



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

Presencia de plaguicidas en cera estampada

Autor: Víctor Lumbreras Pérez

Tutor: M^a Jesús del Nozal Nalda

INDICE

1. RESUMEN.....	5
1.1. <i>Abstract</i>	5
2. ABREVIATURAS UTILIZADAS.....	7
3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	9
3.1. Introducción.....	9
3.2. Plaguicidas utilizados.....	12
3.3. Metodología.....	17
4. OBJETIVO.....	19
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	21
5.1. Instrumentación y reactivos.....	21
5.1.1. Equipos utilizados.....	21
5.1.2. Equipos adicionales y consumibles.....	21
5.1.3. Reactivos y disolventes.....	21
5.2. Condiciones cromatográficas.....	23
5.2.1. Condiciones de detección.....	24
5.3. Tratamiento de muestra.....	29
6. APLICACIÓN DEL MÉTODO.....	37
7. CONCLUSIONES.....	41
8. BIBLIOGRAFÍA.....	43

1. RESUMEN

Este trabajo ha consistido en desarrollar un método analítico para la determinación simultánea de ocho plaguicidas por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC-MS). Se ha propuesto un tratamiento de muestro efectivo (con recuperaciones medias compendiadas entre el 95 % y el 104 %) que consistía en fundir la cera en un baño de agua a 65°C, una extracción con disolventes empleando una mezcla calentada de acetonitrilo y agua (9:1, v/v), una congelación con hielo seco con el propósito de precipitar lípidos y proteínas, una etapa de limpieza y concentración con amina primaria secundaria (PSA) y C₁₈, una centrifugación seguida de una concentración a sequedad en un rotavapor y una reconstitución del residuo seco con 1 mL de una mezcla de ciclohexano y acetato de etilo (8:2; v/v). La separación GC se llevó a cabo empleando una columna J&W HP-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 mm) con un programa de temperatura y utilizando Helio como gas portador a un flujo constante de 1,2 mL/min.

1.1 *Abstract*

This study is concerned with the development of an analytical method for simultaneously determining eight pesticides in beeswax, by means of gas chromatography coupled to a mass detector (GC-MS). An efficient sample treatment is proposed (with average analyte recoveries between 95 % and 104 %) involving the melting of the beeswax in a water bath at 65°C, a solvent extraction with a heated acetonitrile and water (9:1, v/v) mixture, freezing with dry ice with the aim of precipitating lipids and proteins, a clean-up step with primary secondary amine (PSA) and C₁₈, a centrifugation, followed by evaporation to dryness in a rotary evaporator and a reconstitution of the dry extract with 1 mL of a cyclohexane and ethyl acetate (8:2, v/v) mixture. The GC separation was performed on a J&W HP-5 MS column (30 m × 0,25 mm × 0,25 mm) column by using programmed temperature conditions, and the carrier gas was helium at a constant flow-rate of 1,2 mL/min.

2. ABREVIATURAS UTILIZADAS

- ACN: Acetonitrilo
- PSA: Amina primaria y secundaria
- C₁₈: Octadecilsilano
- FAO: Food and Agriculture Organization
- UE: Unión Europea
- LMR: Límites máximos de residuos
- HPLC: Cromatografía de líquidos de alta resolución
- GC: Cromatografía de gases
- MS: Detector de espectrometría de masas
- EI: impacto electrónico
- modo *SIM*: *selective ion monitoring mode*
- modo *SCAN*: *modo que consiste en hacer barridos entre dos masas para tener una información total del contenido de la muestra a analizar*
- QuEChERS: (Método de extracción); *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*
- ppm: partes por millón
- t_r: tiempo de retención
- *Ch*: *Chlorfenvinphos*
- *CP*: *Coumaphos*
- *F-Tau*: *Fluvalinato - Tau*

3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

3.1 Introducción

La cera de abeja 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 principio 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. La procedencia de la cera se encuentra en la secreción de las glándulas específicas que se localizan en el abdomen de las abejas obreras [1] (*género Apis*) con una media de 12 a 18 días de edad, y está compuesta principalmente por mezclas de monoésteres (35%), hidrocarburos parafínicos (14%), diésteres (14%), ácidos grasos libres de alto peso molecular (12%) y una serie de compuestos en menor proporción como pueden ser los alcoholes libres [2].

La cera de abeja tiene gran importancia en el mercado farmacéutico, cosmético y en la industria alimentaria, donde es usada como agente espesante y en ocasiones como emulsionante, aunque se está empezado a reemplazar en parte, por productos sintéticos o fósiles [3]. En la Unión Europea (UE), la cera de abejas está permitida como aditivo alimentario [4] en donde se emplea en productos de confitería, en productos de panadería y frutos secos, o para el tratamiento superficial (agente de pulido) de algunas frutas frescas y se encuentra clasificada con el código alimentario E-901 [4] [5].

Sin embargo, una de las principales aplicaciones de la cera de abejas en la actualidad se encuentra en la apicultura comercial, donde se usa como base funcional de los panales de las colmenas de abejas productoras de miel, y es denominada cera estampada.

La cera estampada está fabricada por medio de maquinaria, la cual imprime hexágonos en láminas de cera de unos 2 ó 3 milímetros de espesor. Estas láminas son de gran utilidad para el apicultor, ya que éste no espera a que las abejas produzcan por completo sus propios panales, sino que les suministra cera estampada a la colonia, siendo colocada en los cuadros donde las abejas producen su nueva cera para depositar las crías o producir la miel. Este proceso se conoce como *estirado de la cera*.

Aproximadamente, para que las abejas produzcan 1 kg de cera necesitan consumir alrededor de unos 6-7 kg de miel [6] [7].

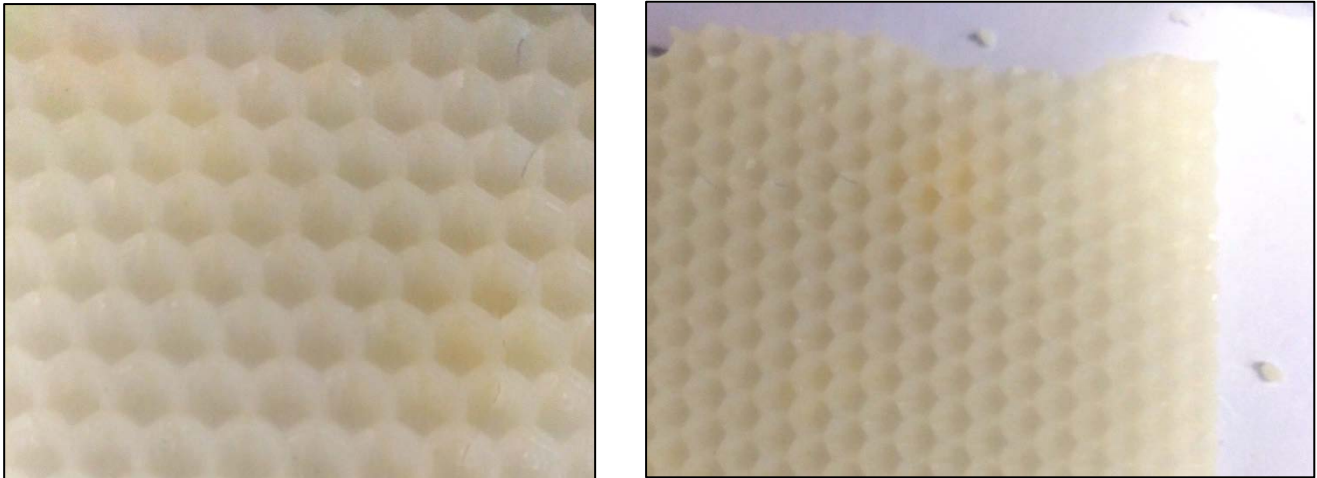


Figura 1.- Imagen de cera estampada

Generalmente, la cera estampada destinada para este uso procede bien de otras abejas que la han elaborado de forma natural para usarla como opérculo o tapadera de las celdillas llenas de miel, o bien de cuadros usados de otras colmenas. Un problema que se origina de este uso es que la cera puede contener residuos o restos de todas aquellas sustancias que, tanto la abeja como el apicultor hayan podido introducir en la colmena.

Existen estudios de investigación que hablan de la función de las abejas como indicadores medioambientales [8], éstas son capaces de proporcionar información sobre la degradación ambiental debido a los análisis que se pueden realizar al cuerpo de la propia abeja. Las abejas, poseen un cuerpo cubierto de pelos que ayudan a capturar las sustancias del exterior. La información también se obtiene del posible análisis de las colmenas y de sus productos generados (cera, miel, polen...) en diferentes épocas, climas o circunstancias. Además para que se lleve a cabo la reproducción vegetal se necesita el traslado del polen, ya sea de la misma planta o de otras plantas que se encuentren a cierta distancia las unas de las otras. Muchas especies de insectos visitan las flores para buscar su néctar o polen; y mientras lo hacen, transportan los gránulos que contribuirán a la polinización. Y es dónde hay que tener en cuenta a las abejas, ya que éstas son una de las especies de insectos polinizadores más eficaces, debido a los motivos expuestos anteriormente acerca de su cuerpo.

El empleo de ciertos plaguicidas y otros productos químicos, permiten combatir las posibles parasitaciones que pueden afectar a las abejas, evitando que enfermen y no puedan polinizar los cultivos alimentarios [3] [9], o producir miel.

