



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster en Técnicas Avanzadas en Química.

Análisis y Control de Calidad Químicos

ESTUDIOS DE MIGRACIÓN DE ACARICIDAS DESDE LA CERA

ESTAMPADA A LA MIEL

Autor:

Edgar Imaz Sánchez

Tutor/es:

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 Nalda y la supervisión del Dr. D. José Luis Bernal Yagüe. A ambos y a los demás miembros del grupo mi más sincero agradecimiento por todo lo vivido.

También he de agradecer el suministro de muestras efectuado por el Grupo del Dr. D. Mariano Higes Pascual del Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal (IRIAF) en Marchamalo (Guadalajara) investigador responsable del Proyecto Coordinado RTA2017-00004-CO2-01.

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, agradecer el apoyo incondicional de mi familia y amigos, especialmente el de mi abuela Flora.

RESUMEN

La utilización de cera estampada favorece el trabajo de las abejas a la hora de construir los panales, ahora bien, hay una constancia generalizada de que en la mayoría de los casos esas láminas de cera llevan unas cantidades preocupantes de residuos de xenobióticos y en particular de los compuestos empleados contra *Varroa*, es por ello que se hace necesario controlar la calidad de las láminas que se introducen en la colmena. Actualmente hay algunos fabricantes que suministran láminas descontaminadas mientras que también en el comercio se siguen encontrando láminas con residuos. Además de los problemas que pueden originar en las abejas existe el problema añadido de que pueden migrar a la miel contaminándola y creando un problema de seguridad alimentaria.

Con este trabajo se ha iniciado un estudio acerca de la posible migración de acaricidas desde la cera estampada a la miel, para ello se ha seleccionado el cumafos por ser uno de los acaricidas encontrados en mayores cantidades y con mucha frecuencia en las láminas actualmente en el mercado. Se ha diseñado una experimentación consistente en poner en contacto cera descontaminada y cera contaminada con miel con agitación y temperatura constante y examinando a lo largo del tiempo los residuos presentes en ambas matrices. Los análisis se han efectuado por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas. El aislamiento de los compuestos ha implicado el empleo de extracciones líquido-líquido y el empleo de sorbentes especiales para eliminar los lípidos presentes en la cera que provocan unos efectos de matriz notables.

Se comprueba que la transferencia existe sobre todo cuando se utilizan láminas con contenidos elevados del acaricida.

SUMMARY

The use of laminated wax sheets favors the work of the bees when constructing the combs, however there is a generalized evidence that in most cases these sheets of wax carry worrying amounts of xenobiotic residues and in particular of the compounds used against *Varroa*, which is why it is necessary to control the quality of the sheets that are introduced into the hive. Currently, there are some manufacturers that supply decontaminated films, while films with residues are still found in commerce. In addition to the problems that can originate in bees, there is the added problem that they can migrate to the honey, contaminating it and creating a food safety problem.

With this work, a study has been started on the possible migration of miticides from laminated wax to honey, for this; coumaphos has been selected because it is one of the compounds found in greater quantities and with much frequency in the sheets currently in the market. An experiment has been designed consisting of putting decontaminated wax and wax contaminated with honey in contact, with stirring and constant temperature and examining the residues present in both matrices over time. The analysis was carried out by gas chromatography with detection by mass spectrometry. The isolation of the compounds has involved the use of liquid-liquid extractions and the use of special sorbents to eliminate the lipids present in the wax that cause remarkable matrix effects.

It is found that the transfer exists especially when using sheets with high contents of the acaricide.

ÍNDICE

1.-INTRODUCCIÓN	3
2.-Antecedentes bibliográficos y situación del tema.....	5
2.1.-La miel.....	7
2.2.-La cera	8
2.3.-Estudio de la migración de xenobióticos	9
2.4.-Métodos de análisis de acaricidas en productos apícolas	10
3.-OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO	14
4.-INSTRUMENTACIÓN Y MATERIALES.....	15
4.1.-Equipo de análisis	15
4.2.-Equipos adicionales.....	16
4.3.-Otras herramientas y materiales de laboratorio	17
4.4.-Reactivos y disolventes	17
5.-PARTE EXPERIMENTAL	18
5.1.-Condiciones cromatográficas.....	18
5.1.1.-Condiciones del detector selectivo de masas	19
5.2.-Estudio del proceso de migración de acaricidas desde la cera a la miel.....	20
5.2.1.-Ensayos previos	21
5.2.2.-Procedimiento	22
5.2.3.-Pruebas realizadas	23
5.3.-Preparación de las muestras.....	26
5.3.1.-Tratamiento de la miel	26
5.3.2.-Tratamiento de la cera	29
5.4.-Preparación de patrones para las líneas de calibrado	31
5.4.1.-Líneas de calibrado para miel	31
5.4.2.-Líneas de calibrado para cera	32
6.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
6.1.-Estudio de la migración	39
7.-CONCLUSIONES	41
8.-REFERENCIAS.....	42

1.-INTRODUCCIÓN

La abeja melífera tiene un papel crucial en la agricultura y en el ecosistema global al polinizar las plantas, al mismo tiempo que proporciona productos con alto valor económico. Globalmente ese valor se ha estimado en aproximadamente 300 mil millones de dólares por lo tanto un punto esencial es intentar su bienestar y conservación. No obstante, en esta centuria se ha observado a nivel mundial una desaparición progresiva de estos insectos atribuyéndose a múltiples factores tales como la exposición a los plaguicidas, patógenos, parásitos y degradación del hábitat natural. Entre esos factores, a los que debería añadirse también el inadecuado manejo de las colmenas, se da una gran importancia al impacto de los plaguicidas ya sean provenientes de su actividad pe coreadora como a los propios tratamientos de la colmena, muchas veces sin la prescripción de los veterinarios.

En la actualidad hay una inquietud muy seria por la propagación de *Varroa* y *Nosema*, por los tratamientos que para su mitigación se efectúan y por la resistencia de esos patógenos a dichos tratamientos, empleándose en la mayoría de los casos el tau-fluvalinato y mucho más recientemente cumafos. No obstante, la contribución relativa de esos plaguicidas en la pérdida de las colonias de abejas todavía no se conoce.

En diversos estudios que se han realizado en nuestro grupo se ha podido constatar que la mayor parte de los plaguicidas frecuentemente encontrados y en particular los dos miticidas señalados tienden a concentrarse en la cera y no desaparecen de ésta con los tratamientos habituales de limpieza con agua a altas temperaturas por lo que, al reutilizar esa cera para fabricar láminas, se mantienen en ellas en concentraciones apreciables. Como esas láminas, tres o cuatro por colmena, se introducen en todas las campañas resulta que se está poniendo en contacto a las abejas con unas sustancias tóxicas que al mismo tiempo pueden estar presentes en los productos de la colmena y en particular en la miel.

Se hace pues necesario conocer el grado en que pueden transferirse esos compuestos desde la cera a la miel. Hay pocas referencias al respecto y, podría decirse, con escaso rigor científico puesto que no se suelen detallar ni cantidades ni modo de operar, por ello en este trabajo se ha iniciado una línea de investigación para poder llegar a conocer de un modo más adecuado esa migración. Puesto que en los últimos análisis sobre láminas de cera comercializadas en nuestro País se ha observado una tremenda diferencia entre los contenidos de residuos, se ha decidido emplear una cera altamente contaminada y otra descontaminada, que se ha empleado como blanco y como matriz para hacer adiciones de cantidades conocidas, en

ambos casos se añade una cantidad adecuada de miel, previamente analizada, y se dejan en contacto en un agitador-incubador durante un tiempo prolongado y con diferentes condiciones de temperatura y agitación.

Tanto las muestras de cera como la miel han sido monitorizadas para conocer el contenido en cumafos, lo cual se ha llevado a cabo aplicando procedimientos de aislamiento/limpieza basados en extracción líquido-líquido y con el empleo de sorbentes específicos, para solventar el problema del contenido lipídico de las ceras. Posteriormente se han detectado y cuantificado empleando cromatografía de gases con detección de espectrometría de masas de cuadrupolo simple.

Los resultados de este estudio inicial muestran que obviamente la cantidad presente inicialmente en la cera influye sustancialmente en la transferencia a la miel, lo cual sugiere que en el futuro deben contemplarse las diferentes posibilidades teniendo en cuenta que la calidad de las láminas es tremendamente diferente.

2.-ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS Y SITUACIÓN DEL TEMA

Las abejas son los principales polinizadores y juegan un papel crucial en la producción de alimentos, de manera que cerca de un tercio de los cultivos del mundo dependen directamente de la polinización natural de estas especies; a lo que, además, y entre otros muchos aspectos de beneficio, debe añadirse su papel en el mantenimiento de la biodiversidad [1]. Debido a esto se hace fundamental su cuidado, asegurando su buen desarrollo y el tratamiento de las colmenas por parte de los apicultores.

Lamentablemente, a nivel mundial se ha apreciado una progresiva disminución del número de individuos y colmenas [2]. Este fenómeno que se denominó como “Síndrome de Despoblamiento” ha originado una gran preocupación tanto socioeconómica como medioambiental, y a día de hoy ha motivado un gran número de estudios y publicaciones relacionados con el tema, incentivando además la actividad de numerosas asociaciones y fundaciones, que tienen como objetivo principal el sensibilizar a la opinión pública y a las instituciones acerca de la importancia de las abejas, difundiendo conocimientos mediante acciones de investigación, divulgación y educación, que contribuyan a su protección y conservación.

Los factores más influyentes afectando a la salud de los polinizadores están relacionados con enfermedades y parásitos, con el cambio climático y con prácticas agrícolas más amplias que no han estado reguladas adecuadamente. Muchos apicultores coinciden en que el ácaro ectoparásito invasivo *Varroa destructor* y el microsporidio *Nosema ceranae* [3] son los dos principales vectores que producen daños directos a las colonias de las abejas, surgiendo la necesidad de prácticas veterinarias que mediante el empleo de acaricidas como el cumafos y otros productos, puedan controlar a estos parásitos [4].

El cumafos al igual que la mayoría de los acaricidas son moléculas orgánicas de carácter predominantemente lipofílico, lo que hace que tengan una gran tendencia a quedar en la cera [5]. Esta cera se recoge, se purifica y recibe usos muy diversos entre los que destaca la fabricación de láminas para la introducción en las colmenas con el objetivo de facilitar la labor de las abejas. Si esa cera tiene residuos de xenobióticos supondrá un grave problema para las larvas, nodrizas y adultas de la colmena. Cuantos más ciclos de reutilización sufra la cera más problemas origina, puesto que, estos compuestos no se eliminan correctamente en los procesos de limpieza que se llevan a cabo fundiendo la cera (tienen una alta estabilidad y pueden resistir la temperatura de fusión de limpieza de la cera), lo que hace que puedan ir

acumulándose durante mucho tiempo y su concentración vaya en aumento [6]. Desde la aprobación del uso de cumafos (2007 en España), su presencia y cantidades han ido aumentando notablemente estando presente en un porcentaje superior al 85% en las colmenas de nuestro País [4]. Por ahora solo la destrucción total de la cera por quemado parece ser la forma de eliminar totalmente estos residuos, siendo así de gran interés el encontrar otras operaciones de limpieza efectivas que sean menos drásticas. Así han ido surgiendo alternativas naturales como el tratamiento de las muestras de cera con carbón activo y tierra de diatomeas que elimina una buena parte de los residuos de tratamientos [7]. Aunque no son tantos los estudios acerca de la migración de los acaricidas de la cera a la miel, este tema ha ido convirtiéndose en una preocupación creciente debido a que no solo contribuyen a disminuir las propiedades beneficiosas de la miel, sino que, si están en cantidades significativas pueden suponer una amenaza en la salud humana.

El profesor Bogdanov, que es una de las autoridades mundiales sobre el tema, ya insistió hace años en los peligros de los residuos de acaricidas en la colmena [8, 9], señalando que en la usual limpieza de las ceras hirviendo con agua el nivel de residuos final es casi dos veces más alto que antes de que fuese fundida, y que cuanto más tiempo se hierve más se enriquece la cera en residuos. Esto mismo fue confirmado por Wallner que señaló la excesiva presencia de acaricidas en cera y los riesgos que esto tenía para la vida de la colmena [10]

Sobre este tema hay artículos más recientes, por ejemplo, el análisis llevado por Bogdanov en 2004 de residuos en mieles y ceras de origen suizo [11], que sirven como aviso ante una posible migración de los mismos desde la cera a la miel, lo que puede hacer que ciertos compuestos que no deban estar presentes en alimentos y sean perjudiciales para la salud humana acaben encontrándose.

En otros países como Francia los datos son igual de preocupantes reflejando que el 69% de las muestras de cera están contaminadas, pero esta vez atribuyen la mayor causa a los tratamientos directos sobre la colmena, [12] se concluye que al entrar en contacto con estos plaguicidas se reduce la longevidad de la abeja adulta, y las larvas pueden llegar a no desarrollarse, además de que se incrementa la susceptibilidad a Nosema.

En un amplio estudio realizado durante diez años en Italia [13] se confirma también la presencia de residuos en las ceras. La mayoría corresponden a acaricidas y se atribuye la presencia de estos compuestos con el tratamiento directo sobre las colmenas junto con la propia contaminación introducida en la labor de las abejas sobre campos con residuos.

De esta manera queda reflejada la presencia de residuos en cera y la transferencia potencial que desde dentro de la colmena puede lograrse de estos contaminantes a los diferentes productos que presenta. Aunque es de interés el conocer el movimiento, la migración y disipación de estos compuestos en la colmena no hay demasiados estudios acerca de ello. El más comentado es el de Kochanski [14] que corrobora experiencias ya expuestas en 1992 por Wallner que anunciaba una transferencia de Cumafos desde la cera a la miel en elevadas concentraciones. También, empleando una metodología más detallada el grupo del profesor Reybroeck [15] examina la posible transferencia desde una cera que contaminan con sulfametacina a la miel, logrando detectar valores de transferencia de un 30 % de la cantidad inicial. En una experimentación muy similar más recientemente se ha mostrado la transferencia de nitroimidazoles desde la cera a la miel donde a su vez son persistentes y resulta que esos compuestos no están autorizados en Europa para el tratamiento de Nosema [16].

