

Análisis cromatográfico de plaguicidas organoclorados, organofosforados y clorotalonil en muestras de miel de *Apis mellifera* L. (1758) y *Scaptotrigona mexicana* (Guérin-Meneville, 1845), Hymenoptera, Apidae.

*Adolfo León, Eduardo E. Espinoza-Medinilla,
Rebeca I. Martínez-Salinas

Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Ciudad Universitaria, Facultad de Ingeniería, Libramiento Norte Poniente 1150, Colonia Lajas Maciel. Tuxtla Gutiérrez Chiapas 29014 Tel. 961 170 9362, *Autor para correspondencia: aleon2040@hotmail.com, eduardo.espinoza@unicach.mx, rebeca.martinez@unicach.mx

RESUMEN

Las abejas son los principales polinizadores de plantas de cultivos agrícolas por ello la probabilidad de que estas tengan contacto diario con los diferentes tipos de plaguicidas y otros compuestos químicos es demasiado alta. En la actualidad estamos enfrentando no solamente efectos de pérdida económica con la muerte de las abejas, sino esto también implica la desaparición de especies de plantas que dependen de ellas para su reproducción. Es así como en el presente trabajo elegimos una zona donde se han empleado por muchos años una gran cantidad y diversidad de plaguicidas como lo es el Soconusco. Así, estudiando la miel de dos especies representativas de esta zona Se detectaron cuatro compuestos organoclorados (malati6n, parati6n, metilico y clorotalonil, el 54.34% de las mieles evaluadas contenian al menos uno de estos compuestos. En *Apis mellifera* el compuesto m6s frecuente en un 39.13% fue el clorotalonil, seguido por heptacloro (33.33%) y γ -HCH (2.22%); en el caso de *Scaptotrigona mexicana* el m6s frecuente fue p,p-DDT (22.22%), seguido por p,p-DDE (16.67%) y hepracloro (14.56%).

Palabras clave: s6ndrome del colapso de las colonias, plaguicidas, polinizadores, dosis letal, Hymenoptera.

ABSTRACT

Bees are the main pollinators of agricultural crop plants, so the probability that they have daily contact with the different types of pesticides and other chemical compounds is too high. Currently we are facing not only effects of economic loss with the death of bees, but this also implies the disappearance of plant species that depend on them for their reproduction. Thus, in the present work we chose an area where a large quantity and diversity of pesticides such as Soconusco have been used for many years. Thus, studying the honeys of two representative species of this area, 4 organochlorine compounds were detected (malathion, parathion, methyl and chlorothalonil, 54.34% of the honeys evaluated contained at least one of these compounds.) In *Apis mellifera* the most frequent compound in a 39.13% was chlorotalinil followed by heptachlor (33.33%) and γ -HCH (2.22%), in the case of *Scaptotrigona mexicana* the most frequent was p, p-DDT (22.22%), followed by p, p-DDE (16.67%) and hepracloro (14.56%).

Key words: Colony Collapse Disorder, Pesticides, Pollinators, Lethal dose, Hymenoptera.

INTRODUCCI6N

Los insecticidas son aquellas sustancias u organismos que matan a los insectos por medio de su acci6n qu6mica, f6sica o biol6gica. En la mayor6a de los casos, al hablar de insecticidas, se hace referencia a productos qu6micos que aniquilan a los insectos (Metcalf y Flint, 1979).

En menos de 20 a6os, los neonicotinoides, junto con los organoclorados y organofosforados, se han convertido en la clase m6s ampliamente utilizada de insecticidas. Su presencia representa en la actualidad una cuarta

parte al menos del mercado de los insecticidas a nivel mundial (Agropages, 2013). Este grupo de insecticidas nitro-sustituido incluye dinotefurano, nitenpiram, tiame-toxam, imidacloprid y clotianidina y sustituido con ciano compuestos acetamiprid y tiacloprid. Est6n destinados al tratamiento de una amplia gama de plantas, incluyendo girasol, ma6z, canola, algod6n, patata, arroz, remolacha de az6car, aceite de colza, soja, plantas ornamentales, viveros de 6rboles y frutas (Biever *et al.*, 2003).