Se ha comprobado que algunos de los tratamientos [4] [11], usados para combatir las enfermedades que afectan a las abejas, como los acaricidas utilizados para controlar parásitos (siendo uno de los más importantes el "*Varroa destructor*"), pueden dejar residuos [11] [12], los cuales se acumulan principalmente en la cera. La mayoría de los plaguicidas utilizados para controlar los ácaros son lipófilos (sustancias solubles en las grasas en la cera de abeja) [4]. Por lo tanto, a cuantos más tratamientos esté expuesto una colmena, más residuos puede tener la cera, ya que se irán acumulando en los diferentes "reciclados" a los que esté expuesta la cera. En el mundo de la apicultura comercial, los tratamientos químicos para combatir el "*Varroa destructor*" [8] [11] y demás ácaros y parásitos son casi inevitables.

La industria que controla el sector del reciclado y purificado de los panales, se encarga de "limpiar" los panales usados en una colmena antes de que sean utilizados en otra colmena o por otro apicultor, de las posibles sustancias que puedan contener o principalmente de los plaguicidas que hayan quedado ligados a ellos. Teniendo en cuenta sus propiedades [9] y su persistencia a residir en la cera, es donde entra el trabajo de controlar la presencia de éstos en las etapas de purificación y limpieza, debido a la importancia que tiene la cera en el proceso de la elaboración de la miel por parte de las abejas y el contacto cercano que tiene con el ser humano como aditivo alimentario.

La UE ha emitido reglamentos estrictos que regulan la comercialización de los productos procedentes de la industria apícola, entre ellos se encuentran los referidos a las concentraciones de plaguicidas en cera, en los cuales se establecen límites máximos de residuos (LMR) para una gran variedad de contaminantes [10]. Algunos de los plaguicidas usados actualmente, pueden ser el *Fluvalinato - Tau* (Tabla 1 y Figura 2), el cual tiene gran afinidad a permanecer en la cera [12]. Otros plaguicidas señalados por estudios realizados en la Unión Europea [4] [8] [11], dando más importancia a los llevados a cabo por países como Francia [9] e Italia y en los cuales se va a centrar este trabajo, por su cercanía con España, son el *Bromopropilato* (Tabla 2 y Figura 3), *Atrazina* (Tabla 3 y

Figura 4), Coumaphos (Tabla 4 y Figura 5), Chlorfenvinphos (Tabla 5 y Figura 6), el Endosulfan α y β (Tabla 6 y Figura 7) y el Chlorpyrifos (Tabla 7 y Figura 8), cuyo uso se está empezando a prohibir debido a su toxicidad y al daño significativo que produce sobre la salud.

3.2 Plaguicidas utilizados

Según la definición de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) un plaguicida, se conoce como *“cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales.”*

Los plaguicidas pueden clasificarse en base a diferentes criterios:

- Según su acción específica pueden considerarse como:
 - *Insecticidas*
 - *Acaricidas*
 - *Fungicidas*
 - *Herbicidas*

- Según su grado de peligrosidad, dentro del cual se separan en:
 - *De baja peligrosidad*: los que por inhalación, ingestión o penetración cutánea no entrañan riesgos apreciables.
 - *Tóxicos*: aquellos que por inhalación, ingestión o penetración cutánea puedan generar riesgos de gravedad limitada.
 - *Nocivos*: relacionados con los que por inhalación, ingestión o penetración cutánea puedan producir riesgos graves, agudos o crónicos, e incluso la muerte.
 - *Muy tóxicos*: haciendo referencia a los que por inhalación, ingestión o penetración cutánea puedan causar riesgos extremadamente graves, agudos o crónicos, o incluso la muerte.

- Según el estado de presentación o sistema utilizado en la aplicación, pueden ser:
 - Gases o gases licuados
 - Aerosoles y fumigantes
 - Polvos con diámetro de partícula inferior a 50 μm
 - Líquidos
 - Sólidos, cebos o tabletas

- Según su constitución química, los plaguicidas pueden clasificarse en varios grupos, siendo algunos de los más importantes:
 - Arsenicales
 - Carbamatos
 - Tiocarbamatos
 - Organoclorados, organofosforados y organometálicos
 - Piretroides
 - Triazinas
 - Derivados de urea

A continuación se detallan los plaguicidas que se han tratado en este trabajo de una forma más específica, atendiendo al nombre más común con el que se encuentran en el mercado comercial, la familia química, estructura, el número CAS identificativo o el ámbito de aplicación que tienen:

Compuesto activo	<i>Fluvalinato- tau</i>	
Nombre comercial	Apistan	
Formula molecular	$\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{O}_3\text{N}_2\text{Cl}$	
Familia química	Piretroide sintético	
Masa molecular (g/mol)	502,15	
Numero CAS	69409-94-5	
Actividad	<i>insecticida y acaricida</i>	

Tabla 1 y Figura 2.- Características y estructura del compuesto *Fluvalinato- tau*.

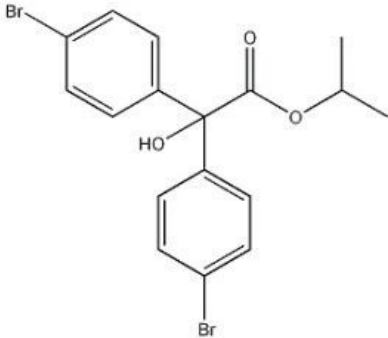
Compuesto activo	<i>Bromopropilato</i>	
Nombre comercial	Acarol	
Formula molecular	C ₁₂ H ₁₆ Br ₂ O ₃	
Familia química	Difenil, bromado	
Masa molecular (g/mol)	425,95	
Numero CAS	18181-80-1	
Actividad	<i>acaricida</i>	

Tabla 2 y Figura 3.- Características y estructura del compuesto *Bromopropilato*.

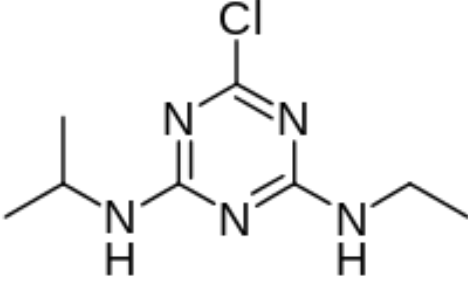
Compuesto activo	Atrazina	
Nombre comercial	Atrazina	
Formula molecular	C ₈ H ₁₄ N ₅ Cl	
Familia química	Triazinas	
Masa molecular (g/mol)	215,68	
Numero CAS	1912-24-9	
Actividad	<i>herbicida</i>	

Tabla 3 y Figura 4.- Características y estructura del compuesto *Atrazina*.

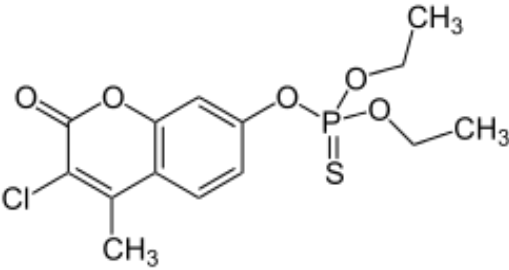
Compuesto activo	Coumaphos	
Nombre comercial	Asuntol, Perizin	
Formula molecular	C ₁₄ H ₁₆ ClO ₅ PS	
Familia química	Organotiofosfato	
Masa molecular (g/mol)	362,00	
Numero CAS	56-72-4	
Actividad	<i>insecticida y acaricida</i>	

Tabla 4 y Figura 5.- Características y estructura del compuesto *Coumaphos*.

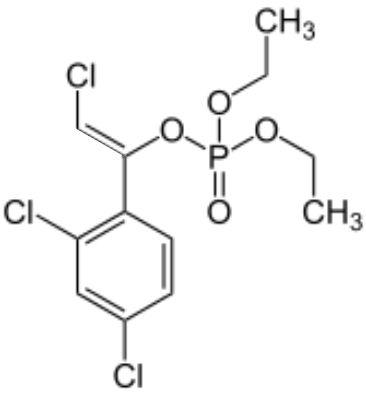
Compuesto	Chlorfenvinphos	
Nombre comercial	Chlorfenvinphos	
Formula molecular	$C_{12}H_{14}Cl_3O_4P$	
Familia química	Organofosforado	
Masa molecular (g/mol)	359,57	
Numero CAS	470-90-6	
Actividad	<i>insecticida</i>	

Tabla 5 y Figura 6.- Características y estructura del compuesto *Chlorfenvinphos*.

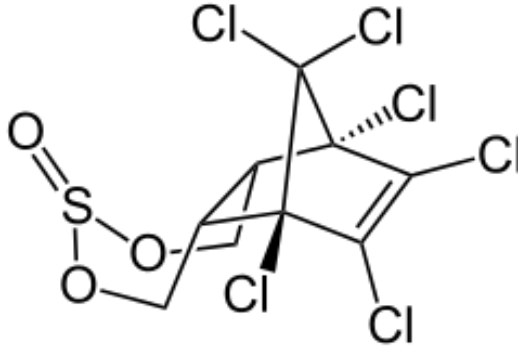
Compuesto	Endosulfan α y β	
Nombre comercial	Benzoepin, Endocel	
Formula molecular	$C_9H_6Cl_6O_3S$	
Familia química	Organoclorado	
Masa molecular (g/mol)	406,95	
Numero CAS	19595-59-6/19670-15-6	
Actividad	<i>insecticida y acaricida</i>	

Tabla 6 y Figura 7. - Características y estructura de los compuestos *Endosulfan α y β* .