2.1.-La miel

Es un producto de la colmena que se emplea desde los orígenes del ser humano, siendo ya referenciada en pinturas rupestres y siendo nombrada en multitud de libros como la Biblia, el Corán, etc. Sus usos eran muy diversos, pero sobre todo se empleaba como alimento y en medicina en la cura de heridas.

Según el diccionario de la lengua española, la miel es una sustancia viscosa, amarillenta y muy dulce que producen las abejas. Está compuesta principalmente por: agua (entre el 15 y el 19%) e Hidratos de carbono (Fructosa, Glucosa y en menor medida maltosa y sacarosa). Además, presenta vitaminas A y B6, ácidos orgánicos, ácidos minerales y aminoácidos esenciales.

La diversidad en el tipo de mieles está relacionada con las flores sobre las que la abeja extrae el néctar, que más adelante tratan y convierten en miel. Principalmente se distinguen dos tipos de mieles: Monofloral y Multifloral. La diferencia es muy sencilla, siendo la monofloral aquel tipo de miel en la que predomina un tipo de flor sobre el resto. Podemos encontrar miel de Romero, Eucalipto, Brezo, Espliego, Tomillo, Azahar, entre otras. Por otra parte, la miel multifloral es aquella que tiene una amplia combinación de flores y ninguna predomina sobre el resto, popularmente es conocida como Miel Mil Flores. Dependiendo su procedencia las mieles tendrán diferentes características de sabor, color, aroma, etc.

2.2.-La cera

La cera es el material con el que las abejas construyen sus celdillas. Es producida por las abejas melíferas jóvenes que la segregan como líquido a través de sus glándulas. Al entrar en contacto con el aire, la cera se endurece y forma pequeñas escamillas de cera, siendo un millón el número de escamillas necesarias para obtener aproximadamente un kilogramo de cera. Las abejas la utilizan para construir las celdillas hexagonales de sus panales, donde conservan la miel y el polen; la reina deposita en ellas sus huevos y las nuevas abejas se crían en su interior.

La cera de la *Apis mellifera* ha sido separada en más de 300 componentes entre los que cabe destacar: agua e impurezas minerales (1-2%), monoésteres de ácidos céreos, hidroésteres, diésteres y triésteres (71%), colorantes (0.3%), ésteres de colesterilo (1%), lactonas (0.6%), ácidos céreos libres (13.5-14.5 %) e hidrocarburos (10.5-13.5 %).

El punto de fusión de la cera está comprendido entre 62 - 65 °C y los valores de densidad entre 0,939 y 0,987 g/mL. Es insoluble en agua y alcohol frío, parcialmente soluble en alcohol caliente y éter, y soluble en grasas calientes, aceites estéricos, benceno caliente y cloroformo. La cera de abejas tiene diversas aplicaciones, destacando en: industria (barnices, velas, impermeabilizantes, etc.), cosmética (ingredientes de lápices labiales, cremas depilatorias), apicultura (para el hábitat de las abejas en forma de cera estampada) y otras como pueden ser en la industria farmacéutica.

La calidad de la cera de las abejas se refleja a partir de su pureza y su color. La de color claro tiene un valor superior a la de color oscuro, ya que una tonalidad más oscura normalmente es motivo de contaminación. La más fina se extrae de la fundición de las capas de cera con la que estos insectos cubren la miel cuando está en su punto. Esta nueva cera es pura y blanca, siendo el color amarillento debido a la presencia de polen. Por ello, para elaborar la cera se debe partir siempre de la obtenida de los opérculos. La purificación de la cera se realiza en equipos derretidores donde se introducen los panales y se funden. Lo más habitual es el tratamiento con agua hirviendo y sucesivos tratamientos con hidróxido de sodio y ácido sulfúrico, lavados repetidamente con agua y posteriormente decoloración con peróxido de hidrógeno para su uso en la industria. De esta manera nos aseguramos que gran cantidad de contaminantes de naturaleza similar sean eliminados. Una vez que la cera está limpia y enfriada, se vuelve a fundir para homogeneizarla y se lleva a la laminadora donde se extienden y se forman las finas

láminas de cera de unos 2 o 3 milímetros de espesor, que finalmente se introduce en la prensa estampadora para que queden impresas las celdillas hexagonales (Figura 1).



Figura 1. Láminas de cera estampada de distinta calidad

2.3.-Estudio de la migración de xenobióticos

Como ya se ha comentado, el empleo de láminas de cera estampada es una práctica muy útil en el ámbito de la apicultura comercial. Estos panales de cera actúan como almacén y soporte de los alimentos de la colmena y es en ellos donde se alojan y desarrollan las crías de abeja. El reciclaje [17] y reutilización de estas hace que se incremente la acumulación de los residuos químicos y, debido al íntimo y estrecho contacto que hay en el interior de la colmena, pueden transferirse de la cera a la miel.

La tendencia de los plaguicidas a repartirse y acumularse en los productos de la colmena está asociada a la capacidad del compuesto para interactuar con las matrices de la colmena, lo cual está condicionado por determinadas propiedades fisicoquímicas del plaguicida como son la solubilidad en agua, la presión de vapor, la estructura molecular, los valores de pKa y la lipofilia [18, 19].

Diversos estudios han evidenciado que la cera de las abejas constituye un importante reservorio de plaguicidas lipofílicos, mientras que la miel ha demostrado estar menos contaminada de estos debido a su naturaleza acuosa. Señalan que los compuestos lipofílicos pueden solubilizarse en la miel al interactuar con las proteínas y aceites esenciales solubilizados, y que el contenido de agua contribuye a la inestabilidad de estos compuestos debido a procesos hidrolíticos y oxidativos. Cuando se extrae la miel del panal de cera también

se extraen diminutas partículas de cera no visibles a simple vista, de manera que si no se realiza un filtrado adecuado al tamaño de las partículas permanecerán en la miel y serán analizadas junto con ella, detectándose contaminantes que en principio no deberían contener y cuya migración se ve favorecida también por las altas temperaturas que se emplean en el proceso de licuado [20, 21].

Estudios recientes [19] han pretendido determinar experimentalmente la distribución y el tiempo de vida media de estos compuestos entre estas matrices, y extrapolar los resultados a muestras de cera y miel de colmenares de otros orígenes.

Todos concluyen que debido al amplio uso de la cera de abeja en la industria farmacéutica, nutracéutica y cosmética deberían de establecerse valores de LMR para las ceras de abeja.

2.4.-Métodos de análisis de acaricidas en productos apícolas

El reto principal a la hora de determinar acaricidas en productos de las colmenas está en la limpieza que es necesaria llevar a cabo de las muestras para evitar los problemas de la matriz, ya que presentan o pueden presentar un gran número de compuestos lipofílicos, pigmentos, vitaminas y proteínas que suelen ser los interferentes más problemáticos durante el análisis [22]. Normalmente es necesario llevar a cabo un procedimiento de extracción y purificación adaptado al tipo de muestra considerada. De esta manera, en el tratamiento de las ceras se prefiere la extracción con disolventes orgánicos como el hexano [4, 23, 24], la acetona o el acetato de etilo [25], mezclas de acetona-agua o acetona-hexano [26, 27] y actualmente un tratamiento con una mezcla de agua-acetonitrilo [28, 29] o acetonitrilo ligeramente acidificado [30]. Para solventar las interferencias causadas por la matriz se han empleado numerosos procedimientos de limpieza, siendo los más destacados: extracción en fase sólida con C18 y/o sorbentes Florisil [27], filtración [31], cromatografía por permeación de gel (GPC) [32], dispersión sólida de la matriz (MSPD) combinada con limpieza en C18 o Florisil [33]. Sin embargo, la mayor tendencia es emplear la metodología QuEChERS [27, 29, 20, 34] o semiQuEChERS con diferentes modificaciones que incluyan una etapa para remover los lípidos y materiales grasos de la matriz y una etapa de congelación o extracción en fase sólida dispersiva como etapa de limpieza final [30].

Por su parte, el tratamiento de mieles presenta menor número de problemas que en el caso de la cera en cuanto a problemas con la matriz y de interferencias generadas, lo que no quita que la forma de tratarlas pueda variar en función del origen de la miel. Normalmente, su

análisis suele ser más sencillo sin la necesidad de etapas de limpieza, empleando los disolventes extractantes que hemos mencionado para el caso de la cera y resaltando técnicas como la extracción líquido-líquido (LLE) [35], extracción asistida por ultrasonidos [36], microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) [37] o extracción asistida por microondas (MAE) [38]. Sin embargo, también es frecuente la descripción de técnicas de extracción en fase sólida (SPE) [39], microextracción en fase sólida (SPME) [40], extracción con fluidos supercríticos (SFE) [41] y la metodología QuEChERS [42].

Como técnicas analíticas empleadas para el análisis de plaguicidas destacan la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) [8, 42, 43, 37, 44] y la cromatografía de gases (GC) [8, 32, 34, 45], la utilización de una u otra depende principalmente de la naturaleza volátil y estabilidad térmica de los analitos. En cuanto al detector empleado, predomina la espectrometría de masas para el análisis de residuos debido a su elevada sensibilidad, pero también se emplean detectores de captura electrónica (ECD) [35], detectores de nitrógeno-fósforo (NPD), y de ionización en llama (FID). Asimismo, es habitual la combinación de varios de estos entre ellos [33], como puede ser GC-ECD/MS, GC-ECD/NPD/MS, etc.

A partir de la bibliografía anteriormente citada y la experiencia del equipo de investigación TESEA, se decidió que la mejor metodología para la determinación de acaricidas en miel y ceras, y, por tanto, el estudio de migración de acaricidas desde la cera a la miel, era mediante el empleo de técnicas de extracción líquido-líquido y semi-QuEChERS modificado, realizando la posterior cuantificación mediante un sistema de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS). Por ello a continuación se recogen algunos datos sobre estas metodologías:

- Extracción líquido-líquido (LLE). La extracción líquido-líquido es un procedimiento clásico muy versátil que puede ser empleado no solo para el aislamiento sino también para preconcentración y limpieza de los compuestos de una mezcla líquida. Se basa en la transferencia de los analitos debida a la diferente solubilidad de los mismos en dos fases inmiscibles (muestra y extractante). Para seleccionar el extractante hay que conocer la polaridad de los analitos de interés o de los interferentes que se quieren retirar. Se suelen utilizar disolventes orgánicos que tengan afinidad con los analitos a extraer, que sean inmiscibles con la fase acuosa en la que se presenten, y que sean relativamente volátiles para facilitar su posterior eliminación por evaporación, pudiéndose reconstituir con otro disolvente más adecuado para su posterior análisis.

Esta metodología es fácil de emplear, pero tiene desventajas como el empleo de volúmenes normalmente grandes de disolventes tóxicos e inflamables. En la Tabla 1 se recogen algunos ejemplos en los que se ha empleado para la extracción de plaguicidas.

Tabla 1.-Descripción de ejemplos de extracción de plaguicidas mediante LLE

Plaguicidas	Matriz	Aislamiento	Detección	Referencia
Acaricidas	Miel de colmena	Diclorometano	GC-NPD GC-ECD	[46]
11 plaguicidas organoclorados	Miel	Éter/acetato de etilo (80:20)	GC/MS	[47]
Plaguicidas	Miel	Acetato de etilo/C ₆ H ₁₂ (50:50)	GC-MS	[48]

- Metodología QuEChERS. Fue desarrollada en 2002 por Anastassiades [49] y se ha convertido en uno de los métodos más empleados para la extracción de pesticidas. Sus principios en inglés definen en resumidas cuentas esta metodología como rápida, fácil, barata, efectiva, robusta y segura. Con el fin de poderlo aplicar a matrices muy diversas y cada vez más complejas, se ha ido modificando a lo largo del tiempo optimizando o añadiendo diferentes etapas que permitan una mejora en la cantidad de pesticidas a extraer de la manera más ecológica posible.

El primer método que se desarrolló era una variación de la extracción líquido-líquido donde se empleaba acetonitrilo como disolvente, seguido de una etapa de retiro del agua remanente usando sulfato de magnesio anhidro. Tras esto, se centrifugaba y se recogía una alícuota del extractante al que se le realizaba una etapa de limpieza mediante extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) empleando PSA junto con nuevamente sulfato magnésico anhidro para asegurarse de que el extracto final no presentaba agua. El PSA (amina primaria y secundaria) tenía la función de actuar como sorbente para retirar la mayor cantidad de interferentes polares de la matriz. Sin embargo, la extracción de determinados pesticidas podía verse influenciado por el pH del medio, por ello surgió una adaptación al método que proponía introducir un tampón acetato en la etapa de extracción [50], logrando así mejorar la extracción de estos pesticidas sensibles al pH.

En el desarrollo de esta técnica para el caso de matrices que presentan un elevado contenido en pigmentos [44] o lípidos [51], se hace necesaria la introducción de una etapa

de limpieza más exhaustiva que retire dichos compuestos. Estas consisten en aplicar una amplia variedad de sorbentes entre los que destaca la mezcla de PSA con C18 o carbono grafitizado (GCB) (que retira muy bien los pigmentos), dióxido de zirconio (Z-Sep) que se ha comprobado que retira los lípidos y restos de cera de abeja residual [26, 52], etc. También está muy de moda el uso de tubos comerciales con los sorbentes ya preparados, que están optimizados para ser realmente efectivos para algunas matrices más complicadas. Así por ejemplo Agilent ofrece kits de SPE dispersivos (QuEChERS-Lipid) que están diseñados para extraer lípidos interferentes de las muestras sin afectar a los analitos de interés.

En la Tabla 2 se describen algunos ejemplos en los que se empleó esta metodología para la extracción de plaguicidas.

