



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

Trabajo Fin de Grado

Grado en Química

Título del Trabajo:

**Determinación de plaguicidas en
muestras de cera estampada de abeja**

Autora:

Isabel Bastardo Fernández

Tutora:

M^a Jesús del Nozal Nalda

Este trabajo ha sido realizado en los laboratorios del grupo de investigación TESEA (QUIFIMA) bajo la dirección de la Dra. D^a. María Jesús del Nozal y la supervisión del Dr. D. José Luis Bernal Yagüe. Con la colaboración inestimable del Técnico D. Mario Martínez Cuellar. A todos ellos mi más sincero agradecimiento.

También he de agradecer el suministro de muestras efectuado por el Grupo del Dr. D. Mariano Higes Pascual (Marchamalo, Guadalajara) investigador responsable del Proyecto Coordinado.

Esta investigación está incluida en el proyecto RTA2017-00004-CO2-02 del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades dentro del Programa Estatal de I+D+I Orientada a los Retos de la Sociedad (Reto de Seguridad y Calidad Alimentaria) a quienes agradecemos la ayuda económica concedida.

Por último, quiero agradecer a mi familia, amigos y compañeros de carrera todo el ánimo y apoyo mostrado durante estos 5 años.

ÍNDICE

| | | |
|-----------|--|----|
| 1 | RESUMEN | 4 |
| 2 | ABSTRACT | 5 |
| 3 | INTRODUCCIÓN | 6 |
| 3.1 | <i>Cera estampada</i> | 6 |
| 3.2 | <i>Contaminación e impacto ambiental</i> | 9 |
| 3.3 | <i>Plaguicidas analizados</i> | 11 |
| 3.4 | <i>Antecedentes bibliográficos analíticos</i> | 16 |
| 4 | OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO | 19 |
| 5 | INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS | 20 |
| 5.1 | <i>Equipo de análisis</i> | 20 |
| 5.2 | <i>Equipos adicionales</i> | 21 |
| 5.3 | <i>Otros instrumentos y materiales</i> | 22 |
| 5.4 | <i>Reactivos y disolventes</i> | 23 |
| 5.5 | <i>Disoluciones</i> | 23 |
| 6 | PARTE EXPERIMENTAL | 25 |
| 6.1 | <i>Condiciones del análisis</i> | 25 |
| 6.1.1 | <i>Condiciones del cromatógrafo</i> | 25 |
| 6.1.2 | <i>Condiciones del detector</i> | 25 |
| 6.2 | <i>Preparación de patrones</i> | 27 |
| 6.2.1 | <i>Líneas de calibrado</i> | 27 |
| 6.3 | <i>Análisis de pesticidas</i> | 29 |
| 6.3.1 | <i>Preparación de muestras</i> | 29 |
| 6.3.2 | <i>Estudio de efecto matriz y recuperación</i> | 33 |
| 6.4 | <i>Resultados</i> | 36 |
| 7 | CONCLUSIONES | 41 |
| 8 | LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS | 42 |
| 8.1 | <i>Figuras</i> | 42 |
| 8.2 | <i>Tablas</i> | 43 |
| 9 | ABREVIATURAS | 44 |
| 10 | BIBLIOGRAFÍA | 46 |

1 RESUMEN

Una de las aplicaciones más importantes de la cera de abejas se encuentra en la apicultura convencional, donde se emplea como base funcional de los panales artificiales diseñados para mitigar el esfuerzo que implica a las abejas la construcción de nuevas celdillas. Esta cera, conocida habitualmente como cera estampada, se suele obtener en láminas manufacturadas a partir de cera proveniente de panales viejos retirados, que han sido sometidos a diferentes procesos de limpieza. Está demostrado que esos procedimientos no son capaces por ahora de eliminar los posibles residuos de agrotóxicos, en particular los de carácter lipofílico.

Los residuos de compuestos químicos sintéticos se acumulan en esta cera debido a su uso reiterado y al reciclaje de dicha cera, lo que puede producir un potencial riesgo para la colmena. Los compuestos más frecuentemente encontrados están relacionados con los tratamientos de la colmena y son fundamentalmente acaricidas.

Esto hace que sea necesario conocer las concentraciones de esos compuestos en las ceras laminadas que se presentan en el mercado. En este estudio, se ha hecho una selección de ceras estampadas de distintos proveedores incluyendo alguna muestra obtenida gracias a nuevos tratamientos de limpieza basados en el empleo de carbón activo.

Se han seleccionado siete compuestos que suelen citarse en la mayoría de los trabajos publicados al respecto y se han probado distintos modos de aislamiento y posterior determinación por cromatografía en fase gaseosa con detector de espectrometría de masas de cuadrupolo simple. Se ha hecho especial hincapié en el proceso de tratamiento de muestra, tratando de prevenir contaminaciones cruzadas y reducir el efecto matriz. El procedimiento propuesto se ha aplicado al examen de diferentes muestras de ceras estampadas, constatando en algunas de ellas que las cantidades en que se encuentran algunos plaguicidas son sin lugar a dudas muy preocupantes.

2 ABSTRACT

One of the most important applications of beeswaxes lies in the conventional beekeeping, where is used as functional base of the artificial waxcombs designed to reduce the effort made by bees in the construction of new cells. This wax is commonly known as embossed beeswax. It is usually produced using wax from old waxcombs which have been subjected to different cleaning processes in order to create thin manufactured sheets of wax. It has been proved that, for the moment, these processes cannot remove the agrochemical residues, especially the lipophilic ones.

Agrochemical residues are stocked up in beeswax due to the repeated used of them and the recycling of beeswaxes, which creates a potential danger for the hives. The compounds more frequently found in embossed beeswax are the ones related to the treatments of the hives, so they are basically antimites.

It is, therefore, essential to know the amount of some pesticides in the beeswax sheets for sale. For this reason, we have selected beeswaxes from numerous makers, including some samples which had been cleaned using activated charcoal.

We have chosen seven compounds that are usually present in the majority of the research publications on the subject and we have checked different ways of isolation and determination by gas chromatography with single quadrupole mass analyser. We have thoroughly carried out the sample treatment in order to avoid cross-contamination and reduce matrix effect. After having employed the proposed procedure to analyse the selected embossed beeswaxes we can confirm that the amount of pesticides in some of them is really alarming.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 Cera estampada

La cera natural es fabricada en el cuerpo de las abejas obreras y secretada a través de unas glándulas específicas. Está formada por una mezcla de hidrocarburos parafínicos, ácidos grasos libres y esterificados, alcoholes de cadena larga y diésteres, junto con residuos de polen y propóleo (sustancia resinosa que las abejas obtienen de los árboles). La presencia de polen y propóleo es la causante del fuerte color amarillento de la cera natural, ya que sin ellos su aspecto sería blanco.



Figura 1. Propóleo y cera natural respectivamente.

Es un producto natural, sólido y duro a temperatura ambiente, estable químicamente, resistente a la hidrólisis y a la oxidación natural, además de ser insoluble en agua. En el momento de la síntesis es líquida pero al contacto con el aire se solidifica en forma de escamas, permitiendo así que sea moldeada y amasada por las abejas para la elaboración de los panales de las colmenas^[1,2].

Como ya se ha comentado, la principal aplicación de la cera de abeja reside en su uso como base funcional de los panales artificiales diseñados para abejas productoras de miel. Se le denomina cera estampada y se fabrica por fusión de la cera de panales.



Figura 2. Láminas de cera estampada.

Los materiales de partida para la manufactura de la cera son los panales viejos. Los panales viejos y restos de cera se guardan para hacer bloques (cerones) que suelen

purificarse antes de su utilización. La calidad de la cera depende en gran medida del método de producción, que puede ser por fusión o por extracción química. La fusión puede realizarse de diversas formas y a gran escala, mientras que la vía química queda reducida prácticamente a escala de laboratorio.

Los métodos que se suelen utilizar en la manufactura de la cera son:

- Extracción por agua caliente empleando inmersión forzada.
- Extracción con agua hirviendo y posterior prensado.
- Arrastre de vapor y prensado.
- Extracción centrífuga después de tratar con agua hirviendo.
- Fusión en placas metálicas calentadas eléctricamente.
- Filtración bajo presión y centrifugación (la más utilizada industrialmente).

La limpieza de las ceras también es realizada en ocasiones por los propios apicultores o sus asociaciones. Usualmente el tratamiento con agua hirviendo es el que se utiliza, añadiendo a veces compuestos tipo peróxido de hidrógeno o algún ácido fuerte. Después de fundir la cera en el agua, se mantiene a 75-80°C durante bastante tiempo, de modo que comienza a flotar y en la parte inferior quedan las impurezas, por lo que solo debe recogerse la parte superior. Se deja enfriar tan lentamente como sea posible. Los bloques se secan y se almacenan en lugar frío. En ningún caso puede asegurarse que durante el proceso se hayan eliminado los residuos de contaminantes químicos, a excepción de aquellos muy solubles en agua caliente, los menos. Una vez que la cera está limpia y enfriada, se vuelve a realizar el fundido, se homogeniza el líquido y se extiende sobre grandes planchas para dar finas láminas de cera de unos 2 o 3 milímetros de espesor. Las láminas se pueden hacer empleando una laminadora y posterior prensa para delimitar las celdillas, la opción más habitual. Otra posibilidad es fundir la cera y llevarla a troqueles especiales. Este método suele provocar láminas más frágiles, si bien es también muy empleado por los apicultores ^[1,2].



Figura 3. Laminadora y troquel industrial para estampado.

Las láminas quedan impresas con hexágonos de tamaño similar a los que diseñan las abejas en los panales naturales. Estas láminas se colocan en unos marcos de madera que se introducen en la colmena y que las abejas utilizan como base para construir su panal, de forma que tardan mucho menos tiempo en empezar a producir.

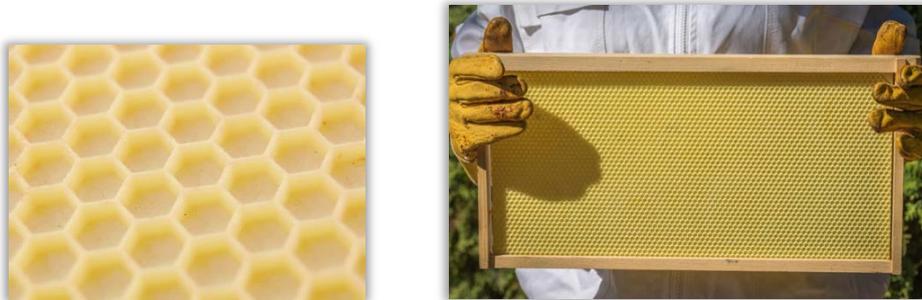


Figura 4. Celdas en cera estampada y lámina de cera enmarcada para panal.

El manejo adecuado de los panales es una parte importante de la práctica apícola [3]. Los panales usados para cría experimentan cambios en diferentes aspectos. El color cambia de amarillo a marrón o incluso negro debido a la acumulación de excrementos de larvas, pieles de pupas y restos de propóleos. Del mismo modo el grosor varía, pudiendo encontrar desde paredes muy finas a muy gruesas, lo que conduce a la producción de abejas más pequeñas. Cada año los apicultores desechan los panales más viejos, estimulando a las abejas a construir nuevos. Para facilitarles la tarea se suelen introducir al menos 3-4 láminas por colmena y se suelen cambiar los panales de cría cada 2-3 años [1-3].



Figura 5. Panal construido sobre láminas de cera estampada.

Por otra parte estos panales también son fuentes de infecciones y pueden contener residuos de contaminantes que tampoco favorecen la cría de las abejas. Los panales viejos contienen menos cera y más proteína y son más rápidamente atacados por las polillas.

Como la cera puede contener residuos de todas aquellas sustancias que tanto la abeja como el apicultor hayan introducido en la colmena, la acumulación de plaguicidas es cada vez superior ya que estos no se degradan en la cera y, por tanto, las contaminaciones se van sumando a lo largo del tiempo. Las concentraciones llegan a ser tales que pueden afectar a la salud y el desarrollo de las colmenas provocando la pérdida de individuos de la colonia.

A pesar de que las ceras son utilizadas en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética, no existe regulación que establezca la concentración de plaguicidas permitida en ellas, mientras que en la miel sí. Sin embargo, la mayor parte de las muestras de cera analizadas contienen numerosos plaguicidas, entre los cuales los más abundantes son el *Cumafós* y el *Fluvalinato* ^[2-5].

3.2 Contaminación e impacto ambiental

Incluso antes del episodio conocido como *Síndrome del Despoblamiento de las Colmenas* (SDC) ya se había constatado por diversos grupos de investigación que la contaminación de la cera provocaba problemas en la perduración de las colmenas. A raíz de la inquietud creciente por la desaparición de los polinizadores se han realizado numerosos estudios en diferentes países tratando de buscar los causantes de ese fenómeno. Una gran parte se dirige a justificarlo por la presencia de residuos de plaguicidas procedentes de los cultivos que visitan las abejas. Más recientemente, se ha señalado como principal causante a los neonicotinoides, y por el contrario, hay menos adeptos a estudiar sinergismos entre plaguicidas y mucho menos los que intentan relacionarlos con patógenos o con las prácticas apícolas. ^[2-7]

Una de las autoridades mundiales sobre el tema el Prof. Bogdanov ^[8,9] ya apuntó hace años y, sigue insistiendo, en los peligros de los residuos de acaricidas en la colmena, señalando que en la usual limpieza de ceras el nivel de residuos final es aproximadamente 1,7 veces más alto que antes de ser fundida y que cuanto más tiempo se hierva para limpiarla más se enriquece la cera en residuos. Estas ideas por la misma época eran reafirmadas por otra de las autoridades en el tema, alertando sobre la presencia excesiva de acaricidas y su implicación en la supervivencia de la colmena ^[10,11].

