



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

Determinación de plaguicidas en miel

Autora:

María Mena Serna

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 a mi compañero de vida todo el ánimo y apoyo mostrado durante estos 4 años.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	7
2. RESUMEN	9
3. ABSTRACT	10
4. ANTECEDENTES Y SITUACIÓN DEL TEMA	11
4.1. Contaminación e impacto ambiental	13
4.2. Plaguicidas analizados	14
4.3. Métodos de preparación de muestras	21
5. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO	23
5.1. Objetivo	23
5.2. Plan de trabajo	23
6. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS	25
6.1. Equipo utilizado	25
6.2. Equipos adicionales	26
6.3. Reactivos y disolventes	28
7. PARTE EXPERIMENTAL	29
7.1. Condiciones del análisis.....	29
7.2. Preparación de patrones para las líneas de calibrado	31
7.3. Optimización.....	35
7.4. Obtención de líneas de calibrado en matriz.....	40
8. CONCLUSIONES	47
9. ABREVIATURAS	49
10. LISTADO DE FIGURAS	50
11. LISTADO DE TABLAS	52
12. BIBLIOGRAFÍA	55

1. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo está orientado a examinar la presencia en la miel de residuos de los principales compuestos habitualmente empleados en el tratamiento de las colmenas a través de su migración desde la cera. Para ello es necesario disponer de metodología sencilla que permita evaluarlos a bajas y medias concentraciones dado que la cera como reservorio está frecuentemente contaminada en muy diferentes concentraciones.

La investigación se ha establecido en dos vertientes por una parte (la que se presenta en esta memoria) la puesta a punto de métodos para la evaluación de esos residuos en diferentes tipos de miel y, posteriormente, ver cómo migran desde la cera estampada, en contacto con las colmenas, hasta la miel.

Se ha realizado la primera parte, incluyendo una amplia revisión bibliográfica y, teniendo en cuenta la experiencia previa del grupo de investigación, se han realizado numerosos ensayos y se han examinado algunos tipos de miel. Lamentablemente, no se han podido iniciar los estudios de transferencia puesto que el laboratorio se cerró en marzo y no hemos tenido acceso al equipamiento que ya teníamos pendiente de entrega y, por tanto, no ha sido posible hasta el momento reanudar la actividad presencial. Confiamos en que en un futuro se pueda completar el estudio.

2. RESUMEN

Debido a la importancia de las abejas para la sociedad tanto por su papel clave con el medioambiente como por sus productos: ceras, miel... es primordial su cuidado a la hora de realizar tratamientos sobre las colmenas. Los residuos mayormente encontrados para el tratamiento de las colmenas son los acaricidas. Esto es causa directa de la presencia del ácaro *Varroa destructor*, culpable de la muerte de miles de individuos de la colmena. Aun así, estos tratamientos pueden llegar a resultar potencialmente dañinos para las abejas e incluso para el ser humano si se utilizan en cantidades superiores a las recomendadas.

Por ello, el presente trabajo se centra en la optimización de un método analítico para la determinación de siete plaguicidas, que son los que se emplean con mayor frecuencia, por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC-MS). Se han estudiado distintas variables que pudieran afectar a la extracción de dichos plaguicidas de una matriz como es la miel siendo la extracción líquido-líquido la utilizada y como disolvente extractante AcOEt:C₆H₁₂ en proporción 50:50 v/v.

Esta optimización se ha realizado con el fin de obtener un método analítico en el que el efecto matriz fuera el menor posible teniendo, a su vez, unos porcentajes de recuperación suficientemente buenos. Por lo tanto, se optó por la proporción de disolvente 50:50 AcOEt:C₆H₁₂, no utilizar sales de secado y un tiempo de agitación de 10 minutos.

Una vez optimizado el método de extracción se procedió a la determinación de dichos analitos en muestras de mieles comerciales.

3. ABSTRACT

Due to the importance of bees to society both for their key role with the environment and for their products: waxes, honey... is vital their care when performing treatments on hives. The most commonly found residues for the treatment on hives are acaricides. This is because of the presence of the parasitic mite *Varroa destructor*, responsible for the deaths of thousands honey bees. Even so, these treatments can be potentially harmful to bees and even for humans if they are used in quantities higher than recommended.

That is the reason why this essay focuses on the optimization of an analytical method which determines seven of the most frequent pesticides using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Different variables that could affect the extraction of these pesticides from a matrix such as honey have been studied once the liquid-liquid extraction has been chosen using AcOEt:C₆H₁₂ 50:50 (v/v) as solvent extractant.

This optimization has been carried out in order to obtain an analytical method in which the matrix effect was the light as possible having as well recovery percentages good enough. Therefore, the solvent ratio 50:50 AcOEt:C₆H₁₂ was chosen, no salts were used and a shaking time of 10 minutes.

Once the extraction method has been optimized, the analytes were determined in commercial honey samples.

4. ANTECEDENTES Y SITUACIÓN DEL TEMA

La matriz que se va a estudiar, la miel, es de sobra conocida. A continuación, se dan algunos datos que tienen interés en relación con su posterior tratamiento.

La miel tiene muchos beneficios para la salud como pueden ser la regulación del azúcar en sangre, la reducción del estrés metabólico, el tratamiento de pieles o labios secos...

El proceso de formación de la miel comienza con las abejas melíferas y la absorción del néctar de las flores introduciéndolo en su buche de manera que así lo transportan hasta la colmena. Una vez allí, el néctar es entregado a las abejas conocidas como obreras jóvenes antes de disponerse a volver a buscar más néctar.

Las abejas del interior de la colmena rápidamente se encargan de transformar dicho néctar en la miel. Para que el proceso se lleve a cabo por completo pueden llegar a pasar varios días, dependiendo de las condiciones en la colmena como son la humedad del interior y la temperatura tanto interior como exterior. Este proceso consiste en rebajar el porcentaje de humedad desde un 60% hasta menos del 20%.

Miles de abejas jóvenes, que todavía no han salido de la colmena, se pasan el néctar de unas a otras enriqueciéndolo al mismo tiempo con enzimas, que ellas mismas segregan. El trabajo de procesamiento de los excedentes de néctar que se han depositado sobre las paredes del panal es completado por las abejas jóvenes, nodrizas y pecoreadoras.

Aun así, el néctar es depositado en las celdas de los panales para que siga perdiendo humedad hasta llegar al grado de maduración perfecto en torno al 18%. En el momento en el que las abejas consideran que la miel está lista, sellan la celda con una fina capa de cera; este proceso se llama el operculado de las celdas y es la señal que indica a los apicultores que pueden proceder a la recogida de la miel. Durante todo el proceso de deshidratación del néctar, la pérdida de humedad es aprovechada por las abejas para refrigerar la colmena, creando corrientes de aire entre los panales por cientos de abejas ventiladores que consiguen bajar la temperatura interior de la colmena en más de 15°C y así poder mantener constante la temperatura del nido de cría, que siempre ronda los 36°C ^[1].

Así, la miel natural será aquella que no haya sido calentada por encima de los 43°C ni sometida a procesos como la pasteurización.

En la industria, la pasteurización se utiliza para evitar la cristalización de la miel, perdiéndose en el proceso gran parte de las enzimas y de los antioxidantes.

Los componentes de la miel se muestran en una tabla a continuación:

Tabla 1. Componentes de la miel y su rango en porcentaje [2].

Componentes	Rango (%)
Agua	14-22
Fructosa	28-44
Glucosa	22-40
Sacarosa	0,2-0,7
Maltosa	2,0-7,0
Otros azúcares	0,1-8,0
Proteínas y aminoácidos	0,2-2,0
Vitaminas, enzimas, hormonas, ácidos orgánicos y otros	0,5-1,0
Minerales	0,5-1,5
Cenizas	0,2-1,0

Los minerales más frecuentes en las mieles son calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, zinc, fósforo y potasio. Entre los ácidos orgánicos presentes en las mieles podemos encontrar el ácido acético y el ácido cítrico entre otros. En cuanto a las vitaminas encontraríamos vitaminas del complejo B, vitamina C, D, E y antioxidantes como flavonoides y fenólicos.

El color de la miel varía entre los diferentes tipos de ésta y está determinado por la fuente floral e incluso de las características del suelo (minerales, pigmentos...) [2].

En el presente trabajo se pueden observar distintas características dependiendo de la miel:

Tabla 2. Características de las mieles tales como color, sabor, aroma y cristalización.

	Miel de romero	Miel multifloral
Color	Dorado hacia amarillento	Rojiza
Sabor	Dulce, intenso, con sabor a romero	Diversos sabores de gusto dulce intenso
Aroma	Poco intenso	Floral tenue
Cristalización	Rápida y fina	Relativamente rápida y en cristal fino

4.1. Contaminación e impacto ambiental

El estudio de las consecuencias de usar un plaguicida conlleva considerar el peligro que produce la dispersión del producto y tener en cuenta los organismos afectados en dicha dispersión. Esto conduce a que dentro de un análisis ambiental se tenga que estudiar si es más peligrosa la volatilización del producto o, en cambio, si es más nociva su percolación a aguas profundas. A su vez, hay que tener en cuenta la toxicidad para los seres vivos que puedan verse en contacto con el plaguicida ya que hay estudios que indican que la cantidad de plaguicida que entra en contacto directo o es consumida por el organismo blanco (organismo que se desea controlar) es una fracción extremadamente pequeña del total aplicado, del orden del 0,3%, es decir, el 99,7% del producto va a parar a otro lugar o actúa sobre organismos que no son el organismo blanco, por lo que habría que tener en cuenta el uso de plaguicidas de baja toxicidad y persistencia ^[3,4].

Wilmart et al. ^[5] estudiaron el riesgo que supone la exposición de los consumidores a estos residuos analizando muestras de miel y de cera de abejas contaminadas. Evaluaron PPPs (Plant Protection Products) tales como el Clorfenvinfos y se encontraron en la colmena tanto restos de plaguicidas que sí que habían sido utilizados para el cuidado de la colmena como otros PPPs que no ^[6].

En Europa plaguicidas como el Cumafós, utilizado para tratamiento veterinario, tiene su MRL (Maximum Residue Level) de 100-200 µg/kg según la regulación europea Nº 37/2010. Sin embargo, su uso para proteger las colmenas contra el ácaro *Varroa destructor* está prohibido en algunos países. El uso ilegal de químicos no autorizados como alternativa a la limitación que presentan los tratamientos que sí que están autorizados puede llegar a la intoxicación de especies como las abejas e incluso el ser humano.

Otro problema que podemos encontrar para acaricidas sintéticos como el Cumafós y el τ-Fluvalinato es que tienen una eficacia variable dependiendo del clima, de las condiciones dentro de la colmena y de la técnica de aplicación (Gracia et al., 2017) ^[7]. Las consecuencias de estas variaciones son tales que los apicultores tienden a optar por el uso de cantidades más altas de estos tratamientos para controlar el *Varroa*. Lo que conlleva a acumulaciones mayores, tanto en mieles como en ceras, especialmente de aquellos con gran lipofilia y persistencia ^[6].

4.2. Plaguicidas analizados

Los plaguicidas son sustancias químicas (orgánicas, inorgánicas o microbiológicas) líquidas o sólidas que producen efectos tóxicos sobre ciertos organismos vivos. Su uso principal es el control de las plagas de la agricultura. Entre los diferentes criterios posibles para clasificar los plaguicidas, los dos más utilizados son: por tipo de plaga o por estructura química. Esta última clasificación tiene como ventaja que permite identificar sustancias que suelen tener efectos similares en las plagas y el ambiente [8].

Los plaguicidas (herbicidas, acaricidas e insecticidas) que se utilizan tanto en agricultura como ganadería pueden llegar a las colmenas a través del proceso de polinización. Las abejas llegan a viajar kilómetros para recoger polen y néctar por lo que la contaminación no puede evitarse solamente con el control de las zonas cercanas a las colmenas. Este polen y néctar contaminado es el que será utilizado más tarde por las abejas obreras como alimento y para la producción de miel tal y como se ha comentado en el primer apartado. Esta miel puede llegar a almacenarse en la colmena durante plazos de tiempo muy elevados de manera que la contaminación va aumentando progresivamente. Además, otros plaguicidas como el τ -Fluvalinato, Cumafós, Bromopropilato, etc. producen contaminación directa a las colmenas debido a que son aplicados sobre los panales. Esta contaminación puede provocar pérdidas de fertilidad a la abeja reina y a los zánganos, una reducción en la expresión de los genes relacionados con el sistema inmunológico y el desarrollo físico e incluso producir la muerte de gran cantidad de individuos por intoxicación [9-12].