Tabla 2.-Algunos ejemplos de extracción de plaguicidas mediante QuEChERS

Plaguicidas	Matriz	Extracción	Detección	Referencia
Múltiples plaguicidas	Cera	QuEChERS	GC/GC-TOF	[22]
Múltiples plaguicidas	Cera	dSPE con Z-Sep	GC/MS-Q	[26]
Múltiples plaguicidas	Cera	QuEChERS	GC/NPD-ECD	[33]
Contaminantes no-target	Miel, Cera	QuEChERS	GC-TOF	[45]

3.-OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO

La finalidad de este Trabajo de Fin de Máster es la iniciación al estudio de los procesos de migración de acaricidas desde cera estampada a la miel, seleccionando el cumafos como el acaricida a seguir su evolución debido a su gran presencia en numerosas ceras analizadas. Para ello se siguió el siguiente plan de trabajo:

1. Búsqueda bibliográfica lo más actual posible acerca del cumafos, los productos de la colmena e investigaciones similares a la nuestra.
2. Tratamiento previo de las muestras seleccionadas de miel y cera sobre las que se va a realizar el estudio.
3. Empleo de la metodología semi-QuEChERS para la extracción de pesticidas en ceras y de LLE en mieles. Ambas fueron optimizadas en estudios anteriores por el grupo de investigación TESEA.
4. Determinación del contenido en cumafos en ambas matrices. Es necesario conocer las cantidades iniciales del acaricida que presentan ambas matrices, para posteriormente realizar un adecuado seguimiento de la migración de este.
5. Selección de ceras estampadas con distinto contenido de cumafos, una vez conocidas las concentraciones iniciales. Convenientemente utilizar para el estudio una miel sin restos de cumafos.
6. Poner en contacto ambas matrices y simular las condiciones existentes en el interior de una colmena. Para ello, se empleó un incubador con agitación orbital y se estudiaron las condiciones de agitación y temperatura.
7. Estudiar la posible migración empleando para ello ceras descontaminadas y contaminadas a concentraciones más bajas y a concentraciones elevadas.
8. Estudiar la transferencia de cumafos en relación con el tiempo que permanecen en contacto cera y miel.

4.-INSTRUMENTACIÓN Y MATERIALES

4.1.-Equipo de análisis

El equipo que se ha empleado para la separación y determinación de los plaguicidas en las diferentes matrices ha sido un cromatógrafo de gases Agilent Technologies series 7890A, que se compone, como muestra la Figura 2, de los siguientes componentes:

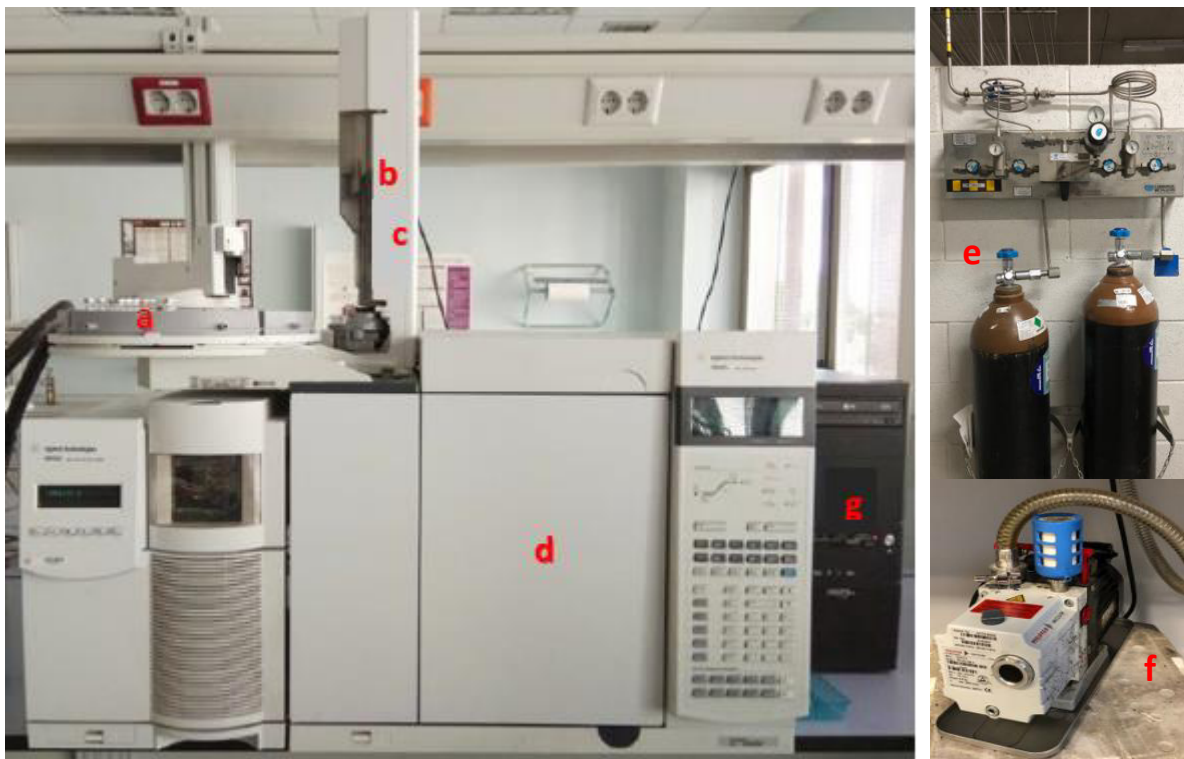


Figura 2. Cromatógrafo de gases Agilent Technologies series 7890A acoplado a un detector de espectrometría de masas Agilent Technologies 5975C

- a) Un automuestreador Agilent Technologies 7683 Series que presenta una bandeja con capacidad de hasta 100 viales.
- b) Un inyector automático Agilent Technologies 7683B Series compuesto por una jeringa de vidrio que puede recoger fracciones de muestra de hasta 10 μL .
- c) Un controlador de temperatura del portal de inyección, donde se volatiliza la muestra, que puede trabajar en modo split o splitless.
- d) Un horno de temperatura programable que permite establecer rampas de temperatura y en donde se encuentra alojada la columna de separación. La columna empleada es una columna capilar Agilent HP-5MS de dimensiones 30 m x 0,250 mm x 0,25 μm y rango de trabajo desde - 60 $^{\circ}\text{C}$ hasta 325 $^{\circ}\text{C}$.

- e) Una fuente que suministra el gas portador, el cual atraviesa un regulador de presión y una trampa de humedad para controlar el flujo y humedad respectivamente del gas de arrastre que entra al equipo.
- f) Sistema de vacío PREIFFER VACUUM.
- g) Ordenador para la adquisición de los datos y para el manejo y control del equipo.

El cromatógrafo está acoplado a un detector de espectrometría de masas Agilent Technologies 5975C que tiene incorporada una fuente de ionización dura de impacto electrónico y un analizador cuadrupolo simple.

El sistema GC/MSD es controlado desde el ordenador mediante los softwares Agilent MassHunter y Quantitative MassHunter.

4.2.-Equipos adicionales

- Agitador mecánico Vibromatic de J.P. SELECTA (Barcelona, Spain).
- Homogeneizador Ultra-Turrax T-18 de IKA (Germany).
- Vórtex de Heidolph (Germany).
- Balanza analítica AE 240 de Mettler Toledo (Darmstadt, Germany).
- Campana de flujo laminar de Flowtronic (Madrid, Spain).
- Molino de trituración M20 de IKA (Germany).
- Equipo de agua ultrapura Elix y Milli-Q de Millipore.
- Incubador con agitación orbital ES-80 de Grant-bio (Cambridge, UK).
- Baño de ultrasonidos termostaticado de J.P. SELECTA (Barcelona, Spain).
- Centrífuga con refrigeración 5810 R de Eppendorf (Hamburg, Germany).
- Estufa de secado de J.P. SELECTA (Barcelona, Spain).
- Rotavapor R-3 de BÜCHI (Switzerland).
- Frigorífico de FAIRLINE.
- Baño de agua termostaticado de J.P. SELECTA (Barcelona, Spain).

4.3.-Otras herramientas y materiales de laboratorio

- Micropipetas (Brand, Germany):
 - Transferpette S de 100 μ L y 1000 μ L.
 - Transferpette S de 0,5 a 5 mL.
 - FINNPIPETTE de 100-1000 μ L.
 - LabMate de 20-200 μ L.
- Puntas de micropipeta de Agilent Technologies.
- Tubos de polipropileno de 50 mL de ENDO plasticware.
- Tubos dSPE EMR-Lipid de Agilent Technologies.
- Tubo final polish con NaCl/MgSO₄ de Agilent Technologies.
- Material de laboratorio de uso común.

4.4.-Reactivos y disolventes

- Patrones de grado analítico para la preparación de las líneas de calibrado y el dopaje de muestras, todos fueron suministrado por Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemania):
 - Atrazina (99,5% pureza).
 - Clorpirifos (99,6% pureza).
 - Clorfenvinfos (98,9% pureza).
 - α -endosulfan (99,0% pureza).
 - Bromopropilato (99,6 pureza).
 - Cumafos (99,5% pureza).
 - τ -fluvalinato (99,6% pureza).

Como patrón interno se seleccionó el estándar deuterado Clorfenvinfos D-10, suministrado por Dr. Ehrenstorfer (99,1% pureza) (Augsburgo, Alemania).

- Acetonitrilo, ACN, acetato de etilo, AcOEt, y Ciclohexano, C₆H₁₂, de calidad PESTIPUR suministrado por CARLO ERBA Reagents.
- Ácido acético glacial de grado analítico suministrado por SigmaAldrich.
- Agua ultrapura obtenida utilizando los sistemas Milipore Milli-RO plus y Milli-Q.

5.-PARTE EXPERIMENTAL

5.1.-Condiciones cromatográficas

En base a la experiencia del grupo de investigación y algunos ensayos se seleccionaron las siguientes condiciones:

- Como columna se opta por una columna capilar de reparto Agilent HP-5MS, que es un polímero apolar (5% Fenil Metilpolisiloxano), con unas dimensiones de 30 m x 250 μm x 0,25 μm , y que tiene un intervalo de trabajo desde -60 °C hasta 325 °C.
- Se configuran 6 lavados antes y después de cada inyección, con el disolvente de lavado.
- El volumen de inyección se fija en 1 μL , y se provee mediante una jeringa de 10 μL .
- Como gas portador se emplea Helio, cuya entrada al sistema hay que regular con un manorreductor a una presión comprendida entre 4,5 y 5 bar, y se establece un flujo de trabajo de 1,2 mL/min.
- La inyección se llevó a cabo en modo splitless (sin división de flujo).
- La temperatura del portal de inyección se estableció en 280 °C.
- Se estableció un gradiente térmico desde los 60 °C iniciales hasta 310 °C, para ello se programaron dos rampas de temperatura (obsérvese en la Tabla 3 y Figura 3), consiguiéndose una eficiente separación de los analitos.

Tabla 3.-Programa de temperaturas del horno de GC

	Pendiente/°C·min ⁻¹	Temperatura/°C	Tiempo de meseta/min	Tiempo de análisis/min
Al Inicio	-	60	1	1
Rampa 1	40	170	0	3,75
Rampa 2	10	310	3	20,75
Post Run	-	320	5	25,75

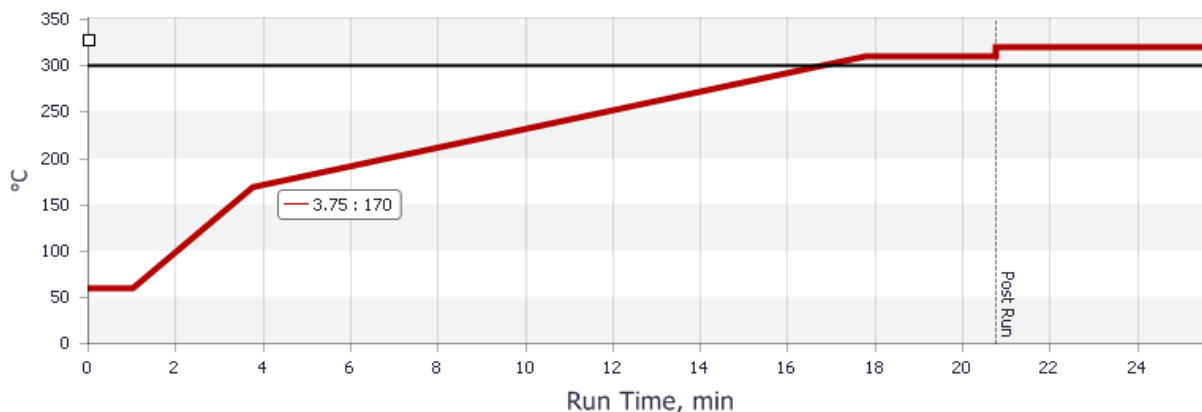


Figura 3. Gráfico del programa de temperatura del horno GC

5.1.1.-Condiciones del detector selectivo de masas

Acoplado al cromatógrafo de gases tenemos un detector selectivo de masas, que presenta una fuente dura como es la fuente de impacto electrónico (EI), Figura 4, que proporciona los iones fragmento positivos resultantes de la fragmentación de los analitos, y un analizador cuadrupolo simple que actúa de filtro dejando pasar los iones fragmento con relación m/z adecuados. La temperatura de la interfase GC/MS se estableció en 300 °C, la de la fuente de ionización en 230 °C y la del analizador en 150 °C. Estas dos últimas comienzan a adquirir la temperatura cuando la turbo bomba está trabajando por encima

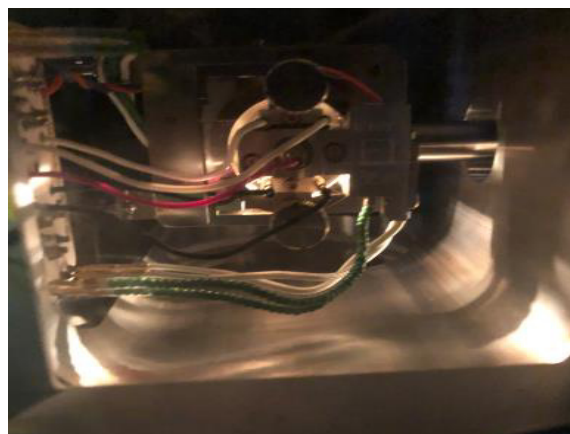


Figura 4. Fuente de ionización de impacto electrónico

del 80% de su capacidad. El factor de ganancia se establece en 1 y se configura el intervalo de trabajo para los modos de adquisición SIM y SCAN. En el modo SIM se seleccionan las relaciones m/z de los iones fragmento más abundantes de los analitos, de manera que el analizador actuará filtrando el resto de los iones dejando únicamente pasar al detector el que presente dicha relación m/z seleccionada, lográndose así una cuantificación lo más sensible posible. Por su parte, en el modo SCAN se establece un barrido completo de iones cuya relación m/z pertenezca al rango seleccionado, y se registran así los espectros de masa de cada uno de los analitos que emerjan de la columna. Para la cuantificación e identificación se monitorean tres iones seleccionados, el más abundante con el fin de cuantificar y los otros dos como iones cualificadores.