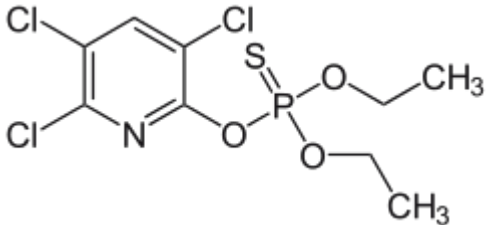
Compuesto	Chlorpyrifos	
Nombre comercial	Chlorpyrifos	
Formula molecular	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	
Familia química	Organotiofosforado	
Masa molecular (g/mol)	321,00	
Numero CAS	2921-88-2	
Actividad	<i>insecticida y acaricida</i>	

Tabla 7 y Figura 8.- Características y estructura del compuesto *Chlorpyrifos*.

- El plaguicida *Endosulfan* es una mezcla de estereoisómeros, designados " α " y " β ," en una relación 7:3, siendo el compuesto *Endosulfan- α* el más estable termodinámicamente, mientras que el *Endosulfan- β* se convierte lenta e irreversiblemente a la forma α a lo largo del tiempo.
- *Chlorpyrifos* es un organofosforado, con una toxicidad aguda en mayores cantidades, provoca defectos neurológicos en el feto y los niños. Está prohibido su uso fuera del ámbito agrícola al igual que le ocurre al *Coumaphos*.
- El *Fluvalinato -Tau* es un compuesto muy activo a altas temperaturas. Su persistencia es de 2 a 4 semanas. Es adsorbido fuertemente por el suelo, especialmente por suelos con alto contenido en materia orgánica.
- La eficacia del *Bromopropilato* no se ve afectada por cambios de temperatura, tiene baja toxicidad, pero una larga vida residual.

3.3 Metodología

Con la búsqueda bibliográfica sobre el análisis de plaguicidas en cera, polen y miel de abeja, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

En los métodos tradicionales de extracción de plaguicidas se han empleado disolventes orgánicos, mezclas de ellos o bien mezclas con agua en diferentes proporciones, siempre teniendo en cuenta la naturaleza de la matriz y de los analitos a determinar.

Atendiendo a los métodos de preparación y extracción de muestra que más se han manejado en la actualidad, resaltan técnicas como la extracción líquido-líquido, [14] aunque este tipo de extracción proporcionó mejores resultados en otras matrices, o el empleo de extracciones en el equipo de ultrasonidos [15], estando éste más enfocado al tratamiento de mieles. Mientras que el método de preparación de muestra que mejores resultados ha ofrecido en el ámbito de los plaguicidas en cera, se basa en una extracción en fase sólida o por el método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, y Safe*), [16] [17], el cual consiste en dos etapas:

Una primera *etapa de preparación y extracción de la muestra*, en la que se 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. En esta etapa, se han encontrado estudios que han usado disolventes muy apolares, con los cuales se han realizado disoluciones de diferentes proporciones con el solvente de extracción, como puede ser la mezcla ACN/hexano [15], el propósito del uso de estos disolventes apolares en los estudios, era eliminar todos los posibles lípidos que hubiera e impedir interferencias en un análisis posterior por espectrometría de masas.

A continuación se realiza la *etapa de limpieza de la muestra o clean up*, en la que una alícuota del extracto se purifica de forma exhaustiva agregando sorbentes de limpieza. Los sorbentes de extracción [16] que mejores resultados ofrecen en esta etapa, según la bibliografía son el PSA (amina primaria y secundaria), el cual se encarga de eliminar el posible contenido en ácidos grasos, azúcares y ácidos orgánicos y C_{18} , de gran utilidad a la hora de eliminar los lípidos y esteroides que se encuentren en la matriz e

interfieren con los analitos. Una variante utilizada en varios estudios bibliográficos para mejorar la limpieza es el uso de dióxido de zirconio [16]. En distintos artículos se ha mencionado que para purificar la cera y obtener una muestra uniforme y purificada, la cera de abeja podía ser fundida en un horno a 80 °C para después ser filtrada [14][17]. Tras ello, la muestra se dejaba solidificar a temperatura ambiente, y a continuación se lavaba con agua para eliminar cualquier residuo de miel. Mientras que en otros se recurría a la congelación [17], ya que es un método simple para la eliminación de lípidos y proteínas del extracto y no requiere ningún reactivo, siendo una operación directa y simple. Esto se debe a que al congelar se facilita la separación del extracto de ACN formado de la cera. En cuanto al análisis, hay varias técnicas analíticas que han ofrecido resultados satisfactorios, las más utilizadas y mencionadas haciendo referencia a la bibliografía han sido la cromatografía de líquidos (LC)[18], la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) [12] [16], y la cromatografía de gases (GC) [11] [17], siendo esta última la que mejores resultados ha proporcionado debido a la gran ventaja de que la fase móvil que utiliza es inerte, por lo tanto no interactúa con las moléculas del analito; siendo su única función la de transportar el analito a través de la columna. Dentro de la GC, pueden usarse dos tipos de columnas, ya sean empaquetadas o capilares, siendo las capilares las que ofrecen mejores resultados debido a su mayor eficacia y reproducibilidad. En lo que respecta a la detección también nos encontramos una variedad de detectores, como pueden ser el detector de *ultra violeta – visible de diodos alineados* (UV- DAD) en los estudios que se decantan por el uso de cromatografía HPLC u otros como el *detector de captura de electrones* (DCE) [11], el *detector fotométrico de llama* (FPD) o el detector de *espectrometría de masas* (MS) o por TOF [14] o MS/MS [14] [21] para su uso por cromatografía de gases.

Con las posibilidades estudiadas en la bibliografía y teniendo en cuenta el trabajo y las investigaciones anteriores llevadas a cabo por el grupo de investigación *TESEA*, se llegó a la conclusión que el tratamiento de muestra que permitiría la puesta a punto de un método para la determinación de los plaguicidas en muestras de cera estampada implicaba realizar una extracción seguida de una etapa de limpieza y concentración, para posteriormente realizar el análisis de los extractos obtenidos por cromatografía de gases acoplado a un detector de espectrometría de masas.

4. OBJETIVO

Desarrollar y optimizar una metodología analítica rápida y sencilla, utilizando como técnica de separación - determinación la GC/MS, que permita identificar y determinar residuos de los ocho plaguicidas en cera estampada.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS

5.1.1 Equipos utilizados

- *Cromatógrafo de Gases* de Agilent Technologies series 7890 A (GC-System) con *inyector automático* de Agilent Technologies 7683 B Series con *bandeja muestreadora* de 100 viales.
- *Detector de espectrometría de masas* Agilent Technologies 5975C (inert XL EI/CI MSD) con analizador cuadrupolar (MS), y fuente de ionización por impacto electrónico, todo ello controlado por el software MSD Productivity *ChemStation Rev.E.02.01* proporcionado por Agilent.

5.1.2 Equipos adicionales y consumibles

- Balanza analítica de precisión EA-240 de Mettler Toledo (Darmstadt, Germany).
- Tubos de centrifuga de 50 mL.
- Pipetas y micropipetas de Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland).
- Agitador oscilante Vibromatic de Selecta (Barcelona, Spain).
- Ultracentrífuga 5810 de Eppendorf AG.
- Baño de ultrasonidos de J.P. Selecta (Barcelona, Spain).
- Columna Agilent Technologies J&W HP-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 mm).
- Rotavapor R-210 de Buchi (Switzerland).
- Material de vidrio de laboratorio de uso general.

5.1.3 Reactivos y disolventes

- Patrones de *Atrazina*, *Chlorpyrifos*, *Chlorfenvinphos*, *Endosulfan- α* , *Endosulfan- β* , *Bromopropilato*, *Coumaphos* y *Fluvalinato-Tau* proporcionados por Dr.Ehrenstofer GmbH (Augsburg, Germany).
- Acetonitrilo "*pestipur*" (ACN) de grado GC de "Carlo Erba Reagents S.A.S".
- Acetato de Etilo y Ciclohexano de grado "*pestipur*" de "Carlo Erba Reagents S.A.S".
- PSA (amina primaria y secundaria) y C18 de la marca "*Supelco*" (Bellefonte, PA, USA).
- Cera estampada purificada.
- Agua Ultrapura obtenida por un equipo compacto que consta de dos unidades de purificación (Milli-RO y Milli-Q) de Millipore (Bedford, MA, USA).

- **Disoluciones**

Las disoluciones patrón se prepararon por pesada de una cantidad exacta y próxima a 10 mg de cada compuesto en 10 mL de Ciclohexano : Acetato de Etilo (80:20, v/v).

Mientras que las disoluciones de trabajo se prepararon por diluciones sucesivas, utilizando el mismo disolvente.