En un estudio mucho más reciente llevado a cabo también por Bogdanov ^[12] sobre muestras de cera provenientes de Suiza, se advierte sobre la presencia en todas las ceras y mieles de *Paradiclorobenceno*, habitualmente empleado como preservante de las láminas estampadas. Este es un aspecto que también debe ser tenido en cuenta pues muestra que existe una migración desde la cera a la miel y nos avisa sobre la posible presencia de compuestos insospechados, compuestos que en muchas ocasiones han sido retirados del mercado como sucede en Bélgica, donde en las ceras se ha encontrado *Lindano* y *Di-clorodifenildicloroetileno*, insecticidas prohibidos, o

DEET, *Propargita* y *Bromofos* que no se habían detectado hasta ahora. No obstante, los más frecuentes son *Fluvalinato*, *Cumafós* y *Bromopropilato* ^[13].

Esos acaricidas son los mismos detectados en el estudio de Wallner (1999) en ceras alemanas ^[14] contaminadas: al menos el 20% de las muestras nativas y un 58% de las procedentes de otros países, principalmente por *Fluvalinato*. En este mismo estudio se llegó a la conclusión de que solo el quemado total de la cera la limpiaba completamente de los plaguicidas. Sin embargo, se piensa que hay que buscar alternativas menos drásticas.

En otros Países se dan datos igual de preocupantes. Así en Francia ^[15], se indica que un 69% de las muestras de cera están contaminadas, atribuyendo la mayor responsabilidad a los tratamientos de la colmena y apareciendo mayoritariamente *Cumafós*, τ -*Fluvalinato* y *Endosulfan*, si bien también se detectan *Lindano*, *Cipermetrin* y *Deltametrin*. De sus estudios deducen que la longevidad de la abeja adulta se reduce 4 días para aquellas expuestas a residuos en la cera durante su desarrollo y también se señala que cuantos más ciclos sufra la cera más problemas origina y que se incrementa la susceptibilidad al parásito *Nosema* que provoca la *Nosemosis* en las colmenas. Además, un estudio de 2012 ^[16] mostró que las abejas tratadas con *Cumafós* en ausencia del parásito *Varroa* presentan una reducción en la expresión de los genes relacionados con el sistema inmunológico y el desarrollo físico.

En un amplio estudio realizado durante diez años en Italia ^[17] se constata también la presencia masiva de residuos de plaguicidas en las ceras, mayoritariamente acaricidas, en la apicultura ecológica, asegurando que por ahora no es posible dada la presencia inequívoca de esos compuestos provenientes de la contaminación directa (tratamientos químicos) e indirecta (por las abejas). Por ello están solicitando que se dé una moratoria que permita ir reduciendo los compuestos y sus cantidades, sugiriendo un cambio más frecuente de láminas así como que se les obligue a presentar bajos niveles de residuos ^[18].

Así pues queda patente la presencia de residuos en la cera, la transferencia potencial y el movimiento dentro de la colmena, dependiente del producto implicado así como de las características físico-químicas del residuo. La presencia de plaguicidas en la cera implica que nazcan menos abejas, con lo que la acción de los parásitos es más probable, y tienen una vida más corta, con lo que también disminuye la labor procreadora. Al mismo tiempo se contaminan la miel y la nueva cera, que pueden producir daños colaterales desde el punto de vista del uso alimentario de esos productos ^[19].

Se puede afirmar que a nivel mundial hay constancia de que la cera es un reservorio ideal para los residuos de plaguicidas, que la presencia de esos compuestos, y otros a veces no sospechados, incluyendo medicamentos veterinarios, afecta seriamente a la salud y actividad de la colmena. Sería por tanto ideal conseguir que las nuevas láminas

de cera estampada introducidas en la colmena resultasen realmente beneficiosas y no constituyesen un veneno administrado continua y desgraciadamente a veces en cantidades prácticamente letales.

3.3 Plaguicidas analizados

Las colmenas actuales presentan en su mayoría ceras fuertemente contaminadas. Los herbicidas, acaricidas e insecticidas que se utilizan en agricultura y ganadería llegan a las colmenas a través de la polinización. Las abejas recogen polen y néctar contaminados que al llegar a sus colmenas son almacenados. El polen y el néctar se fermentan para ser utilizados como alimento por las abejas ^[2,3]. Al alimentarse, ellas también se contaminan y producen ceras contaminadas. Otros plaguicidas como el τ -*Fluvalinato*, *Cumafós*, *Bromopropilato*, etc. contaminan directamente las colmenas al ser aplicados sobre los panales. Esta situación está produciendo fuertes intoxicaciones que llevan a la muerte de infinidad de individuos ^[7]. Según el último informe de la Plataforma Intergubernamental sobre Biodiversidad y Servicios de los Ecosistemas (IPBES), en Europa el 37% de las poblaciones de abejas ha mermado hasta encontrarse en peligro de desaparición y el 40% de los polinizadores invertebrados, en particular abejas y mariposas, se enfrentan a la extinción ^[20].

Se piensa que la principal fuente de contaminación en las abejas de especie *Apis mellifera* y *Apis cerana* son los acaricidas utilizados para prevenir y controlar el parásito *Varroa destructor*, un ácaro que cuando aparece en una colmena puede acabar con toda la colonia. El parásito se alimenta de la hemolinfa (líquido análogo a la sangre en los invertebrados) de la abeja provocando deformaciones en su cuerpo y debilitándola hasta que ya no puede realizar su trabajo y termina muriendo. Como consecuencia, este tipo de plaguicidas son necesarios en la producción apícola para garantizar la subsistencia de las colmenas y asegurar la producción, por ello son utilizados a pesar de los perjuicios que suponen a largo plazo para las abejas.



Figura 6. El parásito *Varroa destructor* en el cuerpo de una abeja.

Para prevenir y controlar los riesgos que sufren estos insectos, es necesario realizar análisis de los productos apícolas, determinar los plaguicidas que presentan y en qué cantidades. Se pueden aplicar dichos ensayos a pólenes, ceras, mieles, jaleas e incluso a las propias abejas. La determinación de los residuos de agrotóxicos puede dar una idea del riesgo potencial al que se exponen las abejas y, al mismo tiempo, de la calidad medioambiental del paraje en que se encuentran, ya que las abejas recorren unos 7 km² en torno a la colmena al realizar la recolección del polen y el néctar ^[2,7,21].

Después de la revisión bibliográfica y teniendo en cuenta las peculiaridades de la apicultura española, se han seleccionado en una primera etapa unos compuestos que en principio pueden ser los más habituales y se presupone que puedan aparecer en cantidades más elevadas y por ello tengan mayor incidencia en la vida de la colmena.

Por otra parte se ha acudido a distintas ferias apícolas para conseguir láminas de cera de distintos proveedores, la mayoría emplean el tratamiento clásico de preparación de cera con agua a elevada temperatura y presión. No obstante, se han conseguido también otras láminas mucho más blancas obtenidas según parece del tratamiento con carbón activo y que, en principio, se comercializan como “sin residuos”.

Se presentan a continuación los siete plaguicidas que se han escogido para este estudio en base a su uso generalizado:

✓ Atrazina

La *Atrazina* es un herbicida de fórmula molecular 2-cloro-4-(etilamina)-6-(isopropilamina)-1,3,5-triazina utilizado para controlar el crecimiento de malas hierbas en la agricultura. Se presenta como un polvo blanco muy fino y está clasificado como peligroso para el medio ambiente y mortal para ciertas especies como algunos organismos acuáticos e insectos. A pesar de que no se acumula en la cadena alimentaria, la exposición a corta duración en seres humanos puede provocar enrojecimientos en la piel y los ojos, mientras que a larga duración los efectos son más severos, llegando a producir dermatitis e incluso problemas en el sistema nervioso central, el hígado y el riñón. Por estas razones, actualmente su utilización y venta está prohibida en toda la Unión Europea, sin embargo, sigue permitida aún en Estados Unidos y el continente oceánico ^[22,23].

✓ Bromopropilato

El *Bromopropilato* es un plaguicida de muy elevada toxicidad utilizado para combatir fundamentalmente los ácaros de la fruta especialmente en los cítricos, las uvas y las fresas, aunque también se usa para otros cultivos como la caña de azúcar, el té o el algodón. En nomenclatura orgánica su nombre es isopropil 4,4'-dibromobencilato y su estado natural es en forma de cristales blancos. Actualmente está prohibido en toda la

UE y América pero debido a que presenta una elevada persistencia en suelos, agua, y otras matrices, aún se pueden encontrar residuos en la naturaleza ^[2,22].

✓ Clorfenvinfos

El *Clorfenvinfos*, 2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etenil dietil fosfato, es un herbicida e insecticida organofosforado líquido y de color naranja que presenta un fuerte olor característico. Se utiliza mayormente en el tratamiento de cereales, arroz, azúcar y semillas y para combatir mosquitos palúdicos. Provoca la muerte de insectos y organismos acuáticos en determinados ecosistemas, afectando incluso a los animales que se alimentan de ellos. Es fuertemente tóxico debido a su capacidad para interferir en la transmisión de impulsos nerviosos, provocando la parálisis del cerebro y la muerte incluso en seres humanos, por lo que la exposición prolongada es altamente peligrosa. Como consecuencia, está prohibido y obsoleto en toda la UE, sin embargo, en lugares como Australia, Sudáfrica, Kenia, Centroamérica y Sudamérica su uso aún está generalizado ^[2,4,22,23].

✓ Clorpyrifos

El *Clorpyrifos* es otro plaguicida organofosforado de nombre químico O, O-dietil O-3,5,6-trichloropyridin-2-il fosforotioato que al igual que el *Clorfenvinfos* provoca la paralización de los impulsos nerviosos en el ser humano llegando a producir la muerte cuando uno se expone a elevadas concentraciones. Sin embargo, la exposición en pequeñas dosis no supone daño aparente para la salud humana. Es un sólido cristalino con olor penetrante, insoluble en agua pero soluble en disolventes orgánicos. Permite combatir plagas de insectos, parásitos del ganado y microorganismos patógenos en cultivos. Es insoluble en agua, aunque esto no evita que sea muy tóxico para los organismos acuáticos, insectos y algunas especies de aves. Está permitido en la mayoría de los países de la UE y en general a nivel mundial ^[22,23].

✓ Cumafós

El *Cumafós* o *Asuntol* es un insecticida de nombre 3-cloro-7-dietoxifosfinotioiloxi-4-metil-2-cromenona que se utiliza para repeler de una amplia variedad de insectos y parásitos en ganadería, entre los que se encuentran los piojos y garrapatas, las larvas y lombrices y la escabiosis. Es un sólido cristalino de color marrón claro, estable y persistente en el medio ambiente. Es altamente tóxico y peligroso para el ser humano cuando se experimentan exposiciones prolongadas a elevadas concentraciones, ya que puede causar convulsiones, incontinencia, pérdida del conocimiento, crisis nerviosas y crisis respiratorias. Sin embargo, actualmente sigue está permitido a nivel mundial excepto en Australia ^[2,4,22,23].

✓ Endosulfán

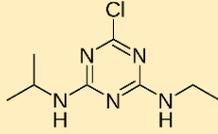
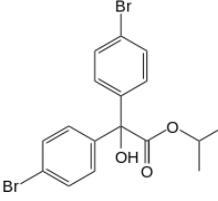
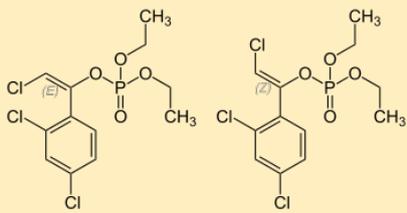
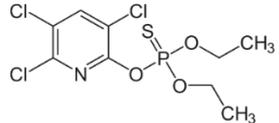
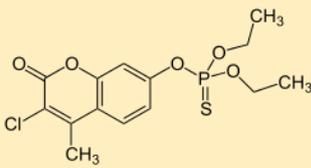
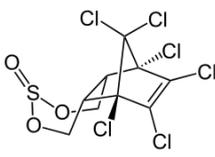
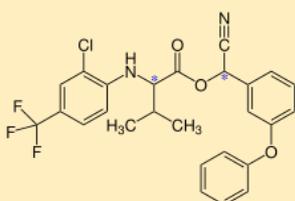
El *Endosulfan* es un compuesto organoclorado que se utiliza como insecticida y acaricida en las cosechas. Su estructura química presenta dos posibles isómeros: alfa, que es el que se analiza en este trabajo, y beta. Ambos isómeros son sólidos cristalinos de color marrón que no se pueden disolver en agua pero sí en disolventes orgánicos. Resulta tóxico para todas las formas de vida como consecuencia de su difícil degradación, que provoca su acumulación en los tejidos grasos de los animales, en especial en el ganado, los insectos y algunos organismos acuáticos. En los seres humanos, la exposición prolongada a elevadas concentraciones de *Endosulfán* puede provocar alteraciones graves en el cerebro, la sangre, el sistema circulatorio, el sistema inmunológico, el sistema reproductivo, los pulmones, el hígado, los riñones y los ojos. Por ello, el endosulfán está prohibido en toda la UE, sin embargo, en otros continentes aún se permite su utilización ^[22,23].