Hoy en d6a, el uso de los neonicotinoides han superado por mucho el uso de los organoclorados y organofosforados, pero eso no indica que estos 6ltimos prevalezcan

en el ambiente y peor aún que tengan contacto con productos alimenticios del ser humano, esto es un motivo de preocupación debido que se han investigado como las posibles causas de recientes descensos en la población de polinizadores (Cresswell, 2011) y a su gran movilidad en las plantas (Tanner y Czerwenka, 2011), se encuentran en flores, polen y néctar pueden incluso llegar a través de las hojas (Van der Sluijs *et al.*, 2013; Van Dijk *et al.*, 2013).

Lo que lo hace mucho más preocupante debido a su sutil influencia en el comportamiento de abeja incluyendo las funciones normales (Williamson *et al.*, 2014); los neonicotinoides actúan en el sistema nervioso central de los insectos, causando la parálisis que llevan a la muerte, frecuentemente en pocas horas (Wright *et al.*, 2015). Denominado trastorno o síndrome del colapso de colonias (*Colony Collapse Disorder*, CCD, por sus siglas en inglés). Esta enfermedad ha sido reportada en todo el mundo, pero su alta prevalencia es una preocupación importante para los colmenares en Norteamérica y Europa, ocasionando pérdidas de billones de dólares y euros.

Esta enfermedad provoca la desaparición repentina de una gran proporción de las abejas obreras. Considerando que las abejas son los principales polinizadores, el CCD plantea una enorme amenaza a la producción de alimentos; En el mundo un 75% de las especies de cultivos utilizados para la alimentación depende de la polinización (Klein *et al.*, 2007). Las abejas son los principales polinizadores de plantas de cultivo (Cutler *et al.*, 2014; Potts *et al.*, 2010). Aunque el uso de los neonicotinoides se incrementa cada vez más, existen países subdesarrollados que aún emplean el DDT por ejemplo y en grandes cantidades, que por su permanencia en el ambiente llegan a acumularse en cantidades muy altas, es así como en el presente trabajo se evalúan las cantidades presentes de dos plaguicidas (organoclorados y organofosforados) y un fungicida que se han empleado en grandes cantidades en la región del Soconusco, en el estado de Chiapas.

METODOLOGÍA

Los residuos de organoclorados, organofosforados, neonicotinoides y clorotalonil se extrajeron de acuerdo con la metodología de Wiest *et al.* (2011). Se pesaron cinco gramos de miel en un tubo de centrifuga de 50 ml, se añadieron 10 ml de agua y se agitó vigorosamente la mezcla para disolver la miel. A continuación, se añadieron 10 ml de acetonitrilo, 4 g de $MgSO_4$ anhidro, 1 g de cloruro de sodio, 1 g de dihidrato de citrato de sodio y 500 mg de sesquihidrato de citrato de disodio; el tubo se agitó inmediatamente con la mano y posteriormente en

vórtex durante un minuto y luego se centrifugó durante dos minutos a 5,000 rpm. Se transfirieron seis ml de sobrenadante a un tubo de 15 ml de PSA (amina secundaria primaria) que contenía 900 mg de $MgSO_4$ anhidro, 150 mg de sílice ligada a PSA y 150 mg de sílice unida a C18. Este tubo se agitó inmediatamente con la mano, se agitó en vórtex durante 10 segundos y se centrifugó durante dos minutos a 5000 rpm. Finalmente, se transfirieron 4 ml del extracto a un tubo de vidrio de 10 ml, se evaporó hasta un volumen final de 50 μ l y se mantuvo a $-18^\circ C$ hasta el análisis.