En la Tabla 4 se recogen las relaciones m/z de los 3 iones más abundantes para cada uno de los plaguicidas analizados en este trabajo junto con su peso molecular. La información de estos parámetros se obtuvo de la biblioteca de espectros, NIST, y fue confirmada con los patrones certificados. Además, se incluye una columna (“Identidad”) para identificarlos en el cromatograma de la Figura 5.

Tabla 4.-Información de plaguicidas característicos según la fuente NIST

Plaguicida	Pm/g·mol ⁻¹	m/z cuantificador	m/z confirmación	Identidad
Atrazina	215,69	200	215; 173	1
Clorpirifos	350,59	197	315; 258	2
Clorfenvinfos	359,57	267	329; 270	3
α-Endosulfán	406,93	241	195; 207	4
Bromopropilato	428,12	345	185; 183	5
Cumafos	362,77	362	226; 109	6
τ-Fluvalinato	502,91	250	207; 181	7
Clorfenvinfos D-10 (PI)	369,63	333	329; 270	PI

Por último, se selecciona un tiempo de espera de solvente de 4 min, de manera que en los cuatro primeros minutos no se registra la señal.

A modo de ejemplo, se presenta en la Figura 5 un cromatograma donde aparecen los 7 plaguicidas analizados y el patrón interno. Su identificación está referenciada en la Tabla 4.

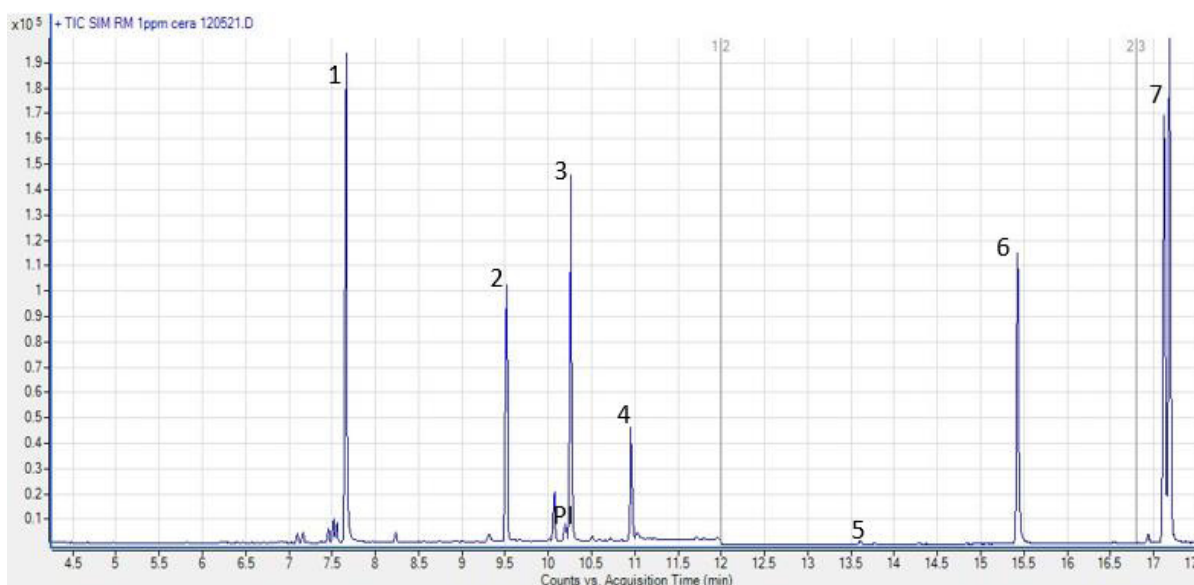


Figura 5. Cromatograma de los siete plaguicidas analizados y el PI empleado

5.2.-Estudio del proceso de migración de acaricidas desde la cera a la miel

Como ya se mencionó, este trabajo es una iniciación a los procesos de migración de acaricidas y en este caso se seleccionó el acaricida cumafos como agente de estudio.

5.2.1.-Ensayos previos

Para empezar, se realizaron varios ensayos con el fin de obtener de alguna manera muestras representativas de cera dopada, de la cual se pudieran obtener los discos que pondríamos en contacto con la miel. Lo primero que se hizo, fue calcular la masa necesaria de cera que habría que dopar para obtener después al menos 3 discos de cera que pesaran aproximadamente lo mismo (que serían los que se pondrían en contacto con la miel) y además sobrara una cantidad suficiente de cera en forma de “restos”, que se analizarían de igual manera para calcular su concentración tras el dopaje. Se probaron distintas maneras siendo al final la más indicada el fundir la cera y llevarla a un platillo de aluminio, del que una vez solidificada se cogerían con ayuda de un molde discos similares de cera. La masa de cera a fundir debía de estar comprendida entre 28 g que era la capacidad máxima del recipiente de aluminio y 10 g que era la cantidad con la que luego se podían obtener discos de en torno a 1 g de espesor, que era el necesario para el posterior análisis. En la Figura 6 podemos ver como se hicieron pruebas sobre vidrio de reloj, sobre recipientes circulares de aluminio con distintas cantidades hasta encontrar la forma más adecuada.

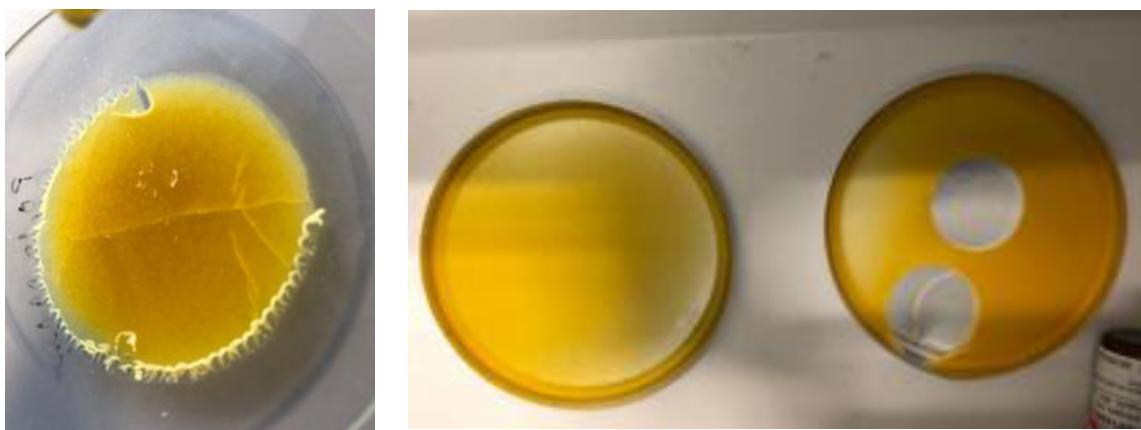


Figura 6. Ensayos previos para optimizar la formación de discos de cera

Una vez que ya se sabe el intervalo de cantidad de cera que se necesita para formar los discos de cera, se pasó a estudiar las condiciones óptimas de agitación y temperatura del interior del incubador. El proceso de migración es un proceso que lleva su tiempo, de manera que para ver si se podía acelerar el estudio se trató de hacer primero un análisis acelerado con condiciones elevadas de temperatura y agitación (60 °C y 250 rpm). La intención era ir viendo cómo se distribuía el acaricida entre la cera y la miel en 1 mes, de manera que se analizaría la concentración en miel al cabo de una, dos y cuatro semanas. Sin embargo, este ensayo no se

pudo completar debido a que desde la primera semana se empezó a ver como se disgregaba la cera, además se produjo la carbonización de la miel, como se observa en la Figura 7.



Figura 7. Disgregación de la cera a condiciones de 60 °C y 250 rpm en el incubador, para una, dos y cuatro semanas respectivamente

Por este motivo es que se desestimó la posibilidad de llevar a cabo un estudio acelerado y se comprobó que la realización del proceso a temperaturas y agitación más suaves conservaba el estado original de ambas matrices, por ello se establecieron como condiciones óptimas del incubador: una temperatura de 40 °C y una agitación de 120 rpm, conociendo de antemano que la temperatura máxima a la que puede llegar una colmena es de unos 45 °C.

5.2.2.-Procedimiento

Para el estudio acerca de la migración del acaricida cumafos desde la cera hasta la miel, se siguieron los siguientes pasos:

1. Selección de ceras: Se seleccionaron dos tipos distintos de cera, por una parte, una cera descontaminada, y por otra parte una cera que contenía cumafos y otros plaguicidas en menor concentración.
2. Dopaje y formación de discos de cera: para dopar con el acaricida, se fundieron previamente las ceras. Para ello, se pesaron las cantidades convenientes de cera (según el ensayo) en un tubo falcon y se llevaron a un baño de agua termostatzado a la temperatura de 70 °C. Una vez fundidas, se adicionó el volumen adecuado del patrón de cumafos, se homogeneizaron en vórtex y se vertieron sobre unos platillos de aluminio donde se dejaba solidificar. Posteriormente se llevaba al frigorífico donde se mantuvieron durante al menos 2 horas. Con un molde se hicieron circunferencias

del mismo tamaño para que todos los discos obtenidos pesaran aproximadamente igual.

3. Puesta en contacto de disco de cera y miel: cada disco de cera se introdujo en un Erlenmeyer de boca ancha (correctamente etiquetado con el nº de ensayo) y se añadió miel hasta que cubriera la superficie del disco, de manera que la cantidad de miel empleada también fuese similar en todos.
4. Simulación de las condiciones de la colmena: los Erlenmeyer se introdujeron en un incubador con agitación orbital y se establecieron las condiciones de agitación, temperatura y el tiempo de residencia en el mismo.
5. Análisis de la cera y la miel: una vez cumplido el tiempo de residencia predefinido para cada ensayo, se extraía del interior del Erlenmeyer el disco de cera, que debía quedar intacto, y se realizaron los tratamientos correspondientes para determinar el contenido de plaguicidas en ambas matrices y estudiar la evolución de la migración del cumafos. (Ver en la sección TRATAMIENTO DE MUESTRAS)

En la Figura 8 se ofrece un resumen visual de algunas de las etapas.



Figura 8. Fusión de cera para el dopaje, formación de discos de cera y posterior puesta en contacto con la miel para el estudio de la migración

5.2.3.-Pruebas realizadas

Una vez se realizaron los ensayos previos con los que se determinó la metodología a seguir y las condiciones de trabajo del incubador, se procedió al estudio de la migración. Para ello se realizaron diferentes pruebas que se describen a continuación:

- Prueba A: Se pesaron 24,5386 g de cera descontaminada en un falcon de polipropileno de 50 mL y se fundieron en un baño de agua termostatzado. A continuación, se

adicionó 1 mL del patrón 1000 ppm de cumafos y se homogeneizó en vórtex. De esta prueba se obtuvieron 3 discos de cera (A1= 2,8680 g; A2= 2,6060 g; A3= 2,8022 g), y unos restos (Arestos) que se guardaron para su posterior análisis (y que servirán para conocer la concentración inicial de cumafos en esta prueba). Los 3 discos de cera se pusieron en contacto con la miel. La cantidad de miel empleada fueron: 62,1533 g (A1), 59,9475 g (A2) y 61,8082 g (A3).

- Prueba B: Se pesaron 25,1577 g de la misma cera descontaminada y de la misma forma se le adicionaron 100 µL del patrón de cumafos de 1000 ppm. Los discos obtenidos fueron: B1 (2,6020 g), B2 (2,8020 g), B3 (2,8126 g); y Brestos se almacenó para su posterior análisis. Los 3 discos se pusieron en contacto con la miel, necesitándose: 60,0443 g (B1), 61,3838 g (B2) y 60,6243 g (B3).
- Prueba C: Se pesaron 24,5286 g de la cera descontaminada y se le hizo el mismo tratamiento sin adicionarle ningún volumen de disolución de cumafos (cera descontaminada sin dopar). Igualmente se obtuvieron 3 discos de cera (C1= 2,7992 g; C2= 2,5640 g; C3= 2,8427 g) que se pusieron en contacto con miel (60,4660 g; 60,0205 g; 60,1155 g, respectivamente) y los restos que se guardaron (Crestos).
- Prueba D: Se pesaron 24,8565 g de cera contaminada, que ya presentaba inicialmente cantidades de cumafos y otros plaguicidas, y de igual manera que en la Prueba C se repitió el proceso sin adición de cumafos. Se guardaron los restos (Drestos) y se pusieron en contacto los discos de cera con la miel: D1 (2,6133g con 59,9183g), D2 (2,6167 g con 60,2773 g) y D3 (2,7680 g con 62,3582 g).
- Prueba A^{IV}: Se pesaron 10,0085 g de cera descontaminada, que se dopó con un volumen de 4 mL del patrón de 1000 ppm de cumafos, y se obtuvieron 3 discos de cera que se pusieron en contacto con la miel (A₁^{IV} = 1,2117 g cera con 55,3249 g miel; A₂^{IV} = 1,1522 g cera con 51,7642 g miel; A₃^{IV} = 1,1256 g cera con 51,7698 g miel) y los restos (A^{IV}restos) que se analizan para conocer la concentración inicial de este ensayo.