✓ Fluvalinato

El *Fluvalinato* es el plaguicida más ampliamente utilizado para eliminar el ácaro *Varroa destructor* en colmenas con el fin de garantizar la subsistencia de las abejas y asegurar la producción. Presenta también otras aplicaciones como insecticida en cultivos de cereales, patatas, frutas o algodón para eliminar el pulgón, las arañas, las cigarras o las orugas que provocan enfermedades en las hojas.

Aunque el *Fluvalinato* presenta cuatro estereoisómeros, actualmente los productos comerciales solo presentan los dos isómeros R, denominados τ -*Fluvalinato*. Esto se debe a que la mezcla isomérica está prohibida a nivel mundial debido a los elevados efectos adversos que provoca: elevadas contaminaciones de suelos y aguas, prolongada persistencia, problemas en el riñón y el hígado, en el sistema endocrino, inhibición de la progesterona, defectos en el desarrollo y la reproducción e irritaciones severas de los ojos y la piel. El τ -*Fluvalinato* está aprobado en toda la UE y en otras partes del mundo y su uso es habitual incluso en países tercermundistas. Los problemas que puede generar en el ser humano son mucho más leves ya que únicamente provoca irritaciones en la piel y es potencialmente dañino para el hígado y el riñón. Su utilización prolongada en la producción apícola hace que este se vaya acumulando en los productos de la colmena, incluyendo en el cuerpo de las propias abejas, aunque se ha comprobado que las abejas presentan fenómenos de resistencia al τ -*Fluvalinato* ^[2,4,22-26].

Tabla 1. Pesticidas analizados: nombre, familia, función y estructura química.

| Nombre | Familia | Función | Compuesto |
|----------------------|------------------|-------------------------|---|
| Atrazina | Triazinas | Herbicida |  |
| Bromopropilato | Bencilatos | Acaricida |  |
| Clorfenvinfos | Organofosforados | Insecticida |  |
| Clorpyrifos | Organofosforados | Insecticida y acaricida |  |
| Cumafós | Organofosforados | Insecticida y acaricida |  |
| α -Endosulfán | Organoclorados | Insecticida y acaricida |  |
| τ -Fluvalinato | Piretroides | Insecticida y acaricida |  |

3.4 Antecedentes bibliográficos analíticos

Muchos han sido los estudios que se han publicado en los últimos 15 años acerca de la determinación cuantitativa de plaguicidas en cera de abeja. Por ello, se cuenta con una amplia bibliografía para guiar este estudio y se comentan a continuación los datos más interesantes sobre el tema.

En primer lugar, cabe destacar que a la hora de realizar la extracción de plaguicidas en las ceras, se emplean siempre disolventes orgánicos, mezclas de disolventes orgánicos o mezclas con agua en proporciones variables.

En cuanto a los métodos de preparación de muestra se han encontrado variaciones significativas. Algunos recurren al hexano (capaz de disolver la cera) para obtener una única fase con ella ^[17,24] y realizan posteriormente extracciones distintas, en algunos casos una extracción sólido-líquido con tierra de diatomeas ^[17], en otros una extracción líquido-líquido utilizando otros disolventes orgánicos inmiscibles con el hexano ^[24]. Otra posibilidad es realizar la extracción sin que la cera se haya disuelto en el disolvente sino simplemente por fusión y extracción en dos fases. En este caso se pueden realizar también extracciones distintas, ya sean líquido-líquido utilizando variados aparatos de agitación o baño de ultrasonidos ^[25] o bien también utilizando tierra de diatomeas ^[18]. Posteriormente, lo más habitual en todos ellos es realizar una concentración a sequedad y reconstituir la muestra, lista ya para su análisis ^[17,18,24,25].

Sin embargo, aunque alguno de esos estudios asegura que su método de extracción proporcionaba recuperaciones mejores y más uniformes que el QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, y Safe) para todos los componentes de la cera permitiendo alcanzar muy bajos límites de cuantificación, el método QuEChERS es el método de preparación de muestra que proporciona en general mejores resultados en el ámbito de los plaguicidas en cera (recuperaciones entre 76 y el 102 %) ^[26-28].

El método original QuEChERS fue diseñado por Michelangelo Anastessiadis ^[26] y se realiza utilizando una extracción en fase sólida consistente en los siguientes pasos:

Una primera etapa de preparación y extracción de la muestra, en la que se funde y homogeniza el producto, se añade acetonitrilo (ACN) como solvente de extracción; pudiéndose también añadir sales (como $MgSO_4$), ácidos y tampones para mejorar la eficacia de la extracción, y para proteger los posibles compuestos sensibles. Algunos estudios en los que se han realizado variaciones al método QuEChERS han usado disolventes muy apolares en mezclas con otros disolventes orgánicos o agua ^[25,27].

Una segunda etapa consistente en la limpieza de la muestra o clean up, en la que una alícuota del extracto se purifica de forma exhaustiva agregando sorbentes de limpieza que se encargan de retener componentes de la matriz que pueden crear interferencias en el análisis o picos indeseados en el cromatograma. Según la bibliografía, los sorbentes más eficaces para este fin son el PSA (amina primaria y secundaria) y el C_{18}

(octadecilsilano). El PSA retiene los ácidos grasos, azúcares y ácidos orgánicos presentes en la matriz de la cera, mientras que el C₁₈, retiene otros lípidos y esteroides que se encuentren en la matriz e interfieren con los analitos^[25,26]. Algunos estudios en lugar de utilizar PSA y C₁₈ utilizan sorbentes como el Florisil^[29] o bien el Dióxido de zirconio^[27].

Como técnicas analíticas, las más utilizadas han sido la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)^[13,27,28,30-32] y la cromatografía de gases (GC)^[9-12,14,15,17,18,24,26,28-30,33,37-39]. A partir de esta bibliografía se ha podido llegar a la conclusión de que el hecho de que la GC presente una fase móvil inerte favorece la obtención de mejores resultados ya que no existe posibilidad de que dicha fase móvil interactúe con los analitos.

Entre los detectores encontrados predominan la espectrometría de masas, ya sea simple^[18,26,32-34] o en tándem^[9,12,13,15,17,28,30] y ya sea de cuadrupolo simple^[15,18,30,33,34] o de triple cuadrupolo (QqQ)^[9,17,31]. El segundo detector más utilizado en este ámbito es el detector de captura electrónica (ECD), utilizado también en varios artículos^[9,12,17,37]. El detector de nitrógeno fósforo también se puede aplicar a los análisis de pesticidas siempre y cuando los únicos pesticidas que se pretendan detectar aquellos que posean nitrógeno o fósforo^[39]. Por último, en algunas publicaciones se ha encontrado como detector el espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (TOF)^[28,30] u otros desfasados para esta aplicación en publicaciones más antiguas, como el detector de ionización de llama (FID)^[10,11,14]. No se han encontrado publicaciones en que se utilice como detector el detector de diodos alineados (DAD) en la matriz de la cera, pero sí para diferentes análisis en otras matrices apícolas como las mieles o el polen^[40,41]. Por otro lado, son habituales las combinaciones de diferentes detectores, como por ejemplo los acoples GC-ECD/MS, GC-MS/ECD, GC-ECD/NPD/MS, GC-ECD/NPD^[29,35,36,39].

Las columnas utilizadas en el análisis de plaguicidas en cera de abeja pueden ser tanto columnas empaquetadas como capilares. Antiguamente las más utilizadas para este fin eran las empaquetadas, pero a día de hoy las columnas capilares son las que presentan mayor auge en el análisis de residuos de agrotóxicos^[37]. Se ha constatado según la bibliografía que las columnas capilares presentan mayor eficacia y reproducibilidad para este fin^[28,29]. Los rellenos que presentan estas columnas como fase estacionaria son muy variados pero son mayormente fases estacionarias y columnas diseñadas específicamente para el análisis de plaguicidas^[29,42]. De la misma manera, los disolventes utilizados durante el proceso de preparación de muestra son de calidad para análisis de residuos.

En base a la bibliografía consultada sobre la determinación de plaguicidas en cera de abeja, se sacaron diversas conclusiones sobre el método y la instrumentación con que llevar a cabo este estudio. El primer método aplicado es un método optimizado

previamente por el grupo de investigación TESEA de la Universidad de Valladolid. Está basado en un método QuEChERS ^[26] modificado al que se han aplicado ciertas variaciones encontradas en algunas publicaciones ^[27] y otras variaciones establecidas por el grupo de investigación TESEA. Además, se ha diseñado otro método alternativo basado también en el QuEChERS ^[26] y en el cual no se realiza la etapa de concentración a sequedad, lo que hace que se puedan preparar las muestras en un periodo de tiempo menor ^[28]. En cuanto a la instrumentación, la técnica de análisis elegida fue la cromatografía de gases acoplada a un detector de espectrometría de masas de cuadrupolo simple e impacto electrónico (GC-MS(EI)).

4 OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

✓ OBJETIVOS

El objetivo principal para de este trabajo de fin de grado es la determinación y cuantificación de siete plaguicidas en ceras estampadas provenientes de distintos fabricantes y utilizando como técnica analítica la cromatografía de gases aplicada a espectrometría de masas.

✓ PLAN DE TRABAJO

El plan de trabajo seguido ha sido el siguiente:

1. Consulta de bibliografía relacionada con la determinación de plaguicidas en productos apícolas, en concreto ceras, con el fin de obtener conocimientos sobre el tema de estudio y seleccionar aquellas ideas que resulten útiles para la realización experimental del trabajo.
2. Comprensión y aprendizaje del manejo del equipo cromatográfico GC-MS así como de la técnica analítica.
3. Aprendizaje y aplicación de método analítico seleccionado para la extracción y preparación de muestra utilizando ceras purificadas.
4. Caracterización de los distintos plaguicidas en los cromatogramas obtenidos.
5. Aprendizaje y aplicación de un método alternativo de preparación de muestra utilizando ceras purificadas.
6. Preparación de patrones de distintas concentraciones para obtener las correspondientes líneas de calibrado en matriz.
7. Optimización de ciertas condiciones de extracción.
8. Determinación de los porcentajes de recuperación y efecto matriz en ambos métodos para establecer cuál permite realizar una mejor extracción proporcionando mejores resultados.
9. Preparación y análisis de muestras reales por el método de extracción seleccionado como más eficiente.
10. Cuantificación de los plaguicidas presentes en las muestras preparadas.

5 INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS

5.1 Equipo de análisis

El equipo utilizado para la separación de los plaguicidas es un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies series 7890 A*. Presenta:

- una bandeja de muestras *Agilent Technologies G 2614 A* con capacidad para 100 viales.
- un inyector automático *Agilent Technologies 7683 B Series* formado por una jeringa de vidrio que puede recoger fracciones de muestra de hasta 5 μL .
- un controlador de la temperatura del portal de inyección, la zona donde se produce la volatilización de la muestra, y donde se puede trabajar en modo split o splitless.
- un horno temperatura programable que permite establecer una rampa de temperaturas y en cuyo interior se encuentra la columna.
- una columna capilar *Agilent J&W DB-5MS* y dimensiones 30m x 250 μm x 0,25 μm de *Agilent Technologies*.
- un contenedor externo en cuyo interior se encuentra el gas que actúa como fase móvil y que presenta un regulador de flujo de entrada al cromatógrafo.
- un sistema de vacío PREIFFER VACUUM.



Figura 7. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies series 7890 A* acoplado a detector de espectrometría de masas *Agilent Technologies 5975 C*.

Para la detección de los plaguicidas, el cromatógrafo está acoplado a un detector de espectrometría de masas *Agilent Technologies 5975 C (inert XL EI/CI MSD)* con analizador de cuadrupolo simple y fuente de ionización por impacto electrónico.

Tanto el cromatógrafo como el detector son controlados desde el ordenador gracias a los softwares *Agilent MassHunter* y *Quantitative MassHunter* respectivamente.

5.2 Equipos adicionales

- Balanza analítica AE-240 de Mettler Toledo.
- Agitador vórtex Heidolph REAX Control de Thermo Fischer Scientific.
- Agitador oscilante Vibromatic de JP Selecta.
- Baño de ultrasonidos H-D de JP Selecta.
- Baño de agua Precis-Term de JP Selecta.
- Ultracentrífuga 5810R de Eppendorf.
- Rotavapor R-3 de BÜCHI.



Figura 8. Rotavapor R-3 de BÜCHI.

- Bomba de vacío de Vacuubrand.
- Estufa de sacado de Heraeus.
- Frigorífico/nevera de FAIRLINE.
- Destilador de agua Milli-Q + ELIX de Milipore.

5.3 Otros instrumentos y materiales

- Micropipetas:
 - Transferpette S de 100 μ L y 1000 μ L de BRAND.
 - Transferpette S de 0,5 a 5 mL de BRAND.
 - FINNPIPETTE de 100 a 1000 μ L de Thermo Electron Corporation.
 - AccumaxPRO de 100 a 1000 μ L de Drifton.
 - LabMate de 20 a 200 μ L de HTL.



Figura 9. Todas las micropipetas utilizadas.

- Puntas de micropipeta de Agilent Technologies.
- Tubos de polipropileno para centrífuga:
 - de 50 mL de CELLSTAR TUBES.
 - de 15 mL de AUXILAB S.L.
- Jeringas de 5mL de BD Plastipak.
- Filtros de Nylon Hidrofílico (13,0 mm de diámetro de filtro y 0,45 μ m de diámetro de poro).
- Material de laboratorio de uso general: Tubos de ensayo, matraces aforados, probetas, vasos de precipitados, zapatillas, viales y tapones, espátulas, frascos lavadores, pipetas de vidrio y de plástico, gradillas, etc.