Reactivos

Para la validación y estandarización del método analítico se utilizaron estándares analíticos proporcionados por Sigma-Aldrich. Se utilizó una mezcla de OCs de grado estándar (aldrina, β -HCH, α -HCH, γ -HCH, δ -HCH, p, p'-DDD, p, p'-DDE, p, p'-DDT, dieldrina, α -endosulfan, β -endosulfan, sulfato de endosulfán, endrina, aldehído de endrina, heptacloro y epóxido de heptacloro), estándares individuales de los organofosforados malatión y paratión metílico, estándares individuales de neonicotinoides (imidacloprida, tiacloprida, tiametoxan y clotianidina) y estándar individual de clorotalonil. Los disolventes orgánicos utilizados para la extracción fueron de grado HPLC y fueron suministrados por Sigma-Aldrich.

Estandarización del análisis cromatográfico

Los extractos se analizaron por cromatografía de gases usando un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus 500, equipado con un detector de captura de electrones, un inyector automático y un inyector split/splitless programable. El volumen de inyección del extracto fue de 2 μ L en modo splitless. La temperatura inicial del inyector se ajustó a $120^\circ C$, y la velocidad del gas portador (hidrógeno) se fijó a 48 cm/s. La temperatura del detector fue de $350^\circ C$, y el flujo de recuperación fue de 30 ml/min. Se utilizó una columna Agilent J & W DB-35MS (p / n 122-3832) de 30 m de longitud, 0.250 mm de diámetro interno y 0.25 μ m de espesor de película. La temperatura inicial del horno fue de $110^\circ C$, que se mantuvo durante 1.4 minutos, seguido de una rampa de temperatura con incrementos de $13^\circ C/min$ hasta $285^\circ C$, mantenimiento a $285^\circ C$ durante 1 min, otra rampa de $30^\circ C/min$ hasta $300^\circ C$, y se mantuvo hasta el final de la rutina (3 min). El tiempo total del análisis fue de 19.36 min.

En las condiciones descritas anteriormente, los niveles de residuos de plaguicidas organoclorados, organofosforados y clorotalonil se determinaron cuantitativamente mediante el método estándar externo utilizando el área

del pico. Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) se determinaron mediante el método de regresión de mínimos cuadrados en las curvas de organoclorados, organofosforados y clorotalonil utilizando datos generados por nueve réplicas cerca de la concentración más baja alcanzable en la curva de calibración.

Las curvas de todos los estándares (analitos) se situaron dentro de los límites aceptables del criterio de linealidad ($r=0,99$). Los valores de LOD de los diferentes organoclorados en miel cayeron entre 0.175 - 1.174 ng/g, los organofosforados entre 0.111–1.033 ng/g y el clorotalonil fue de 0.184 ng/g; para el polen, los valores de LOD en organoclorados cayeron entre 0.008-0.058 ng/g, organofosforados entre 0.011–0.063 ng/g y clorotalonil de 0.045 ng/g. Los valores LOQ de los diferentes organoclorados en miel cayeron entre 0.585 - 3.913 ng/g, organofosforados entre 0.446–3.749 ng/g y clorotalonil fue de 2.384 ng/g; para el polen, los valores de LOQ en organoclorados cayeron entre 0.029 - 0.195 ng/g, en organofosforados entre 0.042 - 0.163 ng/g y clorotalonil de 0.106 ng/g. Las recuperaciones se determinaron agregando los estándares de sustitución antes de la extracción.

Las cantidades fueron similares a las concentraciones de analitos detectadas. El porcentaje de recuperación se determinó agregando el analito a las muestras de miel y polen (por triplicado); el rango del porcentaje promedio de recuperación de polen para organoclorados fue del 78.3 al 103%, organofosforados del 83.5 al 102% y clorotalonil de 106%; y en la miel para organoclorados del 79.1 al 106.8%, organofosforados del 78.6 al 101.4% y clorotalonil de 102%.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de los niveles de organoclorados, organofosforados y clorotalonil calculando medias geométricas, mediana, desviaciones estándar y mínimo y máximo.