Hay estudios que documentan que la principal fuente de contaminación en las abejas de la especie *Apis mellifera* son los acaricidas utilizados para combatir el parásito conocido como *Varroa destructor*, un ácaro que puede llegar a acabar con colmenas enteras alimentándose de la hemolinfa (líquido equivalente a la sangre en los invertebrados) de la abeja provocando deformaciones en su cuerpo y debilitándola hasta que termina muriendo. El ácaro ha llegado a evolucionar hasta tal punto que se ha adaptado por completo al ciclo de vida de la propia abeja de manera que consigue afectar a cualquier etapa de ésta [13]. Por lo tanto, el uso de estos plaguicidas en la producción apícola para combatir a dicho ácaro y, con ello, garantizar la producción apícola y la subsistencia de las colmenas, es de esencial importancia a pesar de los perjuicios que llega a causar para las abejas.



Figura 1. Varroa destructor en el cuerpo de dos abejas.

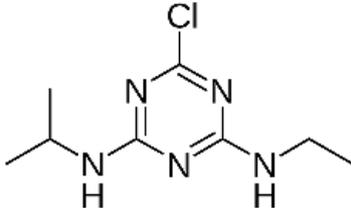
Para prevenir y controlar los riesgos que sufren estos insectos, es de vital importancia que se realicen análisis de los productos apícolas, tales como pólenes, ceras, mieles, las propias abejas... Estos análisis buscan la determinación de los plaguicidas que presentan dichos productos y en qué cantidades para dar una idea del riesgo al que se exponen las abejas y la contaminación que puede haber en los terrenos cercanos a la colmena [14, 15].

Tras la revisión bibliográfica se han seleccionado siete plaguicidas de uso más generalizado ya que sería los que se presentan en mayor cantidad en la colmena y, por ello, en las mieles. Los siete plaguicidas se explican a continuación:

- **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.

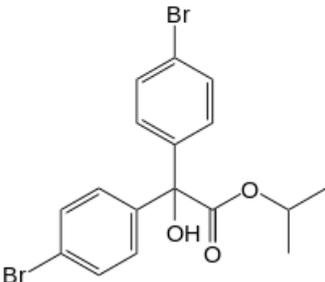
Por estas razones, actualmente su utilización y venta está prohibida en toda la Unión Europea, aunque en países como Estados Unidos y en el continente oceánico sigue estando permitida [8, 16].

Tabla 3. Nombre, nombre comercial, fórmula molecular, masa molecular, familia, actividad y límite apto para el consumo humano de la Atrazina ^[17].

Nombre	Atrazina	
Nombre comercial	Atrazina	
Fórmula molecular	C ₈ H ₁₄ N ₅ Cl	
Masa molecular (g/mol)	215,68	
Familia	Triazinas	
Actividad	Herbicidas	
Límite apto para el consumo humano (mg/kg)	0,05	

- **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 Unión Europea y América, pero debido a que presenta una elevada persistencia en suelos, agua y otras matrices, aún se pueden encontrar residuos en la naturaleza ^[8, 16].

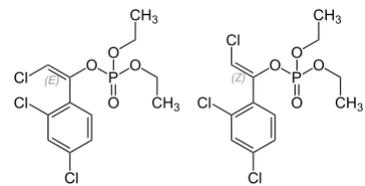
Tabla 4. Nombre, nombre comercial, fórmula molecular, masa molecular, familia, actividad y límite apto para el consumo humano del Bromopropilato ^[17].

Nombre	Bromopropilato	
Nombre comercial	Acarol	
Fórmula molecular	C ₁₂ H ₁₆ Br ₂ O ₃	
Masa molecular (g/mol)	425,95	
Familia	Bencilatos	
Actividad	Acaricidas	
Límite apto para el consumo humano (mg/kg)	0,01	

- **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 Unión Europea, sin embargo, en lugares como Australia, Sudáfrica, Kenia, Centroamérica y Sudamérica su uso aún está generalizado [8, 16, 18].

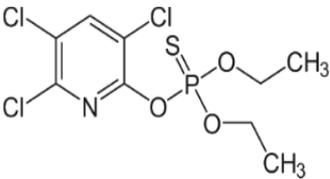
Tabla 5. Nombre, nombre comercial, fórmula molecular, masa molecular, familia, actividad y límite apto para el consumo humano del Clorfenvinfos [17].

Nombre	Clorfenvinfos	
Nombre comercial	Clorfenvinfos	
Fórmula molecular	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₃ O ₄ P	
Masa molecular (g/mol)	359,57	
Familia	Organofosforados	
Actividad	Insecticida	
Límite apto para el consumo humano (mg/kg)	0,01	

- **Clorpirifos:** el Clorpirifos es otro plaguicida organofosforado de nombre químico O,O-dietil O-3,5,6-tricloropiridin-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.

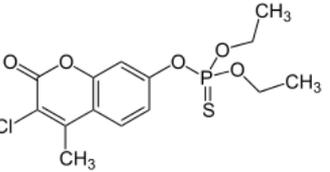
Es insoluble en agua, aunque esto no evita que sea muy tóxico para los organismos acuáticos, insectos y algunas especies de aves. Está permitido en la mayoría de los países de la Unión Europea y en general a nivel mundial [8, 16].

Tabla 6. Nombre, nombre comercial, fórmula molecular, masa molecular, familia, actividad y límite apto para el consumo humano del Clorpirifos ^[17].

Nombre	Clorpirifos	
Nombre comercial	Clorpirifos	
Fórmula molecular	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	
Masa molecular (g/mol)	321,00	
Familia	Organofosforados	
Actividad	Insecticida y acaricida	
Límite apto para el consumo humano (mg/kg)	0,05	

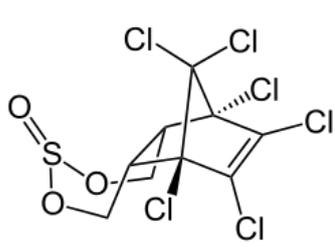
- **Cumafós:** el Cumafós o Asuntol es un insecticida organofosforado de nombre 3-cloro-7-dietoxifosfinitioiloxi-4-metil-2-cromenona que se utiliza para repeler a una amplia variedad de insectos y parásitos en ganadería, entre los que se encuentran los piojos y garrapatas, las larvas y lombrices y la 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 de manera que no se usa para la agricultura o para plantas residenciales. Sin embargo, salvo en Australia, está permitido a nivel mundial ^[8, 16, 18].

Tabla 7. Nombre, nombre comercial, fórmula molecular, masa molecular, familia, actividad y límite apto para el consumo humano del Cumafós ^[17].

Nombre	Cumafós	
Nombre comercial	Asuntol, Perizin	
Fórmula molecular	C ₁₄ H ₁₆ ClO ₅ PS	
Masa molecular (g/mol)	362,00	
Familia	Organofosforados	
Actividad	Insecticida y acaricida	
Límite apto para el consumo humano (mg/kg)	0,10	

- **α -Endosulfán:** el α -Endosulfán 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 el presente 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 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, está prohibido en toda la UE, aunque no es así en otros continentes [8, 16].

Tabla 8. Nombre, nombre comercial, fórmula molecular, masa molecular, familia, actividad y límite apto para el consumo humano del α -Endosulfán [17].

Nombre	α -Endosulfán	
Nombre comercial	Benzoepin, Endocel	
Fórmula molecular	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	
Masa molecular (g/mol)	406,95	
Familia	Organoclorados	
Actividad	Insecticida y acaricida	
Límite apto para el consumo humano (mg/kg)	0,01	

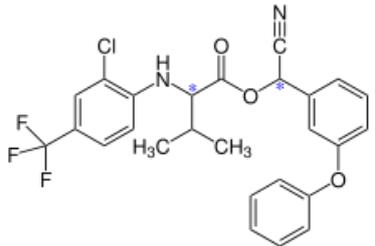
- **τ -Fluvalinato:** el τ -Fluvalinato es el plaguicida más ampliamente utilizado para eliminar el ácaro *Varroa destructor* en colmenas con el fin de garantizar la subsistencia de las abejas y asegurar la producción. Presenta también otras aplicaciones como insecticida en cultivos de cereales, patatas, 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 sólo 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. Los problemas que puede generar en el ser humano son mucho más leves, pero aun así provoca irritaciones en la piel y es potencialmente dañino para el hígado y el riñón. Su utilización prolongada en la producción apícola hace que éste 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. [8, 16, 18- 20].

La desaparición de un compuesto en la colmena está determinada por muchos procesos que dependen del tiempo como son: consumo, distribución, biotransformación, volatilización, difusión... Hay estudios que calculan que la presencia de τ -Fluvalinato no podrá llegar a eliminarse por completo hasta pasados 20 años [21].

Tabla 9. Nombre, nombre comercial, fórmula molecular, masa molecular, familia, actividad y límite apto para el consumo humano del τ -Fluvalinato [17].

Nombre	τ -Fluvalinato	
Nombre comercial	Apistan	
Fórmula molecular	C ₂₆ H ₂₂ F ₃ O ₃ N ₂ Cl	
Masa molecular (g/mol)	502,15	
Familia	Piretroides	
Actividad	Insecticida y acaricida	
Límite apto para el consumo humano (mg/kg)	0,05	

4.3. Métodos de preparación de muestras

Para la preparación de muestra se tuvo en cuenta la bibliografía disponible buscando un método de extracción y preparación de muestra óptima para la miel.

Se encontraron así distintos métodos de extracción interesantes que se muestran en la figura siguiente.

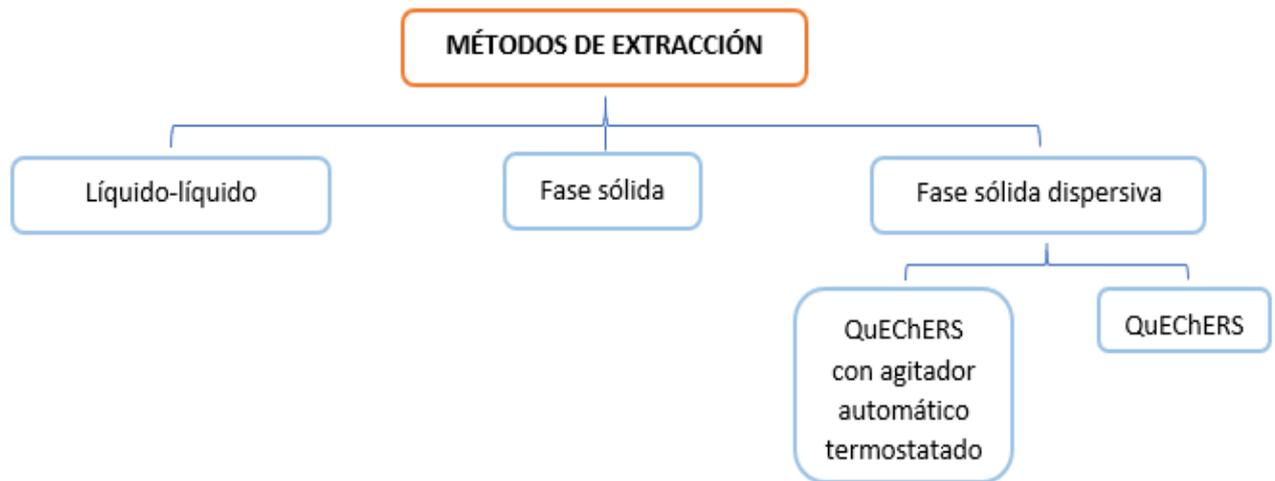


Figura 2. Esquema de los distintos métodos de extracción encontrados.

5. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO

5.1. Objetivo

El objetivo principal de este trabajo de fin de grado es la optimización de un método de extracción de siete plaguicidas, así como la determinación y cuantificación de éstos en mieles de diferentes orígenes florales utilizando como técnica analítica la cromatografía de gases acoplada a un detector de masas.