5.4 Reactivos y disolventes

- Patrones de los siete pesticidas para la preparación de las líneas de calibrado y el dopaje de muestras:
 - *Atrazina* 99% PESTANAL® de Riedel-de Haën.
 - *Bromopropilato* PESTANAL® de SIGMA-ALDRICH.
 - *Chlorfenvinfos* PESTANAL® de SIGMA-ALDRICH.
 - *Chlorpyrifos* PESTANAL® de SIGMA-ALDRICH.
 - *Coumaphos* PESTANAL® de SIGMA-ALDRICH.
 - α -*Endosulfán* 99% PESTANAL® de Riedel-de Haën.
 - *Fluvalinato* PESTANAL® de SIGMA-ALDRICH.
- Patrón interno PCB nº 153 del 98,8% de Dr. Ehrenstorfer.
- Discovery DSC-18 de SUPELCO.
- PSA Sílica de SUPELCO.
- Acetonitrilo PESTI-PUR de CARLO HERBA Reagents.
- Acetato de Etilo PESTI-PUR de CARLO HERBA Reagents.
- Ciclohexano PESTI-PUR de CARLO HERBA Reagents.
- Ácido Fórmico $\geq 98\%$ de SIGMA-ALDRICH.
- Metanol HiperSolv CHROMANORM de VWR Chemicals.
- Acetona pura de CARLO HERBA Reagents.
- Agua Ultrapura.

5.5 Disoluciones

- Disoluciones patrón de ≈ 1000 ppm de los siete pesticidas en ACN, ACN:H₂O y AcOEt:C₆H₁₂ preparadas por pesada de una cantidad de 10 mg de pesticida llevados a un matraz de 10 mL con cada disolvente.
- Disoluciones mezcla de ≈ 100 ppm en ACN, ACN:H₂O y AcOEt:C₆H₁₂ preparadas mezclando 1 mL de disolución de ≈ 1000 ppm de cada pesticida y enrasando a 1 mL con el disolvente oportuno.
- Disoluciones patrón de concentraciones de aproximadamente 10 ppm, 5 ppm, 2,5 ppm, 1 ppm y 0,5 ppm en ACN, ACN:H₂O y AcOEt:C₆H₁₂ preparadas a partir de la mezcla patrón de ≈ 100 ppm realizando sucesivas diluciones.



Figura 10. Diversas disoluciones patrón utilizadas para llevar a cabo el estudio.

- Disoluciones del patrón interno PCB nº 153 en ACN y AcOEt:C₆H₁₂ de concentración 790 ppm. Preparadas por pesada de una cantidad exacta de 7,9 mg de PCB 153 envasados en un matraz de 10 mL con cada disolvente.
- Diluciones sucesivas del patrón interno PCB nº 153 en ACN y AcOEt:C₆H₁₂ de concentraciones 7,9 ppm y 0,79 ppm.
- Mezcla ACN:H₂O (80:20 v/v).
- Mezcla AcOEt:C₆H₁₂ (80:20 v/v).
- Mezcla Ácido Fórmico:Metanol (50:50 v/v).

6 PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Condiciones del análisis

6.1.1 Condiciones del cromatógrafo

Las condiciones se seleccionaron en base a la bibliografía consultada y fueron las siguientes:

- se seleccionó una columna capilar de reparto *Agilent J&W DB-5MS* de dimensiones: 30 m de largo, 250 μm de diámetro, 0,25 μm de diámetro de poro. La columna está rellena con una fase estacionaria de sílice al 5% de fenilmetilpolisiloxano, un tipo de columna óptimo para el análisis de pesticidas proporcionando picos mejor definidos de los analitos.
- se estableció un volumen de inyección de 1 μL .
- como gas portador se utilizó el Helio con un flujo de 1,2 mL/min.
- la inyección se realizó en modo splitless.
- volumen de inyección de muestra: 1 μL .
- temperatura del portal de inyección: 280 °C.
- gradiente térmico de dos rampas de temperatura de los 60 a los 310 °C.

Tabla 2. Rampa de temperaturas utilizadas.

| | Pendiente (°C/min) | Temperatura (°C) | Tiempo estable (min) | Tiempo de análisis (min) |
|---------------------|-------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| Inicialmente | - | 60 | 1 | 1 |
| Rampa 1 | 40 | 170 | 0 | 3,75 |
| Rampa 2 | 10 | 310 | 3 | 20,75 |

6.1.2 Condiciones del detector

Como detector acoplado al cromatógrafo de gases se utilizó un espectrómetro de masas de cuadrupolo simple cuya fuente de ionización era de impacto electrónico (EI), es decir, que proporcionaba los iones positivos asociados a la división de los analitos. El espectrómetro fue configurado con una temperatura de la fuente de 230°C y una temperatura del cuadrupolo de 150°C. Los iones característicos de cada plaguicida fueron tomados de investigaciones previas del grupo TESEA.

Para cada plaguicida se utilizan tres iones de relación masa-carga (m/z) distinta, el mayoritario para la cuantificación de cada analito en modo *SIM* y dos minoritarios para la confirmación en modo *SCAN* y apoyándonos también en la biblioteca del NIST (Instituto nacional de estándares y tecnología).

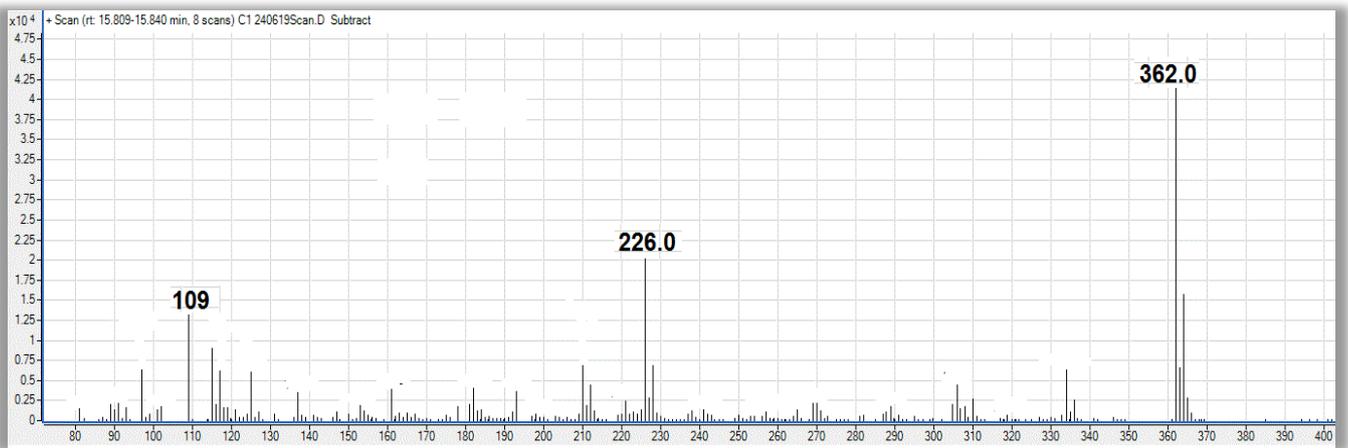


Figura 11. Espectro de masas del Coumaphos en que se observan los tres iones de m/z distinta.

A continuación se muestra un cromatograma con todos los picos de interés relativos a los plaguicidas, y una tabla en la que se indican los iones, pesos moleculares y tiempos de retención para cada uno de ellos.

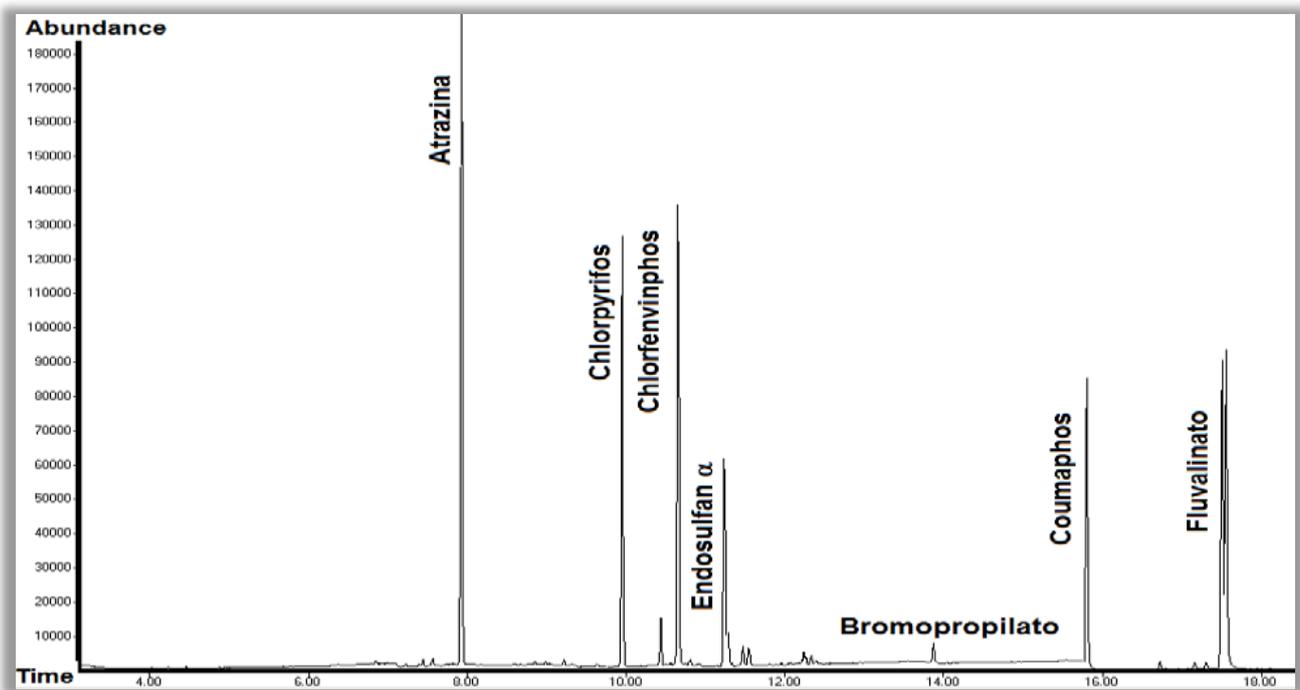


Figura 12. Cromatograma en modo SIM de los siete plaguicidas. Permite identificar el tiempo de retención de cada uno de ellos.

Tabla 3. Información de interés sobre los plaguicidas.

| Compuesto | PM (g/mol) | t_R (min) | m/z cuantificador | m/z de confirmación |
|-----------------------|-------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Atrazina | 215,09 | 7,81 | 200 | 215, 173 |
| Clorpirifos | 321 | 9,72 | 197 | 315, 258 |
| Clorfenvinfos | 359,57 | 10,47 | 267 | 329, 270 |
| α-Endosulfán | 403,82 | 11,2 | 241 | 195, 207 |
| Bromopropilato | 425,95 | 13,82 | 345 | 185, 183 |
| Cumafós | 362 | 15,62 | 362 | 226, 109 |
| T-Fluvalinato | 502,15 | 17,39 | 250 | 207, 181 |
| PCB 153 | 360,87 | 12,5 | 360 | - |

6.2 Preparación de patrones

6.2.1 Líneas de calibrado

Para poder realizar la cuantificación de los plaguicidas fue necesario preparar una serie de patrones en un amplio intervalo de concentraciones, de forma que permitieran obtener las líneas de calibrado.

Todo ello se hizo preparando una disolución patrón de cada plaguicida de aproximadamente 1000 ppm en ACN y AcOEt:C₆H₁₂. Estas se prepararon por pesada de una cantidad de unos 10 mg de plaguicida llevados a un matraz de 10 mL con cada disolvente. A partir de ellas se preparó una disolución mezcla de todos los plaguicidas en ACN, ACN:H₂O y AcOEt:C₆H₁₂, mezclando 1 mL de las disoluciones de 1000 ppm de cada plaguicida y enrasando a 1 mL con el disolvente oportuno. De esta forma la mezcla tenía aprox. 100 ppm de cada plaguicida. A partir de ella, se llevaron a cabo sucesivas diluciones para obtener los patrones de 10 ppm, 5 ppm, 2,5 ppm, 1 ppm y 0,5 ppm en ACN y AcOEt:C₆H₁₂ que se utilizarían para las líneas de calibrado definitivas.

Para la poder realizar la cuantificación se utilizó el método del patrón interno, de forma que nos permitiera compensar errores aleatorios y sistemáticos como interferencias no espectrales de componentes de la matriz, fluctuaciones debidas al método o a errores instrumentales. El patrón interno seleccionado fue el PCB 153, seleccionado debido a su alta estabilidad y a que su tiempo de retención no interfiere con ninguno de los analitos.

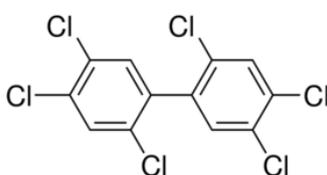


Figura 13. Estructura química del PCB 153.

Se prepararon sendas disoluciones de PCB 153 en ACN y AcOEt:C₆H₁₂ por pesada de una cantidad exacta de 7,9 mg de PCB 153 enrasados en un matraz de 10 mL con cada disolvente, de forma que se obtuvo una concentración de 790 ppm en cada caso. A partir de ella, se realizaron sucesivas diluciones para obtener los patrones de 7,9 ppm y 0,79 ppm necesarios para dopar las muestras.