Coefficiente de peligrosidad

Calculamos el cociente de riesgo (HQ) para las abejas melíferas para cada pesticida usando los métodos descritos por Stoner y Eitzer (2013); Traynor *et al.* (2016). Posteriormente, el HQ se calculó dividiendo la cantidad promedio ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de cada plaguicida por su respectiva LD50 oral de acuerdo con la Ecotox Database de la US EPA (US EPA, 1997) y la Base de Datos de Propiedades de Plaguicidas de la Universidad de Hertfordshire (University of Hertfordshire, 2018).

La cantidad máxima de residuos detectados en muestras de miel se compararon con la dosis de referencia aguda (DRA, la cantidad de un químico que una persona puede

consumir en una comida o en un día que no causaría daño), el valor diario aceptable ingesta (IDA, es la cantidad de un producto químico que se puede consumir todos los días durante toda la vida sin causar daño) y el límite máximo de residuos (LMR), la concentración máxima de un plaguicida permitido legalmente en alimentos o alimentos para animales según la EU Pesticides Database (European Commission, 2018) y la EFSA (European Food Safety Authority), por sus siglas en inglés.

RESULTADOS

En general, se detectaron 4 de los 16 compuestos organoclorados incluidos en la lista, así mismo se detectó malatión, paratión metílico y clorotalonil (cuadro 1). Encontramos que el 54.34% de las muestras de miel de abeja fueron positivas a al menos un organoclorado, organofosforado o clorotalonil. El clorotalonil fue el compuesto más frecuente *A. mellifera* (encontrado en el 39.13% de todas las muestras) seguido por heptacloro (33.33%) y γ -HCH (2.22%); en el caso de *Scaptotrigona mexicana* el más frecuente fue p,p-DDT (22.22%), seguido por p,p-DDE (16.67%) y heptacloro (14.56%) (cuadro 1).

En un estudio similar, nuestros resultados coinciden con los resultados obtenidos en cuatro regiones de Colombia (Boyacá, Cundinamarca, Magdalena y Santander), donde de 61 muestras, 32 (52.4%) de ellas presentaron algún tipo de contaminación por plaguicidas organoclorados u organofosforados. El principal compuesto detectado fue el clorpirifos (36,1%), seguido de profenofos (16.4%), DDT (6.6%), HCB (6.6%), γ -HCH (4.9%) y fenitrotion (1.6%).

Comparando nuestros resultados, tenemos que las incidencias de contaminación por plaguicidas organofosforados u organoclorados son muy parecidas 54.34% para nuestra región y 52.4% para la región colombiana. Ellos encontraron DDT en 6.6% de incidencia, en nuestro estudio evaluamos dos compuestos derivados del DDT con incidencias de mucho mayores, lo cual indica que el DDT fue o es aplicado en concentraciones muy altas en nuestra región. Otro compuesto que fue detectado tanto en las regiones colombianas como en la nuestra fue el γ -HCH donde ellos detectaron un poco más del doble que en nuestra región.

Por otra parte, acuerdo a los resultados de las encuestas realizada en el mismo estudio a los apicultores colombianos, es altamente probable que la contaminación de las mieles producidas en las regiones apícolas colombianas bajo estudio sea causada por las prácticas agrícolas desarrolladas alrededor de las colmenas instaladas

(Rodríguez-López, 2011). Pensamiento que comparten con la mayoría de los productores mexicanos.

Finalmente, cabe mencionar que las regiones estudiadas en Colombia son las principales productoras de granos, frutales y algodón. A este último producto es de vital importancia darle el enfoque que merece, ya que nuestra región fue una gran productora de algodón y además demanda el uso de una gama de plaguicidas. Sin olvidar el incremento de plaguicidas que se emplean cuando se tienen cultivos diferentes.

