. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2019**, *26*, 34723-34740.
4. Bateman, M.; Chernoh, E.; Holmes, K.; Grunder, J.; Grossrieder, M.; Colmenarez, Y.; Babendreier, D.; Faheem, M.; Mulaa, M. *Training Guide on Integrated Pest Management in Tobacco*; CABI: Boston, USA, 2016; pp 51.
5. Yang, L.; Zhao, Y.; Zhao, C.; Li, H.; Wang, M.; Morris-Natschke, S. L.; Qian, K.; Lee, K.; Liu, Y. Design, synthesis, crystal structure, bioactivity, and molecular docking studies of novel sulfonylamidine-derived neonicotinoid analogs. *Med. Chem. Res.* **2014**, *23*, 5043-5057.
6. Pisa, L. W.; Amaral-Rogers, V.; Belzunces, L. P.; Bonmatin, J. M.; Downs, C. A.; Goulson, D.; Kreutzweiser, D. P.; Krupke, C.; Liess, M.; McField, M.; Morrissey, C. A.; Noome, D. A.; Settele, J.; Simon-Delso, N.; Stark, J. D.; Van der Sluijs, J. P.; Van Dyck, H.; Wiemers, M. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2014**, *22*, 68-102.
7. Tomizawa, M.; Casida, J. E. NEONICOTINOID INSECTICIDE TOXICOLOGY: Mechanisms of Selective Action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, *45*, 247-268.
8. Chang, H. Y.; Daugherty, L.; Mitchell, A. Bee afraid, bee very afraid – Neonicotinoids and the nAChRs family. *InterPro Protein Focus* **2013**, *25*, 1-8.
9. European Commission. Commission implementing regulation (EU) No 485/2013 of 24 may 2013 amending implementing regulation (EU) No 540/2011, as regards the conditions of approval of the active substances clothianidin, thiamethoxam and imidacloprid, and prohibiting the use and sale of seeds treated with plant protection products containing those active substances. *OJEU* **2013**, *139*, 12–26.
10. Food, E.; Authority, S. Peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance clothianidin considering the uses as seed treatments and granules. *EFSA Journal* **2018**, *16*, 5177.
11. Food, E.; Authority, S. Peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance imidacloprid considering the uses as seed treatments and granules. *EFSA Journal* **2018**, *16*, 5178.
12. Food, E.; Authority, S. Peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance thiamethoxam considering the uses as seed treatments and granules. *EFSA Journal* **2018**, *16*, 5179.
13. EU Pesticides database. <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database> (accedido Abril 5, 2022).
14. Sanchez-Bayo, F.; Goka, K. Impacts of Pesticides on Honey Bees. *InTech Open Sci.* **2016**, *4*, 77-97.
15. Sanchez-Bayo, F.; Goka, K. Pesticide residues and bees - a risk assessment. *PLoS ONE* **2014**, *9*, 94482.
16. Tanner, G. *Development of a Method for the Analysis of Neonicotinoid Insecticide Residues in Honey using LC-MS/MS and Investigations of Neonicotinoid Insecticides in Matrices of Importance in Apiculture*. M. S. Thesis, University of Vienna, Viena, Marzo 2010.

17. Kahraman, T.; Buyukunal, S. K.; Vural, A.; Altunatmaz, S. S. Physico-chemical properties in honey from different regions of Turkey. *Food Chem.* **2010**, *123*, 41-44.
18. Jiang, S.; Meng, X.; Xu, M.; Li, M.; Li, S.; Wang, Q.; Liu, W.; Hao, L.; Wang, J.; Wang, C.; Wang, Z.; Wu, Q. Green synthesis of novel magnetic porous organic polymer for magnetic solid phase extraction of neonicotinoids in lemon juice and honey samples. *Food Chem.* **2022**, *383*, 132599.
