



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

Determinación de plaguicidas en miel de Biercol

Autora:

Carmen Fernández Álvarez

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 Nalda y la supervisión del Dr. D. José Luis Bernal Yagüe. Con la colaboración inestimable del Técnico D. Edgar Imaz Sánchez 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 y amigos por todo el ánimo y apoyo mostrado durante estos años.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
2. RESUMEN.....	5
3. ABSTRACT	6
4. ANTECEDENTES Y SITUACIÓN DEL TEMA	7
4.1 Contaminación e impacto ambiental.....	9
4.2 Plaguicidas analizados.....	10
4.3 Antecedentes bibliográficos analíticos.....	15
5. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO	16
5.1 Objetivo.....	16
5.2 Plan de trabajo.....	16
6. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS	17
6.1 Equipo de análisis.....	17
6.2 Equipos adicionales.....	18
6.3 Reactivos y disolventes	20
7. PARTE EXPERIMENTAL.....	20
7.1 Condiciones del análisis	20
7.2 Preparación de patrones para las líneas de calibrado	23
7.3 Tratamiento de muestra.....	25
7.4 Obtención de líneas de calibrado en matriz.....	30
8. CONCLUSIONES	32
9. ABREVIATURAS	33
10. LISTADO DE TABLAS	34
11. LISTADO DE ILUSTRACIONES	35
12. BIBLIOGRAFÍA.....	36

1. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo está orientado a adecuar metodología analítica para examinar la presencia en la miel de biércol de residuos de los principales compuestos empleados en el tratamiento de las colmenas y que frecuentemente se encuentran en concentraciones elevadas en la cera. Para ello es necesario disponer de metodología sencilla que permita evaluarlos a bajas y medias concentraciones.

La miel de biércol o *calluna vulgaris* presenta un matiz entre marrón-rojizo, es muy oscura y su consistencia es de gel. Estos atributos hacen que sea muy complicado y laborioso su estudio planteando así un reto analítico.

La investigación en este trabajo se ha focalizado en la puesta a punto de métodos para la estimación de los residuos de los compuestos más frecuentemente detectados en los productos de la colmena en la miel del origen floral anteriormente mencionado.

Se ha realizado la puesta a punto del método que permita la determinación de dichos posibles contaminantes en la miel de biércol, incluyendo una amplia revisión bibliográfica y, teniendo en cuenta la experiencia previa del grupo de investigación, se han realizado numerosos ensayos atendiendo tanto a su aislamiento como a su cuantificación.

2. RESUMEN

Las abejas son muy importantes para la sociedad tanto por su papel clave en el medioambiente como por la producción de ceras, y miel, por lo que es primordial su cuidado a la hora de realizar tratamientos sobre las colmenas. Los residuos mayoritariamente encontrados en la actualidad en las colmenas derivan del tratamiento de las mismas con acaricidas, consecuencia directa de la presencia del ácaro *Varroa destructor*. Estos químicos pueden resultar potencialmente dañinos para las abejas e incluso para el ser humano si su uso excede los límites fijados, por lo que su utilización debe estar muy controlada.

Por ello, el presente trabajo se centra en la optimización de un método analítico para la determinación de siete plaguicidas, utilizados con mayor frecuencia, por cromatografía de gases con espectrómetro de masas como detector (GC-MS). También se han estudiado distintas variables que pudieran afectar a la extracción de dichos plaguicidas de una matriz compleja como es la miel de biércol, siendo la extracción líquido-líquido la utilizada. El disolvente extractante elegido fue la mezcla AcOEt:C₆H₁₂ en proporción 40:60 v/v.

La optimización se ha realizado con el fin de obtener un método analítico en el que el efecto matriz fuera el menor posible obteniendo, a su vez, unos porcentajes de recuperación suficientemente buenos. Se optó por tanto por la proporción de disolvente extractante 40:60 AcOEt:C₆H₁₂, no utilizar sales de secado y un tiempo de agitación de 15 minutos.

3. ABSTRACT

Bees are very important for society, due to their key role in the environment and for the production of waxes and honey, therefore their care is essential when treating hives. The main residues found in hives come from their treatment with acaricides, which is a direct consequence of the presence of *Varroa destructor*. These chemicals products can be potentially harmful to bees and even to humans if their use exceeds the established limits, so their application must be strongly controlled.