A continuación, se muestra en la Tabla 5 la concentración teórica de cumafos, en mg/kg, que deberían presentar las ceras tras la adición del patrón de 1000 ppm:

Tabla 5.-Concentración teórica de cumafos de las ceras tras el dopaje

	A	B	C	D	A ^{IV}
mg/kg	40,7	4,0	-	-	399,7

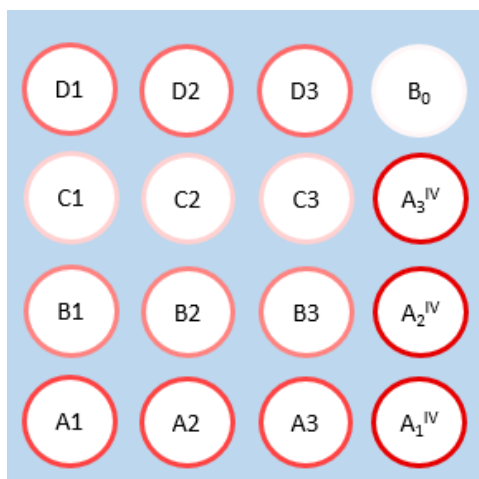


Figura 9. Disposición de los ensayos en el interior del incubador

Además de estos 15 erlenmeyers se introdujo uno más que contenía únicamente miel, actuando como control del proceso dentro del incubador ($B_0 = 50,0885$ g miel). De esta manera se completó la capacidad máxima del incubador de 16 posiciones, tal y como se muestra en la Figura 9. La diferente tonalidad en las posiciones del esquema tiene que ver con la concentración teórica, que a priori, debería de ser mayor en aquellas ceras donde se adicionó mayor volumen del patrón de cumafos.

En cuanto al tiempo de residencia que permanecieron las ceras en contacto con la miel, dentro del incubador, a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 120 rpm se pueden diferenciar 2 estudios:

- Por una parte, los ensayos A, B, C y D para el estudio de la migración a bajos niveles de cumafos, por lo que el tiempo de contacto entre ambas matrices se mantuvo por más tiempo, determinando su contenido tras casi 7, 18 y 20 semanas (ensayos 1, 2 y 3 respectivamente).
- Por otra parte, los ensayos A^{IV} , con los que se estudió el proceso de migración a niveles bastante más elevados de cumafos, estableciéndose como tiempo total del estudio un mes, con 1, 2 y 4 semanas respectivamente para los ensayos A_1^{IV} , A_2^{IV} y A_3^{IV} .

A modo resumen se presenta a continuación la Tabla 6 en la que se recoge el tipo de cera empleada, los ensayos, procesos y análisis realizados y el tiempo en que estuvieron en contacto disco de cera y miel:

Tabla 6.-Esquema de los ensayos y análisis realizados

Cera	Ensayo	Proceso	Análisis	Tiempo de incubación/semanas
Descontaminada	A	24,5386 g cera + 1 mL (Patrón 1000 ppm cumafos)	A1, A2, A3	A1, B1, C1 y D1 → 7
	B	25,1577 g cera + 100 µL (Patrón 1000 ppm cumafos)	B1, B2, B3	A2, B2, C2 y D2 → 18
	C	24,5286 g cera (Sin adición de cumafos)	C1, C2, C3	A3, B3, C3 y D3 → 20
Contaminada	D	24,8565 g cera (Sin adición de cumafos)	D1, D2, D3	A ₁ ^{IV} → 1
Descontaminada	A ^{IV}	10,0085 g cera + 4 mL (Patrón cumafos 1000 ppm)	A ₁ ^{IV} , A ₂ ^{IV} , A ₃ ^{IV}	A ₂ ^{IV} → 2 A ₃ ^{IV} → 4

5.3.-Preparación de muestras

Antes de poner en contacto la cera con la miel es necesario conocer la cantidad inicial que ambos productos presentan del acaricida en estudio. El tratamiento de muestra difiere en función de la complejidad de la matriz, necesitándose el empleo de la metodología QuEChERS, en el caso de ceras, para la limpieza del extracto y una eficiente extracción de los analitos; o un método más básico como es la extracción líquido-líquido para el caso de las mieles. Ambos tratamientos fueron optimizados en investigaciones anteriores del grupo de investigación TESEA [30, 48], asegurando buenos porcentajes de recuperación y reproducibilidad.

5.3.1.-Tratamiento de la miel

Se pesaron 5 g de miel en un vaso de precipitados y a continuación se disolvieron en 10 mL de agua ultrapura, ayudándose de una varilla de vidrio y sonicando en un baño de ultrasonidos hasta completa disolución. Posteriormente se traspasó a un embudo de decantación, y se arrastraron con 10 mL de



Figura 10. Metodología de LLE

disolvente orgánico (mediante sucesivos lavados) los restos que pudiesen haber quedado en el vaso, añadiéndolo de igual manera al embudo (Figura 10). El disolvente orgánico extractante que se empleó fue la mezcla acetato de etilo-ciclohexano en proporción 50:50. Posteriormente se llevaron los embudos a un agitador vibrador, Vibromatic (Figura 11), donde

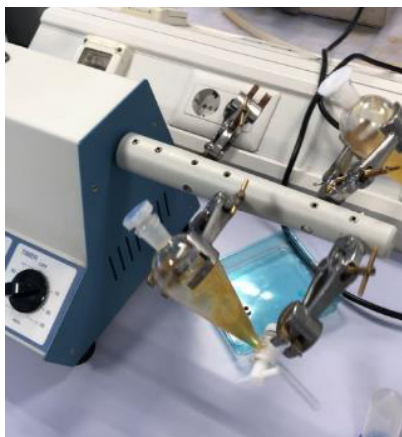
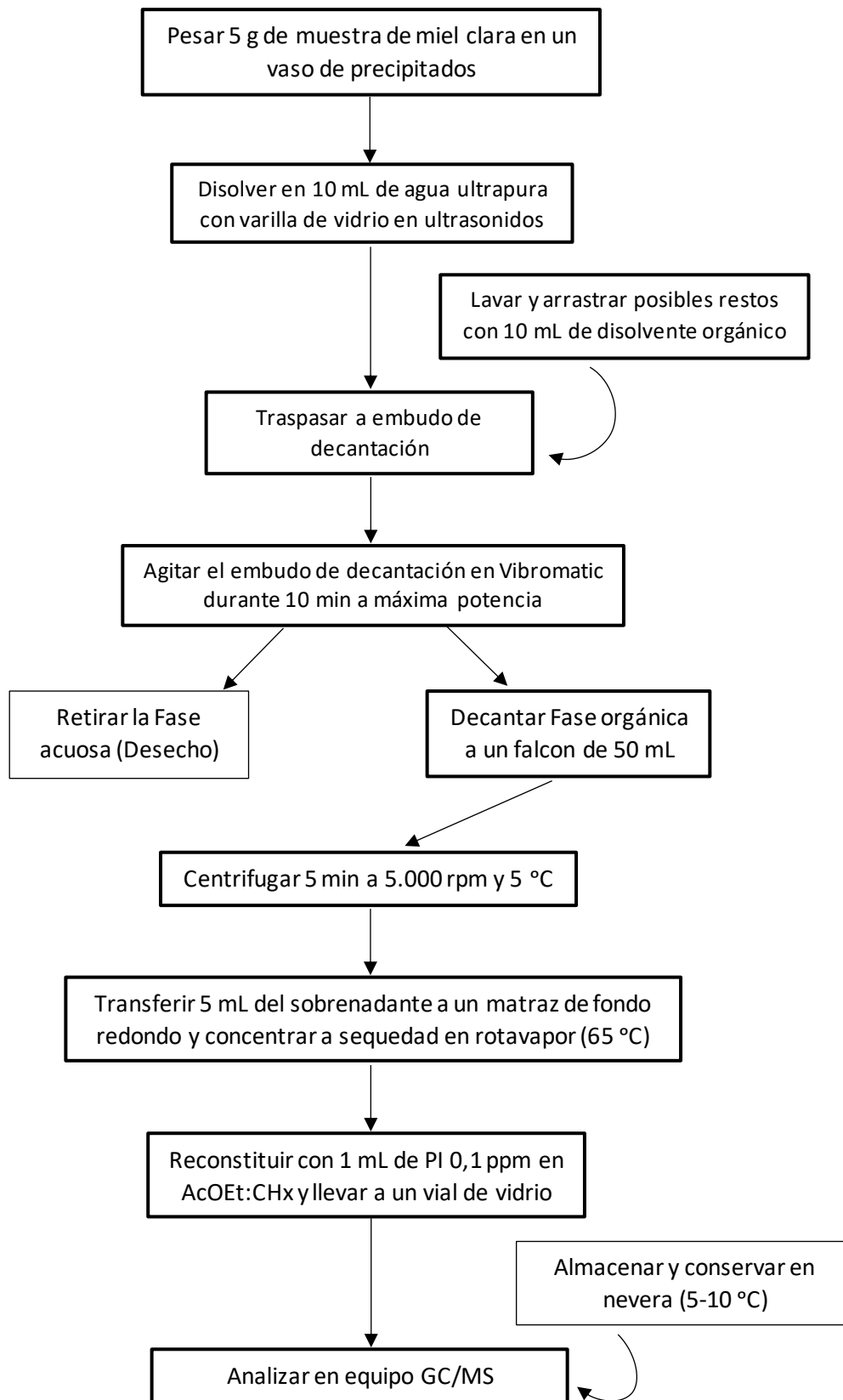


Figura 11. Equipo Vibromatic

se mantuvieron agitando durante diez minutos a máxima potencia (965 oscilaciones/min). Para mejorar aún más la extracción se dispusieron los embudos en el Vibromatic en un ángulo entre 170-150 °. A continuación, se separaron las fases, desechando la acuosa que quedaba en la parte inferior y decantando la fase orgánica en un tubo Falcon de 50 mL, que se centrifugó durante cinco minutos, a 5000 rpm y 5 °C. Inmediatamente después se tomaron 5 mL del sobrenadante y se llevaron a un matraz de fondo redondo.

Se concentró a sequedad en un rotavapor a 65 °C controlando el vacío para evitar la posible formación de proyecciones. Para terminar, se dejó atemperar el matraz de destilación, se reconstituyó con 1 mL de patrón interno (de concentración 0,1 ppm) disuelto en la disolución extractante (AcOEt:C₆H₁₂, 50:50) y se llevó a viales para su posterior análisis en el equipo GC/MS.

A continuación, se muestra un esquema del tratamiento de mieles.



5.3.2.-Tratamiento de la cera

El tratamiento comienza moliendo la muestra de cera junto con hielo seco, que evita que la cera se funda por el calor de las cuchillas y se aglomere en una pasta. La cera en polvo se deja al aire para que se evapore el agua que pueda haber retenido, y posteriormente se pesaron 1 o 2 gramos en un tubo falcon de 50 mL (en función de lo empleado para preparar la línea de calibrado). Se añadieron 10 mL de ACN acidificado con AcOH al 1 %, y se homogenizó primero en Ultraturrax durante 2,5 minutos a potencia entre 2 y 3 para evitar que se caliente (Figura 12) y posteriormente en un vortex durante 30 segundos a 2.500 rpm. A continuación, se centrifugó durante 5 minutos a 7.5000 rpm y 5 °C, e inmediatamente después se transfirieron 5 mL del sobrenadante al tubo QuEChERS dSPE EMR previamente activado con 5 mL de agua ultrapura. La mezcla se homogenizó durante 1 min en vórtex y luego se centrifugó en las