CONCLUSIONES

Más del 50% de la miel estudiada en la zona presentan contaminación por algún tipo de compuesto, ya sea plaguicida o fungicida. Al parecer existe una diferencia entre el hábito de pecoreo entre *A. mellifera* y *S. mexicana* ya que su miel no contiene los mismos compuestos. Finalmente, se podría pensar *A. mellifera* visita más a los cultivos que son atacados por hongos, ya que presentó altos niveles del fungicida estudiado.

LITERATURA CITADA

- AGROPAGES, 2013.** <http://agropages.com/buyersguide/category/neonicotinoid-insecticide-insight.html>.
- BIEVER, R.C., J.R. HOBERG, B. JACOBSON, E. DIONNE, M. SULAIMAN & P. MCCAHERN, 2003.** ICON rice seed treatment toxicity to crayfish (*Procambarus clarkii*) in experimental rice paddies. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22, 167–174.
- COMMISSION, E.U., 2018.** EU pesticides database. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1531990582490&uri=CELEX:32018R0832>.
- CRESSWELL, J., 2011.** A meta-analysis of experiments testing the effects of neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. *Ecotoxicology* 20, 149–157.
- CUTLER, G., C. SCOTT-DUPREE, & D. DREXLER, 2014.** Honey bees, neonicotinoids and bee incident reports: the Canadian situation. *Pest Management Science*. 70: 779–783.
- EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY), 2017.** The 2015 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal*. 15,4791. doi:10.2903/j.efsa.2017.4791.
- HENRY, M., M. BEGUIN, F. REQUIER, O. ROLLEN, J.F. ODOUX, P. AUSPINEL, J. APTEL, S. TCHAMITCHIAN, & A. DECOURTUPPE, 2013.** A common pesticide decreases foraging success and survival in honeybees. *Science*. 336: 348-350.
- KLEIN, A., B. VAISSIERE, J. CANE, I. STEFFAN-DEWENTER, S. CUNNINGHAM, C. KREMEN, & T. TSCHARNTKE, 2007.** Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings Biological Science*. 274: 303–313.
- METCALF, C.L. Y W.P. FLINT, 1979.** *Insectos destructivos e insectos útiles, sus costumbres y su control*. 4ª Ed. Continental S.A. México, 1208 pp.
- POTTS, S., J. BIESMEIJER, C. KREMEN, P. NEUMANN, O. SCHWEIGER & W. KUNIN, 2010.** Global pollinator declines: trends, impacts and drivers, *Trends Ecology Evolution*. 25: 345–353.
- RENWICK, A.G., 2012.** Pesticide residue analysis and its relationship to hazard characterisation (ADI/ARfD) and intake estimations (NEDI/NESTI). *Pest Management Science*. 58, 1073–1082. doi:10.1002/ps.544.