5.2. Plan de trabajo

El plan de trabajo seguido ha sido el siguiente:

1. Consulta bibliográfica relacionada con la determinación de plaguicidas en productos apícolas, específicamente en mieles, 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 aplicación del método analítico seleccionado para la extracción y preparación de muestra utilizando distintas mieles.
3. Aprendizaje del manejo del equipo cromatográfico GC-MS.
4. Caracterización de los distintos plaguicidas en los cromatogramas obtenidos.
5. Optimización de las condiciones de extracción de los plaguicidas.
6. Determinación de los porcentajes de recuperación y efecto matriz para cada condición de optimización con el fin de establecer qué condiciones permiten obtener mejores resultados y, con ello, mejores extracciones.
7. Preparación de patrones de distintas concentraciones para obtener las correspondientes líneas de calibrado en matriz.
8. Preparación y análisis de muestras reales para obtener las correspondientes líneas de calibrado.
9. Obtención de resultados en cuanto a validez del método de extracción para cada una de las mieles.

6. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS

6.1. Equipo utilizado

El equipo utilizado es un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies series 7890 A*. El equipo presenta las siguientes partes:

- Bandeja de muestras *Agilent Technologies G 2614 A* con capacidad para 100 viales.
- Inyector automático *Agilent Technologies series 7683 B Series* formado por una jeringa de vidrio que puede recoger fracciones de muestra de hasta 5 μL .
- Controlador de la temperatura del portal de inyección, zona donde se produce la volatilización de la muestra, y donde se puede trabajar en modo split o splitless.
- Horno con temperatura programable que permite establecer una rampa de temperaturas en cuyo interior se encuentra la columna.
- Columna capilar *Agilent J&W HP-5MS* de dimensiones 30 m x 250 μm x 0,25 μm de *Agilent Technologies*.
- Suministro de gas portador.

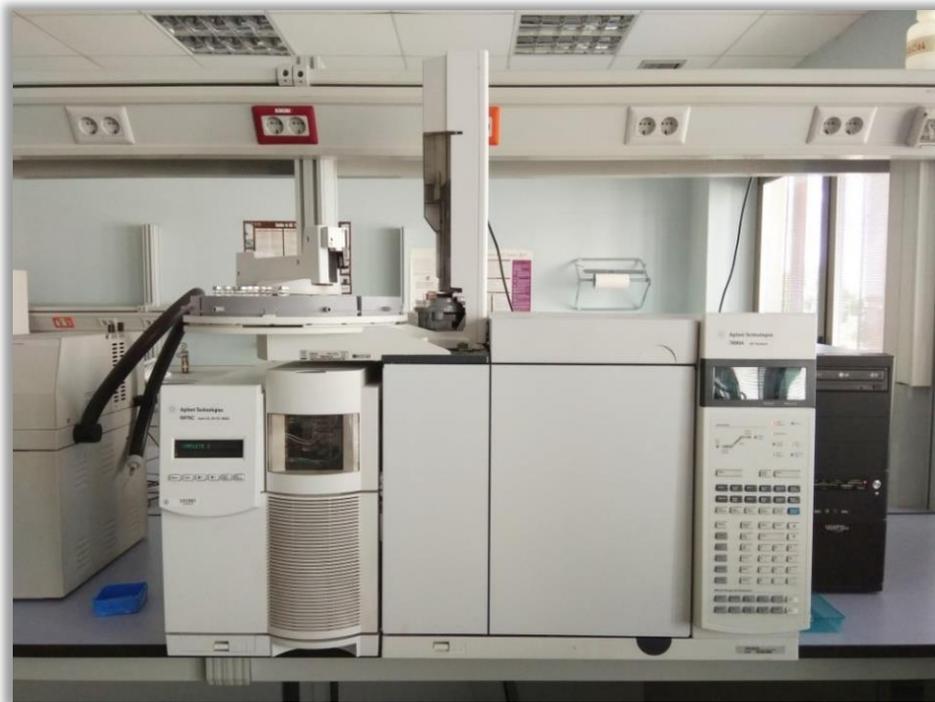


Figura 3. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies series 7890 A* acoplado a un detector de espectrometría de masas *Agilent Technologies 5975 C*.

El equipo utilizado para la detección de los plaguicidas es un detector de espectrometría de masas *Agilent Technologies series 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.

6.2. Equipos adicionales

- Balanza analítica EA-240 de Mettler Toledo (Darmstadt, Germany).
- Agitador oscilante Vibromatic de JP Selecta (Barcelona, Spain).
- Baño de ultrasonidos H-D de JP Selecta (Barcelona, Spain).
- Ultracentrífuga 5810 de Eppendorf AG (Germany).
- Rotavapor R-3 de BÜCHI (Switzerland).
- Bomba de vacío de Vacuubrand.
- Estufa de secado de Heraeus.
- Frigorífico/nevera de FAIRLINE.
- Destilador de agua Milli-Q + ELIX de Millipore.



Figura 4. Rotavapor R-3 de BÜCHI.

- 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.
- Puntas de micropipeta de Agilent Technologies.
- Tubos de polipropileno para centrifuga de 50 mL de CELLSTAR TUBES.
- Embudos de decantación de 100 mL de Labbox.
- Vasos de precipitados de 100 mL de Schott Duran.
- Probetas de 10 mL y de 100 mL de MBL Volumetrics.
- Matraces aforados de 10 mL de Alamo.
- Pegasustancias de Alamo.
- Viales de vidrio con sus respectivos tapones de Agilent.
- Material de laboratorio adicional: espátulas, frascos lavadores, pipetas de vidrio, gradillas, varillas de vidrio, etc.



Figura 5. Conjunto de micropipetas utilizadas.

6.3. Reactivos y disolventes

- Patrones de los siete plaguicidas utilizados en la preparación de las líneas de calibrado y el dopaje de muestra:
 - Atrazina 99% de Dr. Ehrenstofer (Augsburg, Germany).
 - Bromopropilato de Dr. Ehrenstofer (Augsburg, Germany).
 - Clorfenvinfos de Dr. Ehrenstofer (Augsburg, Germany).
 - Clorpirifos de Dr. Ehrenstofer (Augsburg, Germany).
 - Cumafós de Dr. Ehrenstofer (Augsburg, Germany).
 - α -Endosulfán de Dr. Ehrenstofer (Augsburg, Germany).
 - τ -Fluvalinato de Dr. Ehrenstofer (Augsburg, Germany).
- Patrones internos utilizados:
 - Clorfenvinfos deuterado de Dr. Ehrenstofer (Augsburg, Germany).
 - Clorpirifos deuterado de Dr. Ehrenstofer (Augsburg, Germany).
- Acetato de etilo PESTIPUR de grado GC de Carlo Erba Reagents S.A.S.
- Ciclohexano PESTIPUR de grado GC de Carlo Erba Reagents S.A.S.
- Acetonitrilo PESTIPUR de grado GC de Carlo Erba Reagents S.A.S.
- Acetona de limpieza PESTIPUR de grado GC de Carlo Erba Reagents S.A.S.
- Agua ultrapura obtenida de la combinación de la actividad de dos unidades de purificación (Milli-RO y Milli-Q) de Millipore (Bedford, MA, USA).

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1. Condiciones del análisis

En base a la experiencia del grupo investigador y después de unas pequeñas adaptaciones, se seleccionaron las siguientes condiciones:

- **Condiciones del cromatógrafo**

Las condiciones utilizadas en el cromatógrafo fueron las siguientes:

- Columna capilar de reparto Agilent J&W HP-5MS (5% Fenil Metilpolisiloxano) con unas dimensiones 30m x 250 μm x 0,25 μm .
- Volumen de inyección de 1 μL .
- Como gas portador se utilizó Helio con un flujo de 1,2 mL/min.
- Inyección en modo splitless.
- Temperatura del portal de inyección de 280°C
- Gradiente térmico de tres rampas de temperatura de 60°C a 310°C.
- Post run de 5 minutos a una temperatura de 320°C

Tabla 10. Gradiente térmico empleado.

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

- **Condiciones del detector**

El detector acoplado al cromatógrafo de gases se trataba de un espectrómetro de masas cuya fuente de ionización era de impacto electrónico (EI) proporcionando iones positivos con relaciones m/z inferiores a las del ion molecular. El espectrómetro fue configurado con una temperatura de la fuente de 230 °C y una temperatura de cuadrupolo de 150 °C. 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) como se puede observar en la siguiente figura donde se muestra el espectro de masas para el τ -Fluvalinato.

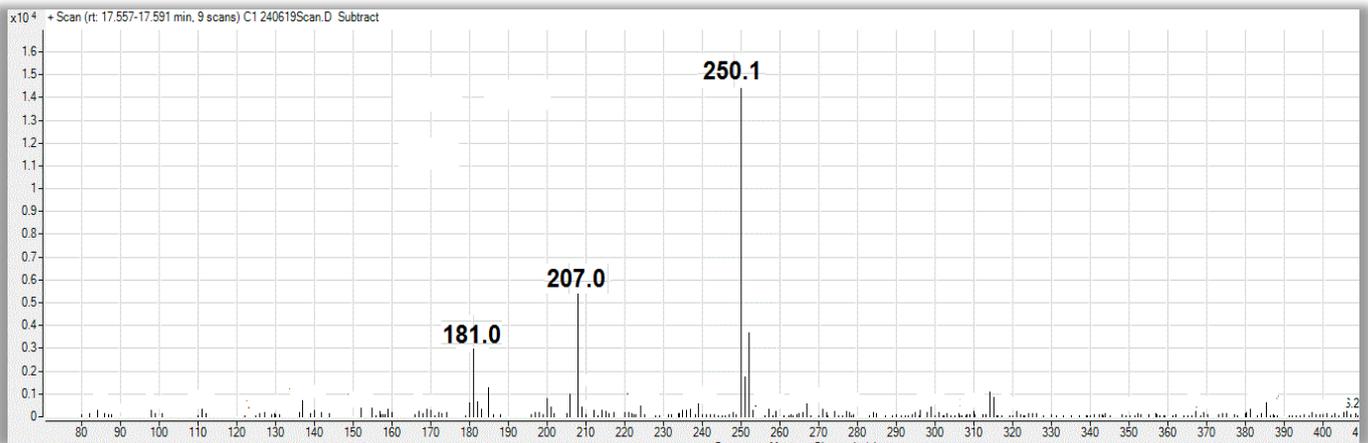


Figura 6. Espectro de masas del τ -Fluvalinato en que se observan los tres iones de m/z distinta.

Por otro lado, se muestra un cromatograma con todos los picos de interés relativos a los plaguicidas en el que se pueden identificar los tiempos de retención de cada uno de ellos.

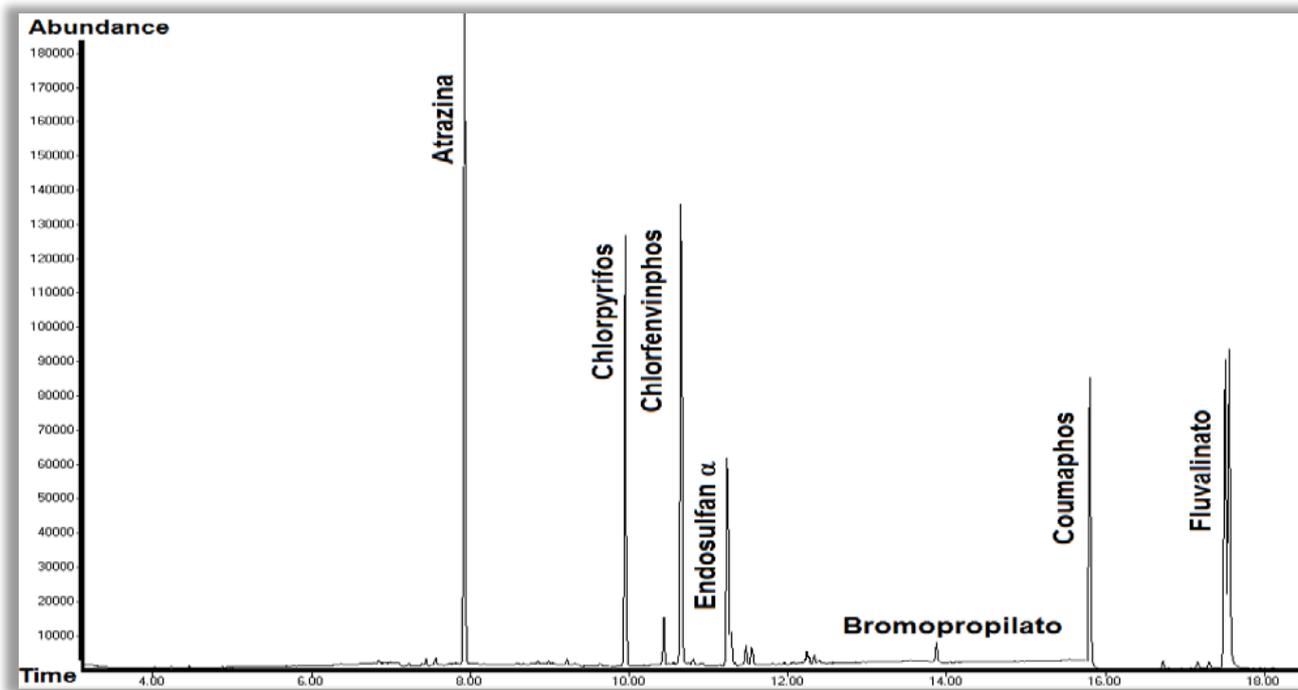


Figura 7. Cromatograma en modo SIM de los siete plaguicidas en una concentración de 0,5 ppm.