Therefore, the present project focuses on the optimization of an analytical method for the determination of seven pesticides used the most frequently, by gas chromatography with a mass spectrometer as detector (GC-MS). Different variables that could affect the extraction of these pesticides from a matrix such as honey have also been studied, with liquid-liquid extraction being used. The chosen extracting solvent was the AcOEt:C₆H₁₂ mixture in a ratio of 40:60 v / v.

The optimization has been carried out in order to obtain an analytical method in which the matrix effect was as low as possible, obtaining, also, good recovery percentages. Therefore, the extractant solvent ratio 40:60 AcOEt:C₆H₁₂ was chosen, drying salts were not used and a stirring time of 15 minutes was established.

4. ANTECEDENTES Y SITUACIÓN DEL TEMA

La miel es un producto rico en azúcares, vitaminas y minerales, por lo que posee propiedades beneficiosas para la salud, además, se usa como endulzante para alimentos. Por estas y por muchas otras razones es importante el cuidado de las colmenas y abejas, ya que son ellas las que producen la miel.

La producción de la miel comienza con la recolección del néctar (pecoreo) de las flores por las abejas. Estas llevan el néctar en su buche hasta la colmena, donde se lo entregan a las abejas receptoras jóvenes, que son las encargadas de transformarlo en miel. El proceso comienza con la disminución del porcentaje de humedad, desde un 60% hasta aproximadamente un 30%, gracias a las corrientes de aire que circulan por dentro de la colmena debido al aleteo de las propias abejas. El néctar va pasando de abeja en abeja perdiendo más agua y enriqueciéndose de las enzimas que las mismas segregan hasta que es introducido en las celdas de la colmena. Allí el contenido en agua sigue disminuyendo hasta que la humedad es aproximadamente del 18%. Es entonces cuando las abejas sellan la celda con una fina capa de cera, proceso que se denomina operculado de celdas y que indica a los apicultores que pueden proceder con la recogida de la miel^{1,2}

Durante todo este proceso de deshidratación, la pérdida de humedad de la miel es aprovechada para la refrigeración de la colmena, cuya temperatura se mantiene constante a aproximadamente 36°C.¹

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.

Así, la miel natural será aquella que no haya sido calentada por encima de los 43°C ni sometida a procesos como la pasteurización. Además, también existe miel que no procede del néctar de las flores, sino de la mielada o mielato².

Todas las mieles (independientemente de su origen floral) poseen los mismos componentes, lo que varía de un origen a otro es el porcentaje de cada uno de ellos^{3,4}. A continuación, en la siguiente Tabla, se muestran los componentes de la miel con su intervalo en porcentaje en el caso de que la miel provenga del néctar o del mielato.

Tabla 1: Componentes de la miel según su origen³

	min-max / %	
	Miel de néctar	Miel de mielato
Agua	15-20	15-20
Fructosa	30-45	28-40
Sacarosa	0,1-4,8	19-32
Glucosa	24-40	28-40
Otros azúcares	28	16
Minerales	0,1-0,5	0,6-2
Aminoácidos y proteínas	0,2-0,4	0,4-0,7
Ácidos	0,2-0,8	0,8-1,5

Los minerales que se encuentran con frecuencia son el sodio, el calcio, el potasio, el magnesio y el fósforo, y en menor medida, el zinc, el cobre y el manganeso. En cuanto a las vitaminas, están presentes algunas derivadas del complejo B y la vitamina C. Por último, los ácidos son en su mayoría orgánicos, como el cítrico, el glucónico o el succínico.^{3,4}

Otro aspecto importante en las mieles es el pH de las mismas. Para miel de néctar el pH suele encontrarse entre 3,5 y 4,5. Por el contrario, la miel de mielada suele tener un pH más alto, entre 4,5 y 6,5.³

La miel de calluna, biércol o brezo, objeto de estudio en el presente trabajo, destaca por su gran calidad, siendo considerada como la segunda mejor del mundo. Es obtenida a partir de las flores de brechina (*calluna vulgaris*), y su extracción de los panales se ve dificultada debido a su alta consistencia gelatinosa (tixotropía).⁵