5.2 Condiciones cromatográficas

Las referencias bibliográficas consultadas en su gran mayoría proponen métodos para el análisis de plaguicidas empleando el mecanismo de reparto con un régimen de elución por gradiente térmico. Estas condiciones se tomaron como punto de partida y se resumen a continuación:

- Columna:
Agilent Technologies J&W HP-5 MS (5% Fenil Metilpolisiloxano) (30m × 0,25mm × 0,25mm)
- Flujo de gas portador: Helio, 1,2 mL/min.
- Inyector en modo splitless
- Volumen de inyección de muestra: 1µL
- Temperatura del portal de inyección: 280 °C

El gradiente térmico utilizado se muestra en la siguiente Tabla 8:

Tabla 8.- Gradiente térmico empleado

	Pendiente (°C /min)	Temperatura / °C	Tiempo/ min
<i>Inicialmente</i>	--	60	1
<i>Rampa 1</i>	40	170	--
<i>Rampa 2</i>	10	310	0
<i>Rampa 3</i>	--	310	3

Se estableció un post run durante 5 minutos a una temperatura de 320 °C para arrastrar los componentes fuertemente retenidos.

5.2.1 Condiciones de detección

El sistema que se empleó para la detección de los compuestos fue un espectrómetro de masas cuadrupolar equipado con una fuente de ionización de impacto electrónico (EI), por lo que se obtenían iones positivos.

Se fijaron las temperaturas de la fuente en 230 °C y en el cuadrupolo en 150 °C.

Se realizó un barrido en modo *SCAN*, entre 50 y 400 unidades de m/z , inyectando una mezcla patrón de los compuestos en concentración de 10 ppm, con la finalidad de obtener los espectros de masas para cada uno, que permitirá seleccionar los iones característicos para cada analito.

Algunos de los espectros de masas se muestran en las siguientes Figuras 9 y 10:

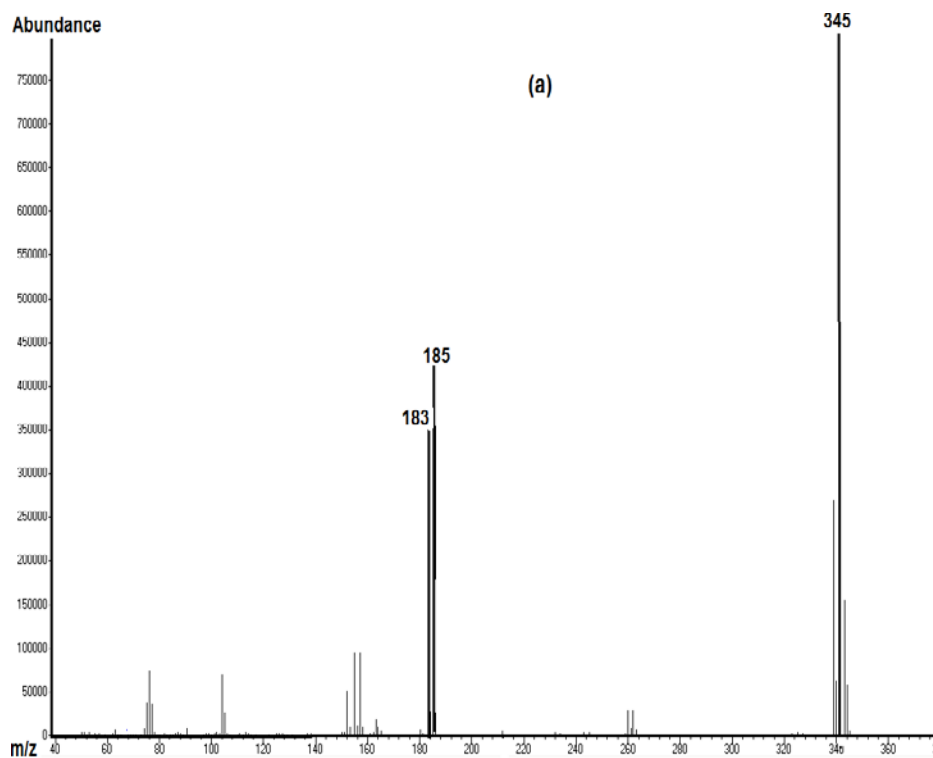


Figura 9 .- Espectro de MS del plaguicida conocido como *Bromopropilato*

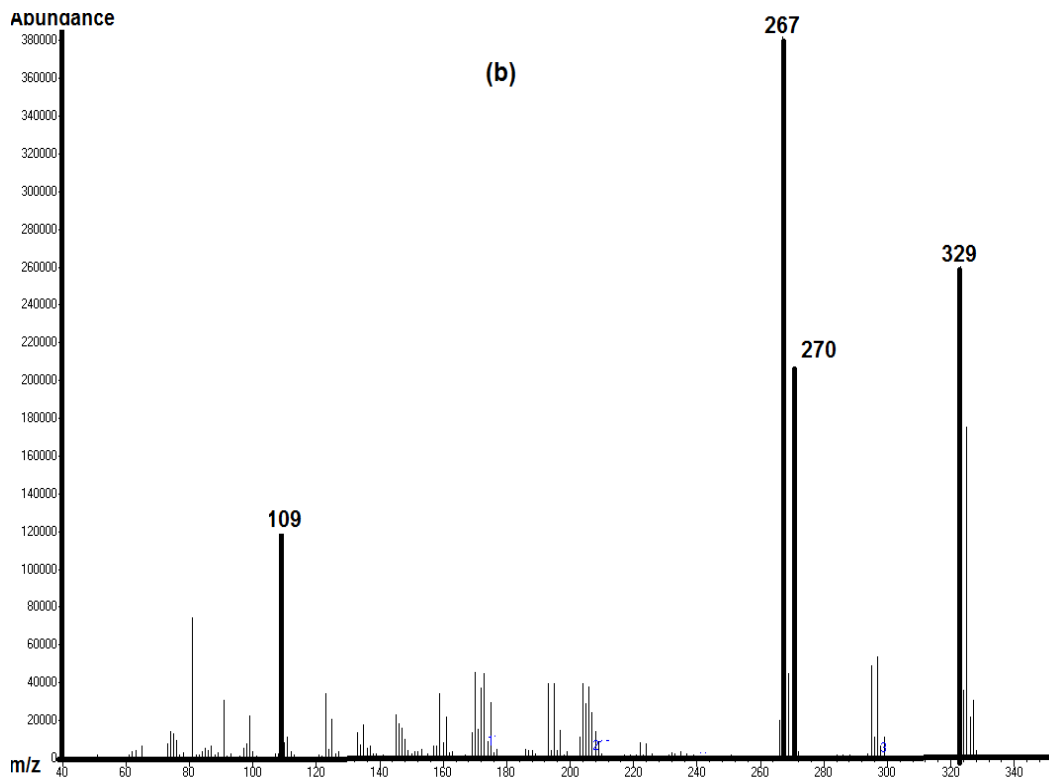


Figura 10 .- Espectro de MS del plaguicida conocido como *Chlorfenvinphos*

A partir de dichos espectros se establecieron tres relaciones m/z características para cada uno de los analitos, seleccionando el ion más intenso para posteriormente cuantificar en modo *SIM*, mientras los otros dos iones se utilizarán para la identificación. En la Tabla 9 se muestran los iones seleccionados para cada compuesto.

Tabla 9.- Iones seleccionados para los compuestos.

Compuesto	m/z	Q ₁	Q ₂
<i>Atrazina</i>	200,1	215,1	173
<i>Chlorpyrifos</i>	196,9	314,97	257,9
<i>Chlorfenvinphos</i>	267	329	269,8
<i>Endosulfan - α</i>	241	195	207
<i>Endosulfan - β</i>	195	207	237
<i>Bromopropilato</i>	345	185	183
<i>Coumaphos</i>	362	226	97
<i>Fluvalinato - Tau</i>	250,1	207	181

Con las condiciones cromatográficas y de detección anteriormente señaladas, se procedió a inyectar en el sistema 1 μL de una mezcla patrón de los 8 compuestos objeto de estudio en concentración de 2,5 ppm en modo *SIM*, obteniéndose el cromatograma que se muestra a continuación en la Figura 11:

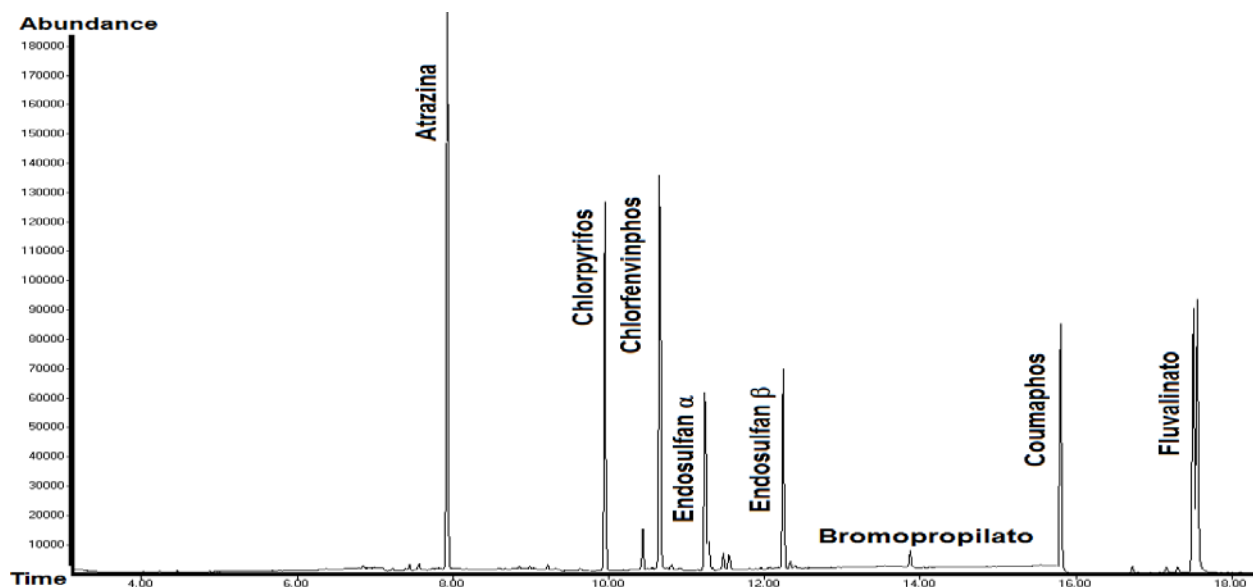


Figura 11.- Cromatograma correspondiente a la inyección de 1 μL de una mezcla patrón de 2,5 ppm de concentración en modo *SIM*, en las condiciones cromatográficas señaladas.