A continuación, se recogen en la **Tabla 11** los iones seleccionados para cada plaguicida y los tiempos de retención.

Tabla 11. Tiempo de retención, m/z cuantificador y m/z de confirmación de cada plaguicida.

Plaguicida	t_r (min)	m/z cuantificador	m/z confirmación
Atrazina	7,810	200	215,173
Clorpirifos	9,720	197	315,258
Clorfenvinfos	10,47	267	329,270
α-Endosulfán	11,20	241	195,207
Bromopropilato	13,82	345	185,183
Cumafós	15,62	362	226,109
τ-Fluvalinato	17,39	250	207,181

7.2. Preparación de patrones para las líneas de calibrado

Para poder realizar la cuantificación de los plaguicidas fue necesaria la obtención de líneas de calibrado de cada plaguicida. Para ello, se preparan una serie de patrones de los plaguicidas en un intervalo entre 0,2 ppm y 2 ppm.

Se comenzó preparando una disolución patrón de cada plaguicida de aproximadamente 1000 ppm en ACN y en AcOEt:C₆H₁₂ 50:50 (v/v). Las disoluciones se prepararon por pesada de una cantidad de unos 10 mg de plaguicida llevados a un matraz aforado de 10 mL enrasando con cada una de las mezclas de disolvente. A partir de estas disoluciones se preparó una disolución mezcla de 100 ppm de los siete plaguicidas para cada uno de los disolventes tomando 1 mL de cada disolución de 1000 ppm de cada plaguicida y enrasando a 10 mL en un matraz aforado con el disolvente correspondiente. Finalmente, se realizaron sucesivas diluciones a partir de la disolución de 100 ppm para la obtención de la línea de calibrado en el intervalo de 0,2 ppm a 2 ppm.

La cuantificación se realizó siguiendo el método del patrón interno de manera que se pudieran compensar interferencias generadas por la matriz, problemas generados por el método de extracción o incluso errores instrumentales, es decir, el método nos permite compensar errores aleatorios y sistemáticos. Los patrones internos que se utilizaron fueron patrones deuterados de Clorfenvinfos y Clorpirifos que se añadieron a los patrones y muestras en una concentración de 0,1 ppm.

Una vez preparadas las disoluciones, se inyectaron en el cromatógrafo. A modo de ejemplo, a continuación se muestra un cromatograma para el patrón de 0,5 ppm.

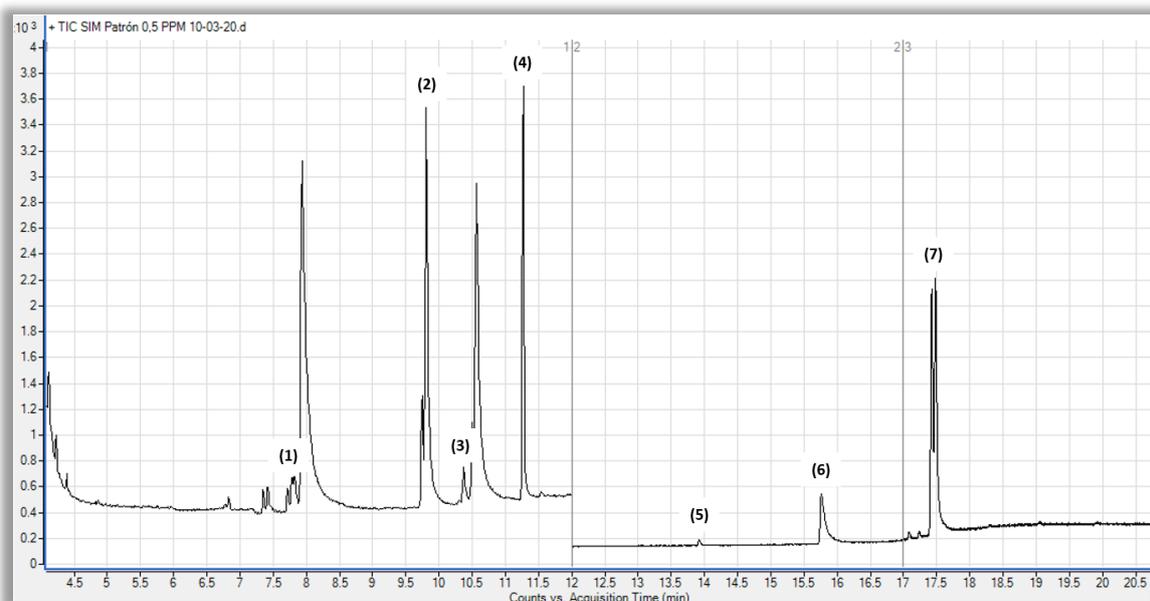


Figura 8. Cromatograma en modo SIM de un patrón de 0,5 ppm: (1) Atrazina, (2) Clorpirifos, (3) Clorfenvinfos, (4) α -Endosulfán, (5) Bromopropilato, (6) Cumafós y (7) τ -Fluvalinato.

Para la obtención de 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 obteniéndose una recta con ajuste por mínimos cuadrados. Esta representación se realizó para cada uno de los patrones internos (Clorpirifos y Clorfenvinfos deuterados).

- Clorpirifos

A título de ejemplo, en las siguientes figuras (**Figura 9** y **Figura 10**) aparecen las representaciones obtenidas para el Cumafós y el τ -Fluvalinato.

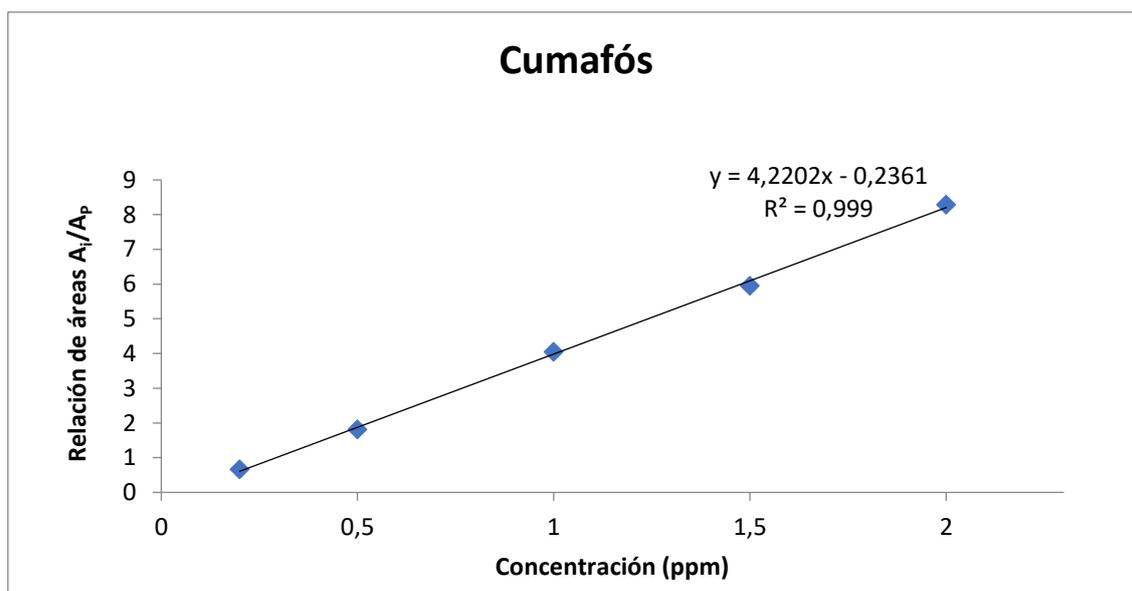


Figura 9. Línea de calibrado para el patrón del Cumafós con el Clorpirifos como patrón interno.

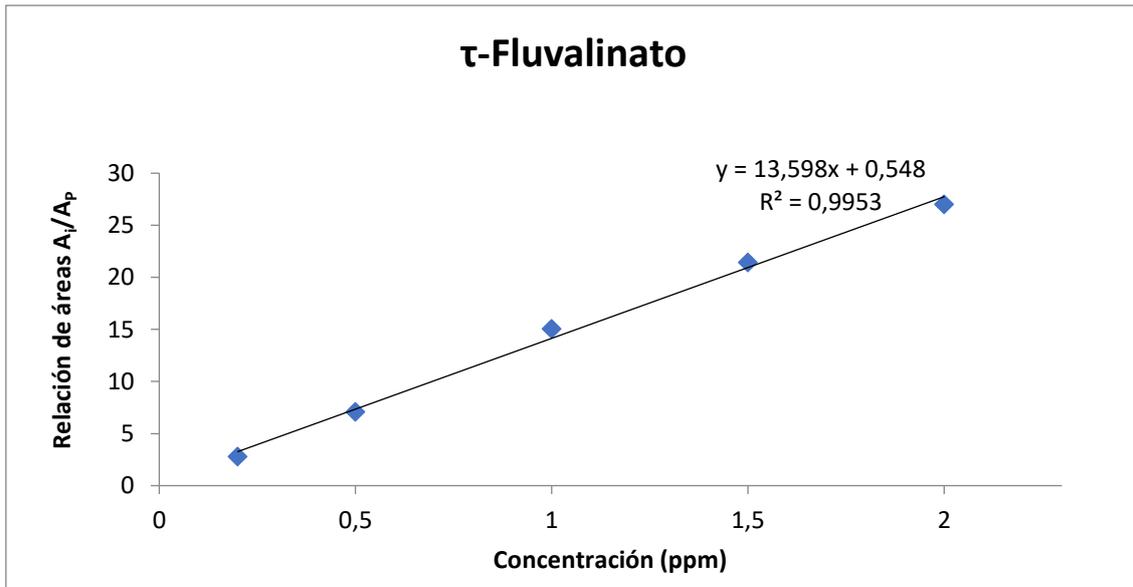


Figura 10. Línea de calibrado para el patrón del τ-Fluvalinato con el Clorpirifos como patrón interno.

A continuación, se presenta una tabla en la que se pueden observar los resultados de las líneas de calibrado para cada uno de los plaguicidas.

Tabla 12. Pendiente, ordenada en el origen y coeficiente R^2 de la línea de calibrado correspondiente a cada plaguicida en relación con el Clorpirifos.

Plaguicida	Ecuación de la recta		
	Pendiente	Ordenada	R^2
Atrazina	31,228	-0,1847	0,9992
Clorpirifos	13,078	-0,1942	0,9987
Clorfenvinfos	11,088	-0,3151	0,9991
α-Endosulfán	4,4802	0,1578	0,9981
Bromopropilato	0,116	-0,0046	0,997
Cumafós	4,2202	-0,2361	0,999
τ-Fluvalinato	13,598	0,548	0,9953

- **Clorfenvinfos**

Al igual que con el Clorpirifos, en las siguientes figuras (**Figura 11** y **Figura 12**) aparecen las representaciones obtenidas para el Cumafós y el τ -Fluvalinato.