Ilustración 1: Planta de Calluna vulgaris⁵

Este tipo de miel es muy valorada, sin embargo, a su vez es poco frecuente ya que su colecta se obstaculiza, como ya se ha dicho, por su consistencia gelatinosa. Se produce mayoritariamente en zonas montañosas, por lo que su origen es ecológico, característica que ofrece un valor añadido a este producto apícola. A ello se une que desde la edad media se ha usado en el tratamiento de enfermedades por su alto contenido en vitaminas, proteínas y sales minerales, por lo que actualmente, se recomienda para la depuración de riñones, como antiséptico, revitalizante y antioxidante entre otras aplicaciones.⁵

4.1 Contaminación e impacto ambiental

Como ya se ha comentado, el cuidado de las colmenas y abejas es muy importante, por lo que, en muchas ocasiones se hace necesario recurrir al uso de plaguicidas para combatir distintos tipos de enfermedades y plagas. Las consecuencias del uso de plaguicidas deben ser profundamente estudiadas, ya que la presencia de residuos químicos en la miel, así como en otros productos de la colmena puede inducir graves daños tanto a las propias abejas como a los consumidores.^{6,7}

Lozano et al.⁸ estudiaron el riesgo de los consumidores a la exposición a residuos de pesticidas analizando muestras de miel y cera contaminadas por ellos. Concluyeron que, aunque en menor cantidad que en la cera, en la miel también existían trazas de plaguicidas, por lo que la exposición del consumidor era relativamente peligrosa.

Por otra parte, Klaus Wallner expuso que el uso de pesticidas como el Bromopropilato, el Cumafós o el Fluvalinato, usados para combatir las plagas del ácaro *Varroa destructor*, dejan residuos en productos apícolas como la miel y la cera. Esto ocurre ya que los agentes químicos son solubles en grasa y no volátiles, por lo que existe una migración de pesticidas del panal a la cera y de esta a la miel.⁹

El ácaro *Varroa destructor* es actualmente una de las mayores amenazas para la apicultura, y uno de los métodos más efectivos para combatir sus plagas es el uso de acaricidas sintéticos como el Cumafós o Fluvalinato.¹⁰ Sin embargo, el uso de estos pesticidas está prohibido en algunos países, lo que supone tener que sustituirlos por otros tratamientos químicos, que, en su mayoría, no son tan efectivos. Esto hace que el uso no controlado de estos acaricidas que no están autorizados como alternativa a la

limitación que presentan los tratamientos que sí que lo están, pueda dar lugar a la intoxicación de especies como las abejas e incluso el ser humano.

Otro problema que presentan estos varroacidas es que su eficacia depende de varios factores como el clima, las condiciones dentro de la colmena y el modo de aplicación. Esto hace que los apicultores opten por usar cantidades más altas de los químicos lo que se traduce en una mayor acumulación en ceras y mieles.^{8,11}

4.2 Plaguicidas analizados

Los pesticidas, también denominados plaguicidas, son sustancias químicas, ya sean orgánicas, inorgánicas o microbiológicas, líquidas o sólidas que producen efectos tóxicos sobre determinados organismos. Están destinados a combatir plagas o pestes, y surgieron debido a la necesidad de eliminar poblaciones de organismos nocivos para los cultivos, alimentos almacenados, animales o humanos.¹²

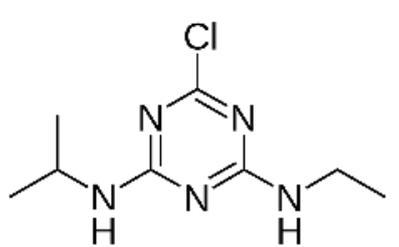
Los acaricidas son también plaguicidas usados para acabar con la acción de los ácaros, que son arácnidos diminutos. Uno de los más utilizados es el Fluvalinato, que combate la Varroosis, parasitosis causada por el ácaro *Varroa jacobsoni Oudemans*.¹³

Tras la revisión bibliográfica se han seleccionado siete plaguicidas de uso generalizado ya que cabe esperar que sean los que se presentarían en mayor frecuencia y cantidad en las mieles. Los pesticidas son los que se exponen a continuación:

❖ **Atrazina**

Se trata de un herbicida con nomenclatura orgánica 2-cloro-4-(etilamina)-6-isopropilamina)-1,3,5-triazina usado para el control del crecimiento de malas hierbas en la agricultura. Se comercializa como un polvo blanco y es peligroso para el medio ambiente y mortal para algunas especies acuáticas e insectos. En cuanto a la especie humana, puede provocar enrojecimientos en la piel y los ojos como e incluso enfermedades más severas como la dermatitis. También puede producir daños en el sistema nervioso central, hígado y riñones. Por estos motivos su uso está prohibido actualmente en la Unión Europea (UE), sin embargo, en Estados Unidos y el continente oceánico sigue estando permitido.^{7,12}

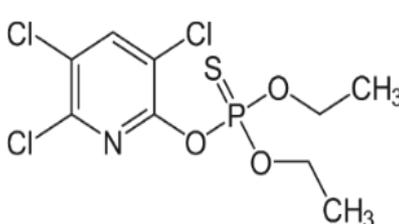
Tabla 2: Nombre, nombre comercial, fórmula molecular, masa molecular, familia, actividad y límite inferior de detección analítica (LIDA) de la atrazina¹⁴

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 inferior de detección analítica (mg/kg)	0,05	

❖ Clorpirifos

Este insecticida organofosforado con nombre químico O,O-dietil O-3,5,6-tricloropiridin-2-il fosforotioato es un sólido cristalino con olor penetrante insoluble en agua pero soluble en disolventes orgánicos. Permite combatir plagas de insectos y parásitos del ganado y microorganismos patógenos en cultivos. En contacto con el ser humano a elevadas concentraciones puede producir paralización de impulsos nerviosos llegando a provocar la muerte, sin embargo, a concentraciones más bajas no supone un daño aparente. Aunque sea insoluble en agua es altamente tóxico para las especies acuáticas, insectos y algunas aves. Debido a que a pequeñas exposiciones no provoca graves daños, su uso está permitido a nivel mundial.^{7,12}

Tabla 3: Nombre, nombre comercial, fórmula molecular, masa molecular, familia, actividad y límite inferior de detección analítica (LIDA) del clorpirifos¹⁴

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	
LIDA (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 anaranjado que presenta un olor fuerte y característico. Su uso más generalizado es el tratamiento de diferentes semillas y azúcar, y también combate las plagas de mosquitos palúdicos. Es altamente tóxico, ya que al igual que el clorpirifos puede producir la paralización de impulsos nerviosos. Como consecuencia, está prohibido en toda la UE, sin embargo, en lugares como Australia, Sudáfrica, Kenia, Centroamérica y Sudamérica su uso aún está generalizado.^{6,7,12,15}

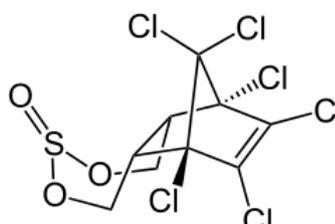
Tabla 4: Nombre, nombre comercial, fórmula molecular, masa molecular, familia, actividad y límite inferior de detección analítica (LIDA) del clorfenvinfos¹⁴

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 inferior de detección analítica (mg/kg)	0,01	

❖ α-Endosulfán

Se trata de un compuesto organoclorado usado como insecticida y acaricida en cosechas. Es un sólido cristalino de color marrón soluble en disolventes orgánicos y tóxico para todos los organismos como consecuencia de su difícil degradación. En los seres humanos, la exposición prolongada a este plaguicida puede provocar alteraciones en el sistema inmunológico y circulatorio, así como graves daños en el cerebro, hígado y pulmón. Por estos motivos el α-endosulfán está prohibido en toda la UE, sin embargo, su uso está aún permitido en otros continentes.^{7,12}

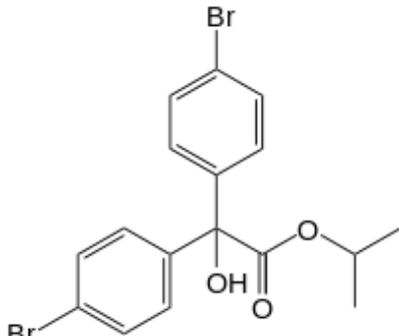
Tabla 5: Nombre, nombre comercial, fórmula molecular, masa molecular, familia, actividad y límite inferior de detección analítica (LIDA) del α -endosulfán¹⁴

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 inferior de detección analítica (mg/kg)	0,01	