Posteriormente, se inyectaron los patrones para comprobar si las diluciones habían sido bien preparadas y si se cumplía la linealidad en las líneas de calibrado. Una vez comprobado, se llevó a cabo un calibrado en matriz, es decir, un calibrado dopando una cera blanca purificada y realizando un tratamiento de muestra equivalente al que se realizaría después con las muestras. En este caso, se añadió patrón interno PCB a los patrones en matriz, para poder obtener líneas de calibrado.

En las líneas de calibrado de cada plaguicida se representó la relación de áreas entre el analito y el patrón interno (A_i/A_p) frente a la concentración, junto con el ajuste por mínimos cuadrados.

Tabla 4. Pendiente, ordenada y el coeficiente de variación en el origen de la línea de calibrado correspondiente a cada plaguicida.

| | Ecuación de la recta | | |
|---------------------------------------|-----------------------------|-----------------|--------|
| | <i>Pendiente</i> | <i>Ordenada</i> | R^2 |
| Atrazina | 17,57 | 2,54 | 0,9976 |
| Clorpirifos | 12,12 | 0,5 | 0,997 |
| Clorfenvinfos | 28,67 | -1,9 | 0,9993 |
| α-Endosulfán | 2,82 | -0,54 | 0,9961 |
| Bromopropilato | 0,16 | -0,01 | 0,9986 |
| Cumafós | 19,75 | 4,09 | 0,9983 |
| τ-Fluvalinato | 56,96 | 5,07 | 0,9993 |

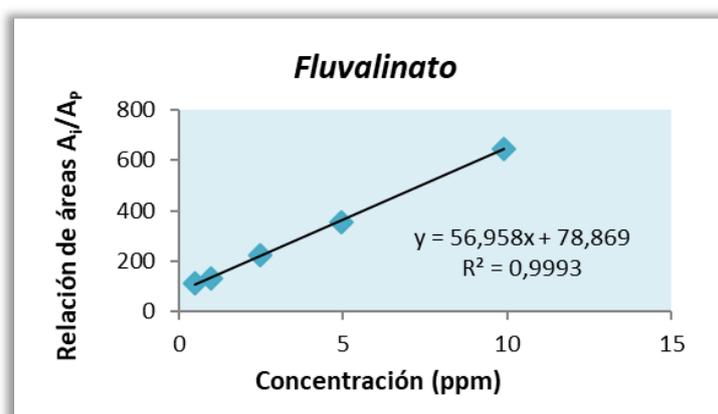


Figura 14. Línea de calibrado en matriz para el patrón de Fluvalinato.

6.3 *Análisis de pesticidas*

6.3.1 *Preparación de muestras*

Para la preparación de muestra se estudió la bibliografía disponible con el fin de encontrar un método de extracción y preparación de muestra que proporcionase buenos resultados. Se encontraron así dos métodos interesantes variantes del método QuEChERS: a uno de los métodos se le llamó “Método QuEChERS concentrado” [26,27], debido a que presenta una etapa de concentración a sequedad, mientras que al otro “Método QuEChERS simplificado” [26,28], ya que después de la extracción de los pesticidas la preparación de muestra es muy sencilla y apenas requiere tratamiento. Cada muestra se analizó realizando los dos métodos de preparación de muestra seleccionados, ambos se diseñaron con una extracción líquido-líquido inicial seguida de una extracción en fase sólida. Posteriormente, el tratamiento de la muestra fue distinto en cada caso.

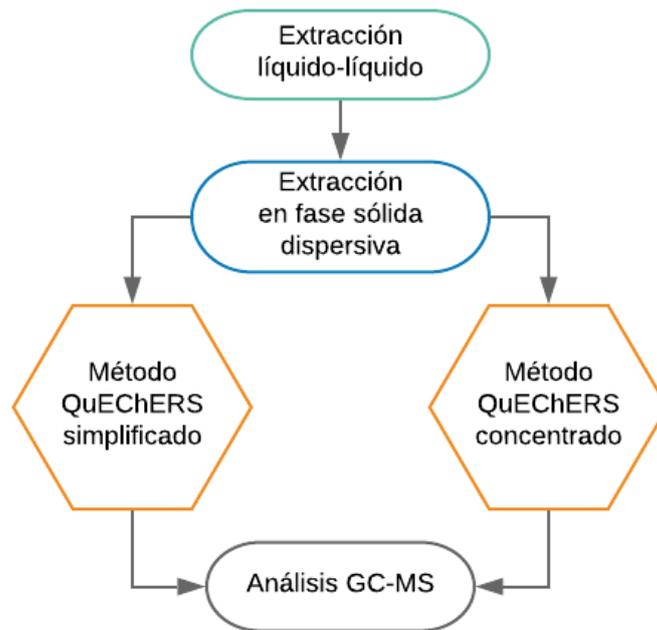


Figura 15. Esquema sencillo de la descripción que se va a dar a continuación sobre los métodos realizados.

✓ *PRETRATAMIENTO Y EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO*

Para la preparación de las muestras los pasos fueron los siguientes:

1. Se pesaron 2 g de de cera en un tubo de polipropileno de 50 mL para centrífuga.
2. Se fundió la cera en un baño de agua a 70 °C.
3. Una vez fundida la cera, se añadieron 10 mL de ACN o ACN:H₂O en función del extractante que se haya seleccionado.

4. Se dejó fundir de nuevo la cera que había precipitado.
5. Se agitó con agitador Vórtex: cinco veces durante 30 segundos a 1000 rpm dejando un tiempo entre la agitación de cada tubo para que volviera a fundirse la cera que hubiera precipitado.
6. Se dejó temperar a temperatura ambiente.
7. Se introdujo en frigorífico durante 2 horas para que precipitase toda la cera.
8. Se sacó del frigorífico pasadas las dos horas.
9. Se centrifugó durante 10 minutos a 1000rpm y 5°C.
10. Se decantó el líquido sobrenadante en un tubo de ensayo.

Partiendo de un estudio realizado previamente por el equipo de investigación TESEA, se realizó inicialmente la extracción con mezcla ACN:H₂O (v/v 80:20). Sin embargo, más adelante se decidió realizarla únicamente con ACN.

A partir del líquido sobrenadante recogido en el tubo de ensayo se realizaron las dos preparaciones de muestra distintas.

✓ *EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DISPERSIVA (SPL)*

Para llevar a cabo la preparación de muestra según el “Método QuEChERS concentrado” se tomaron 5 mL de extractante del tubo de ensayo. Estos 5 mL se introdujeron en un tubo de polipropileno para centrifuga de 50 mL en el que previamente se habían pesado 50 mg/mL de los sorbentes PSA y C₁₈, que se encargaban de retener los ácidos grasos de la cera y otros productos polares con el fin de que al llevar a cabo la separación y detección se obtuvieran un cromatograma más limpio y en el que se reducían el número de picos indeseados ^[26,27]. En el caso del “Método QuEChERS simplificado” se tomaron únicamente 2 mL en un tubo de polipropileno de 15 mL en el que previamente se había pesado 25 mg/mL de los sorbentes PSA y C₁₈ ^[26,28]. En el caso de este segundo método se realizaron pruebas variando la concentración de PSA y C₁₈ para comprobar si aumentar o disminuir la cantidad mejoraba en algo los resultados obtenidos.

Posteriormente, en ambos casos los tubos se llevaron a agitación en un agitador oscilante Vibromatic durante 10 minutos y, después, se centrifugaron durante otros 10 minutos a 1000 rpm y 5 °C.

✓ *“MÉTODO QuEChERS CONCENTRADO”*

El sobrenadante correspondiente al “Método QuEChERS concentrado” se decantó en un balón de vidrio y se llevó a sequedad a 60 °C en el rotavapor. Después de la evaporación total del disolvente, se retiró el balón del rotavapor y se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de realizar la reconstitución con 1mL de mezcla AcOEt:C₆H₁₂ y 100 µL de disolución 0,79 ppm de PCB 153 en AcOEt:C₆H₁₂. El líquido obtenido se introdujo en un vial de muestra para el análisis. Si después de la

reconstitución con ultrasonidos el líquido tenía una elevada cantidad de residuo de PSA y C₁₈, se utilizaba una jeringa con filtro de membrana de nylon para introducir el líquido limpio en el vial de análisis. De esta forma quedaba preparada la muestra y lista para inyectar ^[26,27].

✓ *“MÉTODO QuEChERS SIMPLIFICADO”*

En el caso del “Método QuEChERS simplificado”, el sobrenadante se decantó en tubos de ensayo una vez extraído de la centrifuga, y se adicionaron 20 µL de mezcla Ácido Fórmico:Metanol (50:50 v/v) y 20 µL de disolución 7,9 ppm de PCB 153 en ACN. La muestra se agitó con ayuda de un agitador vórtex, se transfirió a un vial de vidrio para realizar el análisis ^[26,28].

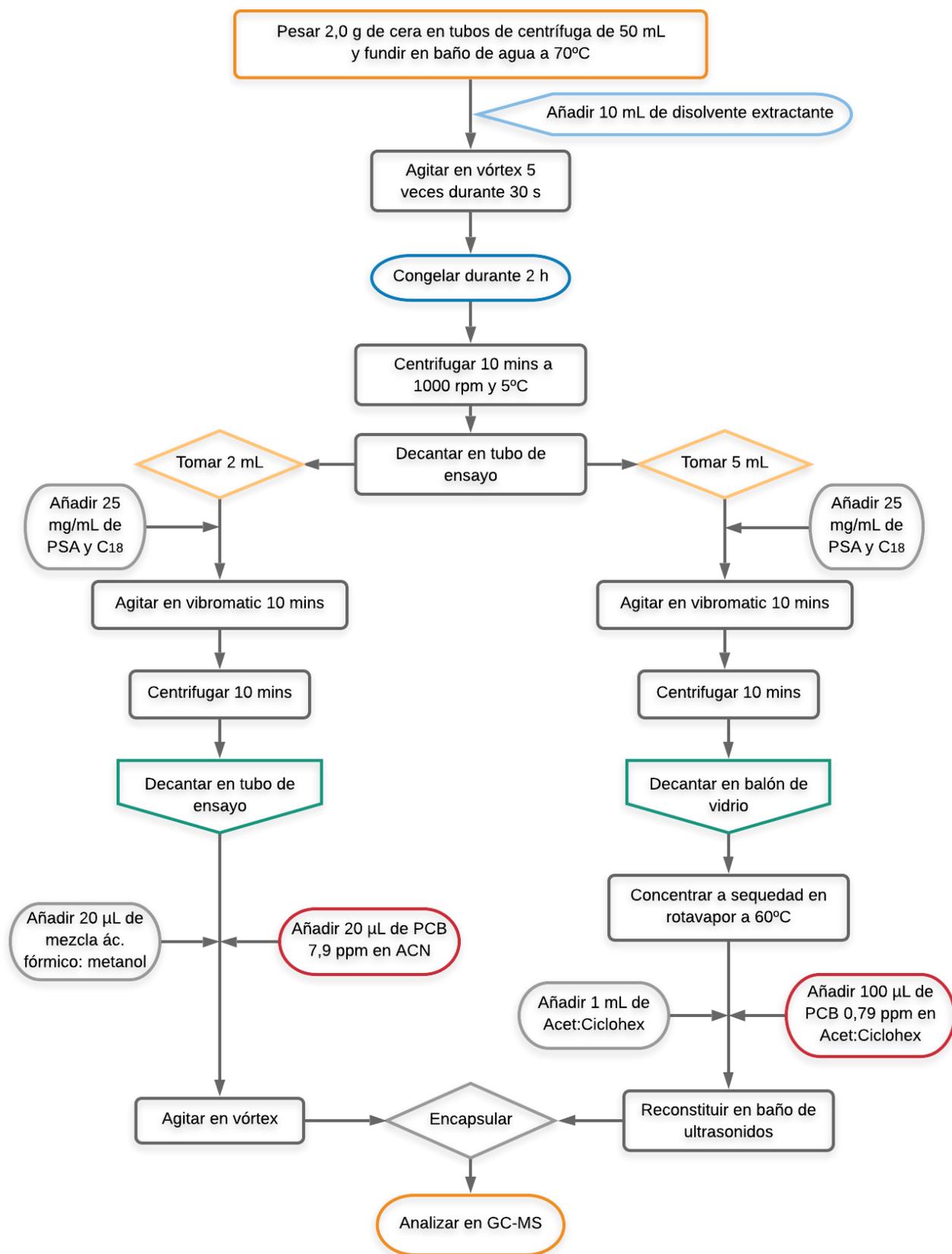


Figura 16. Esquema global de preparación de muestra.

6.3.2 Estudio de efecto matriz y recuperación

Para determinar si la matriz de la cera produce variaciones significativas en los resultados se realizó un estudio de efecto matriz. El estudio se llevó a cabo utilizando una cera blanca purificada y realizando la preparación de muestras según los dos métodos seleccionados. La prueba consistió en comparar la relación de áreas entre cada plaguicida y el patrón interno (A_i/A_p) para un blanco de cera sin dopar (B), una muestra dopada con patrón antes de la extracción (DA) y otra dopada con el patrón después de la extracción (DD). Además, se llevaron a cabo duplicados para garantizar la precisión de los resultados.

La preparación de muestra se realizó siguiendo el procedimiento aplicado a las muestras reales con unas ligeras variaciones:

- En el caso de los DA, se añadió 1 mL de patrón en ACN en el momento de la fusión de la cera y se ajustaron otras etapas de la preparación.