19. An, Y.; Wang, J.; Jiang, S.; Li, M.; Li, S.; Wang, Q.; Hao, L.; Wang, C.; Wang, Z.; Zhou, J.; Wu, Q. Synthesis of natural proanthocyanidin based novel magnetic nanoporous organic polymer as advanced sorbent for neonicotinoid insecticides. *Food Chem.* **2022**, *373*, 131572.
20. Gbylik-Sikorska, M.; Sniegocki, T.; Posyniak, A. Determination of neonicotinoid insecticides and their metabolites in honey bee and honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2015**, *990*, 132-140.
21. Sánchez-Hernández, L.; Hernández-Domínguez, D.; Martín, M. T.; Nozal, M. J.; Higes, M.; Bernal Yagüe, J. L. Residues of neonicotinoids and their metabolites in honey and pollen from sunflower and maize seed dressing crops. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1428*, 220-227.
22. Yáñez, K. P.; Martín, M. T.; Bernal, J. L.; Nozal, M. J.; Bernal, J. Trace Analysis of Seven Neonicotinoid Insecticides in Bee Pollen by Solid-Liquid Extraction and Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Food Anal. Methods* **2013**, *7*, 490-499.
23. Valverde, S.; Ibáñez, M.; Bernal, J. L.; Nozal, M. J.; Hernández, F.; Bernal, J. Development and validation of ultra high performance-liquid chromatography-tandem mass spectrometry based methods for the determination of neonicotinoid insecticides in honey. *Food Chem.* **2018**, *266*, 215-222.
24. Mrzlikar, M.; Heath, D.; Heath, E.; Markelj, J.; Kandolf Borovšak, A.; Prosen, H. Investigation of neonicotinoid pesticides in Slovenian honey by LC-MS/MS. *LWT-Food Sci. Technol.* **2019**, *104*, 45-52.
25. Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Stajnbaher, D.; Schenck, F. J. 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*, 412-431.
26. Liu, W.; Wang, J.; Song, S.; Hao, L.; Liu, J.; An, Y.; Guo, Y.; Wu, Q.; Wang, C.; Wang, Z. Facile synthesis of uniform spherical covalent organic frameworks for determination of neonicotinoid insecticides. *Food Chem.* **2022**, *367*, 130653.
27. López-Fernández, O.; Rial-Otero, R.; Simal-Gándara, J. High-throughput HPLC-MS/MS determination of the persistence of neonicotinoid insecticide residues of regulatory interest in dietary bee pollen. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 7101-7110.
28. Hou, J.; Xie, W.; Hong, D.; Zhang, W.; Li, F.; Qian, Y.; Han, C. Simultaneous determination of ten neonicotinoid insecticides and two metabolites in honey and Royal-jelly by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **2019**, *270*, 204-213.
29. Tomšič, R.; Heath, D.; Heath, E.; Markelj, J.; Kandolf Borovšak, A.; Prosen, H. Determination of Neonicotinoid Pesticides in Propolis with Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *Molecules* **2020**, *25*, 5870.
30. Yáñez, K. P.; Bernal, J. L.; Nozal, M. J.; Martín, M. T.; Bernal, J. Determination of seven neonicotinoid insecticides in beeswax by liquid chromatography coupled to electrospray-mass spectrometry using a fused-core column. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1285*, 110-117.
31. Jabot, C.; Fieu, M.; Giroud, B.; Buleté, A.; Casabianca, H.; Vulliet, E. Trace-level determination of pyrethroid, neonicotinoid and carboxamide pesticides in beeswax using

- dispersive solid-phase extraction followed by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2015**, *95*, 240-257.
32. Tu, X.; Chen, W. Overview of Analytical Methods for the Determination of Neonicotinoid Pesticides in Honeybee Products and Honeybee. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2020**, *51*, 329-338.
  33. Song, S.; Zhang, C.; Chen, Z.; He, F.; Wei, J.; Tan, H.; Li, X. Simultaneous determination of neonicotinoid insecticides and insect growth regulators residues in honey using LC–MS/MS with anion exchanger-disposable pipette extraction. *J. Chromatogr. A* **2018**, *1557*, 51-61.