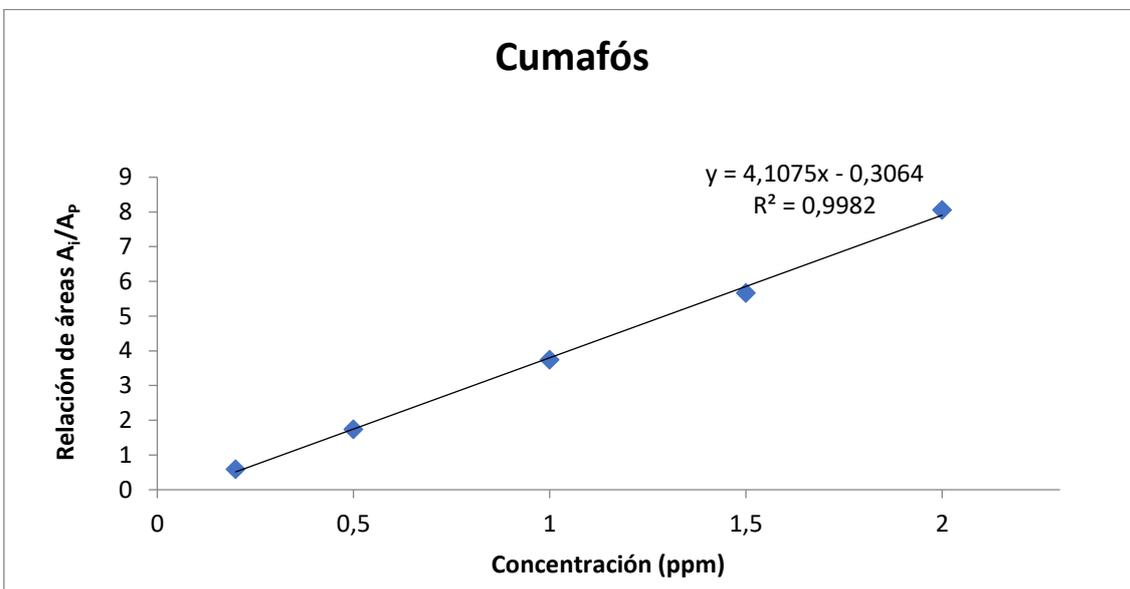


Figura 11. Línea de calibrado para el patrón del Cumafós con el Clorfenvinfos como patrón interno.

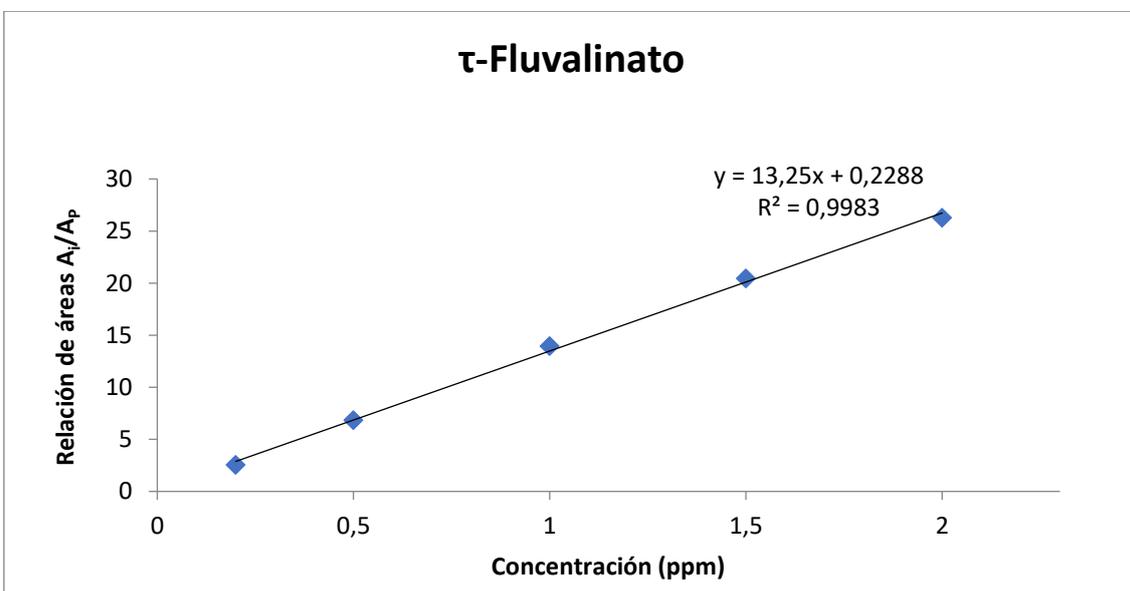


Figura 12. Línea de calibrado para el patrón del τ -Fluvalinato con el Clorfenvinfos como patrón interno.

Asimismo, se presenta una tabla en la que se pueden observar los resultados de las líneas de calibrado para cada uno de los plaguicidas.

Tabla 13. Pendiente, ordenada en el origen y coeficiente R^2 de la línea de calibrado correspondiente a cada plaguicida en relación con el Clorfenvinfos.

Plaguicida	Ecuación de la recta		
	Pendiente	Ordenada	R^2
Atrazina	30,428	-0,8325	0,9994
Clorpirifos	12,737	-0,4532	0,9997
Clorfenvinfos	10,795	-0,522	0,9999
α -Endosulfán	4,367	0,053	0,9997
Bromopropilato	0,1129	-0,0067	0,9983
Cumafós	4,1075	-0,3064	0,9982
τ -Fluvalinato	13,25	0,2288	0,9983

Como se puede observar los resultados que se obtuvieron empleando como patrón interno Clorfenvinfos deuterado o Clorpirifos deuterado son prácticamente análogos por lo que se decidió emplear únicamente el Clorfenvinfos deuterado.

7.3. Optimización

A partir de la bibliografía consultada se seleccionó como método para el aislamiento de los compuestos de interés la extracción líquido-líquido debido a que es un método simple y económico.

Para la optimización de la extracción de los plaguicidas de una matriz de miel se tuvieron en cuenta tres variables principalmente: proporción de disolvente, utilización de sales de secado y cantidad utilizada y tiempo de agitación. En la figura siguiente podemos observar un esquema visual de las variables de optimización.

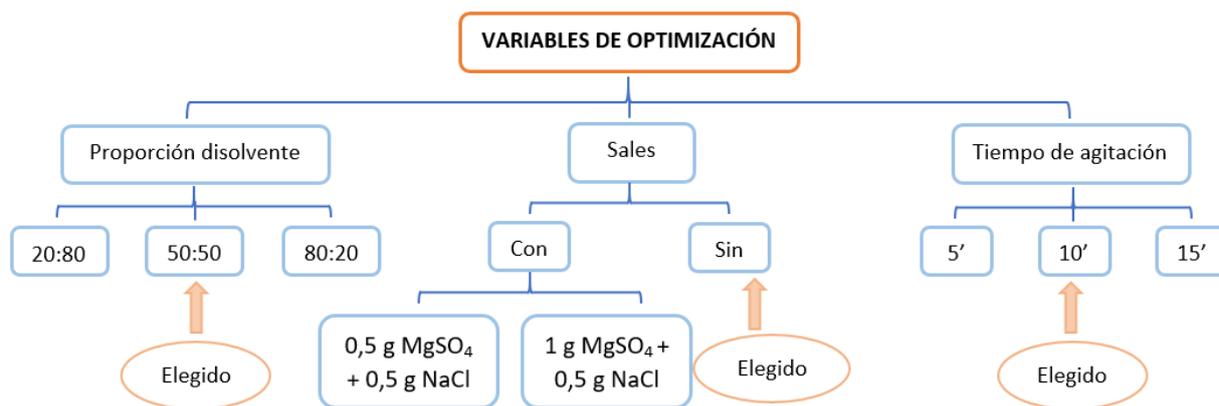


Figura 13. Esquema de las variables de optimización.

Una vez que se tuvieron claras las variables que se iban a tener en cuenta en el estudio de optimización se comenzó con la evaluación de cada una de ellas manteniendo fijas las otras dos variables para un estudio más sencillo y fiable de la variable elegida.

En todos los casos se tomaron 5 g de miel, a los que se añadió una concentración de 1 ppm de la mezcla de los siete compuestos objeto de estudio, disueltos en 10 mL de agua y se emplearon 10 mL de disolvente extractante.

A la hora de seleccionar cada una de las variables se tuvo en cuenta tanto el porcentaje de recuperación como el efecto matriz.

En primer lugar, se procedió a estudiar la influencia de la proporción de AcOEt:C₆H₁₂ que pudiera ejercer sobre dicha recuperación. Se ensayaron tres proporciones de la mezcla extractante que fueron: 20:80, 50:50 y 80:20 (v/v) de AcOEt:C₆H₁₂. Se inició el estudio utilizando una proporción 20:80 (v/v) de AcOEt:C₆H₁₂. A continuación, se comprobaron los resultados para una proporción 50:50 AcOEt:C₆H₁₂ y finalmente, para una proporción 80:20 de AcOEt:C₆H₁₂. Los mejores resultados en cuanto a recuperación (cerca del 100%) se obtuvieron con el uso de la proporción 50:50 de AcOEt:C₆H₁₂ como disolvente extractante. Por lo tanto, se seleccionó dicha proporción para su utilización en los siguientes pasos de optimización.

La siguiente variable que se estudió fue la utilización de sales para eliminar el agua que pudiera quedar en la fase orgánica y favorecer el proceso de salting out. Como sales se utilizaron MgSO₄ y NaCl que se añadieron en distintas cantidades. A su vez, se compararon los resultados con la experiencia en la cual no se añadían sales. Las cantidades de sales empleadas fueron: 1 g MgSO₄ + 0,5 g NaCl; 0,5 g MgSO₄ + 0,5 g NaCl y finalmente se probó a no hacer uso ni de MgSO₄ ni de NaCl. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 14. Resultados de % R y % ME para cada uno de los plaguicidas a cada cantidad de sales utilizando como patrón interno Clorfenvinfos deuterado.

Plaguicida	1 g MgSO ₄ + 0,5 g NaCl		0,5 g MgSO ₄ + 0,5 g NaCl		Sin sales	
	% R	% ME	% R	% ME	% R	% ME
Atrazina	106,7	80,6	109,3	84,5	107,8	91,3
Clorpirifos	108,2	78,7	104,3	85,6	102,1	95,0
Clorfenvinfos	105,3	94,1	108,4	84,5	104,9	86,1
α-Endosulfán	105,9	81,9	108,1	85,8	105,1	88,4
Bromopropilato	109,3	92,9	104,5	85,9	101,5	80,1
Cumafós	104,8	102,0	113,5	93,1	108,5	97,2
τ-Fluvalinato	97,3	117,9	93,1	91,7	109,8	92,4

De la observación de los resultados que se obtuvieron se pudo concluir que la adición de sales no favorecía ni el porcentaje de recuperación ni el efecto matriz por lo cual se decidió la eliminación de sales.

Por último, se estudió la influencia que ejercía el tiempo de agitación sobre la recuperación de los compuestos. Se estudiaron tres tiempos de agitación: cinco, diez y quince minutos.

Tabla 15. Resultados de % R para cada uno de los plaguicidas a cada tiempo de agitación utilizando como patrón interno el Clorfenvinfos deuterado.

Plaguicida	5 minutos	10 minutos	15 minutos
	% R	% R	% R
Atrazina	101,89	106,8	105,8
Clorpirifos	82,426	103,1	104,1
Clorfenvinfos	88,06	105,9	104,9
α-Endosulfán	82,592	104,1	103,8
Bromopropilato	73,927	101,0	100,9
Cumafós	85,25	108,5	108,0
τ-Fluvalinato	53,106	108,8	107,8

De los resultados que se obtuvieron se dedujo que la utilización de cinco minutos de agitación proporcionaba recuperaciones bajas fundamentalmente para el caso del τ -Fluvalinato mientras que la utilización de quince minutos no provocaba variaciones sustanciales con respecto a los resultados obtenidos con diez minutos. Por lo tanto, se seleccionó un tiempo de agitación de diez minutos.

Por lo que el tratamiento que se propone para el análisis de los siete analitos en muestra de miel es el que se muestra en la siguiente figura.