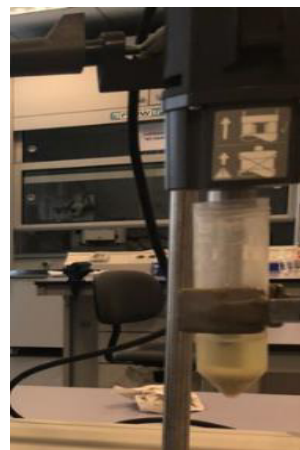


Figura 12. Equipo UT

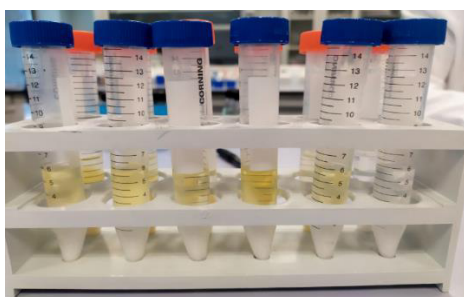
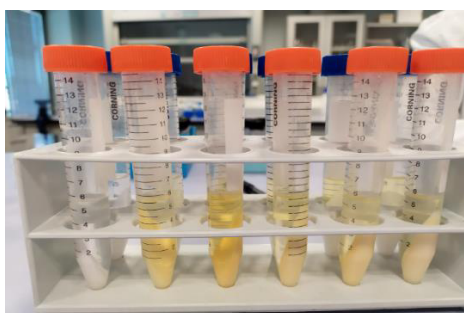
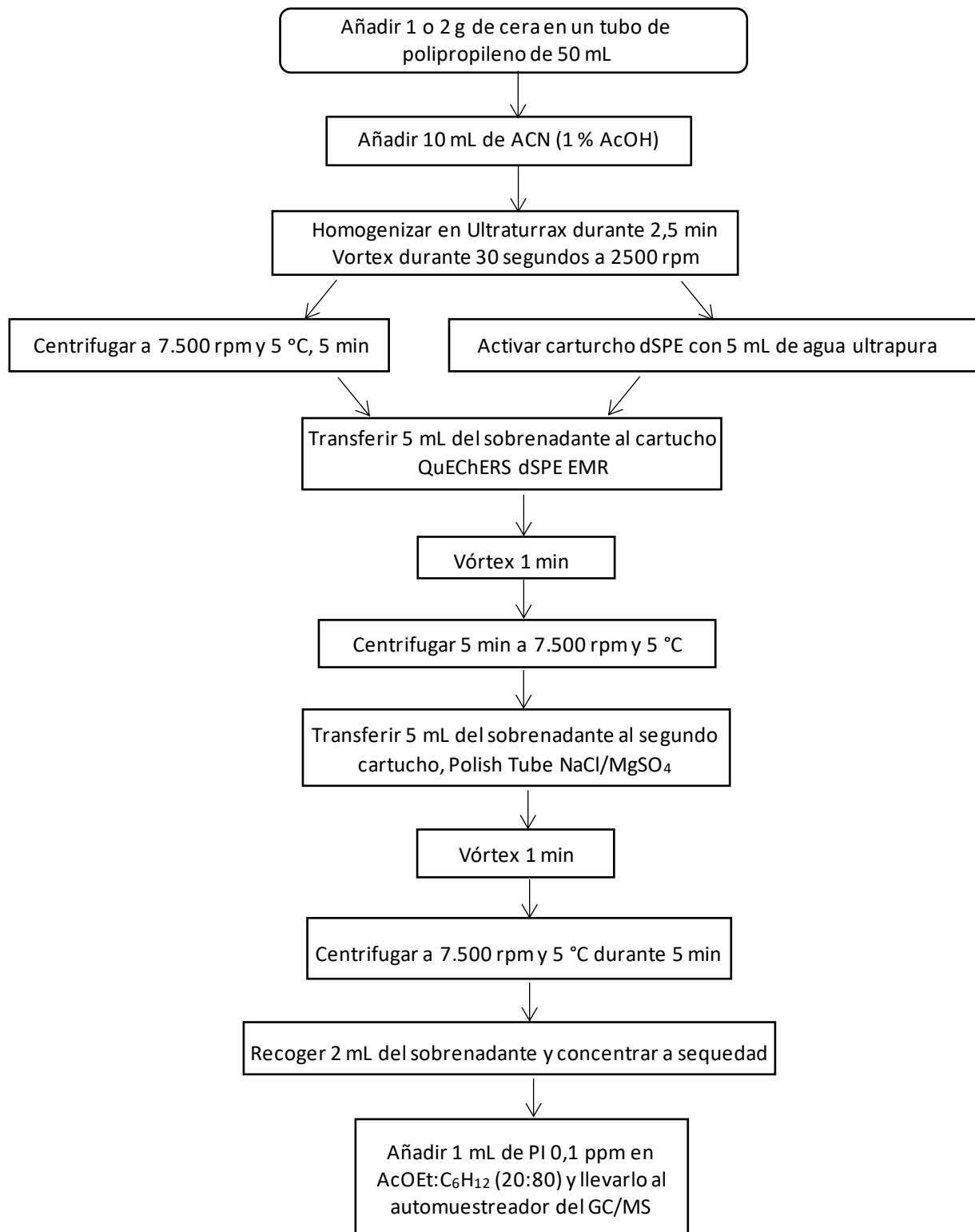


Figura 13. Tubos QuEChERS dSPE EMR-Lipid y Polish NaCl/MgSO₄ respectivamente

mismas condiciones que hemos mencionado anteriormente (parte superior de la Figura 13). Se transfirieron 5 mL del sobrenadante al Polish Tube-NaCl/MgSO₄, se agitó durante 1 min en vórtex y nuevamente se volvió a centrifugar de la misma manera (parte inferior de la Figura 13). Se recogieron 2 mL del sobrenadante en un matraz de fondo redondo y se concentraron a sequedad en el rotavapor a 60 °C. Finalmente, el extracto fue reconstituido con 1 mL de patrón interno 0,1 ppm disuelto en la mezcla acetato de etilo-ciclohexano (20:80, v/v) en un baño de ultrasonidos y se llevó a los viales para su posterior análisis en el sistema GC/MS.

A continuación, se muestra un esquema del tratamiento de ceras.



5.4.-Preparación de patrones para las líneas de calibrado

Aunque en nuestro estudio las ceras se doparon únicamente con el acaricida cumafos, es cierto que una de las ceras empleadas presentaba residuos de otros plaguicidas (atrazina, clorpirifos, clorfenvinfos, α -endosulfan, bromopropilato, cumafos y τ -fluvalinato) por ello se justifica la preparación de la línea de calibrado de cada uno de ellos por si hubiera que analizarlos. Se prepararon disoluciones madre de aproximadamente 1000 mg/L de cada uno de los plaguicidas, pesando con precisión 10 mg, disolviéndolos en una mezcla de acetato de etilo-ciclohexano (20:80, v/v) y llevándolos a un volumen final de 10 mL. A partir de estas disoluciones madre, se preparó una disolución mezcla de los siete plaguicidas de concentración 100 mg/L, para ello se pipetearon 1mL de cada una y se llevaron a un volumen final de 10 mL ("Mix 100 ppm"). Por dilución del Mix 100 ppm se prepararon las disoluciones patrón intermedias y los patrones de la línea de calibrado, empleando para todas ellas la misma mezcla de disolventes.

Para realizar la cuantificación se emplea el método del patrón interno, que corrige (entre otras cosas) variaciones en la medición del espectrómetro de masas y en la inyección de muestra en el sistema GC. Como patrón interno se escogió el deuterado de uno de ellos, el clorfenvinfos deuterado, con lo que nos aseguramos que el comportamiento del patrón interno va a ser muy similar al del resto, compensando así las variaciones mucho mejor. Este se adiciona en la misma proporción a todos los patrones de la línea de calibrado de la forma adecuada.

Para llevar a cabo la cuantificación mediante las líneas de calibrado se representa la relación de áreas del analito y del patrón interno con respecto a la concentración.

5.4.1.-Líneas de calibrado para miel

Como ya mencionamos, en estudios previos se determinó que no existen diferencias significativas entre las líneas de calibrado con o sin matriz en mieles claras, por ello se realizó la cuantificación de los plaguicidas con calibrados en patrones en un intervalo desde 0,05 mg/L y 5 mg/L, llevando todos ellos una concentración de patrón interno de 0,1 ppm. Para ello se partió del mix de 100 mg/L con los siete plaguicidas y se prepararon 20 mL de una disolución intermedia de 10 mg/L por dilución. Esta es una disolución intermedia que utilizamos para preparar las líneas de calibrado, luego no se le adiciona el patrón interno. A partir de diluciones

de la misma, cogiendo los volúmenes adecuados se prepararon las disoluciones patrón de la siguiente manera:

- Mix 5 ppm sin PI: se pipetearon 5 mL (Mix 10 ppm) y se llevaron a un volumen final de 10 mL.
- Mix 5 ppm con PI: se cogieron 5 mL (Mix 10 ppm), 1 mL de PI (1 ppm) y se enrasaron en un matraz aforado de 10 mL.
- Mix 2 ppm sin PI: se transfirieron 2 mL (Mix 10 ppm) y se enrasaron en un matraz aforado de 10 mL.
- Mix 2 ppm con PI: se cogieron 2 mL (Mix 10 ppm), 1 mL PI (1 ppm) y se enrasaron en un matraz de 10 mL.
- Mix 1 ppm sin PI: se pipetearon 1 mL (Mix 10 ppm) y se llevaron a 10 mL.
- Mix 1 ppm con PI: se transfirieron 1 mL (Mix 10 ppm), 1 mL de PI y se llevaron a un matraz aforado de 10 mL.
- Mix 0,5 ppm sin PI: se pipetearon 1 mL (mix 5 ppm) y se llevaron a un matraz aforado de 10 mL.
- Mix 0,5 ppm, 0,2 ppm, 0,1 ppm y 0,05 ppm con PI, se prepararon por dilución 1:10 de los anteriores sin PI y estos deben de contener igual que el resto de los patrones que van a formar la línea de calibrado el PI con la misma concentración de 0,1 ppm.

Para completar los volúmenes de aforo se empleó la mezcla de disolventes acetato de etilo-ciclohexano (50:50).

5.4.2.-Líneas de calibrado para cera

La línea de calibrado para ceras se lleva a cabo sobre matriz para minimizar el efecto que ésta introduce sobre la señal. El intervalo de trabajo se estableció entre 0,05 mg/L y 10 mg/L. Para ello se pesaron 1 g de la cera en polvo descontaminada sobre una superficie amplia de aluminio (o de un vidrio de reloj) y se añadió el volumen apropiado del “patrón mix” para obtener la concentración deseada:

- 10 mg/L: se añadió sobre 1 g de cera 1 mL del mix de 100 mg/L
- 5 mg/L: 500 µL del mix de 100 mg/L
- 2 mg/L: 200 µL del mix de 100 mg/L
- 1 mg/L: 100 µL del mix de 100 mg/L

- 0,5 mg/L: 50 µL del mix de 100 mg/L
- 0,05 mg/L: 50 µL del mix de 10 mg/L

Posteriormente se dejó evaporar el disolvente en estufa a una temperatura comprendida entre 35-45 °C, durante una noche y se procedió al tratamiento de muestra que se detalla en el epígrafe 5.3.2. El propio tratamiento de las muestras de cera conlleva una dilución 1:10, que es tenida en cuenta en la línea de calibrado realizada.

6.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Antes de mostrar los resultados del contenido de cumafos en cera y miel para valorar el estudio de la migración, vamos a comentar algunos datos obtenidos de interés. En la Figura 14 se superponen los cromatogramas de los diferentes plaguicidas en cera, miel y disolvente en la misma concentración (1 ppm). En azul se representa el cromatograma para la cera, se cogió un gramo de cera descontaminada y se dopó para que presentara finalmente una concentración de 1 ppm; en rojo se hizo lo mismo pero sobre miel; y en verde tenemos el cromatograma de una disolución de 1 ppm del mix de plaguicidas sobre el disolvente AcOEt:C₆H₁₂ (50:50, v/v). Se observa que al variar de cera a miel, se produce una ligera variación en los tiempos de retención pero una gran diferencia en la intensidad de los picos para los mismos analitos, mientras que entre la miel y el disolvente son muy similares. Por último, también puede observarse una señal de la línea base en el cromatograma de la cera con mayor ruido debido a que ésta presenta mayor suciedad en su matriz.

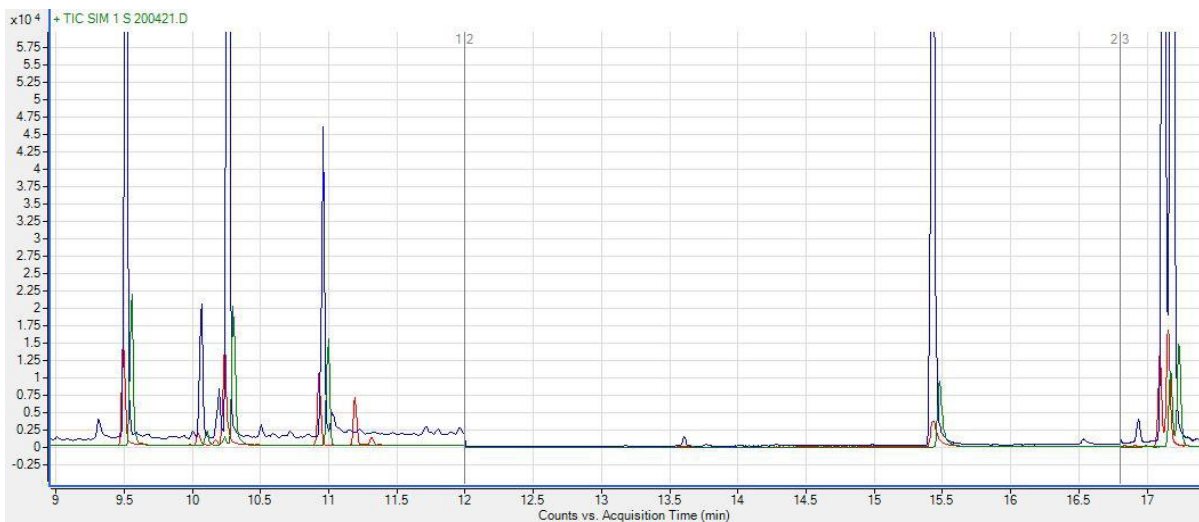


Figura 14. Cromatogramas superpuestos de los 7 plaguicidas en concentración de 1 ppm sobre las matrices cera (azul), miel (rojo) y disolvente AcOEt:C₆H₁₂ (50:50, v/v) (verde)

En la Tabla 7 se muestran los tiempos de retención a los que eluyeron los analitos para el patrón de 1 ppm de la línea de calibrado para cera y miel, que será necesario conocer a la hora de identificar los compuestos en los distintos ensayos realizados.

Tabla 7.-t_R de los plaguicidas en miel y cera

Plaguicida	t _R /min	
	Cera	Miel
Atrazina	7,662	7,652
Clorpirifos	9,518	9,497
Clorfenvinfos	10,258	10,237
α-Endosulfán	10,956	10,925
Bromopropilato	13,602	13,576
Cumafos	15,427	15,432
τ-Fluvalinato	17,184	17,154
Clorfenvinfos D-10 (PI)	10,195	10,175

En la Tabla 8 se han incluido los parámetros de las líneas de calibrado de cada compuesto para cera y miel. Estos parámetros se han calculado mediante el método de mínimos cuadrados y definen las líneas de calibrado mediante la ecuación: $y = ax + b$, donde “y” es la relación entre áreas del compuesto y el patrón interno, “x” es la concentración del compuesto, “a” es la pendiente, y “b” la ordenada en el origen.

Tabla 8.-Parámetros de las líneas de calibrado con n = 6

	Cera			Miel		
	Pendiente	Ordenada	r ²	Pendiente	Ordenada	r ²
Atrazina	38,622	-2,633	0,9981	31,164	-0,8411	0,9994
Clorpirifos	19,559	-4,2517	0,9921	17,002	-0,4904	0,9993
Clorfenvinfos	28,498	-5,224	0,9949	21,321	-1,3585	0,9984
α-Endosulfán	3,7853	-0,2218	0,9995	4,9885	0,0264	0,9995
Bromopropilato	0,3041	-0,0382	0,9982	0,2342	-0,0181	0,9979
Cumafos	28,168	-4,3115	0,9987	16,658	-3,0461	0,9935
τ-Fluvalinato	105,69	-21,078	0,9975	59,243	-7,6235	0,9963

Para la obtención de los resultados, se realizó un blanco tanto para el caso de la cera (sobre matriz) como de la miel, y la señal ($\text{Área}_{\text{compuesto}}/\text{Área}_{\text{PI}}$) que proporcionó se le restó a la de los puntos del calibrado (motivo por el que no está incluido como un punto del calibrado).