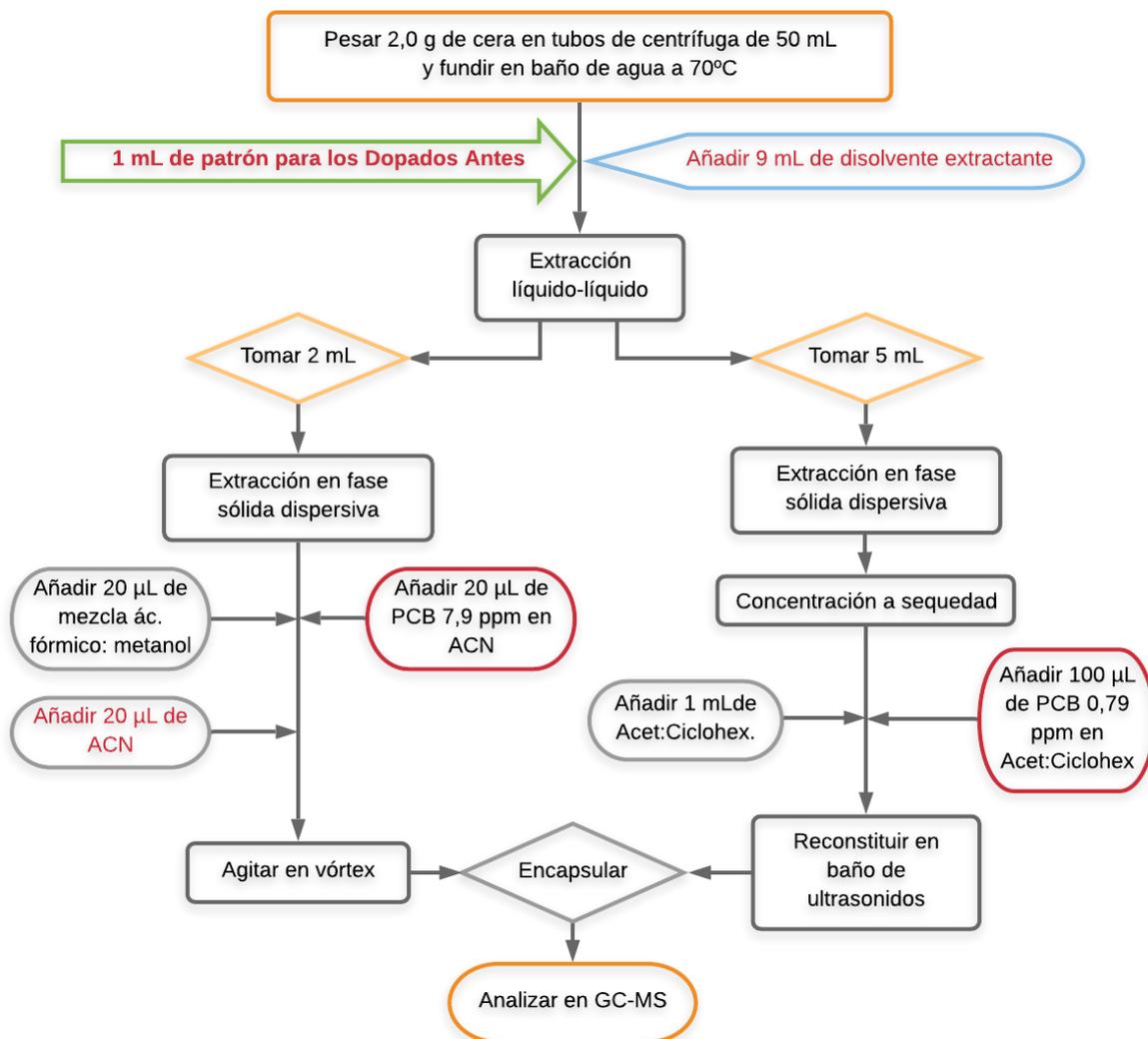


Figura 17. Preparación de Dopados Antes (los cambios aplicados están escritos en rojo).

- En el caso de los DD, para “Método QuEChERS concentrado” se añadió 1 mL de patrón en AcOEt:C₆H₁₂ el momento de la reconstitución, mientras que para el “Método QuEChERS simplificado”, se añadieron 20 µL de patrón en ACN justo antes introducir en el vial para el análisis.

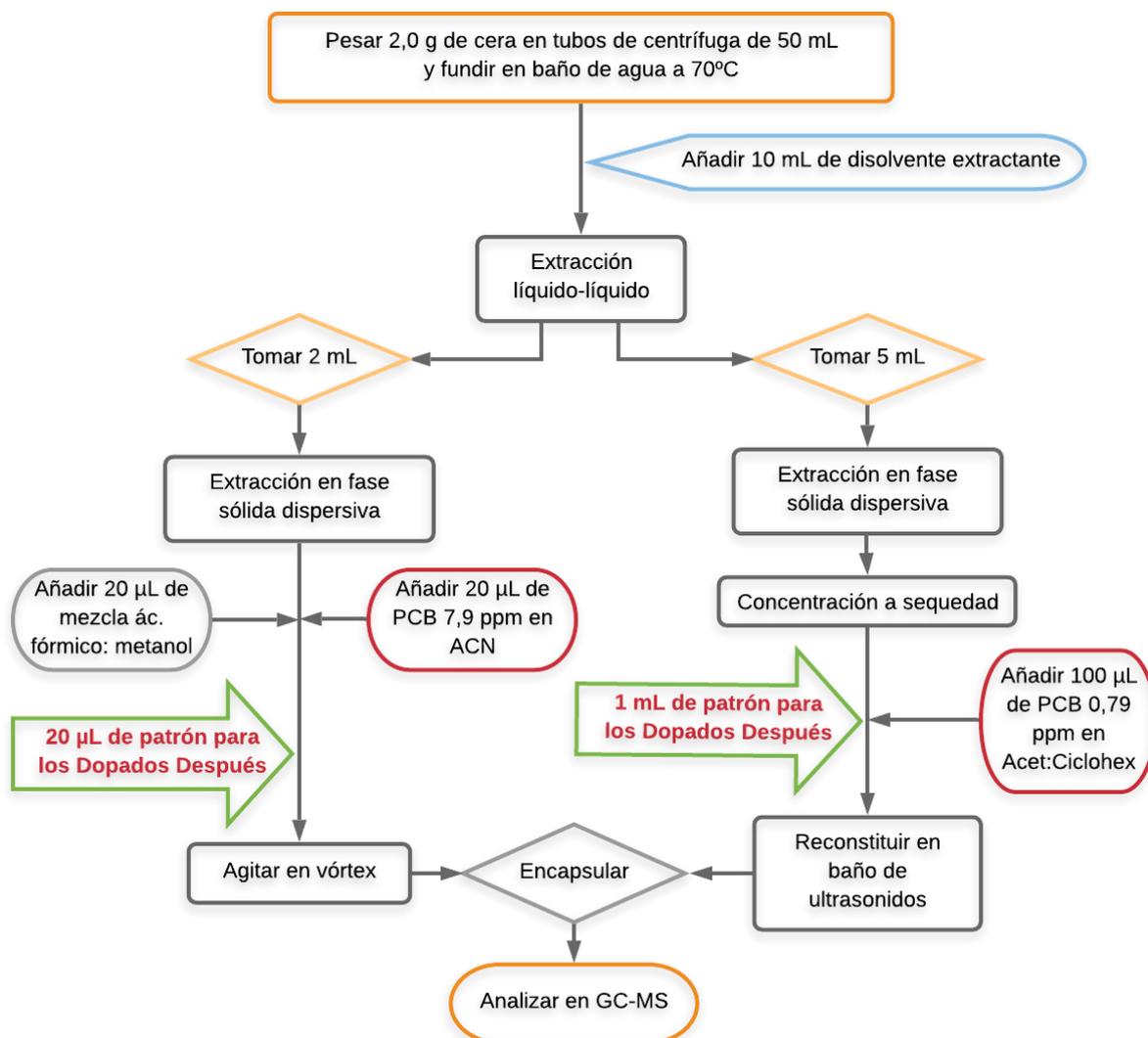


Figura 18. Preparación de Dopados Después (los cambios aplicados están escritos en rojo).

La prueba de efecto matriz se realizó a tres niveles de concentración, obteniendo así para el “Método QuEChERS simplificado” muestra dopadas de 0,1 ppm, 1 ppm y 10 ppm, mientras que para el “Método QuEChERS concentrado”, muestras dopadas de 0,5 ppm, 5 ppm y 50 ppm.

Se calculó con los valores de áreas obtenidos la relación A_i/A_p restando el blanco en cada caso y se calculó el efecto matriz y la recuperación comparando los dopados antes y después con el patrón a cada concentración y según las fórmulas establecidas.

$$\% R = \frac{(A_i/A_P)_{DA}}{(A_i/A_P)_{DD}} \times 100 \qquad \% ME = \frac{(A_i/A_P)_{DD}}{(A_i/A_P)_{PATRÓN}} \times 100$$

Figura 19. Ecuaciones de porcentaje de recuperación (%R) y de efecto matriz (%ME).

Los resultados obtenidos según el “Método QuEChERS simplificado” estuvieron lejos de ser satisfactorios. Proporcionaron no solo unas recuperaciones bajas y muy inestables sino también un efecto matriz en ocasiones desorbitado. Por esa razón y debido a que el “Método QuEChERS concentrado” presentaba resultados estables y con mayor recuperación, se descartó el “Método QuEChERS simplificado” para el análisis de las muestras, que se prepararon únicamente según el “Método QuEChERS concentrado”.

Las recuperaciones obtenidas con el “Método QuEChERS concentrado” proporcionaron un efecto matriz dentro del rango aceptable. Las recuperaciones obtenidas para las tres concentraciones fueron sin dudas mejores y se dan a continuación junto con la desviación estándar relativa.

Tabla 5. Porcentajes de recuperación (%R_{media}) obtenidos a tres niveles de concentración añadidos sobre la cera y desviación estándar relativa (%RSD).

| Compuesto | Concentración (mg/L) | %R_{medio} ± %RSD |
|-----------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| Atrazina | 0,53 | 92,5 ± 4,3 |
| | 5,27 | 90,2 ± 3,2 |
| | 52,73 | 93,3 ± 2,5 |
| Clorpyrifos | 0,46 | 94,3 ± 3,6 |
| | 4,59 | 99,5 ± 4,4 |
| | 45,91 | 103,3 ± 2,3 |
| Clorfenvinfos | 0,45 | 97,4 ± 5,2 |
| | 4,50 | 103,5 ± 3,4 |
| | 45,00 | 101,2 ± 4,3 |
| α-Endosulfán | 0,46 | 97,4 ± 5,4 |
| | 4,59 | 103,6 ± 5,3 |
| | 45,91 | 101,6 ± 3,1 |
| Bromopropilato | 0,46 | 91,3 ± 6,3 |
| | 4,59 | 99,6 ± 4,2 |
| | 45,91 | 99,9 ± 2,3 |
| Cumafós | 0,46 | 99,6 ± 5,5 |
| | 4,55 | 103,7 ± 6,4 |
| | 45,46 | 101,9 ± 3,4 |
| τ-Fluvalinato | 0,46 | 98,7 ± 6,6 |
| | 4,59 | 97,2 ± 5,4 |
| | 45,91 | 101,8 ± 2,3 |

6.4 Resultados

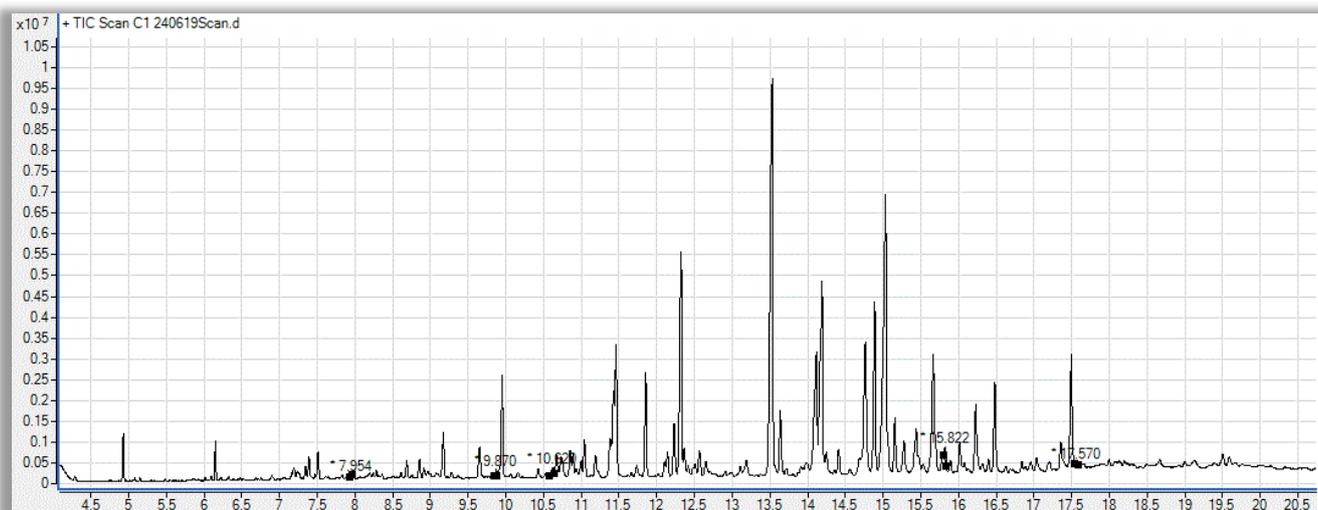
Una vez seleccionado el método que se iba a aplicar, el “Método QuEChERS concentrado”, se procedió al análisis de muestras reales.