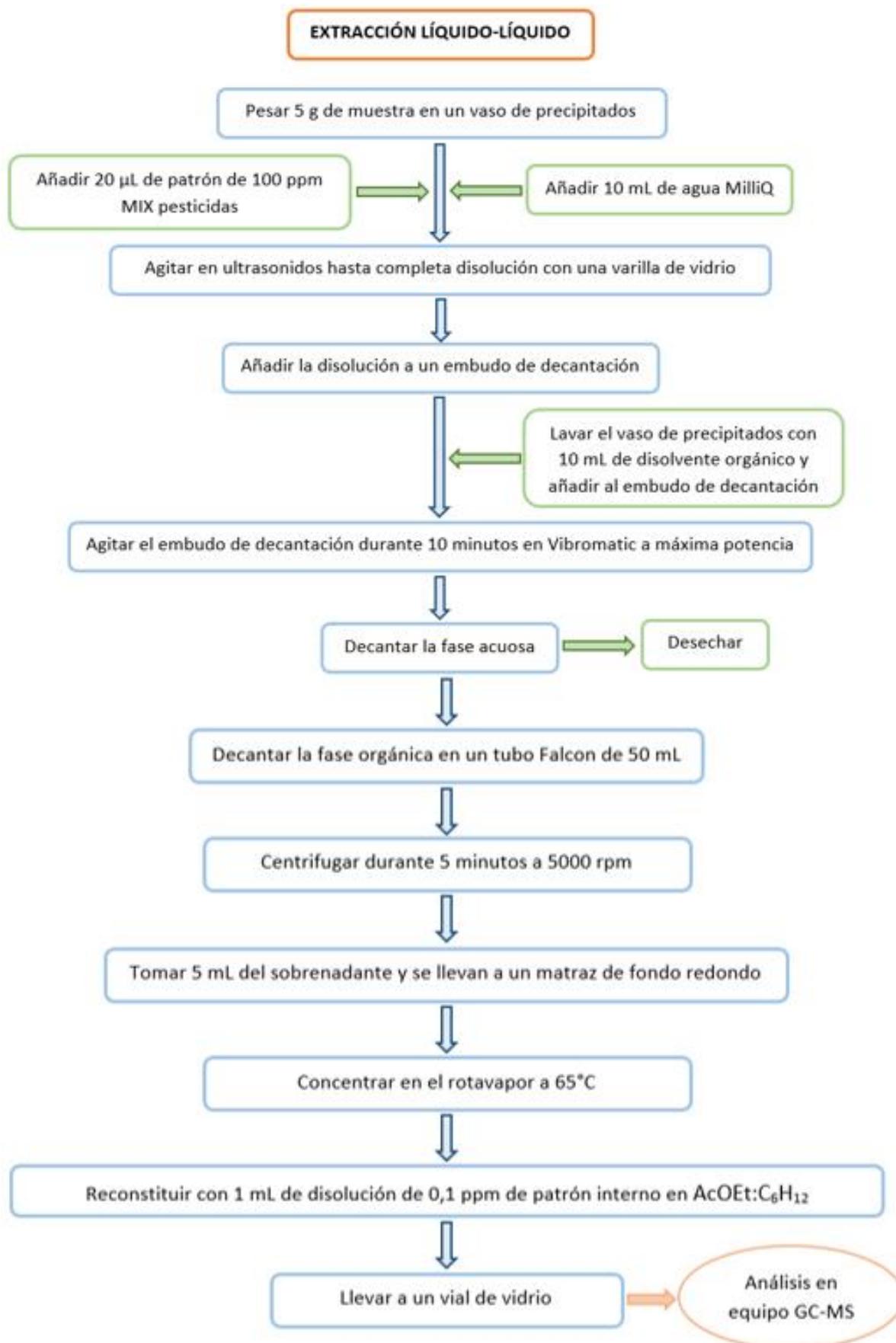


Figura 14. Esquema general de trabajo.

7.4. Obtención de líneas de calibrado en matriz

El siguiente paso fue la obtención de las líneas de calibrado en matriz y estudiando al mismo tiempo si existía efecto matriz. Para ello, se procedió a la preparación de una serie de muestras de miel de romero a las cuales se les añadieron concentraciones conocidas y variables de la mezcla patrón de los siete compuestos objeto de estudio en el intervalo de 0,2 ppm a 2 ppm.

En la siguiente figura se puede observar el cromatograma para la muestra tratada haciendo el dopado con patrones antes de proceder a la extracción.

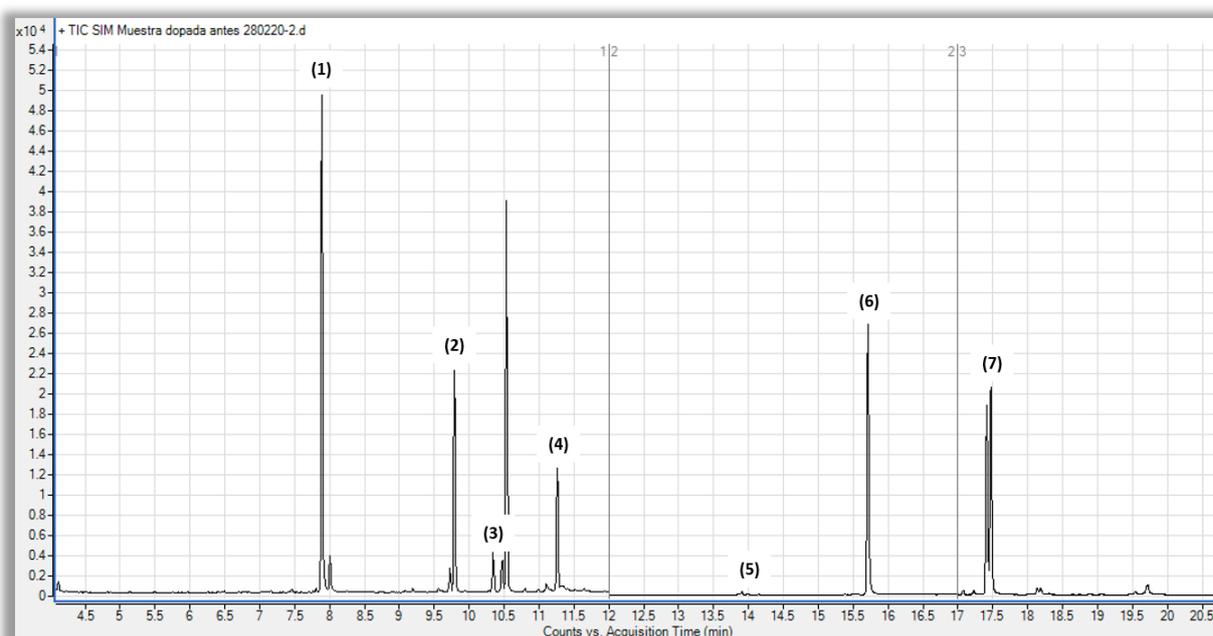


Figura 15. Cromatograma en modo SIM de una muestra dopada antes: (1) Atrazina, (2) Clorpirifos, (3) Clorfenvinfos, (4) α -Endosulfán, (5) Bromopropilato, (6) Cumafós y (7) τ -Fluvalinato.

Por otro lado, se prepararon muestras de miel a las cuales no se les añadió la mezcla patrón de los compuestos para posteriormente, y después de ser sometidas al método de extracción, reconstituir dichas muestras con 1 mL de la mezcla de los patrones en el mismo intervalo de concentraciones (entre 0,2 y 2 ppm) junto con el patrón interno en la concentración establecida (0,1 ppm).

La siguiente figura muestra el cromatograma para la muestra tratada y dopada al reconstituir.

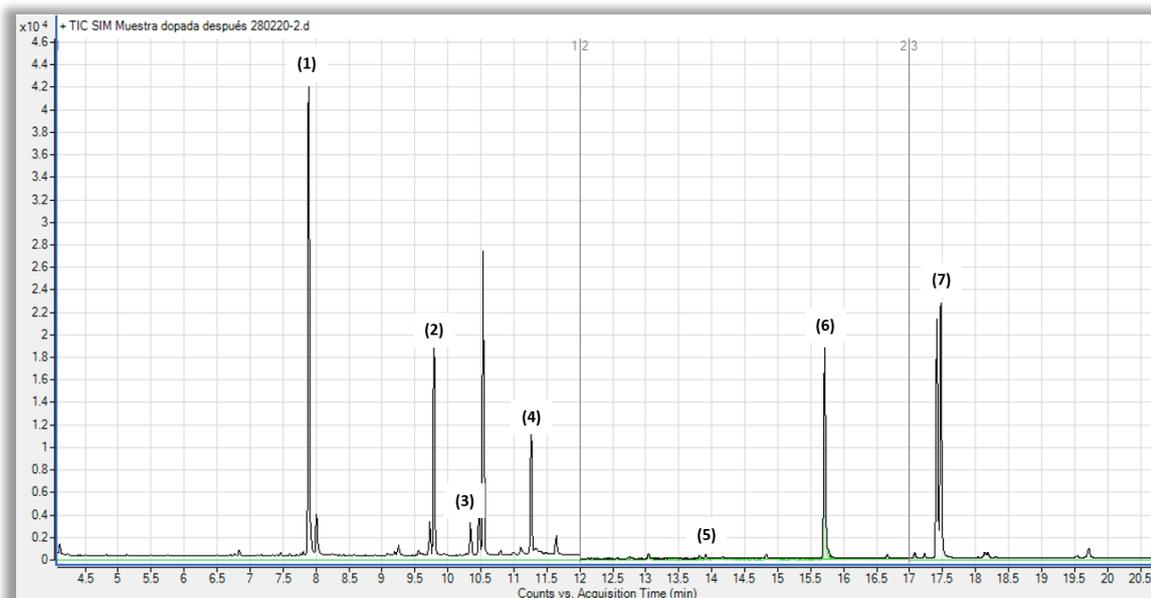


Figura 16. Cromatograma en modo SIM de una muestra dopada después: (1) Atrazina, (2) Clorpirifos, (3) Clorfenvinfos, (4) α -Endosulfán, (5) Bromopropilato, (6) Cumafós y (7) τ -Fluvalinato.

También se preparó una muestra de miel que actuara como blanco, es decir, una muestra en la que en ningún momento se añadió patrones.

De los cromatogramas que se obtuvieron se calcularon las relaciones de áreas que se representó frente a la concentración para la obtención de la línea de calibrado. Al igual que en la línea de calibrado para los patrones, a continuación se muestra una representación para el Cumafós y para el τ -Fluvalinato (**Figura 17** y **Figura 18** respectivamente).

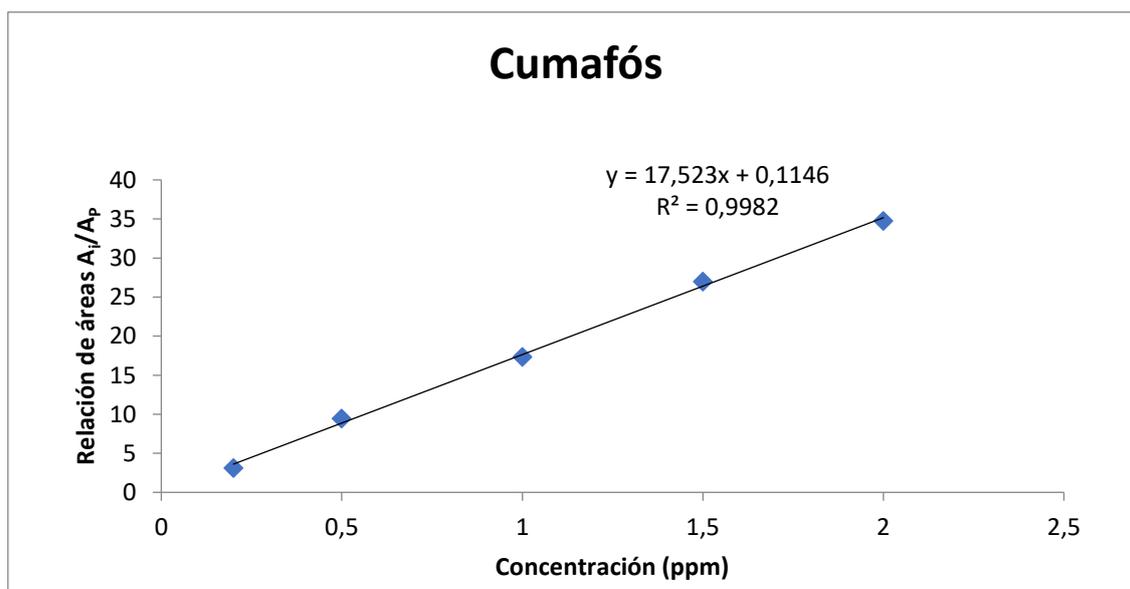


Figura 17. Línea de calibrado para la miel de romero del Cumafós.