En estas condiciones los tiempos de retención (t_r) para los compuestos se muestran en la siguiente tabla 10:

Tabla 10.- Tiempos de retención para los compuestos en las condiciones cromatográficas seleccionadas.

Compuesto	t_r (min)
<i>Atrazina</i>	7,91
<i>Chlorpyrifos</i>	9,94
<i>Chlorfenvinphos</i>	10,64
<i>Endosulfan - α</i>	11,23
<i>Endosulfan - β</i>	12,23
<i>Bromopropilato</i>	13,88
<i>Coumaphos</i>	15,79
<i>Fluvalinato - Tau</i>	17,60

A continuación se realizó el calibrado para cada compuesto utilizando el método del patrón externo cuantificándose en base al área del pico, realizando la inyección de siete mezclas de los compuestos en un intervalo de concentraciones comprendido entre 0,1 y 10 ppm, en las condiciones cromatográficas descritas en modo *SIM*.

Se aplicó la *prueba t* para verificar la tendencia de la regresión y para asumir una tendencia lineal se ha de cumplir que t_{exp} sea superior a la t_{tab} , obteniéndose la t_{exp} mediante el cociente entre el valor de la pendiente (b) de la recta y la desviación estándar de la misma (s_b). La t_{tab} es la *t-Student* obtenida para $n-2$ grados de libertad y una probabilidad de 0,95.

En todos los casos se cumple que la $t_{exp} > t_{tab}$, por lo tanto se acepta que el método es lineal y la ausencia de bias. Los valores del coeficiente de determinación (r^2) eran para todos los casos mayores de 0,99 lo que indica la bondad del ajuste del calibrado.

5.3 TRATAMIENTO DE MUESTRA

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas más adecuadas, el siguiente paso fue desarrollar un procedimiento de extracción y concentración a fin de eliminar posibles interferentes de la matriz y concentrar los analitos de interés de forma que puedan ser detectados y cuantificados a bajas concentraciones.

Debido a la experiencia del grupo de investigación en el que me incorporé, en el análisis de cera de abeja y lo descrito en la bibliografía, se pensó que el paso previo para la extracción de los compuestos pasaba por fundirla, para lo cual era necesario su calentamiento a una temperatura superior a 65 °C, realizándose en un baño de agua.

Se tomó una muestra de cera estampada purificada y que se suponía que se habían eliminado cualquier residuo de plaguicidas, para utilizarla como blanco de muestra para el desarrollo del tratamiento. Para establecer el tratamiento de muestra, se realizaron una serie de pruebas preparando por triplicado dos tipos de muestras de la siguiente manera:

Muestra de cera sin adicionar los analitos de interés (blanco) y muestra adicionada. Se pesó por duplicado una cantidad exactamente conocida y próxima a 2 gramos de la cera estampada en tubos Falcon. Éstos se introducían en un baño de agua caliente, y a una de las muestras, una vez fundida, se le añadía un volumen fijo de una mezcla patrón de los compuestos objeto de estudio en concentración conocida, en concreto en estos ensayos previos se añadió 1 mL de una mezcla patrón de todos los compuestos en concentración de 0,4 ppm , todos los ensayos que se realizaron para el establecimiento del tratamiento de muestra se realizaron por triplicado.

A continuación era necesaria la adición de un extractante que, según la bibliografía consultada, el disolvente más utilizado para extraer este tipo de compuestos era el ACN o mezclas acuosas de ACN en distintas proporciones. Por lo que en un primer lugar se pensó en utilizar ACN como extractante, fijando un volumen de 10 mL. Una vez añadido, las muestras eran agitadas en vortex durante un corto intervalo de tiempo, operación que se repetía cuatro veces manteniendo siempre las muestras fundidas para favorecer el reparto, lo que implicaba seguirlas manteniendo en el baño de agua. Después de este proceso las muestras se dejaban enfriar a temperatura ambiente y a continuación se congelaban para

favorecer la precipitación de los lípidos durante al menos 2 horas en congelador o con hielo seco. Posteriormente se tomaba un volumen del líquido sobrenadante en un matraz, inicialmente se tomaron 2 mL, y en el rotavapor se concentraba a sequedad a una temperatura de 60 °C. El residuo seco se disolvía en 1 mL de la mezcla Ciclohexano : Acetato de Etilo, se transfería a un vial y se procedía a su inyección en el cromatógrafo. De los cromatogramas que se obtuvieron se puso en evidencia la necesidad de incorporar una etapa de limpieza ya que los cromatogramas mostraban la aparición de picos correspondientes a la matriz que en alguno de los casos se solapaban con los compuestos de interés, impidiendo su cuantificación, incluso en modo *SIM*.

Para realizar la etapa de limpieza se pensó en utilizar PSA y C₁₈ conjuntamente, ya que según la bibliografía consultada proporcionaban una buena eliminación de interferencias en este tipo de matrices.

Se repitió a continuación el mismo tratamiento descrito anteriormente, pero ahora los 2 mL del líquido sobrenadante se transfirieron a tubos de centrifuga y se les añadió 25 mg/mL de PSA y C₁₈, se agitó vigorosamente en vortex y a continuación se centrifugaron durante 5 minutos a 10000 rpm. Posteriormente se decantó el líquido en un matraz y se concentraba a sequedad como en el ensayo inicial.

A continuación se compararon los cromatogramas obtenidos en este último ensayo con los obtenidos en el ensayo inicial, poniéndose en evidencia que la adición de estos sorbentes era necesaria ya que los cromatogramas eran más limpios y se conseguía eliminar la mayor parte de interferencias, por lo que se debía de establecer la cantidad adecuada que de dichos sorbentes se debían de añadir.

El siguiente estudio que se realizó fue para establecer el volumen del extracto que se debía tomar para conseguir límites de detección y cuantificación menores, variándose de 2 a 5 mL, de los resultados que se obtuvieron se estableció un volumen de 4 mL como el adecuado ya que la utilización de volúmenes mayores planteaba problemas en el sentido de que se recogía, algunas veces, parte de sólido lo que proporcionaba poca reproducibilidad.

Al realizar este estudio por otra parte se puso en evidencia que la cera estampada que inicialmente se había supuesto que no tenía residuos de los compuestos objeto de estudio no era cierto, ya que se comprobó, mediante la inyección del extracto reconstituido en Ciclohexano : Acetato de Etilo, en modo SCAN, la existencia de residuos de los plaguicidas *Chlorfenvinphos*, *Coumaphos* y *Fluvalinato - Tau*.

Una vez establecido el volumen del extracto a tratar, el siguiente paso consistió en establecer la cantidad de sorbentes a añadir a los 4 mL, para ello se realizaron una serie de ensayos en los cuales se tomaban 2 g de cera a los que se añadían 10 mL de ACN y se trataban como anteriormente se ha descrito. Después de la precipitación de los lípidos por congelación a cada uno de los extractos se añadió una cantidad distinta de los sorbentes entre 25 y 100 mg y después de agitar, centrifugar y concentrar fueron inyectados en el cromatógrafo. De la observación de los cromatogramas que se obtuvieron se pudo establecer que 50 mg eran los que proporcionaban una eliminación de interferentes, que permitía la elución sin solapamientos de los compuestos de interés, cosa que no se conseguía con la utilización de menores cantidades y que la utilización de mayores cantidades era innecesaria, ya que no se producía ningún efecto positivo.

Con estas condiciones se evaluó el porcentaje de recuperación para los analitos, restando en el caso del *Chlorfenvinphos*, *Coumaphos* y *Fluvalinato - Tau* el área de la muestra sin adicionar al área que proporciona la muestra adicionada con una mezcla en concentración de 0,4 ppm. Los porcentajes de recuperación que se obtuvieron, con respecto al área que proporciona la mezcla patrón de 0,4 ppm aparecen en la Tabla 11:

Tabla 11.- Porcentajes de recuperación frente a un mezcla patrón de 0,4 ppm.

Compuesto	% Recuperación
<i>Atrazina</i>	70,6
<i>Chlorpyrifos</i>	65,5
<i>Chlorfenvinphos</i>	75,2
<i>Endosulfan - α</i>	63,7
<i>Endosulfan - β</i>	65,8
<i>Bromopropilato</i>	72,5
<i>Coumaphos</i>	78,6
<i>Fluvalinato - Tau</i>	72,1

Como se puede observar en la Tabla 11 los porcentajes de recuperación para algunos de los compuestos son inferiores al 70%, por lo que se pensó en que era necesario aumentarlos, para lo cual se consideró, según la revisión bibliográfica, utilizar para la extracción de los compuestos en lugar de solo ACN, una disolución acuosa de ACN.