❖ Bromopropilato

El bromopropilato es un acaricida de alta toxicidad usado fundamentalmente para combatir los ácaros de la fruta (cítricos, uvas y fresas) y otros cultivos como el azúcar, el té o el algodón. Su nomenclatura orgánica es isopropil 4,4'-dibromobencilato y en su estado natural se encuentra en forma de sólido cristalino de color blanco. Actualmente está prohibido en toda la UE y el continente americano, pero debido a que su degradación es lenta aún se pueden encontrar residuos en suelos, agua y otras matrices.^{7,12}

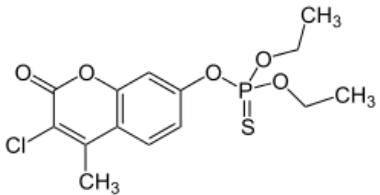
Tabla 6: Nombre, nombre comercial, fórmula molecular, masa molecular, familia, actividad y límite inferior de detección analítica (LIDA) del bromopropilato¹⁴

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 inferior de detección analítica (mg/kg)	0,01	

❖ Cumafós

Este insecticida organofosforado con fórmula molecular 3-cloro-7-dietoxifosfinotioiloxi-4-metil-2-cromenona es utilizado para repeler a varios insectos y parásitos, como las garrapatas, los piojos, las larvas, etcétera en la ganadería. Es un sólido cristalino de color marrón estable y persistente en el medio ambiente. Su uso está prohibido en Australia por completo y en zonas residenciales o agricultura en el resto del mundo ya que es altamente tóxico para el ser humano a elevadas concentraciones y largas exposiciones, puede causar convulsiones, pérdida del conocimiento y crisis respiratorias.^{6,7,12,15}

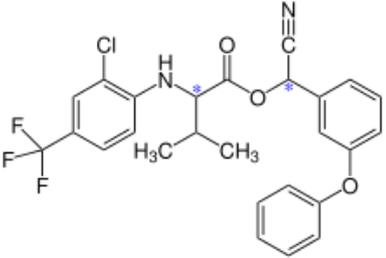
Tabla 7: Nombre, nombre comercial, fórmula molecular, masa molecular, familia, actividad y límite inferior de detección analítica (LIDA) del cumafós¹⁴

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 inferior de detección analítica (mg/kg)	0,10	

❖ τ-Fluvalinato

Como ya se ha dicho, se trata de un acaricida para eliminar el ácaro *Varroa destructor* en colmenas con el fin de garantizar la subsistencia de las abejas *Apis Mellifera* y asegurar la producción de miel. También presenta otras aplicaciones como insecticida en cultivos de cereales, patatas, frutas, etcétera para eliminar el pulgón y otros insectos que provocan enfermedades en las hojas de las plantas. Debido a los efectos adversos que provocan los 4 estereoisómeros posibles (problemas en el sistema endocrino, hígado y riñón), solo está autorizado el uso de los isómeros R, que solo provoca irritaciones en la piel. El τ-fluvalinato está aprobado en toda la UE y a nivel mundial, incluso es habitual su uso en países tercermundistas.^{6,7,12,15}

Tabla 8: Nombre, nombre comercial, fórmula molecular, masa molecular, familia, actividad y límite inferior de detección analítica (LIDA) del τ -fluvalinato¹⁴

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 inferior de detección analítica (mg/kg)	0,05	

4.3 Antecedentes bibliográficos analíticos

Los estudios de determinación de residuos de pesticidas en mieles han sido numerosos en los últimos años, por ello, se cuenta con una amplia bibliografía en la que basar este trabajo.

Como técnicas analíticas de separación y determinación, las más utilizadas son la cromatografía de gases (CG)¹⁶⁻¹⁹ y la cromatografía líquida (LC)²⁰⁻²², siendo la primera la más frecuente para los compuestos aquí considerados. Algún estudio también ha usado la cromatografía de capa fina²³ o la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)²⁴.

En cuanto a los detectores que se han utilizado el que predomina es el espectrómetro de masas. Como analizadores se ha utilizado el cuadrupolo simple^{19,25-27}, en tándem^{24,28}, o triple cuadrupolo²⁹ (QqQ). Aunque es menos habitual, también se ha usado el detector de captura electrónica^{29,30}.