Se analizaron 21 ceras procedentes de distintas regiones de España junto con alguna procedente de Francia y Alemania.

Tabla 6. Ceras analizadas, procedencia y nombre asignado.

| Nombre | Procedencia |
|---------------|----------------------------------|
| C0 | País Vasco (Vitoria) |
| C1 | País Vasco (Vitoria) |
| C2 | Castilla y León (Zamora) |
| C3 | Asturias (Oviedo) |
| C4 | Castilla y León (Salamanca) |
| C5 | Francia (Bollene) |
| C6 | Andalucía (Córdoba) |
| C7 | Castilla la Mancha (Guadalajara) |
| C8 | Alemania (Bremen) |
| C9.1 | Castilla la Mancha (Guadalajara) |
| C9.2 | Castilla la Mancha (Guadalajara) |
| C9.3 | Castilla la Mancha (Guadalajara) |
| C10 | Castilla la Mancha (Guadalajara) |
| C11 | Castilla la Mancha (Guadalajara) |
| C12 | Castilla la Mancha (Guadalajara) |
| C13 | Castilla la Mancha (Guadalajara) |
| C14 | Castilla la Mancha (Guadalajara) |
| C30 | Castilla la Mancha (Cuenca) |
| C31 | Castilla la Mancha (Cuenca) |
| C32 | Castilla y León (Salamanca) |
| C33 | Castilla y León (Salamanca) |

Después de la preparación de muestras se obtuvieron los cromatogramas por análisis GC-MS, que se pudieron realizar tanto en modo *SIM* como *SCAN*. En el modo *SCAN* se observó el cromatograma con todos los picos salidos de la columna. Permite realizar la identificación de los compuestos en la zona de t_R a la que debería salir el compuesto que se esté buscando.



**Figura 20. Cromatograma en modo SCAN de la muestra de cera C1.
Abundancia frente a tR.**

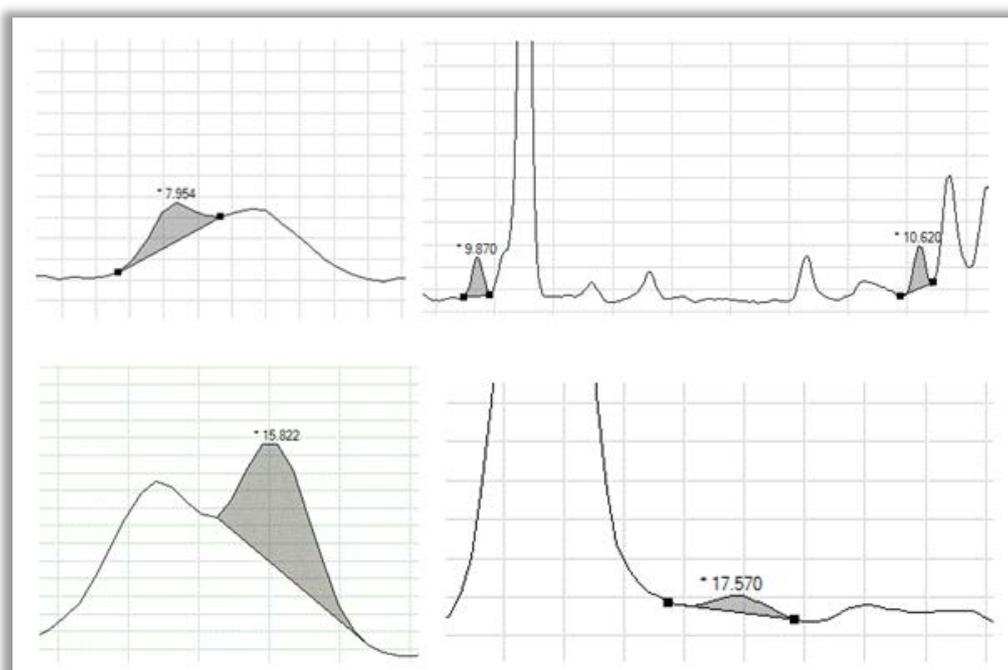


Figura 21. Ampliación del cromatograma en SCAN de la muestra C1 en las zonas donde eluyen los plaguicidas Atrazina, Clorpirifos, Clorfenvinfos, Cumafós y Fluvalinato.

El modo *SIM* se utiliza cuando ya se ha identificado la presencia de un compuesto en la muestra y es necesario cuantificar el área del pico que le corresponde. Da lugar a cromatogramas más sencillos porque monitoriza selectivamente los iones característicos que se han seleccionado.

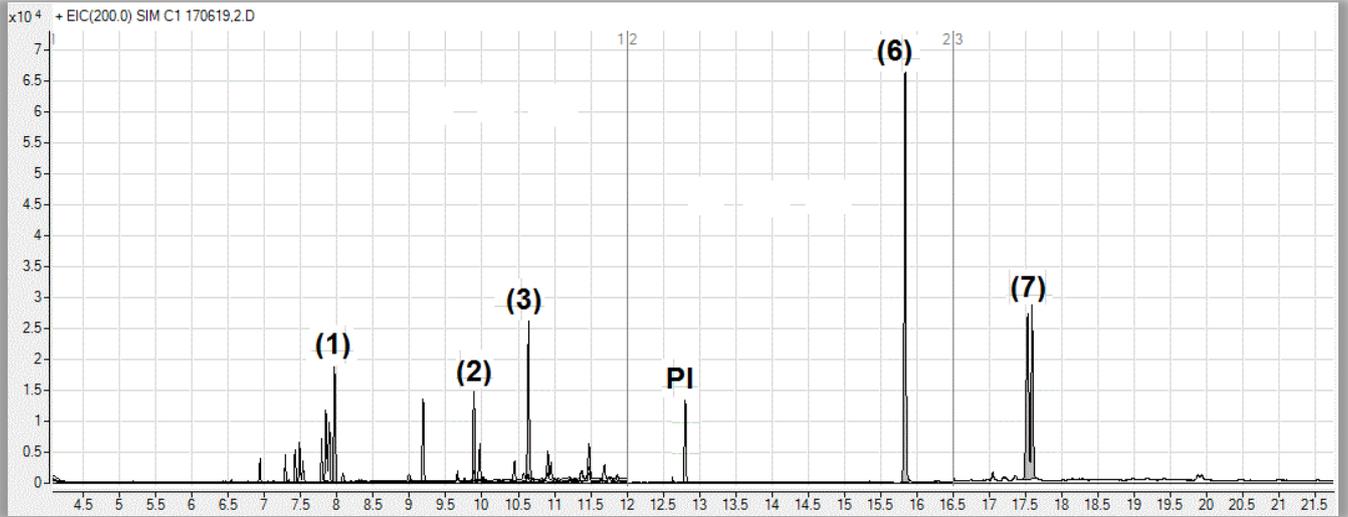


Figura 22. Cromatograma en modo SIM de la muestra de cera C1: (1) Atrazina, (2) Clorpyrifos, (3) Clorfenvinfos, (6) Cumafós y (7) Fluvalinato.

De los cromatogramas obtenidos se integraron los picos correspondientes a cada plaguicida presente y se llevó la relación A_i/A_p sobre las líneas de calibrado en matriz para obtener la concentración en ppm presente en la muestra. La concentración en ppm se transformó en concentración mg/Kg para visualizar más fácilmente la contaminación presente en las muestras.

La concentración de plaguicidas presentes en las muestras de cera laminada de abeja es muy elevada y mayor de lo que se había esperado. Al llevar a cabo la extracción y el análisis de las primeras muestras reales de cera se observó que estas presentaban concentraciones mucho más elevadas que las que se habían estimado y por tanto, se salían considerablemente del intervalo de concentraciones en que inicialmente se habían realizado las líneas de calibrado en matriz. Por esta razón, se prepararon nuevos patrones concentraciones mayores que permitieran obtener una línea de calibrado en matriz del mismo orden de concentraciones que las muestras. Con estas correcciones los resultados obtenidos se recogen en la *Tabla 7*.

Tabla 7. Resultado del contenido en mg/Kg de los plaguicidas estudiados en las muestras de cera de abeja laminada analizadas.

| | <i>Atrazina</i> | <i>Clorpirifos</i> | <i>Clorfenvinfos</i> | <i>α-Endosulfan</i> | <i>Bromopropilato</i> | <i>Cumafós</i> | <i>τ-Fluvalinato</i> |
|-------------|-----------------|--------------------|----------------------|---------------------|-----------------------|----------------|----------------------|
| C0 | - | - | 0,09 | - | - | 11,89 | 0,89 |
| C1 | 0,56 | 0,87 | 0,75 | - | 0,55 | 2,71 | 0,89 |
| C2 | - | 0,09 | 0,56 | - | - | 6,28 | 1,71 |
| C3 | - | 0,10 | 0,13 | - | - | - | 0,90 |
| C4 | - | - | 0,20 | - | - | 0,44 | 1,11 |
| C5 | - | 0,03 | | - | - | - | 1,97 |
| C6 | - | 0,02 | 0,09 | - | - | - | 1,88 |
| C7 | - | 0,02 | 0,60 | - | - | 8,16 | 0,90 |
| C8 | - | 0,13 | 0,10 | - | - | - | - |
| C9.1 | - | 0,11 | 0,64 | - | - | 14,70 | - |
| C9.2 | - | 0,07 | 0,98 | - | - | 8,79 | 1,22 |
| C9.3 | - | 0,42 | 0,76 | - | - | 11,95 | 1,00 |
| C10 | - | 0,03 | 0,40 | - | - | 6,06 | 0,77 |
| C11 | - | - | 0,09 | - | - | 2,00 | - |
| C12 | - | 0,58 | 0,08 | - | - | 1,97 | 0,02 |
| C13 | - | - | 0,99 | - | - | 9,23 | 1,15 |
| C14 | - | - | | - | - | - | 1,79 |
| C30 | - | - | 0,21 | - | - | 1,51 | 1,13 |
| C31 | - | - | 0,38 | - | - | 4,37 | 0,51 |
| C32 | - | - | 0,42 | - | - | 11,58 | 1,78 |
| C33 | - | - | 0,55 | - | - | 8,82 | 2,50 |

Como puede observarse todas las láminas analizadas presentaban residuos de plaguicidas. En orden creciente de abundancia los más presentes son *Clorpirifos*, *Clorfenvinfos*, *Fluvalinato* y *Cumafós*, estando el *Cumafós* con diferencia muy por encima de los demás y siendo el que presentaba unas concentraciones más llamativas y preocupantes, del orden de los 10 mg por Kg de cera.

Los plaguicidas *Atrazina*, *α-Endosulfán* y *Bromopropilato* no se encontraron en las ceras estudiadas excepto en el caso de la muestra *C1*, lo que resultó bastante satisfactorio ya que los tres están prohibidos en todas la UE.

La gran abundancia de *Clorpirifos*, *Fluvalinato* y *Cumafós* no resultó sorprendente ya que estos tres plaguicidas están permitidos en la UE y además, tanto el *Fluvalinato* como el *Cumafós* son los más utilizados en el tratamiento de las colmenas. Sin embargo, la elevada concentración en la que se encontraban no puede pasarse por alto.

Por último, las elevadas concentraciones en que se encontró el *Clorfenvinfos* sí que resultaron preocupantes ya que este plaguicida está prohibido en la UE desde hace años debido a sus efectos sobre el medio ambiente.

7 CONCLUSIONES

- El “Método QuEChERS simplificado” proporciona recuperaciones más bajas que el “Método QuEChERS concentrado” y el efecto matriz está fuera del intervalo permitido, por lo que no resulta adecuado para analizar este tipo de muestras.
- Al llevar a cabo la extracción en fase sólida dispersiva, no existen diferencias significativas al aumentar la cantidad de PSA y C₁₈ de 25 a 50 mg/mL, sin embargo, sí se produce un aumento considerable del efecto matriz al subirla hasta 75 mg/mL. Por esa razón, se debe mantener la cantidad de sorbentes entre 25 y 50 mg/mL.
- Utilizando únicamente ACN como extractante se obtienen porcentajes de recuperación más altos que con la mezcla ACN:H₂O, hecho que quedó demostrado con las pruebas de efecto matriz.
- En todas las láminas de cera analizadas y actualmente en comercialización hay una evidencia real de la presencia de residuos de plaguicidas, siendo destacable la presencia común de *Clorpirifos*, *Clorfenvinfos*, *Fluvalinato* y *Cumafós*.
- Se puede afirmar que la presencia de *Atrazina*, *α-Endosulfán* y *Bromopropilato*, en la mayoría de los casos indetectables o muy por debajo de los límites de determinación, no parece ser un dato relevante.
- Debe hacerse una mención preocupante al excesivo empleo del *Cumafós*, y su presencia en cantidades muy elevadas en la mayoría de las muestras.
- También es muy importante la presencia del *Clorfenvinfos (Supona)* que a pesar de que fue prohibido en España hace tiempo, los resultados evidencian que sigue empleándose.
- Debe resaltarse que incluso en aquellas láminas más blancas también se encuentran residuos, a pesar de comercializarse como puras.