Por lo que los siguientes ensayos se realizaron tomando, como en los ensayos anteriores, dos muestras de la cera estampada de una cantidad exactamente conocida y próxima a 2 g, se fundía y a una de las muestras se le añadió 1 ml de una mezcla patrón en concentración de 0,4 ppm. Posteriormente a ambas muestras se les añadió 10 mL de una mezcla ACN: H₂O (9:1, v/v), siendo las siguientes etapas del tratamiento idénticas a las ya descritas.

Los resultados que se obtuvieron aparecen descritos en la siguiente Tabla 12:

Tabla 12.- Porcentajes de recuperación usando una disolución acuosa de ACN

Compuesto	% Recuperación
<i>Atrazina</i>	93,0
<i>Chlorpyrifos</i>	86,9
<i>Chlorphenvinphos</i>	92,4
<i>Endosulfan - α</i>	91,6
<i>Endosulfan - β</i>	85,8
<i>Bromopropilato</i>	80,0
<i>Coumaphos</i>	94,3
<i>Fluvalinato - Tau</i>	93,0

Como se puede observar en la Tabla 12, la presencia del agua en el disolvente extractante incrementa el porcentaje de recuperación para todos los compuestos, por lo que se seleccionó como más adecuada para el resto del trabajo.

Por último se pensó en la posibilidad de que algo de los compuestos quedasen retenidos en el sólido sorbente. Para comprobarlo se realizó, sobre nuevas muestras igual tratadas, después de la centrifugación y de recoger el extracto en un matraz, la adición de otros 5 mL de la mezcla extractante, se agitó en el vortex durante un corto intervalo de tiempo (\approx 30s), luego se centrifugó y el líquido sobrenadante se vertió en el mismo matraz que contenía el extracto de la primera extracción.

Como en los otros ensayos se concentró a sequedad en rotavapor y el residuo seco se disolvió en 1 mL de la mezcla Ciclohexano : Acetato de Etilo. Los resultados se muestran en la Tabla 13:

Tabla 13.- Porcentajes de recuperación obtenidos con 2 extracciones frente a un mezcla patrón de 0,4 ppm

Compuesto	% Recuperación
<i>Atrazina</i>	100,2
<i>Chlorpyrifos</i>	97,2
<i>Chlorfenvinphos</i>	100,7
<i>Endosulfan - α</i>	101,1
<i>Endosulfan - β</i>	98,2
<i>Bromopropilato</i>	97,6
<i>Coumaphos</i>	99,7
<i>Fluvalinato - Tau</i>	101,8

De la observación de la Tabla 13, con esta segunda extracción se consigue la recuperación casi cuantitativa de todos los compuestos.

Por lo que el tratamiento de muestra que se propone para realizar la determinación de los 8 plaguicidas en cera de abeja estampada se resume en la siguiente Figura 12:

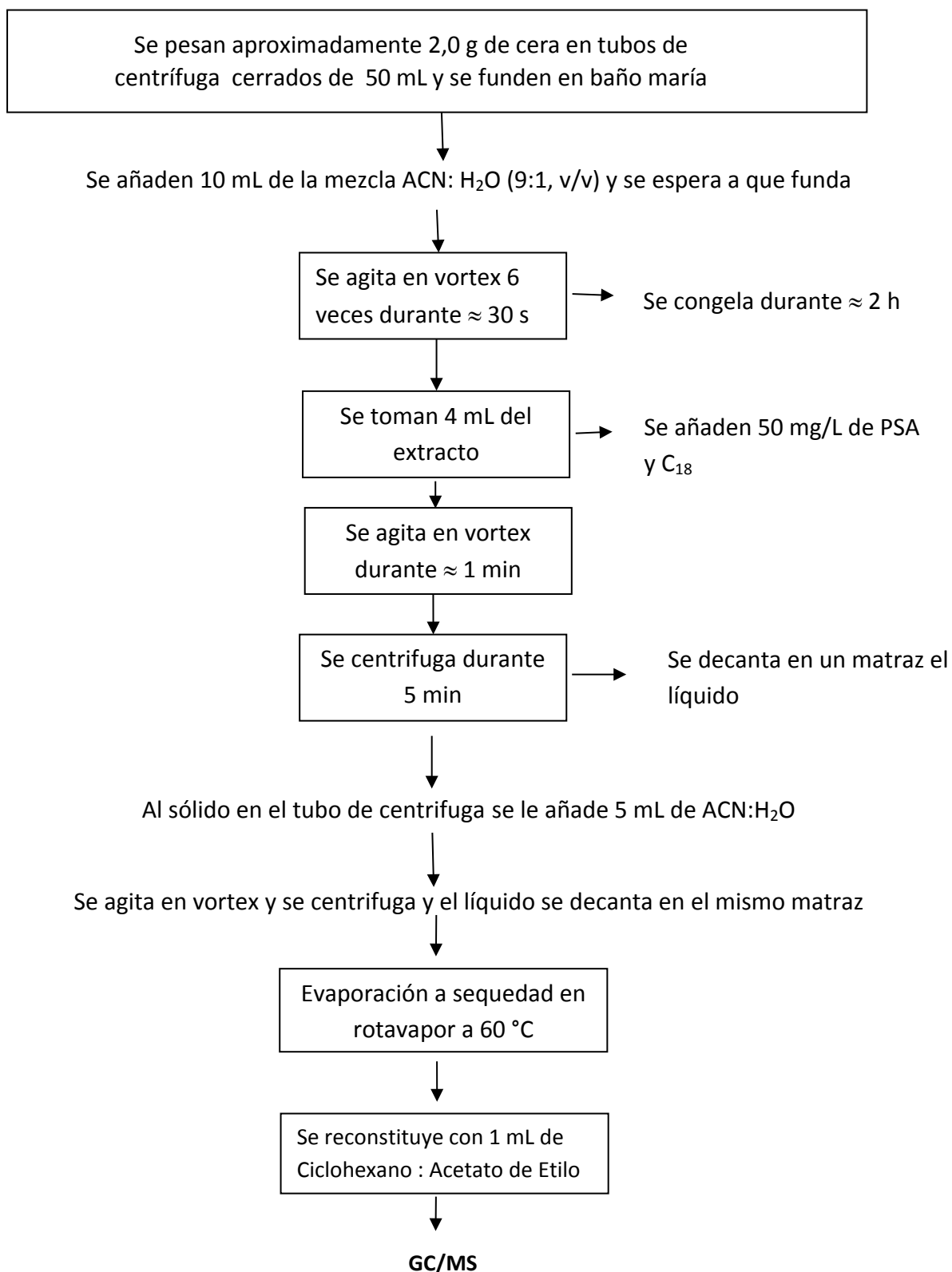


Figura 12.- Esquema del procedimiento analítico para la determinación de plaguicidas en cera.

En la siguiente Figura 13 se muestra un cromatograma correspondiente a la inyección de 1 μL en Splitless y modo *SIM* en las condiciones cromatográficas descritas de una muestra de cera adicionada con una mezcla patrón de los 8 compuestos en concentración de 0,6 ppm.

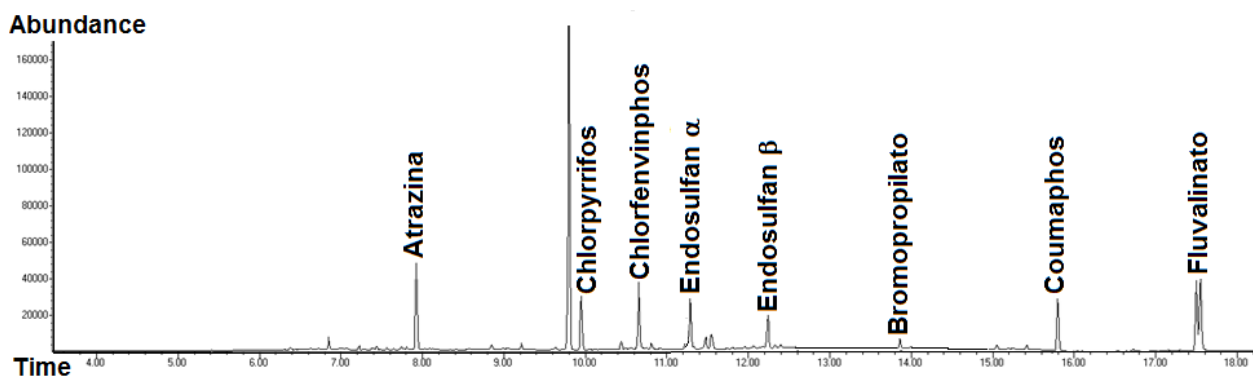


Figura 13.- Cromatograma correspondiente a una muestra de cera tratada según el procedimiento que se propone.

De la observación del cromatograma se desprende que es posible la determinación de los compuestos ya que no existe ningún tipo de solapamiento con interferentes y la resolución entre los picos es adecuada.

Hasta ahora, los porcentajes de recuperación que se han dado, se han calculado con respecto al calibrado para cada compuesto obtenido con mezclas de los compuestos en el disolvente utilizado, no obstante se planteó la posibilidad de que existiera efecto matriz, por lo que era necesario, para comprobar su existencia o no, realizar un calibrado en matriz.