En lo relativo a la preparación de muestras se han encontrado varias opciones. El método de extracción más habitual es el QuEChERS^{18,21,28} (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, y Safe). Se trata de un sistema de extracción en fase sólida dispersiva con dos etapas. La primera consiste en una extracción simple, y la segunda, es una etapa de limpieza (clean up) mediante DSPE (Dispersive solid phase extraction). Otro método también muy frecuente es la extracción en fase sólida (SPE)^{19,31,32}. Es una

técnica basada en la diferencia de afinidad entre un analito, en este caso un pesticida, y la muestra, en este caso la miel, y una fase sólida (sorbente) determinada. Otros estudios recurren a la extracción líquido-líquido. Generalmente se disuelve la miel en agua y se extraen los pesticidas utilizando disolventes que no sean miscibles con ella³³, pero también se realiza con la ayuda de un baño de ultrasonidos²³ o usando tierra de diatomeas²². Otra posibilidad menos habitual es el uso de un sistema acuoso bifásico (ABS)²⁴ o una microextracción en fase sólida (MEPS)²⁶.

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 miel de Biércol 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. Compresión y aplicación del método analítico seleccionado para la extracción y preparación de muestra utilizando miel de Biércol.
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 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.

6. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS

6.1 Equipo de análisis

El equipo usado es un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies series 7890 A*, y 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.



Ilustración 2: Cromatógrafo de gases Agilent Technologies series 7890 A acoplado a 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



Ilustración 3. 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



Ilustración 4: Micropipetas utilizadas

- Tubos de polipropileno para centrífuga 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, 20 mL y 100 mL de MBL Volumetrics
- Matraces aforados de 10 mL de Alamo
- Pesarustancias 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, etcétera.

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)
- Patrón interno utilizado:
 - Clorfenvinfos 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
- Ácido Acético Glaciar de Scharlab
- 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 μ m x 0,25 μ m.
- Volumen de inyección de 1 μ L.

- 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 9: 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 es un espectrómetro de masas con fuente de ionización de impacto electrónico (EI) y analizador cuadrupolar. Esta fuente proporciona iones positivos con relaciones m/z inferiores a las del ion molecular, y su temperatura se fijó en 230°C. La temperatura del cuadrupolo se configuró a 150 °C.

Para cada plaguicida se utilizan tres iones de distinta relación masa-carga (m/z). El ion mayoritario se usa para la cuantificación de cada analito en modo *SIM*, y los dos minoritarios para la confirmación en modo *SCAN* apoyándose también en la biblioteca del NIST (Instituto nacional de estándares y tecnología). En la siguiente ilustración se muestra el espectro de masas para el τ -Fluvalinato.

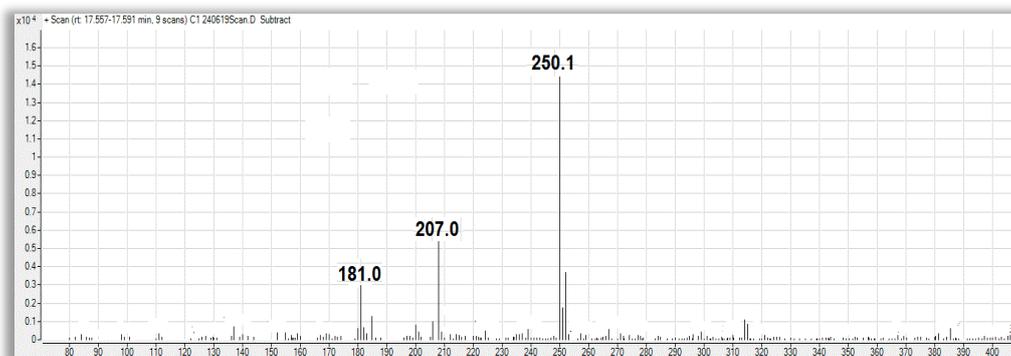


Ilustración 5: Espectro de masas del τ -Fluvalinato en que se observan los tres iones de m/z distinta

A continuación, se presenta el cromatograma correspondiente a una inyección de una muestra de patrón de 0,5 ppm en modo SIM. En él se identifican los picos de los analitos de interés relativos a los plaguicidas y sus tiempos de retención.