- RÓDRIGUEZ-LÓPEZ, D., 2011.** *Evaluación de la presencia de residuos de plaguicidas en miel de abejas provenientes de los departamentos de Boyacá, Cundinamarca, Magdalena y Santander.* Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias, Departamento de Química Bogotá, Colombia. Pp. 28-30.
- STONER, K.A., B.D. EITZER, 2013.** Using a Hazard Quotient to Evaluate Pesticide Residues Detected in Pollen Trapped from Honey Bees (*Apis mellifera*) in Connecticut. *PloS one.* 8, 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0077550.
- TANNER, G., C. CZERWENKA, 2011.** LC–MS/MS analysis of neonicotinoid insecticides in honey: methodology and residue findings in Austrian honeys. *Journal of Agricultural Food Chemistry.* 59: 12271–12277.
- TRAYNOR, K.S., J.S. PETTIS, D.R. TARPY, C.A. MULLIN, J.L. FRAZIER & M. FRAZIER, 2016.** In-hive Pesticide Exposome: assessing risks to migratory honey bees from in-hive pesticide contamination in the Eastern United States. *Nature,* 1–16. doi:10.1038/srep33207.
- HERTFORDSHIRE, U., 2018.** Pesticide Properties DataBase Recuperado de <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>.
- EPA, U.S., 1997.** Ecotox database. United States, Recuperado de <http://cfpub.epa.gov/ecotox/>.
- VAN DER SLUIJS, J.P., SN. IMON-DELISO, D. GOULSON, L. MAXIM, J.M. BONMATIN & L.P. BELZUNCES, 2013.** Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Current Opinion in Environmental Sustainability.* 5 (3–4): 293–305.
- VAN DIJK, T.C., M.A. VAN STAALDUINEN & J.P. VAN DER SLUIJS, 2013.** Macro-invertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid. *PLOS ONE* 8 (5), e62374.
- WRIGHT, G.A., S. SOFTLEY, & H. EARNSHAW, 2015.** Low doses of neonicotinoid pesticides in food rewards impair short-term olfactory memory in foraging-age honeybees. *Scientific Reports.* 5: 1-7.
- WIEST, L., A. BULETÉ, B. GIROUD, C. FRATTA, S. AMIC, O. LAMBERT, H. POULIQUEN & C. ARNAUDGUILHEM, 2011.** Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A.* 1218, 5743–5756. doi:10.1016/j.chroma.2011.06.079.
- WILLIAMSON, S., S. WILLIS & G. WRIGHT, 2014.** Exposure to neonicotinoids influences the motor function of adult worker honeybees. *Ecotoxicology,* 23: 1409–1418.

Analito	N	%≥DL a		GM b		Mediana		SD		Mínimo		Máximo		HQ	
		Amell	Smex	Amell	Smex	Amell	Smex	Amell	Smex	Amell	Smex	Amell	Smex	Amell	Smex
Organoclorados															
□-HCH	23	0	0	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	-	-
□-HCH	23	22.22	0	26.57	N/D	19.48	N/D	34.96	N/D	10.33	N/D	92.22	N/D	56.82	-
□-HCH	23	0	0	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	-	-
Heptacloro	23	33.33	14.56	15.29	12.43	38.44	18.44	23.15	14.23	9.83	2.48	43.18	27.12	22.15	N/C
□-HCH	23	0	0	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	-	-
Aldrina	23	0	0	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	-	-
Heptacloro epóxido	23	0	0	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	-	-
□-Endosulfan	23	0	0	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	-	-
p,p'-DDE	23	11.11	16.67	17.26	7.42	11.01	34.05	13.33	2.48	6.87	66.23	69.15	25.27	N/C	N/C
Dieldrina	23	0	0	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	-	-
Endrina	23	0	0	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	-	-
p,p'-DDD	23	0	0	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	-	-
□-Endosulfan	23	0	0	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	-	-
p,p'-DDT	23	22.22	22.22	70.56	37.56	3.29	25.82	29.6	27.62	57.05	2.29	83.32	48.78	185.28	N/C
Endrina aldehído	23	0	0	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	-	-
Endosulfan sulfato	23	0	0	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	-	-
Organofosforados															
Malatión	23	13.04	13.04	0.28	0.20	0.25	0.21	0.08	0.06	0.23	0.14	0.39	0.26	1.46	20.68
Paratión metílico	23	17.39	8.69	0.14	0.15	0.15	0.22	0.04	0.03	0.10	0.10	0.22	0.18	1.13	15.13
Fungicida															
Clorotalonil	23	39.13	0	1.15	N/D	0.46	N/D	7.44	N/D	0.25	N/D	13.24	N/D	5.57	-

CUADRO 1

Concentración de organoclorados, organofosforados y clorotalonil en muestras de miel de *Apis mellifera* y *Scaptotrigona mexicana*.

Concentración en miel reportada en $\mu\text{g}/\text{Kg}$; ^a % de muestras con niveles detectables ($\% \geq \text{DL}$); ^b Valores reportados como media geométrica (GM); (SD) desviación estándar; (N/D) no detectado. (HQ) Cociente de peligrosidad; (N/C) no calculado.