  34. Orso, D.; Floriano, L.; Ribeiro, L. C.; Bandeira, N. M. G.; Prestes, O. D.; Zanella, R. Simultaneous Determination of Multiclass Pesticides and Antibiotics in Honey Samples Based on Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Food Anal. Methods* **2015**, *9*, 1638-1653.
  35. Hall, M. J.; Dang, V.; Bradbury, S. P.; Coats, J. R. Optimization of QuEChERS Method for Simultaneous Determination of Neonicotinoid Residues in Pollinator Forage. *Molecules* **2020**, *25*, 2732.
  36. Ligor, M.; Bukowska, M.; Ratiu, I.; Gadzała-Kopciuch, R.; Buszewski, B. Determination of Neonicotinoids in Honey Samples Originated from Poland and Other World Countries. *Molecules* **2020**, *25*, 5817.
  37. Beceiro-González, E.; González-Castro, M. J.; Muniategui-Lorenzo, S.; López-Mahía, P.; Prada-Rodríguez, D. Analytical Methodology for the Determination of Organochlorine Pesticides in Vegetation. *J. AOAC Int.* **2012**, *95*, 1291-1310.
  38. Wiest, L.; Buleté, A.; Giroud, B.; Fratta, C.; Amic, S.; Lambert, O.; Pouliquen, H.; Arnaudguilhem, C. Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 5743-5756.
  39. Barganska, Z.; Slebioda, M.; Namiesnik, J. Pesticide residues levels in honey from apiaries located of Northern Poland. *Food control* **2013**, *31*, 196-201.
  40. Jovanov, P.; Guzsány, V.; Franko, M.; Lazić, S.; Sakač, M.; Milovanović, I.; Nedeljković, N. Development of multiresidue DLLME and QuEChERS based LC–MS/MS method for determination of selected neonicotinoid insecticides in honey liqueur. *Int. Food Res. J.* **2014**, *55*, 11-19.
  41. Kujawski, M. W.; Namieśnik, J. Challenges in preparing honey samples for chromatographic determination of contaminants and trace residues. *TrAC, Trends Anal. Chem. (Regular ed.)* **2008**, *27*, 785-793.
  42. Hrynko, I.; Łozowicka, B.; Kaczyński, P. Liquid Chromatographic MS/MS Analysis of a Large Group of Insecticides in Honey by Modified QuEChERS. *Food Anal. Methods* **2018**, *11*, 2307-2319.
  43. Gawel, M.; Kiljanek, T.; Niewiadowska, A.; Semeniuk, S.; Goliszek, M.; Burek, O.; Posyniak, A. Determination of neonicotinoids and 199 other pesticide residues in honey by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **2019**, *282*, 36-47.
  44. Kammoun, S.; Mulhauser, B.; Aebi, A.; Mitchell, E. A. D.; Glauser, G. Ultra-trace level determination of neonicotinoids in honey as a tool for assessing environmental contamination. *Environ. Pollut. (1987)* **2019**, *247*, 964-972.
  45. Mitchell, E. A. D.; Mulhauser, B.; Mulot, M.; Mutabazi, A. A.; Glauser, G. G.; Aebi, A. A worldwide survey of neonicotinoids in honey. *Science* **2017**, *358*, 109.

46. Jovanov, P.; Guzsavány, V.; Lazić, S.; Franko, M.; Sakač, M.; Šarić, L.; Kos, J. Development of HPLC-DAD method for determination of neonicotinoids in honey. *J. Food Compos. Anal.* **2015**, *40*, 106-113.
47. Jovanov, P.; Guzsavány, V.; Franko, M.; Lazić, S.; Sakač, M.; Šarić, B.; Banjac, V. Multi-residue method for determination of selected neonicotinoid insecticides in honey using optimized dispersive liquid–liquid microextraction combined with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta (Oxford)* **2013**, *111*, 125-133.