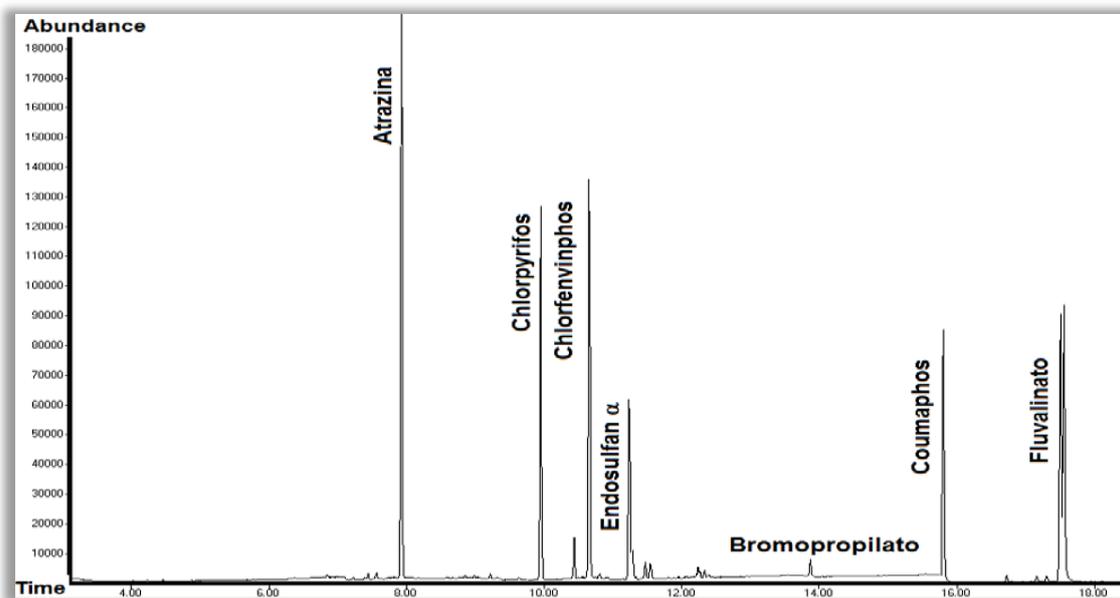


Ilustración 6: Cromatograma en modo SIM de los siete plaguicidas en una concentración de 0,5 ppm

En la **Tabla 10** aparecen reflejados los iones seleccionados para cada plaguicida, así como sus tiempos de retención.

Tabla 10: 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 prepararon una serie de patrones de los plaguicidas en un intervalo entre 0,2 ppm y 5 ppm.

Se comenzó preparando una disolución patrón de cada plaguicida de aproximadamente 1000 ppm en ACN y en AcOEt:C₆H₁₂ 50:50 (v/v). Estas disoluciones se prepararon por pesada de una cantidad aproximada de 10 mg de plaguicida llevados a un matraz 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 se tomó 1 mL de cada disolución de 1000 ppm de cada plaguicida y se llevó a un matraz de 10 mL que posteriormente se enrasó 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 5 ppm.

La cuantificación de los plaguicidas se realizó siguiendo el método del patrón interno. Este método permite eliminar las interferencias generadas por la matriz, los posibles problemas generados por el método de extracción o incluso errores instrumentales, ya que estos inconvenientes afectarán de igual modo al analito y al patrón interno. El patrón interno elegido fue el clorfenvinfos deuterado, que se añadió a los patrones y a las muestras en una concentración de 0,1 ppm.

Con el fin de obtener una línea de calibrado, las disoluciones de patrones ya preparadas se inyectaron en el cromatógrafo. A continuación, se muestra el cromatograma correspondiente al patrón de 0,5 ppm.