Como se puede observar claramente, los valores del parámetro “pendiente” son más o menos muy parecidos, entre las dos matrices, para todos los compuestos excepto dos, cumafos y fluvalinato, esto es debido al efecto matriz que presentan ambos en la cera. La pendiente de la línea de calibrado está relacionada con la sensibilidad del método, de manera que cuanto mayor sea su valor más sensible. Con esto se puede concluir que para las ceras se podrá discriminar entre diferencias más pequeñas en la concentración de los analitos cumafos y fluvalinato. El coeficiente de determinación (r^2) es mayor que 0,98 para todos los casos por lo que se justifica la linealidad del sistema de medición.

Por último, antes de cuantificar el contenido de un analito hay que estar seguro que la señal corresponde a dicho analito, en la Figura 15, se muestra el monitoreo que se hizo en modo SCAN para la muestra CERA A^{IV}restos diluida 1:10. Al analizar su cromatograma se observa que al $t_R = 15,439$ min hay una señal que coincide con el t_R del patrón de cumafos y al sacar su espectro de masas se observó que era coincidente con el del patrón certificado y con el de la

base de datos NIST, confirmándose de esta manera la presencia del analito, pudiéndose finalmente cuantificar en el modo de adquisición SIM.

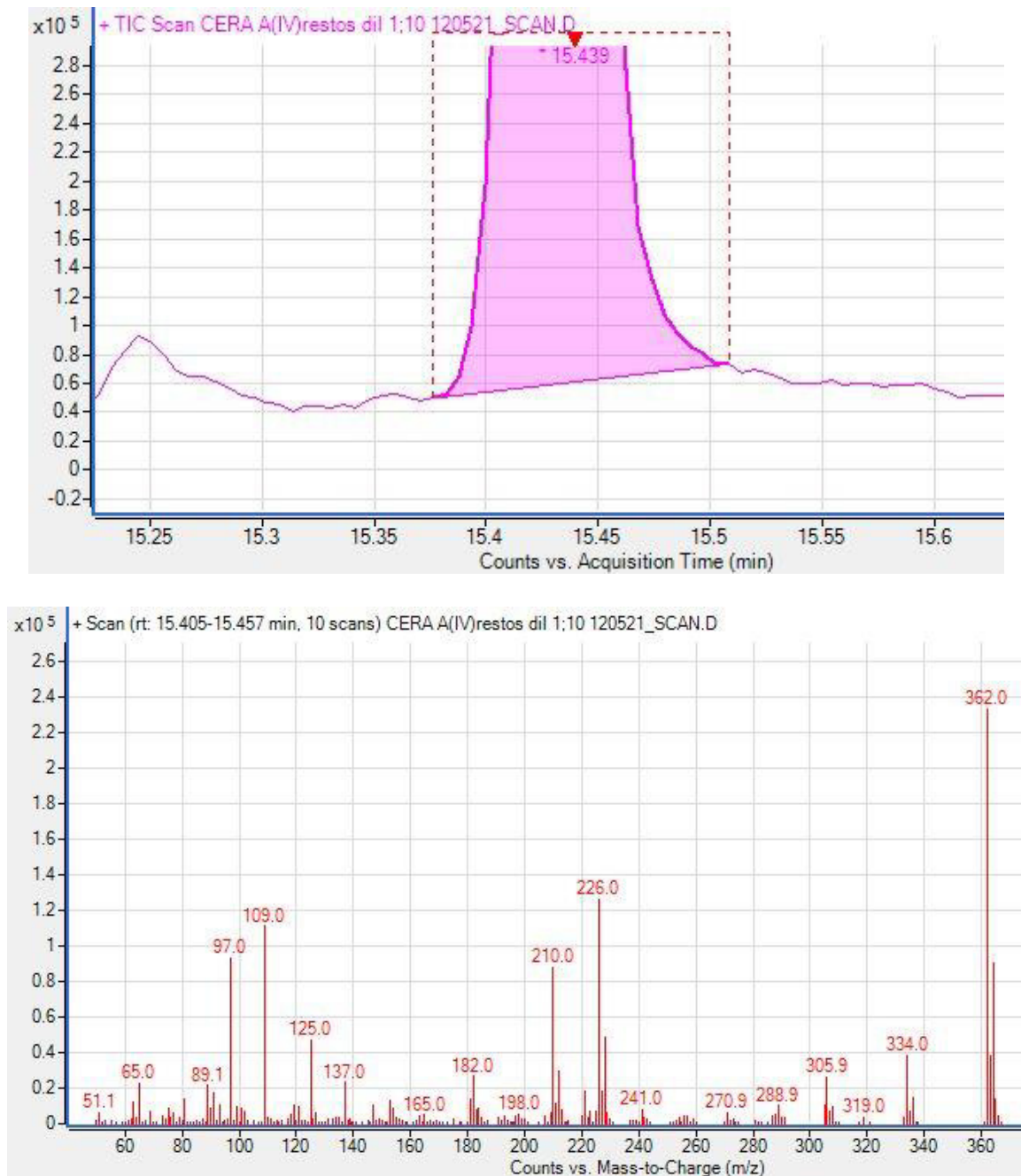


Figura 15. Identificación del compuesto cumafos mediante el monitoreo en modo SCAN

En las tablas Tabla 9 y Tabla 10, que aparece a continuación se presentan los resultados del análisis de los plaguicidas en las muestras de cera y miel (en los ensayos).

Tabla 9.- Concentración en mg/Kg de los plaguicidas en los discos de cera

Muestra/Análisis	Atrazina	Clorpirifos	Clorfenvinfos	α -Endosulfán	Bromopropilato	Cumafos	τ -Fluvalinato
Cera A restos	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	38,8	< LOD
Cera A1	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	31,0	< LOD
Cera A2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	17,2	< LOD
Cera A3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	13,9	< LOD
Cera B restos	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	4,2	< LOD
Cera B1	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	3,3	< LOD
Cera B2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	2,9	< LOD
Cera B3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	2,5	< LOD
Cera C restos	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Cera C1	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Cera C2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Cera C3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Cera D restos	< LOD	0,85	0,49	< LOD	< LOD	17,4	1,6
Cera D1	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	14,6	< LOQ
Cera D2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	9,2	< LOQ
Cera D3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	7,9	< LOQ
Cera A ^{IV} restos *	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	409,5	< LOD
Cera A ₁ ^(IV) *	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	346,0	< LOD
Cera A ₂ ^{IV} *	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	288,3	< LOD
Cera A ₃ ^{IV} *	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	207,7	< LOD

*Muestras que se diluyeron 1:10 para analizarlas

Tabla 10.-Concentración en $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de los plaguicidas en las mieles

Muestra/Análisis	Atrazina	Clorpirifos	Clorfenvinfos	α -Endosulfán	Bromopropilato	Cumafos	τ -Fluvalinato
Miel A1	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Miel A2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Miel A3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOQ	< LOD
Miel B1	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Miel B2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Miel B3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Miel C1	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Miel C2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Miel C3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Miel D1	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Miel D2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Miel D3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Miel A ₁ ^(IV)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	62,3	< LOD
Miel A ₂ ^{IV}	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	102,9	< LOD
Miel A ₃ ^{IV}	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	140,6	< LOD

6.1.-Estudio de la migración

En la Figura 16 se observa la evolución del compuesto cumafos para las distintas ceras analizadas. En el gráfico de arriba se representa como ha ido variando la concentración del mismo a lo largo de las semanas, para el caso de los ensayos A, B, C y D, que eran las ceras que servirían para un estudio de la migración a niveles bajos de cumafos. Se observa una caída

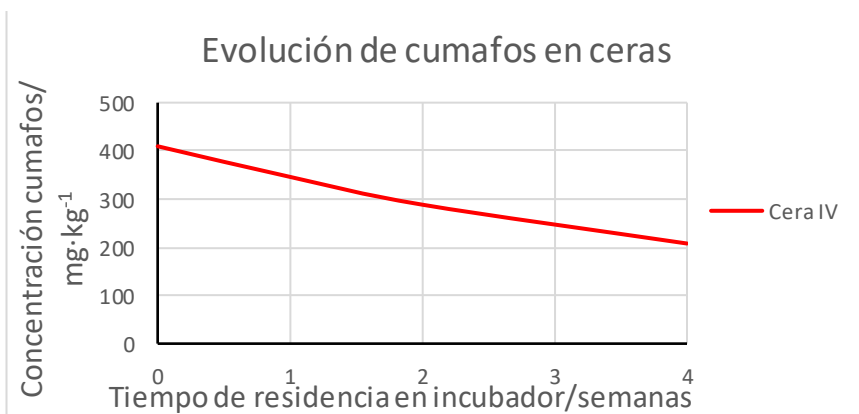
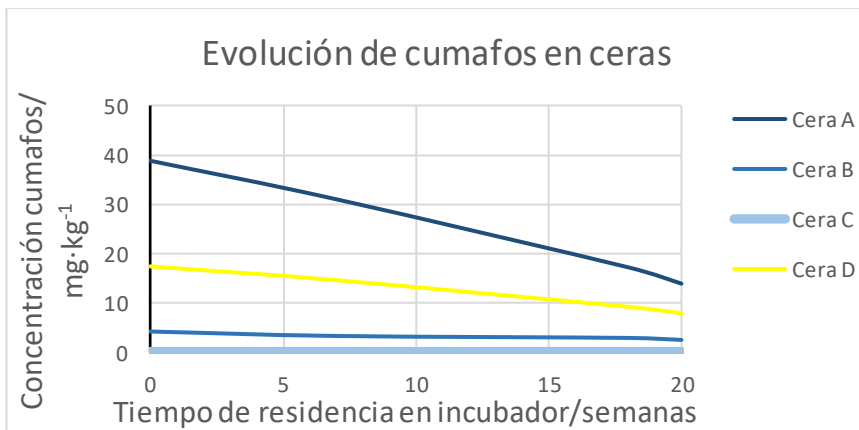


Figura 16. Evolución del acaricida cumafos en los distintos ensayos

en la pendiente que indica una pérdida en la concentración o posible migración a la matriz con la que estaba en contacto. La caída en la concentración es más o menos constante y proporcional en el tiempo para las ceras A (mayor pérdida) y D (menor pérdida) y prácticamente invariable y nula para C y D, respectivamente. En el gráfico de abajo de la Figura 16 se representa de la misma forma la pérdida o migración de cumafos para el ensayo A^{IV}, se refleja una pérdida de cumafos mucho mayor (de algo más de 7 veces mayor) en un intervalo de tiempo cinco veces menor.

En la Figura 17 se presenta la evolución del acaricida en miel con la finalidad de estudiar si este descenso en su concentración es debido a una supuesta migración o puede deberse a otros factores, como descomposición del mismo. Se observa como para los ensayos con niveles más bajos de cumafos, la migración o la aparición del acaricida en la miel no se produce, presentándose una recta constante al nivel del eje de abscisas durante las 20 semanas que están en contacto; mientras que para el ensayo A^{IV} va aumentando en muy pequeñas

Cantidades de forma proporcional y constante a lo largo del tiempo, llegándose a determinar hasta $140 \mu\text{g}/\text{kg}$ cuando la miel está en contacto con la cera durante 1 mes en el incubador.

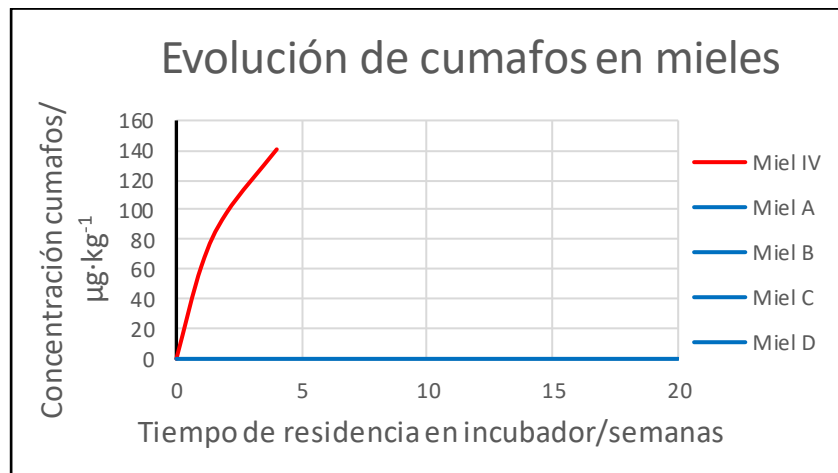


Figura 17. Evolución del acaricida cumafos en los distintos ensayos

7.-CONCLUSIONES

- ❖ La experimentación para el estudio de la migración de plaguicidas desde la cera a la miel no puede hacerse en condiciones aceleradas ya que estas ocasionan la degradación de las muestras impidiendo la continuación de los ensayos. Por ello debe efectuarse en condiciones suaves lo cual implica una mayor duración de los experimentos
- ❖ La transferencia del cumafos presente en la cera hacia la miel depende claramente del contenido inicial de este compuesto en la cera, así:
 - Contenidos en la cera inferiores a 40mg/kg prácticamente no migran en cantidades significativas a la miel, solo en algunos casos y después de más de 20 semanas se ha detectado el compuesto en la miel.
 - Contenidos próximos o superiores a 400mg/kg permiten confirmar la transferencia del cumafos desde la cera a la miel ya en la primera semana de contacto (62,3 µg/kg), llegando a alcanzar 140,6µg/kg al cabo del mes.
- ❖ Los resultados obtenidos en este primer estudio han mostrado claramente que la cantidad presente en la cera laminada influye sustancialmente en su transferencia a la miel, ello sugiere que en el futuro deben contemplarse diferentes opciones teniendo en cuenta la pureza de las láminas de cera, tremendamente diferentes.