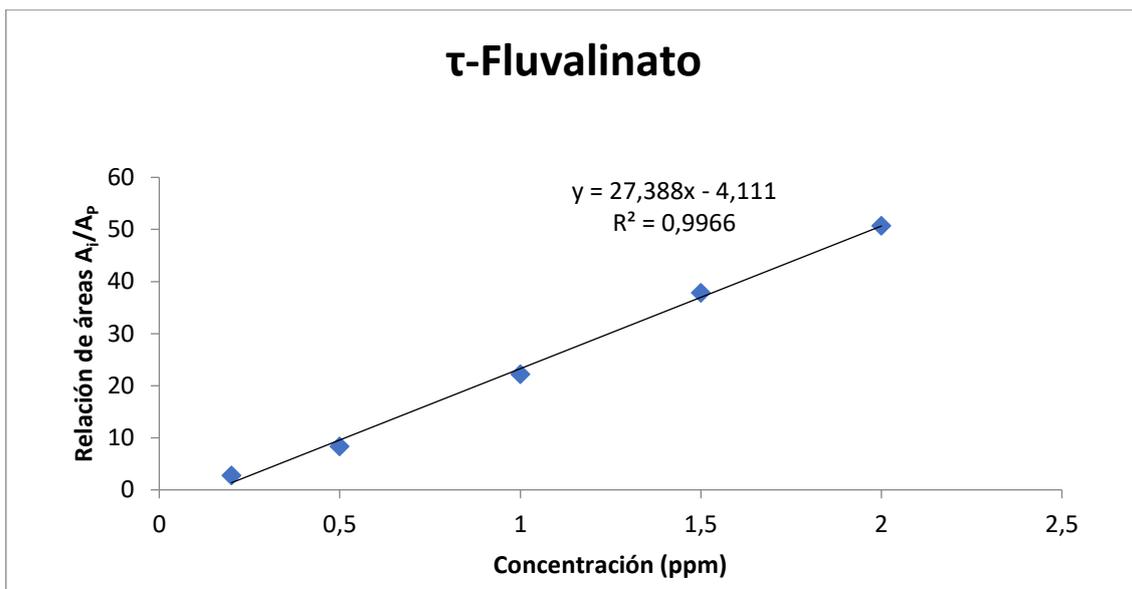


Figura 18. Línea de calibrado la miel de romero del τ-Fluvalinato.

Los resultados de las líneas de calibrado se recogen en una tabla a continuación.

Tabla 16. Pendiente, ordenada en el origen y coeficiente R^2 de la línea de calibrado correspondiente a cada plaguicida para la miel de romero.

Plaguicida	Ecuación de la recta		
	Pendiente	Ordenada	R^2
Atrazina	22,748	-0,3186	0,9984
Clorpirifos	9,6769	-0,1458	0,9986
Clorfenvinfos	19,576	-0,8198	0,9985
α-Endosulfán	2,9981	0,0998	0,9981
Bromopropilato	0,1684	-0,0074	0,9989
Cumafós	17,523	0,1146	0,9982
τ-Fluvalinato	27,388	-4,111	0,9966

Del estudio se puede extraer que el intervalo de confianza de las pendientes se superpone con los del calibrado en patrón de lo cual se deduce que se puede realizar la cuantificación mediante el calibrado en patrón.

Por otro lado, se puso en evidencia la existencia o no del efecto matriz para lo cual, a partir de los resultados que se obtuvieron, se evaluó la presencia de dicho efecto utilizando la siguiente relación.

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

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

Los resultados que se obtuvieron se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 17. Recuperación del contenido en mg/kg de los plaguicidas estudiados en la miel de romero utilizando como patrón interno el Clorfenvinfos deuterado.

Patrón interno: Clorfenvinfos deuterado							
[(mg/kg)	Atrazina	Clorpirifos	Clorfenvinfos	α-Endosulfán	Bromopropilato	Cumafós	τ-Fluvalinato
0,396	0,337	0,342	0,380	0,319	0,373	0,343	0,328
0,973	1,07	1,07	1,05	1,07	1,05	1,05	0,882
1,97	1,93	1,93	1,88	1,96	1,90	1,93	1,83
2,98	2,97	2,96	2,96	2,97	2,97	3,01	3,00
3,89	3,90	3,91	3,93	3,89	3,92	3,88	3,97

Como se deduce de la tabla anterior, no hay evidencia de efecto matriz posibilitando, por lo tanto y tal y como se comentó anteriormente, el poder realizar la cuantificación con los calibrados en patrón.

Se realizó un estudio totalmente análogo al realizado con la miel de romero utilizando una miel de distinto origen floral, en concreto, una miel multifloral.

El siguiente cromatograma muestra de miel multifloral a la que se ha añadido una cantidad de MIX de los siete compuestos de 0,5 ppm.

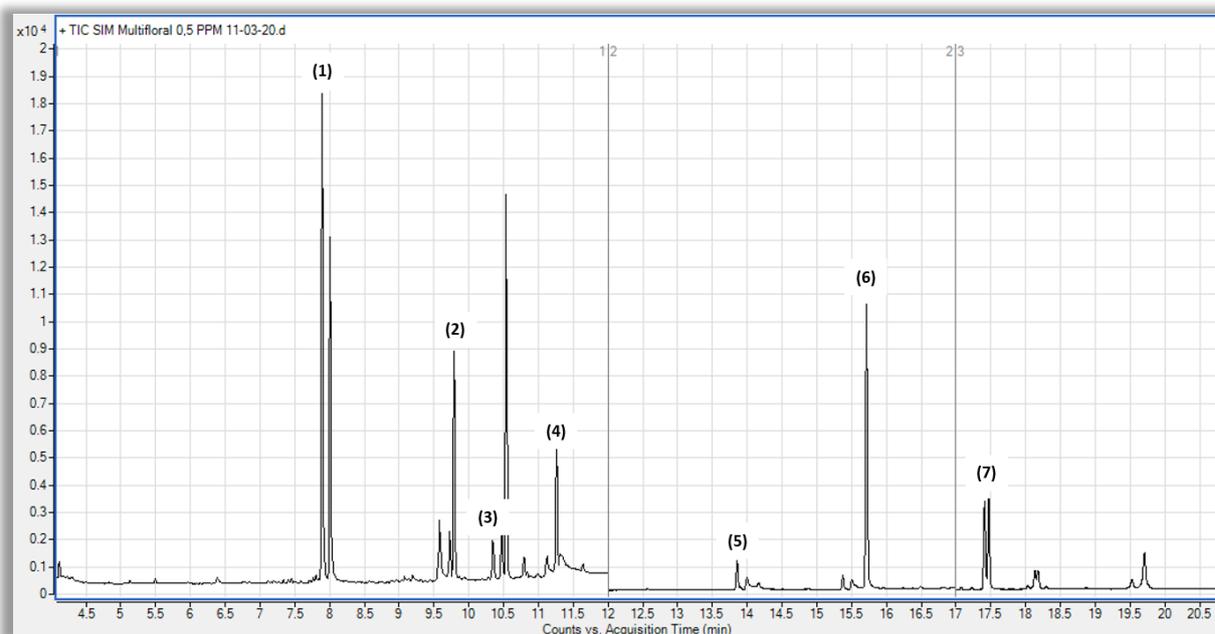


Figura 20. Cromatograma en modo SIM de una muestra de miel multifloral de 0,5 ppm: (1) Atrazina, (2) Clorpirifos, (3) Clorfenvinfos, (4) α -Endosulfán, (5) Bromopropilato, (6) Cumafós y (7) τ -Fluvalinato.

Al igual que con la miel de romero, se realizó una línea de calibrado para un rango de concentraciones entre 0,2 ppm y 2 ppm. Asimismo, de los cromatogramas que se obtuvieron se calcularon las relaciones de áreas que se representaron frente a la concentración para la obtención de la línea de calibrado. A modo de ejemplo, a continuación se muestra una representación para el Cumafós y para el τ -Fluvalinato (**Figura 21** y **Figura 22** respectivamente).

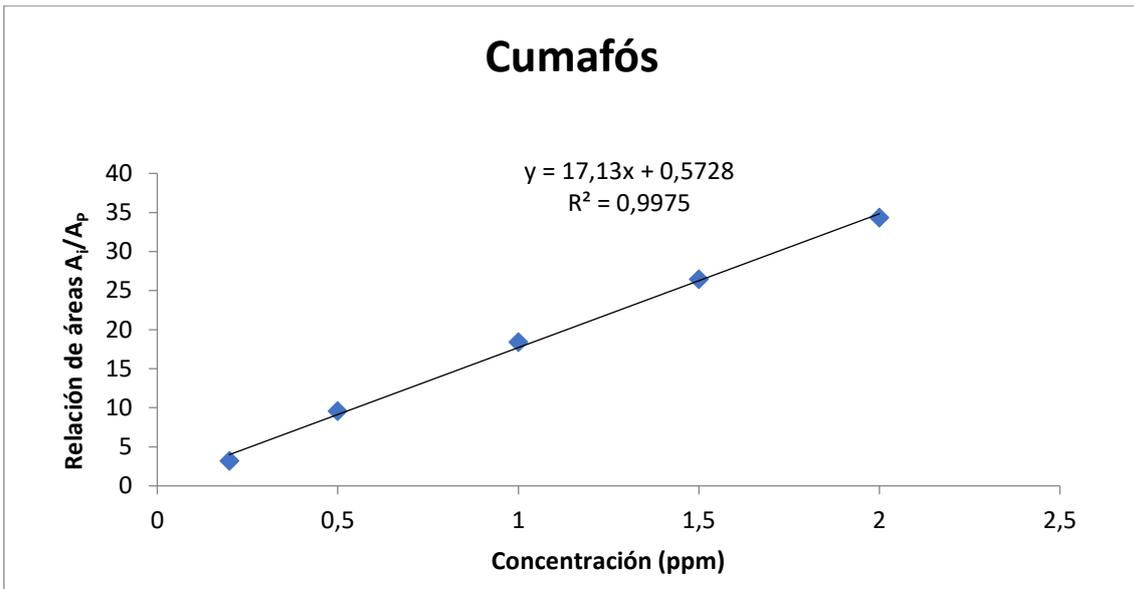


Figura 21. Línea de calibrado para la miel multifloral del Cumafós.

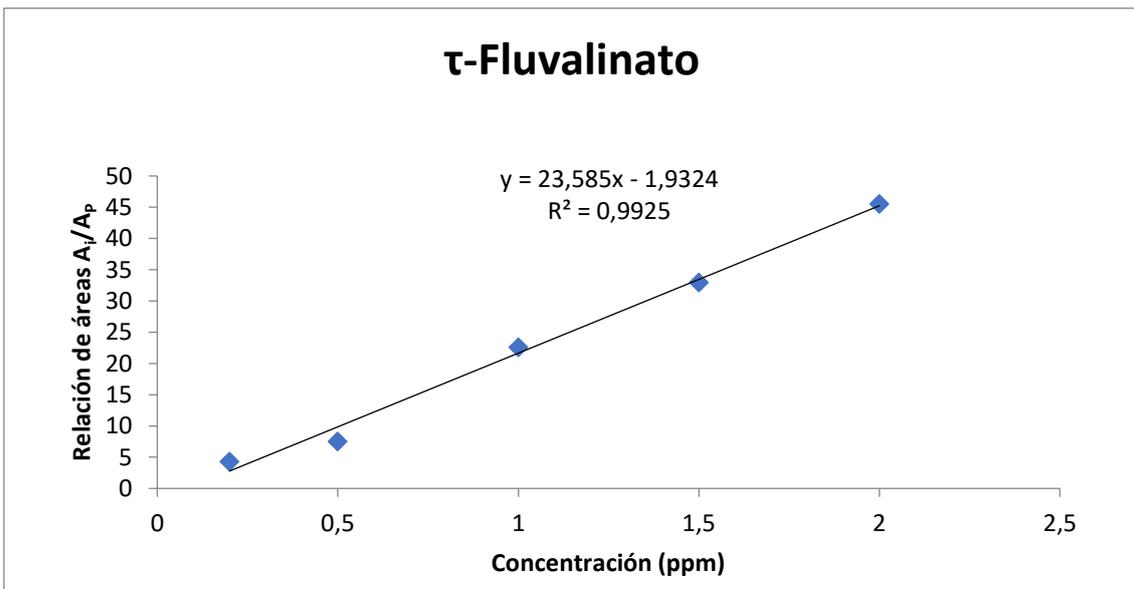


Figura 22. Línea de calibrado la miel multifloral del τ -Fluvalinato.

Los datos de todas las pendientes, ordenadas en el origen y coeficientes R^2 para cada uno de los plaguicidas se recogen en la siguiente tabla.

Tabla 18. Pendiente, ordenada en el origen y coeficiente R² de la línea de calibrado correspondiente a cada plaguicida para la miel multifloral.