Para la realización de dicho calibrado se pesaron 7 muestras de 2 g de la cera estampada utilizada en todo el trabajo, que fueron tratadas según el procedimiento que se propone, la única diferencia fue que los residuos sólidos obtenidos después de la evaporación a sequedad fueron reconstituidos con 1 mL de mezclas de patrones, de concentraciones comprendidas en un intervalo entre 0,15 y 10 ppm, en Ciclohexano : Acetato de Etilo. Posteriormente se inyectó 1 μL en Splitless en modo *SIM* en las condiciones cromatográficas descritas. A partir de los cromatogramas correspondientes se calibró por el método del patrón externo, representando el área para cada compuesto frente a la concentración.

En todos los casos se cumple que la $t_{exp} > t_{tab}$, por lo tanto se acepta que el método es lineal y la ausencia de bias. Los valores del coeficiente de determinación (R^2) eran para todos los casos mayores de 0,99 lo que indica la bondad del ajuste del calibrado. Para verificar el efecto matriz se realizó la comparación de las pendientes del calibrado obtenido con patrones en el disolvente con las obtenidas en el calibrado con matriz cuyos resultados indicaron que los valores de las pendientes para cada compuesto se encontraban dentro del mismo intervalo de confianza de la pendiente ($p=0,95$) en el calibrado con patrones. Quedando de esta manera demostrada la ausencia de efecto matriz. Por último se evaluó la eficacia, expresada como el porcentaje de recuperación, del tratamiento de muestra que se propone, para tres niveles de concentración, bajo (0,3 ppm), medio (2,5 ppm) y alto (10 ppm). Los resultados de tres réplicas se detallan en la siguiente Tabla 14:

Tabla 14.- Evaluación de la eficacia del tratamiento que se propone para la determinación de plaguicidas en cera.

Compuesto	Concentración	%R(medio)± RSD (%)
Atrazina	0,3250	100,5 ± 4
	2,6000	95,7 ± 3
	10,4000	94,9 ± 2
Chlorpyrifos	0,3590	101,5 ± 3
	2,8750	98,1 ± 4
	11,5000	99,9 ± 2
Chlorphenvinphos	0,3380	103,6 ± 5
	2,7000	104,5 ± 3
	10,8000	101,2 ± 4
α Endosulfan	0,3280	99,4 ± 5
	2,6250	96,6 ± 5
	10,5000	101,6 ± 3
β Endosulfan	0,3340	101,3 ± 4
	2,6750	99,6 ± 5
	10,7000	101,8 ± 2
Bromopropilato	0,3375	97,3 ± 6
	2,7000	97,6 ± 4
	10,8000	99,9 ± 2
Coumaphos	0,3470	99,8 ± 5
	2,7750	102,0 ± 6
	11,1000	101,9 ± 3
Fluvalinato - Tau	0,3375	98,7 ± 6
	2,7000	97,2 ± 5
	10,8000	100,8 ± 2

Como se puede observar en la anterior Tabla 14 el tratamiento proporciona elevada eficacia y reproducibilidad, ya que las desviaciones standard para los tres niveles de concentración ensayados para cada compuesto, son inferiores al 10%.

6. APLICACIÓN DEL MÉTODO

El método se aplicó a la determinación del contenido en plaguicidas de la cera estampada utilizada a lo largo del desarrollo de todo el trabajo. Como ya se indicó anteriormente en esta memoria, se detectó la presencia de residuos de algunos de los plaguicidas, cuando se trató la cera sin adicionar y el extracto evaporado a sequedad y reconstituido en el disolvente empleado a lo largo de todo el trabajo, se inyectó en el cromatógrafo en las condiciones establecidas pero en modo *SCAN*, en el cromatograma que se obtuvo aparecían picos a los tiempos de retención correspondientes al *Chlorfenvinphos*, *Coumaphos* y *Fluvalinato - Tau*, comprobándose, a través de la obtención de los espectros de MS, que efectivamente se trataba de la presencia de dichos compuestos ya que en los espectros aparecían en las mismas proporciones tanto los iones de cuantificación como los de cualificación. Uno de los cromatogramas obtenidos en modo *SCAN* correspondientes a una muestra de cera sin adicionar se muestra en la siguiente Figura 14 y en la Figura 15 (a) el mismo cromatograma pero extrayendo los iones característicos para *Ch*, *CP* y *F-Tau* y en la Figura 15 (b) extrayendo los iones de los otros 5 compuestos analizados.

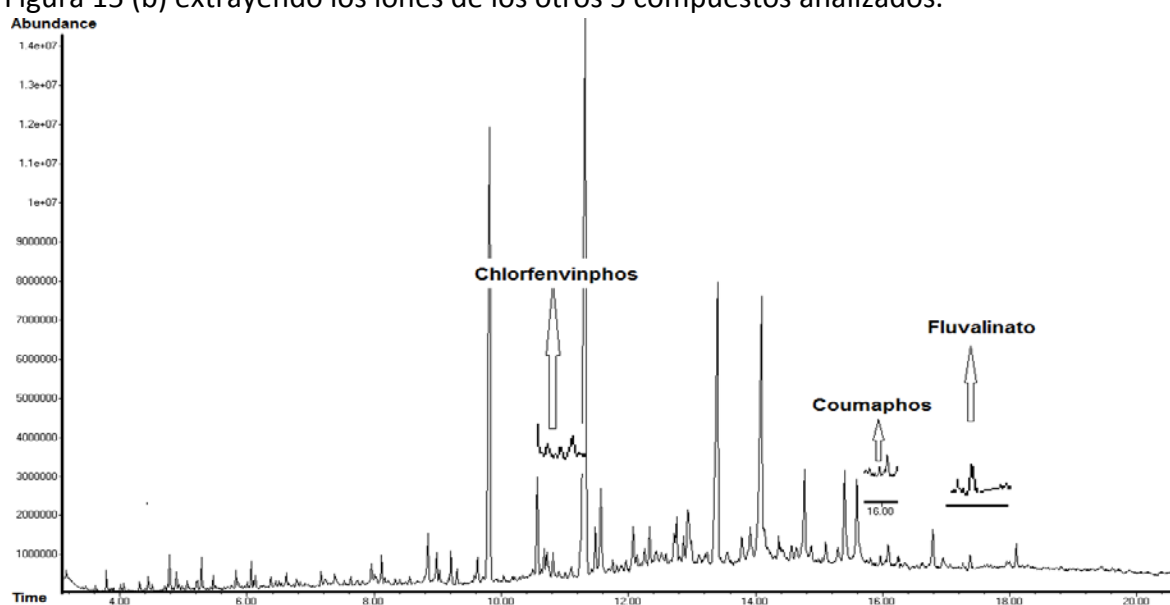


Figura 14.- Cromatograma correspondiente a una cera estampada sin adicionar, obtenido en modo *SCAN*