8.-REFERENCIAS

- [1] Staveley, J. P.; Law, S. A.; Fairbrother, A.; Menzie, C. A. A Causal Analysis of Observed Declines in Managed Honey Bees (*Apis mellifera*). *Hum.Ecol. Risk Assess* **2014**, 20, 2, 566-591. <https://doi.org/10.1080/10807039.2013.831263>
- [2] Van Der Zee, R.; Pisa, L.; Andonov, S.; Brodschneider, R.; Charrière, J. D.; Chlebo, R.; Coffey, M. F.; Crailsheim, K.; Dahle, B.; Gajda, A.; Gray, A.; Drazic, M. M.; Higes, M.; Kauko, L.; Kence, A.; Kence, M.; Kezic, N.; Kiprijanovska, H.; Kralj, J.; Kristiansen, P.; Martín Hernández, R.; Mutinelli, F.; Nguyen, B. K.; Otten, C.; Özkirim, A.; Pernal, S. F.; Peterson, M.; Ramsay, G.; Santrac, V.; Soroker, V.; Topolska, G.; Uzunov, A.; Vejsnæs, F.; Wei, S.; Wilkins, S. Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the winters of 2008-9 and 2009-10. *J. Api. Res.* **2012**, 51, 1, 100-114. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.51.1.12>
- [3] Genersch, E. Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Appl Microbiol Biotechnol* **2010**, 87, 1, 87-97. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2573-8>
- [4] Serra, J.; Orantes, J. Acaricides and their residues in Spanish Commercial beeswax. *Pest.Manag.Sci.* **2010**, 66, 11, 1230-1235 . <https://doi.org/10.1002/ps.1999>
- [5] Bogdanov, S.; Kilchenmann, V.; Imdorf, A. Acaricide residues in beeswax and honey. *En Bee products, properties, applications, apitherapy.* Mizrahi, A., Lensky, Y., Eds.; Plenum Press: New York, 1997; pp 239-246.
- [6] Zhu, W.; Schmehl, D. R.; Mullin, C. A.; Frazier, J. L. Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. *PLoS ONE* **2014**, 9,1. Doi: 10.1371/journal.pone.0077547
- [7] Serra, J.; Orantes, J. Discoloration and adsorption of acaricides from beeswax. *J.Food Process.Eng.* **2016**, 40, 1. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12344>
- [8] Bogdanov, S.; Kilchenmann, V.; Imdorf, A. Acaricide residues in honey, beeswax and propolis. *Swiss Bee Research Centre* **1999**, 1-11.
- [9] Bogdanov, S.; Kilchenmann, V.; Imdorf, A. Acaricide residues in some bee products. *Journal of Apicultural Research* **1998**, 37, 2, 57-67.
- [10] Wallner, K. Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie* **1999**, 30, 2-3, 235-248. <https://doi.org/10.1051/apido:19990212>

- [11] Bogdanov, S.; Kilchenmann, V.; Seiler, K.; Frey, T. H.; Roux, B.; Wenk, P.; Noser, J. Residues of para-dichlorobenzene in honey and beeswax. *Journal of Apicultural Research* **2004**, *43*, 1, 14-16. <https://doi.org/10.1080/00218839.2004.11101102>
- [12] Chauzat, M. P.; Faucon, J. Pesticide residues in beeswax samples collected from honey bee colonies (*Apis Mellifera* L.) in France. *Pest. manag. Sci.* **2007**, *66*, 11, 1100-1106. <https://doi.org/10.1002/ps.1451>
- [13] Boi, M.; Serra, G.; Colombo, R.; Lodesani, M.; Massi, C.; Costa, C. A 10 year survey of acaricide residues in beeswax analysed in Italy. *Pest. manag. Sci.* **2016**, *72*, 7, 1366-1372. <https://doi.org/10.1002/ps.4161>
- [14] Kochansky, J.; Wilzer, K.; Feldlaufer, M. Comparison of the transfer of coumaphos from beeswax into syrup and honey. *Apidologie* **2001**, *32*, 2, 119-125. <https://doi.org/10.1051/apido:2001117>
- [15] Reybroeck, W.; Jacobs, F. J.; De Brabander, H. F.; Daeseleire, E. Transfer of Sulfamethazine from Contaminated Beeswax to Honey. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 12, 7258–7265. <https://doi.org/10.1021/jf1005275>
- [16] Mitrowska, K.; Antczak, M. Transfer of nitroimidazoles from contaminated beeswax to honey. *Food Additives & Contaminants: Part A* **2017**, *34*, 4, 573-581. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1260166>
- [17] Lusby, E.; Lusby, D. *The Way Back to Biological Beekeeping*; X-star Publishing Company: Phoenix, 2006.
- [18] Goss, K. U.; Schwarzenbach, R. P. Linear free energy relationships used to evaluate equilibrium partitioning of organic compounds. *Environ Sci Technol.* **2001**, *35*, 1, 1–9. <https://doi.org/10.1021/es000996d>
- [19] Shimshoni, J. A.; Sperling, R.; Massarwa, M.; Chen, Y.; Bommuraj, V.; Borisover, M.; Pesticide distribution and depletion kinetic determination in honey and beeswax: Model for pesticide occurrence and distribution in beehive products. *PLoS ONE* **2019**, *14*, 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212631>
- [20] Calatayud, P.; Calatayud, F.; Simó, E.; Pico, Y. Occurrence of pesticide residues in Spanish beeswax. *Sci. Total. Environ.* **2017**, *605–606*, 745–754. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2017.06.174](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.174)

- [21] Quesada, D. *Cera de abeja sin residuos químicos, orgánica y ecológica. Problemas derivados de la contaminación de la cera*; El dedo en la llaga. www.apiculturabiologica.blogspot.com (accessed May 20, 2021)
- [22] Niell, S.; Cesio, V.; Hepperie, J.; Doerk, D.; Kirsch, L.; Kolberg, D.; Scherbaum, E.; Anastassiades, M.; Heinzen, H. QuEChERS-based method for the multiresidue analysis of pesticides in beeswax by LC-MS/MS and GCxGC. TOF. *J.Agric.Food Chem.* **2014**, 62, 17. <https://doi.org/10.1021/jf405771t>
- [23] Bajuk, B. P.; Babnik, K.; Snoj, T.; Milcinski, L.; Ocepek, M. P.; Skof, M.; Jencic, V.; Filazi, A.; Stajnbaher, S. Coumaphos residues in honey, bee brood, and beeswax after Varroa treatment. *Apidologie* **2017**, 48, 5. DOI:10.1007/s13592-017-0501-y
- [24] Bogdanov, S.; Kilchenmann, V.; Butikofer, U. Determination of acaricide residues in beeswax: collaborative study. *Apiacta*, **2003**, 38.
- [25] Chauzat, M. P.; Faucon, J. P.; Martel, A. C.; Lachaize, J.; Gougoule, N.; Aubert, M. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *J.Econ.Entomol.* **2006**, 99, 2. <https://doi.org/10.1093/jee/99.2.253>
- [26] Li, Y.; Kelley, R. A.; Anderson, T. D.; Lydy, M. J. Development and comparison of two multi-residue methods for the analysis of selected pesticides in honey bees, pollen and wax by gas chromatography quadrupole mass spectrometry. *Talanta* **2015**, 140. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.03.031>
- [27] Mullin, C. A.; Frazier, M.; Frazier, J. L.; Ashcraft, S.; Simonds, R.; Van Engelsdorp, D.; Pettis, J. S.; 2010. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: Implications for honey bee health. *PLoS ONE* **2010**, 5, 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009754>
- [28] Alkassab, A. T.; Thorbahn, D.; Frommberger, M.; Bischoff, G.; Pistorius, J. Effect of contamination and adulteration of wax foundations on the brood development of honeybees. *Apidologie* **2020**, 51. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00749-2>
- [29] Bommuraj, V.; Chen, Y.; Klein, H.; Sperling, R.; Barel, S.; Shimshoni, J. A. Pesticide and trace elements residues in honey and beeswax combs from Israel in association with human risk assessment and honey adulteration. *Food Chem.* **2019**, 299. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125123>
- [30] Nozal, M.J.; Imaz, E.; Bernal, J.L.; Nieto, J.L.; Higes, M.; Bernal, J. An Optimized Extraction Procedure for Determining Acaricide Residues in Foundation Sheets of Beeswax by Using

- GasChromatography-Mass Spectrometry. *Agronomy* **2021**, 11, 804. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040804>
- [31] Ghini, S.; Fernández, M.; Pico, Y.; Marín, R.; Fini, F.; Mañes, J.; Girotti, S. Occurrence and distribution of pesticides in the province of Bologna, Italy, using honeybees as bioindicators. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2004**, 47. <https://doi.org/10.1007/s00244-003-3219-y>
- [32] Rossi, S.; Dalpero, A.; Ghini, S.; Colombo, R.; Sabatini, A.; Girotti, S. Multiresidual method for the gas chromatographic analysis of pesticides in honeybees cleaned by gel permeation chromatography. *J. Chromatogr.* **2001**, 905, 1-2. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00928-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00928-6)
- [33] Łozowicka, B. The development, validation and application of a GC-dual detector (NPD-ECD) multi-pesticide residue method for monitoring bee poisoning incidents. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **2013**, 97. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.07.010>
- [34] Gil, M.D.; Uclés, S.; Lozano, A.B.; Sosa, A.; Fernández, A.R. Muliresidue method for trace pesticide analysis in honeybee wax comb by GC-QqQ-MS. *Talanta* **2017**, 163, 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.083>
- [35] 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 honey by gas chromatography–electron-capture detection and matrix-matched calibration. *Journal of Chromatography A* **2004**, 1048, 1, 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.07.034>
- [36] Rezić, I.; Horvat, A. J. M.; Babić, S.; Kaštelan-Macan, M. Determination of pesticides in honey by ultrasonic solvent extraction and thin-layer chromatography. *Ultrasonics Sonochemistry* **2005**, 12, 6, 477-481. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2004.07.004>
- [37] Vichapong, J.; Burakham, R.; Srijaranai, S. Vortex-assisted surfactant-enhanced-emulsification liquid–liquid microextraction with solidification of floating organic droplet combined with HPLC for the determination of neonicotinoid pesticides. *Talanta* **2013**, 117, 221-228. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.08.034>
- [38] Singh, S. B.; Foster, G. D.; Khan, S. U. Microwave-assisted extraction for the simultaneous determination of thiamethoxam, imidacloprid, and carbendazim residues in fresh and cooked vegetable samples. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 1, 105–109. <https://doi.org/10.1021/jf030358p>

- [39] Watanabe, E.; Baba, K.; Eun, H. Simultaneous determination of neonicotinoid insecticides in agricultural samples by solid-phase extraction cleanup and liquid chromatography equipped with diode-array detection. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 10, 3798–3804. <https://doi.org/10.1021/jf063140m>
- [40] Cai, L.; Xing, J.; Dong, L.; Wu, C. Application of polyphenylmethylsiloxane coated fiber for solid-phase microextraction combined with microwave-assisted extraction for the determination of organochlorine pesticides in Chinese teas. *J. Chromatogr. A.* **2003**, *1015*, 1-2, 11–21. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01328-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01328-1)
- [41] Lang Q., Wai C.M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies — a practical review. *Talanta* **2001**, *53*, 4, 771–782. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(00\)00557-9](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(00)00557-9)
- [42] Proietto, M.; Scordino, M.; Sabatino, L.; Pantò, V.; Morabito, G.; Chiappara, E.; Traulo, P.; Gagliano, G. UHPLC/MS-MS Analysis of Six Neonicotinoids in Honey by Modified QuEChERS: Method Development, Validation, and Uncertainty Measurement. *International Journal of Food Science*, **2013**, 2013, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/863904>
- [43] Herrera, S.; Lozano, A.; Sosa, A.; Hernando, M. D.; Fernandez, A. R. Screening of pesticide residues in honeybee wax comb by LC-ESI-MS/MS. A pilot study. *Chemosphere*, **2016**, *163*, 44-53. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.008>
- [44] Oshita, D.; Jardim, I. Comparison of Different Sorbents in the QuEChERS Method for the Determination of Pesticide Residues in Strawberries by LC–MS/MS. *Chromatographia* **2014**, *77*, 19-20, 1291-1298. DOI: 10.1007/s10337-014-2726-5
- [45] Hakme, E.; Lozano, A.; Gomez-Ramos, M. M.; Hernando, M. D.; Fernandez-Alba, A. R. Non-target evaluation of contaminants in honey bees and pollen samples by gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Chemosphere* **2017**, *184*, 1310-1313. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.089>
- [46] Menkissoglu-Spiroudi, U.; Diamantidis, G. C.; Georgiou, V. E.; Thrasyvoulou, A. T. Determination of malathion, coumaphos, and fluvinate residues in honey by gas chromatography with nitrogen-phosphorus or electron capture detectors. *J. AOAC Int.* **2000**, *83*, 1, 178-82. <https://doi.org/10.1093/jaoac/83.1.178>
- [47] Tahboub, Y. R.; Zaater, M. F.; Barri, T. A. Simultaneous identification and quantitation of selected organochlorine pesticide residues in honey by full-scan gas chromatography-

- mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* **2006**, 558, 62-68.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.004>
- [48] Mena Serna, M. Determinación de plaguicidas en miel. Trabajo fin de grado, Universidad de Valladolid, 2020. <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/43318>
- [49] Anastassiades, M.; Lehotay, S. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC International* **2003**, 86, 2, 412-431.
<https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>
- [50] Lehotay, S.; Mastovska, K.; Lightfield, A. Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables. *Journal of AOAC International* **2005**, 88, 2, 615-629.
<https://doi.org/10.1093/jaoac/88.2.615>
- [51] Días, J.; Cutillas, V.; Lozano, A.; Pizzutti, I.; Fernández-Alba, A. Determination of pesticides in edible oils by liquid chromatography-tandem mass spectrometry employing new generation materials for dispersive solid phase extraction clean-up. *Journal of Chromatography A*. **2016**, 1462, 8-18. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.07.072>
- [52] Wallner, K. The actual beeswax quality in foundations from the market. *Apidologie* **1997**, 28, 3-4, 168-171.