8 LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

8.1 Figuras

| | |
|--|----|
| <i>Figura 1. Propóleo y cera natural respectivamente.</i> | 6 |
| <i>Figura 2. Láminas de cera estampada.....</i> | 6 |
| <i>Figura 3. Laminadora y troquel industrial para estampado.</i> | 7 |
| <i>Figura 4. Celdas en cera estampada y lámina de cera enmarcada para panal.</i> | 8 |
| <i>Figura 5. Panal construido sobre láminas de cera estampada.</i> | 8 |
| <i>Figura 6. El parásito Varroa destructor en el cuerpo de una abeja.....</i> | 11 |
| <i>Figura 7. Cromatógrafo de gases Agilent Technologies series 7890 A acoplado a detector de espectrometría de masas Agilent Technologies 5975 C.....</i> | 20 |
| <i>Figura 8. Rotavapor R-3 de BÜCHI.....</i> | 21 |
| <i>Figura 9. Todas las micropipetas utilizadas.....</i> | 22 |
| <i>Figura 10. Diversas disoluciones patrón utilizadas para llevar a cabo el estudio.</i> | 24 |
| <i>Figura 11. Espectro de masas del Cumafós en que se observan los tres iones de m/z distinta.</i> | 26 |
| <i>Figura 12. Cromatograma en modo SIM de los siete plaguicidas. Permite identificar el tiempo de retención de cada uno de ellos.</i> | 26 |
| <i>Figura 13. Estructura química del PCB 153.</i> | 27 |
| <i>Figura 14. Línea de calibrado en matriz para el patrón de Fluvalinato.</i> | 28 |
| <i>Figura 15. Esquema sencillo de la descripción que se va a dar a continuación sobre los métodos realizados.....</i> | 29 |
| <i>Figura 16. Esquema global de preparación de muestra.....</i> | 32 |
| <i>Figura 17. Preparación de Dopados Antes (los cambios aplicados están escritos en rojo).</i> | 33 |
| <i>Figura 18. Preparación de Dopados Después (los cambios aplicados están escritos en rojo).</i> | 34 |
| <i>Figura 19. Ecuaciones de porcentaje de recuperación (%R) y de efecto matriz (%ME).....</i> | 35 |
| <i>Figura 20. Cromatograma en modo SCAN de la muestra de cera C1. Abundancia frente a tR.....</i> | 37 |
| <i>Figura 21. Ampliación del cromatograma en SCAN de la muestra C1 en las zonas donde eluyen los plaguicidas Atrazina, Clorpyrifos, Clorfenvinfos, Cumafós y Fluvalinato.</i> | 37 |

Figura 22. Cromatograma en modo SIM de la muestra de cera C1:
(1) Atrazina, (2) Clorpirifos, (3) Clorfenvinfos, (6) Cumafós y (7) Fluvalinato..... 38

8.2 Tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Pesticidas analizados: nombre, familia, función y estructura química. | 15 |
| Tabla 2. Rampa de temperaturas utilizadas. | 25 |
| Tabla 3. Información de interés sobre los plaguicidas. | 27 |
| Tabla 4. Pendiente, ordenada y el coeficiente de variación en el origen de la línea de calibrado correspondiente a cada plaguicida..... | 28 |
| Tabla 5. Porcentajes de recuperación ($\%R_{media}$) obtenidos a tres niveles de concentración añadidos sobre la cera y desviación estándar relativa ($\%RSD$). | 35 |
| Tabla 6. Ceras analizadas, procedencia y nombre asignado..... | 36 |
| Tabla 7. Resultado del contenido en mg/Kg de los plaguicidas estudiados en las muestras de cera de abeja laminada analizadas. | 39 |

9 ABREVIATURAS

- A_i = Área del pico de muestra
- A_p = Área del patrón interno
- ACN = Acetonitrilo
- AcOEt = Acetato de Etilo
- B = Blanco
- C_6H_{12} = Ciclohexano
- C_{18} = Octadecilsilano
- DA = Dopado antes
- DD = Dopado después
- EI = Impacto electrónico
- FAO = Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
- GC = Cromatografía de gases
- H_2O = Agua
- HPLC = Cromatografía de líquidos de alta resolución
- IPBES = Plataforma Intergubernamental sobre Biodiversidad y Servicios de los Ecosistemas
- m/z = Relación masa carga
- MS = Detector de espectrometría de masas
- NIST = Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (National Institute of Standards and Technology)
- PCB = Bifenilo policlorado
- PESTANAL[®] = Patrón para análisis de pesticidas
- PESTI-PUR = De pureza compatible para el análisis de pesticidas
- PM = Peso molecular
- ppm: Partes por millón
- PSA = Amina primaria y secundaria
- QqQ = Triple cuadrupolo
- QuEChERS = Rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)

- rpm = *Revoluciones por minuto*
- %RSD = *Desviación Estándar relativa*
- SCAN: *Modo de análisis cualitativo que consiste en hacer barridos entre dos masas para tener una información total del contenido de la muestra a analizar*
- SIM = *Modo de análisis cuantitativo que monitoriza selectivamente los iones característicos que se han seleccionado*
- LLE = *Extracción líquido-líquido*
- SPE = *Extracción en fase sólida*
- TESEA = *Laboratorio de Técnicas de Separación y Análisis Aplicado*
- TOF = *Tiempo de vuelo*
- t_R = *Tiempo de retención*
- UE = *Unión Europea*
- USA = *Estados Unidos de América*

10 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ferraro D. O., Rositano F., *Conocimiento e insumos en la agricultura moderna*. Ciencia Hoy 122 (2011) 17-22.
- [2] Rodríguez García D., *Impacto social de la presencia de residuos químicos de síntesis en los productos de la colmena*. Revista electrónica de Veterinaria 810 (2007) 1695-7504.
- [3] Bogdanov S., *Beeswax: production, properties, composition and control*. Bee Product Science (2009) 1-16.
- [4] Isern M. D., *La química de los pesticidas y su metodología analítica*. Universidad del Centro Educativo Latinoamericano (2002) 1-61.
- [5] Martínez-Ghersa M. A., *Consecuencias ambientales del uso de pesticidas*. Ciencia Hoy 122 (2011) 30-35.
- [6] Wilmart O., Legrève A., Scippo M. L., Reybroeck W., Urbain B., de Graaf D. C., Steurbaut W., Delahaut P., Gustin P., Nguyen B. K., and Saegerman C., *Residues in beeswax: a health risk for the consumer of honey and beeswax?* Journal of Agricultural Food Chemistry 64 (2016) 8425-8434.
- [7] Medici S. K., Castro A., Sarlo E. G., Marioli J. M., Eguaras M. J., *The concentration effect of selected acaricides present in beeswax foundation on the survival of Apis mellifera colonies*. Journal of Apicultural Research 51, 2 (2012) 164-168.
- [8] Bogdanov S., Kilchenmann V., Imdorf A., *Acaricide residues in some bee products*. Journal of Apicultural Research 37, 2 (1998) 57-67.
- [9] Bogdanov S., Kilchenmann V., Imdorf A., *Acaricide residues in honey, beeswax and propolis*. Swiss Bee Research Centre (1999) 1-11.
- [10] Wallner K., *The residues of p-dichlorobenzene in wax and honey*. American Bee Journal 1328 (1992) 538-541.

- [11] Wallner K., *The actual beeswax quality in foundations from the market*. Apidologie 28, 3-4 (1997) 168-171.
- [12] Bogdanov S., Kilchenmann V., Seiler K., Frey T. H., Roux B., Wenk P., Noser J., *Residues of p-dichlorobenzene in honey and beeswax*. Journal of Apicultural Research 43, 1 (2004) 14-16.
- [13] Ravoet J., Reybroeck W., de Graaf D.C., *Pesticides for apicultural and/or agricultural application found in Belgian honey bee wax comb*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 94 (2015) 543-548.
- [14] Wallner K., *Varroacides and their residues in bee products*. Apidologie 30, 2-3 (1999) 235-248.
- [15] Chauzat M. P., Faucon J., *Pesticide residues in beeswax samples collected from honey bee colonies (Apis Mellifera L.) in France*. J. Econ. Entomol. 99 (2007) 1100-1106.
- [16] Boncristiani H., Underwood R., Schwarz R., Evans JD., Pettis J. and van Engelsdorp D., *Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees Apis Mellifera*. J Insect Physiol 58, 5 (2012) 613-620.
- [17] Boi M., Serra G., Colombo R., Lodesani M., Massi C., Costa C., *A 10 year survey of acaricide residues in beeswax analyzed in Italy*. Pest. Manag. Sci. 72 (2016) 1366-1372.
- [18] Lodesani M., Costa C., Serra G., Colombo R., Sabatini G. A., *Acaricide residues in beeswax after conversion to organic beekeeping methods*. Apidologie 39 (2008) 324-333.
- [19] Ostiguy N., Eitzer B., *Overwintered brood comb honey: colony exposure to pesticide residues*. Journal of Apicultural Research 53,3 (2014) 413-421.
- [20] *Plenario de la Plataforma Intergubernamental Científico-Normativa sobre diversidad biológica y servicios de los ecosistemas* (París del 29 de abril al 4 de mayo de 2019).

- [21] Adamczyk S., Lázaro R., Pérez-Arquillué C., Bayarri S., Herrera A., *Impact of the use of Fluralinate on different types of beeswax from Spanish hives*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 58 (2010) 733–739.
- [22] Bedmar F., *¿Qué son los plaguicidas?* Ciencia Hoy 122 (2011) 10-16.
- [23] Wolansky M. J., *Plaguicidas y salud humana*. Ciencia Hoy 122 (2011) 23-29.
- [24] Jiménez J. J., Bernal J. L., del Nozal M. J., Martín M. T., *Residues of organic contaminants in beeswax*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 107 (2005) 896-902.
- [25] Režid, I., Horvat, A. J. M., Babid, S. & Kaštelan-Macan, M. *Determination of pesticides in honey by ultrasonic solvent extraction and thin-layer chromatography*. Ultrasonics. Sonochemistry 12 (2005) 477- 481.
- [26] Anastassiades M., Lehotay S. J., Stajnbaher D., Schenk F. J., *Fast and easy multiresidue methods employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce*. Journal of AOAC International 86 (2003) 412-431.
- [27] Steinborn A., *Development of a QuEChERS-based method for the simultaneous determination of acidic pesticides, their esters, and conjugates following alkaline hydrolysis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 65 (2017) 1296 -1305.
- [28] Niell S., Cesio V., Hepperle J., Doerk D., Kirsch L., Kolberg D., Scherbaum E., Anastassiades M., and Heinzen H., *QuEChERS-based method for the multiresidue analysis of pesticides in beeswax by LC-MS/MS and GC×GC-TOF*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 62 (2014) 3675-3683.
- [29] Frison S., Breitzkreitz W., Currie R., Nelson D., Sporns P., *The analysis of fluralinate in beeswax using GC/MS*. Food Research International 32 (1999) 35-41.
- [30] 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*. Journal of Chromatography A 26 (2011) 5743-5756.

- [31] Herrera López S., Lozano A., Sosa A., Hernando M. D., Fernandez-Alba A. R., *Screening of pesticide residues in honeybee wax comb by LC-ESI-MS/MS. A pilot study.* Chemosphere 163 (2016) 44-53.
- [32] Yáñez K. P., Bernal J. L., Nozal M. T., 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.* Journal of Chromatography A, 1285 (2013) 110–117.
- [33] Jiménez J. J., Bernal J. L., del Nozal M. J., Alonso C., *Liquid–liquid extraction followed by solid-phase extraction for the determination of lipophilic pesticides in beeswax by gas chromatography–electron-capture detection and matrix-matched calibration.* Journal of Chromatography A, 1048 (2004) 89-97.
- [34] Sánchez-Brunete C., Albero B., Martín G., Tadeo J. L., *Determination of pesticide residues by GC-MS using analytic protectants to counteract the matrix effect.* Analytical Sciences 21 (2005) 1291-1296.
- [35] Tsigouri A. D., Menkissoglu-Spiroudi U., Thrasyvoulou A., Diamantidos G., *Determination of Fluvalinate Residues in beeswax by gas chromatography with Electron Capture Detection.* Journal of AOAC International Vol. 83, 5 (2000) 1225-1228.
- [36] Tsigouri A. D., Menkissoglu-Spiroudi U., Thrasyvoulou A., Diamantidos G., *Fluvalinate residues in honey and beeswax after different colony treatments.* Bull. Environ. Contam. Toxicol. 72 (2004) 975-982.
- [37] Gil M. D., Ucles S., Lozano A. R., Sosa A. B., Fernández A. R., *Multiresidue method for trace pesticide analysis in honeybee wax comb by GC-QqQ-MS.* Talanta 163 (2017) 54-64.
- [38] Dainat B., Evans J. D., Ping Chen Y., Gauthier L., Neumann P., *Dead or Alive: deformed wing virus and Varroa destructor reduce the life span of winter honeybees.* American Society for Microbiology Journals 78 (2012) 981-987.

- [39] Serra-Bonvehí J. and Orantes-Bermejo J., *Acaricides and their residues in Spanish commercial beeswax*. Wiley Online Library (2010) 1230-1235.
- [40] Akšić F., Guffa M. A., Gašić B. A., Zagorac U. D., Natić D. C., Meland M. B., *Phenolic profile of pollen collected from different 'Oblačinska' sour cherry (Prunus cerasus L.) clones*. Acta Horticulturae 1235 (2019) 387-394.
- [41] Santana A.C.B.A, Santana, M.V.A., Pereira P.A.P., *Development of a method based on DLLME and UFLC-DAD for the determination of antibiotics in honey samples and the study of their degradation kinetics*. Journal of the Brazilian Chemical 29 (2018) 1538-1550.
- [42] Bonzini S., Tremolada P., Bernardinelli I., Colombo M., Vighi M., *Predicting pesticide fate in the hive (part 1): experimentally determined τ -fluvalinate residues in bees, honey and wax*. Apidologie 42 (2011) 378-390.