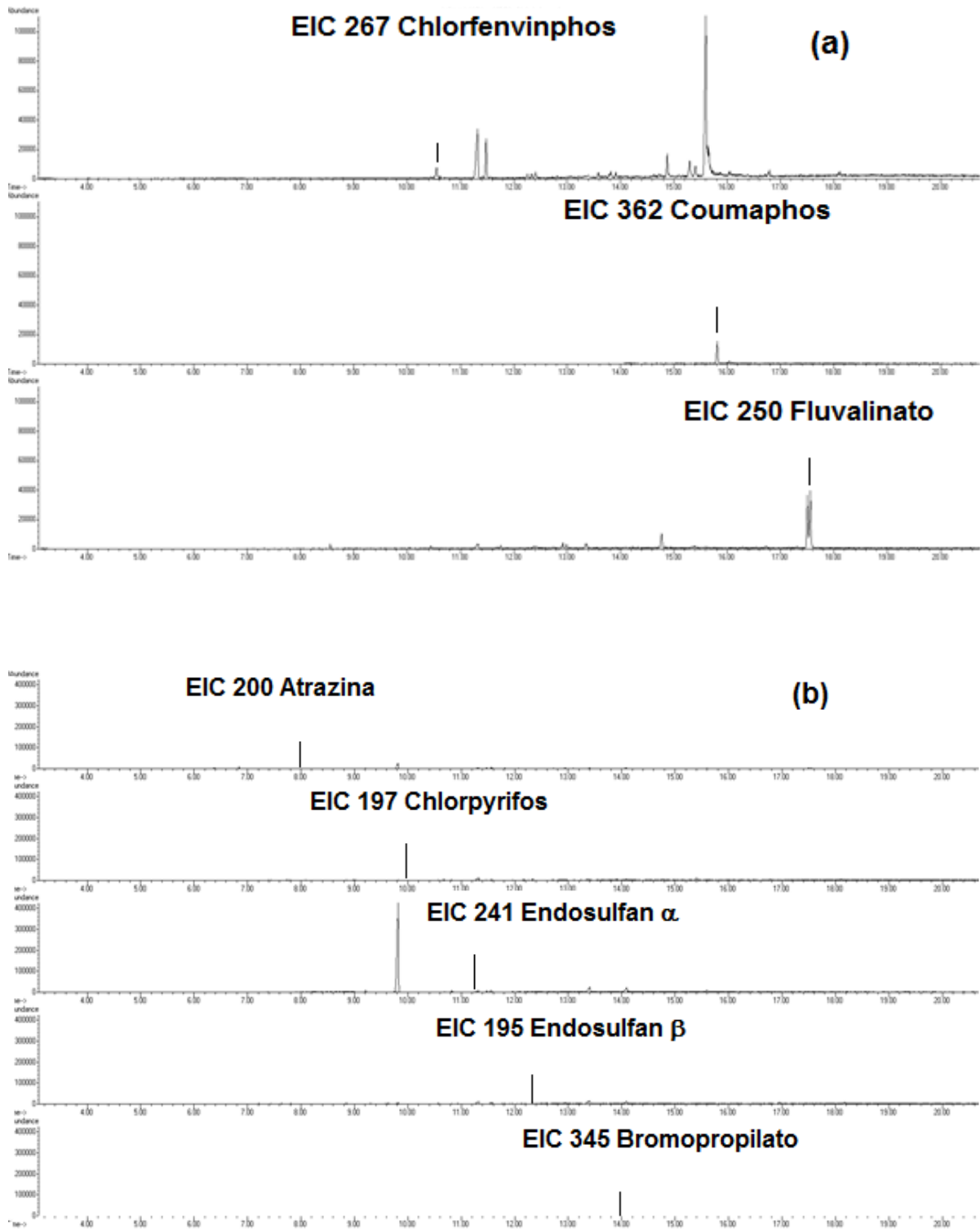


Figura 15.- Cromatogramas de los iones extraídos para los 8 compuestos objeto de estudio.

Como se puede observar en los anteriores cromatogramas, al tiempo de retención de los analitos, solo aparecen picos correspondientes al *Ch*, *CP* y *F- Tau*, mientras que a los tiempos de retención de otros compuestos (marcados por rayas) no aparecen picos, lo cual indica la ausencia de residuos en la cera de los mismos.

Aparte de comprobar la identidad de estos compuestos a través de los espectros de MS, se realizó la cuantificación de los mismos utilizando el método de adiciones patrón, la concentración determinada para cada uno de ellos se muestra en la Tabla 15:

Tabla 15.- Concentraciones de los residuos de *CH*, *CP* y *F- Tau* encontradas en la cera estampada de abeja utilizada.

Compuesto	ppm	µg/Kg
<i>Chlorfenvinphos</i>	0,0429	21,36
<i>Coumaphos</i>	0,4875	242,77
<i>Fluvalinato - Tau</i>	2,3443	1167,42

Que aunque no son cantidades elevadas en relación con las que aparecen en la bibliografía para estos compuestos en muestras de otros países, muestran que la limpieza de la cera todavía debe ser mejorada, debe tenerse en cuenta que la muestra seleccionada para verificar el estudio es teóricamente la más pura que existe en el mercado.

7. CONCLUSIONES

- Se ha desarrollado un método analítico para separar y determinar ocho plaguicidas en cera estampada de abeja por cromatografía de gases empleando un detector de masas cuadrupolar.
- La separación se ha llevado a cabo por reparto, utilizando una columna J&W HP-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 mm) en régimen de gradiente térmico, empleando como fase móvil Helio a un flujo de 1,2 mL/min.
- La extracción de los analitos de la cera se ha llevado a cabo a través de un procedimiento de extracción con ACN: H₂O, limpieza de los extractos con PSA y C₁₈ y concentración en rotavapor.
- Los valores de los porcentajes de recuperación obtenidos son superiores al 90% en los tres niveles de concentración estudiados para todos los analitos.
- La cuantificación de los compuestos se puede realizar a través de las líneas de calibrado con patrones, ya que se ha comprobado la ausencia de efecto matriz.
- A pesar de que las muestras de cera estampada habían sido purificadas y teóricamente estaban exentas de plaguicidas, se han detectado cantidades residuales de *Chlorfenvinphos*, *Coumaphos* y en mayor proporción de *Fluvalinato - Tau*.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] BioEnciclopedia: Clasificación de la abeja melífera (<http://www.bioenciclopedia.com/abeja/>)
- [2] Tulloch A.P. (2015). Beeswax composition and analysis. *Praire Regional Laboratory, National Research Council of Canada.*
- [3] Bradbear N. (2005). La apicultura y los medios de vida sostenibles. *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO.*
- [4] Boi M., Serra G., Colombo R., Lodesani M., Massi S. and Costa C. A 10 year survey of acaricide residues in beeswax analysed in Italy. *Pest Management Science*; 72 (2016) 1366-1372
- [5] Aditivos alimentarios (<http://www.aditivos-alimentarios.com/>)
- [6] Manual básico de apicultura, Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación.
- [7] Ugalde F.D. (2015). La Cadena de Valor de la Cera de Abejas. *Tecnología para la Industrialización Apícola.*
- [8] González Coto J. D. Bioindicadores como aliados en el monitoreo de condiciones ambientales. *Éxito Empresarial / No. 252, (2014)*
- [9] Chauzat M.P. , Faucon J.P., Martel A.C. Lachaize J.,Cougoule N., Aubert M. A Survey of Pesticide Residues in Pollen Loads Collected by Honey Bees in France. *Journal of Economic Entomology*, Volume 99, Issue 2 . (2006) 253-262
- [10] Reglamento (ce) Nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea.*
- [11] Dainat B., Evans J. D.,Ping Chen Y., Gauthier L. and Neumann P.. Dead or Alive: Deformed Wing Virus and Varroa destructor Reduce the Life Span of Winter Honeybees. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(4) (2012) 981

- [12] Neira C.M.; Kaulzarich R.C.; Navarro D.G.; Dörner C.K. y Manquián T.N. Residuos de *fluvalinato - tau* (piretroide) en la cera de la cámara de cría y su efecto sobre larvas de abejas de la casta obrera (*Apis mellifera* L.) *Agro Sur Vol.* 39 (2011) (1)
- [13] Korta E., Bakkali A., Berrueta L. A, Gallo B., Vicente F., Kilchenmann V., y Bogdanov S. Study of Acaricide Stability in Honey. Characterization of Amitraz Degradation Products in Honey and Beeswax. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* Vol 49 (12), (2001) 5835- 842
- [14] Jimenez 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
- [15] Rezid, 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
- [16] 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.* vol 65, (2017) 1296 -1305
- [17] 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
- [18] 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, Chemosphere* 163, (2011), 44 – 53

[19] Parrilla Vázquez P., Lozano A., Uclés S., Gómez Ramos M.M., Fernández-Alba A.R.. A sensitive and efficient method for routine pesticide Multiresidue analysis in bee pollen samples using gas and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1426, (2015) ,161- 173

[20] Gil García M.D., Uclés Duque S., Lozano Fernández A.B., Sosa A., Fernández-Alba A.R.,. Multiresidue method for trace pesticide analysis in honeybee wax comb by GC-QqQ -MS., *Talanta* 163, (2017) 54 - 64.

[21] Herrera López S., Lozano A., Sosa A, Hernando M. D., Fernández-Alba A. R, Screening of pesticide residues in honeybee wax comb by LC-ESI-MS/MS. A pilot study. *Chemosphere*, 163 (2016), 44-53

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Características del compuesto *Fluvalinato - tau*.

Tabla 2. Características del compuesto *Bromopropilato*.

Tabla 3. Características del compuesto *Atrazina*.

Tabla 4. Características del compuesto *Coumaphos*.

Tabla 5. Características del compuesto *Chlorfenvinphos*.

Tabla 6. Características de los compuestos *Endosulfan α y β* .

Tabla 7. Características del compuesto *Chlorpyrifos*.

Tabla 8. Gradiente térmico empleado.

Tabla 9. Iones seleccionados para los compuestos.

Tabla 10. Tiempos de retención para los compuestos en las condiciones cromatográficas seleccionadas.

Tabla 11. Porcentajes de recuperación frente a un mezcla patrón de 0,4 ppm.

Tabla 12. Porcentajes de recuperación usando una disolución acuosa de *ACN*.

Tabla 13. Porcentajes de recuperación obtenidos con 2 extracciones frente a un mezcla patrón de 0,4 ppm.

Tabla 14. Evaluación de la eficacia del tratamiento que se propone para la determinación de plaguicidas en cera.

Tabla 15. Concentraciones de los residuos de CH, CP y F encontradas en la cera estampada de abeja utilizada.

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Cera estampada.

Figura 2. Estructura del *Fluvalinato – Tau*.

Figura 3. Estructura del *Bromopropilato*.

Figura 4. Estructura de la *Atrazina*.

Figura 5. Estructura del *Coumaphos*.

Figura 6. Estructura del *Chlorfenvinphos*.

Figura 7. Estructura del *Endosulfan α y β* .

Figura 8. Estructura del *Chlorpyrifos*.

Figura 9. Espectro de MS del *Bromopropilato*.

Figura 10. Espectro de MS del *Chlorfenvinphos*.

Figura 11. Cromatograma correspondiente a la inyección de 1 μ L de una mezcla patrón en concentración 2,5 ppm en modo SIM, en las condiciones cromatográficas señaladas.

Figura 12. Esquema del procedimiento para la determinación de plaguicidas en cera.

Figura 13. Cromatograma correspondiente a una muestra de cera tratada según el procedimiento que se propone.

Figura 14. Cromatograma correspondiente a una cera estampada sin adicionar, obtenido en modo SCAN

Figura 15. Cromatogramas de ion extraído para los 8 compuestos objeto de estudio