Plaguicida	Ecuación de la recta		
	Pendiente	Ordenada	R ²
Atrazina	23,796	0,5408	0,9955
Clorpirifos	10,252	0,2035	0,9984
Clorfenvinfos	18,711	0,0512	0,9962
α-Endosulfán	2,5529	-0,0129	0,9974
Bromopropilato	0,1453	-0,005	0,9989
Cumafós	17,13	0,5728	0,9975
τ-Fluvalinato	23,585	-1,9324	0,9925

En cuanto al estudio del efecto matriz, se siguió el mismo procedimiento que para la miel de romero obteniéndose los resultados que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 19. Recuperación del contenido en mg/kg de los plaguicidas estudiados en la miel multifloral utilizando como patrón interno el Clorfenvinfos deuterado.

[] (mg/kg)	Patrón interno: Clorfenvinfos deuterado						
	Atrazina	Clorpirifos	Clorfenvinfos	α-Endosulfán	Bromopropilato	Cumafós	τ-Fluvalinato
0,393	0,391	0,386	0,395	0,383	0,401	0,398	0,383
0,994	1,06	1,04	1,05	1,05	1,04	1,04	0,932
1,98	2,02	2,04	2,03	1,97	1,98	2,02	1,94
3,00	3,01	3,03	3,09	3,09	3,03	3,01	3,05
3,99	3,89	3,94	3,90	3,95	4,04	3,93	4,01

Como se desprende de los resultados, los valores obtenidos son comparables a los de la miel de romero.

8. CONCLUSIONES

- ❖ Se ha desarrollado un método para la determinación de siete plaguicidas en muestras de miel de distinto origen floral empleando la extracción líquido-líquido utilizando como mezcla extractante AcOEt:C₆H₁₂.
- ❖ La proporción de disolvente más adecuada para realizar la extracción resultó ser la mezcla constituida al 50:50 (v/v) de AcOEt:C₆H₁₂.
- ❖ La utilización de MgSO₄ y NaCl como sales de secado no mejoró el procedimiento por lo cual se decidió no usarlas.
- ❖ Se estimó que el tiempo de agitación más adecuado para el proceso era de 10 minutos.
- ❖ El método que se propone se aplicó a dos muestras de miel de distinto origen floral: romero y multifloral proporcionando porcentajes de recuperación muy adecuadas (próximos al 100%) y se comprobó la ausencia de efecto matriz. Por ello, se puede realizar la cuantificación en dichas mieles con calibrado en patrones.

9. ABREVIATURAS

- TESEA = Laboratorio de Técnicas de Separación y Análisis Aplicado
- GC = Cromatografía de gases
- MS = Espectroscopía de masas
- EI = Ionización de impacto electrónico
- CI = Ionización química
- MSD = Detector selectivo de masas
- PESTANAL® = Patrón para análisis de pesticidas
- PESTIPUR = Pureza compatible con el análisis de pesticidas
- ppm = Partes por millón
- ACN = Acetonitrilo
- H₂O = Agua
- AcOEt = Acetato de etilo
- C₆H₁₂ = Ciclohexano
- A_i = Área del pico de la muestra
- A_p = Área del patrón interno
- QuEChERS = Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (Rápido, Fácil, Barato, Efectivo, Robusto y Seguro).
- rpm = Revoluciones por minuto
- % R = Porcentaje de recuperación
- % ME = Porcentaje de efecto matriz
- UE = Unión Europea
- PPPs = Plant Protection Products, Productos para la protección de plantas
- MRL = Maximum Residue Level, Nivel máximo de residuo
- TIC = Total Ion Chromatogram (Cromatograma de iones totales)
- NIST = Instituto nacional de estándares y tecnología

10. LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Varroa destructor en el cuerpo de dos abejas.....	15
Figura 2. Esquema de los distintos métodos de extracción encontrados	21
Figura 3. Cromatógrafo de gases Agilent Technologies series 7890 A acoplado a un detector de espectrometría de masas Agilent Technologies 5975 C.	25
Figura 4. Rotavapor R-3 de BÜCHI.	26
Figura 5. Conjunto de micropipetas utilizadas	27
Figura 6. Espectro de masas del τ -Fluvalinato en que se observan los tres iones de m/z distinta.....	30
Figura 7. Cromatograma en modo SIM de los siete plaguicidas en una concentración de 0,5 ppm	30
Figura 8. Cromatograma en modo SIM de un patrón de 0,5 ppm: (1) Atrazina, (2) Clorpirifos, (3) Clorfenvinfos, (4) α -Endosulfán, (5) Bromopropilato, (6) Cumafós y (7) τ -Fluvalinato.....	32
Figura 9. Línea de calibrado para el patrón del Cumafós con el Clorpirifos como patrón interno.....	32
Figura 10. Línea de calibrado para el patrón del τ -Fluvalinato con el Clorpirifos como patrón interno.....	33
Figura 11. Línea de calibrado para el patrón del Cumafós con el Clorfenvinfos como patrón interno.....	34
Figura 12. Línea de calibrado para el patrón del τ -Fluvalinato con el Clorfenvinfos como patrón interno	34
Figura 13. Esquema de las variables de optimización.	36
Figura 14. Esquema general de trabajo.	39
Figura 15. Cromatograma en modo SIM de una muestra dopada antes: (1) Atrazina, (2) Clorpirifos, (3) Clorfenvinfos, (4) α -Endosulfán, (5) Bromopropilato, (6) Cumafós y (7) τ -Fluvalinato	40
Figura 16. Cromatograma en modo SIM de una muestra dopada después: (1) Atrazina, (2) Clorpirifos, (3) Clorfenvinfos, (4) α -Endosulfán, (5) Bromopropilato, (6) Cumafós y (7) τ -Fluvalinato	41
Figura 17. Línea de calibrado para la miel de romero del Cumafós	41
Figura 18. Línea de calibrado la miel de romero del τ -Fluvalinato.....	42

Figura 19. Ecuaciones de porcentaje de efecto matriz (%ME)	43
Figura 20. Cromatograma en modo SIM de una muestra de miel multifloral de 0,5 ppm: (1) Atrazina, (2) Clorpirifos, (3) Clorfenvinfos, (4) α -Endosulfán, (5) Bromopropilato, (6) Cumafós y (7) τ -Fluvalinato	44
Figura 21. Línea de calibrado para la miel multifloral del Cumafós.	45
Figura 22. Línea de calibrado la miel multifloral del τ -Fluvalinato	45

11. LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Componentes de la miel y su rango en porcentaje.	12
Tabla 2. Características de las mieles tales como color, sabor, aroma y cristalización.....	12
Tabla 3. Nombre, nombre comercial, fórmula molecular, masa molecular, familia, actividad y límite apto para el consumo humano de la Atrazina	16
Tabla 4. Nombre, nombre comercial, fórmula molecular, masa molecular, familia, actividad y límite apto para el consumo humano del Bromopropilato	16
Tabla 5. Nombre, nombre comercial, fórmula molecular, masa molecular, familia, actividad y límite apto para el consumo humano del Clorfenvinfos.....	17
Tabla 6. Nombre, nombre comercial, fórmula molecular, masa molecular, familia, actividad y límite apto para el consumo humano del Clorpirifos	18
Tabla 7. Nombre, nombre comercial, fórmula molecular, masa molecular, familia, actividad y límite apto para el consumo humano del Cumafós	18
Tabla 8. Nombre, nombre comercial, fórmula molecular, masa molecular, familia, actividad y límite apto para el consumo humano del α -Endosulfán.....	19
Tabla 9. Nombre, nombre comercial, fórmula molecular, masa molecular, familia, actividad y límite apto para el consumo humano del τ -Fluvalinato	20
Tabla 10. Gradiente térmico empleado.....	29
Tabla 11. Tiempo de retención, m/z cuantificador y m/z de confirmación de cada plaguicida	31
Tabla 12. Pendiente, ordenada en el origen y coeficiente R^2 de la línea de calibrado correspondiente a cada plaguicida en relación con el Clorpirifos	33
Tabla 13. Pendiente, ordenada en el origen y coeficiente R^2 de la línea de calibrado correspondiente a cada plaguicida en relación con el Clorfenvinfos	35
Tabla 14. Resultados de % R y % ME para cada uno de los plaguicidas a cada cantidad de sales utilizando como patrón interno Clorfenvinfos deuterado.....	37
Tabla 15. Resultados de % R para cada uno de los plaguicidas a cada tiempo de agitación utilizando como patrón interno el Clorfenvinfos deuterado.....	37
Tabla 16. Pendiente, ordenada en el origen y coeficiente R^2 de la línea de calibrado correspondiente a cada plaguicida para la miel de romero.	42

Tabla 17. Recuperación del contenido en mg/kg de los plaguicidas estudiados en la miel de romero utilizando como patrón interno el Clorfenvinfos deuterado	43
Tabla 18. Pendiente, ordenada en el origen y coeficiente R^2 de la línea de calibrado correspondiente a cada plaguicida para la miel multifloral.	46
Tabla 19. Recuperación del contenido en mg/kg de los plaguicidas estudiados en la miel multifloral utilizando como patrón interno el Clorfenvinfos deuterado	46

12. BIBLIOGRAFÍA

- [1] *¿Cómo elaboran la miel las abejas?* 2020. [online] Available at: <<http://www.mielarlanza.com/es/contenido/?iddoc=64>> [Accessed 17 May 2020].
- [2] Ecocolmena, innovación social en apicultura, 2020. *Beneficios y propiedades de la miel natural de las abejas*. [online] Available at: <<https://ecocolmena.com/beneficios-y-propiedades-de-la-miel-natural-de-las-abejas/>> [Accessed 17 May 2020].
- [3] Martínez-Ghersa M. A., *Consecuencias ambientales del uso de pesticidas*. Ciencia Hoy 122 (2011) 30-35.
- [4] Viglizzo, E. and Jobbagy, E., 2010. *Expansión de la frontera agropecuaria en Argentina y su impacto ecológico-ambiental* [online] Available at: <https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-expansin_frontera_agropecuaria_2010.pdf> [Accessed 19 May 2020].
- [5] 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 (2016).
- [6] Lozano, A., Hernando, M., Uclés, S., Hakme, E. and Fernández-Alba, A., *Identification and measurement of veterinary drug residues in beehive products*. Food Chemistry 274 (2019), 61-70.
- [7] Gracia, M., Moreno, C., Ferrer, M., Sanz, A., Peribáñez, M. and Estrada, R., *Field efficacy of acaricides against Varroa destructor* PLOS ONE, 12(2) (2017).
- [8] Bedmar F., *¿Qué son los plaguicidas?* Ciencia Hoy 122 (2011) 10-16.
- [9] 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.
- [10] Pettis, J. S., Wilson, W. T., Shimanuki, H., & Teel, P. D. Fluvalinate treatment of queen and worker honeybees (*Apis mellifera* L) and effects on subsequent mortality, queen acceptance and supersedure. Apidologie, 22(1), (1991) 1–7.
- [11] Fell, R.D, Tignor, K. Acaricide effects on the reproductive physiology of queens and drones. American Bee Journal 141, (2001) 888- 889.

- [12] 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.
- [13] Masaquiza D.A., Curbelo L.M., Díaz B.L., Arenal A., *Varroasis y mecanismos de defensa de la abeja melífera (Apis mellifera)*. Producción animal 31 (3) (2019) 76-87.
- [14] Baša Česnik, H., Kmecl, V. and Velikonja Bolta, Š., *Pesticide and veterinary drug residues in honey - validation of methods and a survey of organic and conventional honeys from Slovenia*. Food Additives & Contaminants: Part A, 36(9) (2019) 1358-1375.
- [15] Adamczyk S., Lázaro R., Pérez-Arquillué C., Bayarri S., Herrera A., *Impact of the Use of Fluvalinate on Different Types of Beeswax from Spanish Hives*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 58 (2010) 733–739.
- [16] Wolansky M.J., *Plaguicidas y salud humana*. Ciencia Hoy 122 (2011) 23-29.
- [17] EU Pesticides Database - European Commission 2020. [online] Available at: <<https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.selection&language=EN>> [Accessed 15 April 2020].
- [18] Rodríguez García D., *Impacto social de la presencia de residuos químicos de síntesis en los productos de la colmena*. Revista electrónica de Veterinaria 8:10 (2007) 1695-7504.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] Bonzini, S., Tremolada, P., Bernardinelli, I., Colombo, M. and Vighi, M., *Predicting pesticide fate in the hive (part 1): experimentally determined τ -fluvalinate residues in bees, honey and wax*. Apidologie, 42(3) (2011) 378-390.