48. Chen, M.; Collins, E. M.; Tao, L.; Lu, C. Simultaneous determination of residues in pollen and high-fructose corn syrup from eight neonicotinoid insecticides by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 9251-9264.
49. Valverde, S.; Ares, A. M.; Bernal, J. L.; Nozal, M. J.; Bernal, J. Fast determination of neonicotinoid insecticides in beeswax by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using an enhanced matrix removal–lipid sorbent for clean-up. *Microchem. J.* **2018**, *142*, 70-77.
50. Moreno-González, D.; Alcántara-Durán, J.; Gilbert-López, B.; Beneito-Cambra, M.; Cutillas, V. M.; Rajska, Ł.; Molina-Díaz, A.; García-Reyes, J. F. Sensitive Detection of Neonicotinoid Insecticides and Other Selected Pesticides in Pollen and Nectar Using Nanoflow Liquid Chromatography Orbitrap Tandem Mass Spectrometry. *J. AOAC Int.* **2018**, *101*, 367-373.
51. Valverde, S.; Bernal, J. L.; Martín, M. T.; Nozal, M. J.; Bernal, J. Fast determination of neonicotinoid insecticides in bee pollen using QuEChERS and ultra-high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Electrophoresis* **2016**, *37*, 2470-2477.
52. Vichapong, J.; Burakham, R.; Srijaranai, S. In-coupled syringe assisted octanol–water partition microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of neonicotinoid insecticide residues in honey. *Talanta (Oxford)* **2015**, *139*, 21-26.
53. Zgoła-Grzeškowiak, A.; Grzeškowiak, T. Dispersive liquid-liquid microextraction. *TrAC, Trends Anal. Chem. (Regular ed.)* **2011**, *30*, 1382-1399.
54. Campillo, N.; Viñas, P.; Férrez-Melgarejo, G.; Hernández-Córdoba, M. Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Tandem Mass Spectrometry for the Determination of Neonicotinoid Insecticides in Honey Samples Using Dispersive Liquid–Liquid Microextraction. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 4799-4805.
55. Yang, C.; Ran, L.; Xu, M.; Ren, D.; Yi, L. In situ ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction combined with ultra high performance liquid chromatography for determination of neonicotinoid insecticides in honey samples. *J. Sep. Sci.* **2019**, *42*, 1930-1937.
56. Carbonell-Rozas, L.; Lara, F. J.; Olmo Iruela, M.; García-Campaña, A. M. Capillary liquid chromatography as an effective method for the determination of seven neonicotinoid residues in honey samples. *J. Sep. Sci.* **2020**, *43*, 3847-3855.
57. Vichapong, J.; Burakham, R.; Santaladchaiyakit, Y.; Srijaranai, S. A preconcentration method for analysis of neonicotinoids in honey samples by ionic liquid-based cold-induced aggregation microextraction. *Talanta (Oxford)* **2016**, *155*, 216-221.
58. Reynoso, E. C.; Torres, E.; Bettazzi, F.; Palchetti, I. Trends and Perspectives in Immunosensors for Determination of Currently-Used Pesticides: The Case of Glyphosate, Organophosphates, and Neonicotinoids. *Biosensors* **2019**, *9*, 20.
59. Fang, Q.; Zu, Q.; Hua, X.; Lv, P.; Lin, W.; Zhou, D.; Xu, Z.; Fan, J.; Li, X.; Cao, H. Quantitative Determination of Acetamiprid in Pollen Based on a Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Molecules* **2019**, *24*, 1265.



60. Chen, W.; Wu, S.; Zhang, J.; Yu, F.; Hou, J.; Miao, X.; Tu, X. Matrix-Induced Sugaring-Out: A Simple and Rapid Sample Preparation Method for the Determination of Neonicotinoid Pesticides in Honey. *Molecules* **2019**, *24*, 2761.