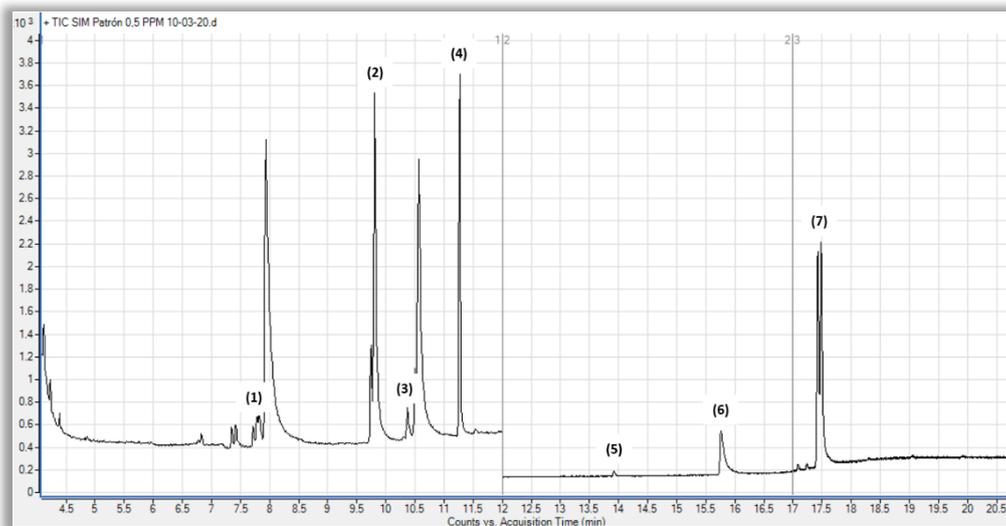


Ilustración 7: Cromatograma en modo SIM de un patrón de 0,5 ppm: (1) Atrazina, (2) Clorpirifos, (3) Clorfenvinfos, (4) α -Endosulfán, (5) Bromopropilato, (6) Cumafós y (7) τ -Fluvalinato

Una vez obtenidos todos los cromatogramas se procedió a la representación de las líneas de calibrado. Se representó la relación de áreas entre el analito y el patrón interno (A_i/A_p) frente a la concentración del mix de patrón obteniéndose así una recta por ajuste de mínimos cuadrados.

A título de ejemplo, en las siguientes ilustraciones (**ilustración 7** e **ilustración 8**) aparecen las representaciones obtenidas para el Cumafós y el τ -Fluvalinato.

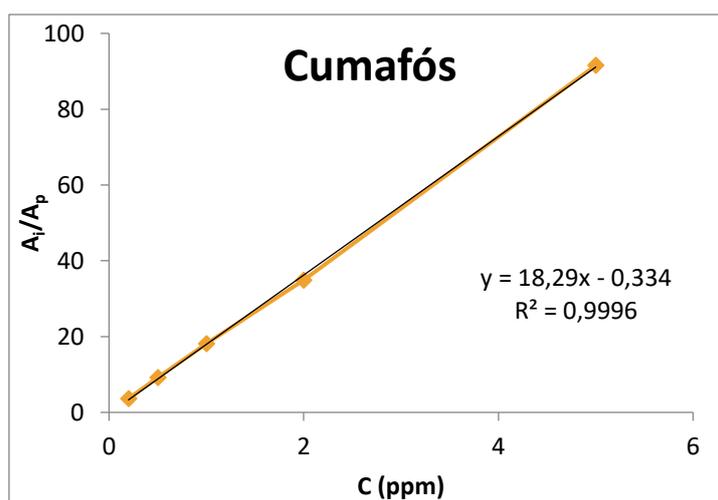


Ilustración 8: Línea de calibrado para el patrón del Cumafós con el Clorfenvinfos como patrón interno

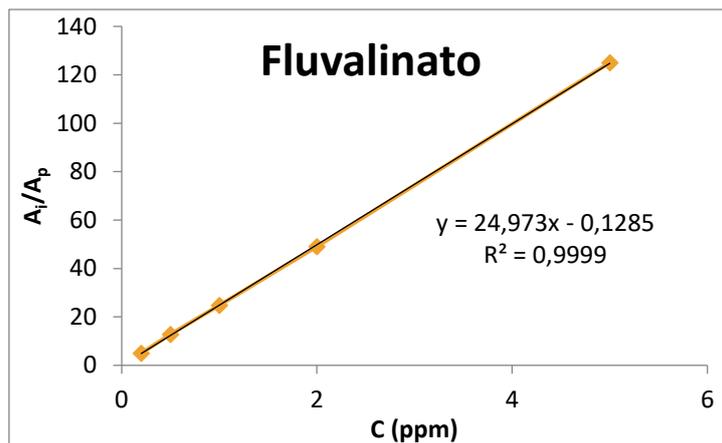


Ilustración 9: Línea de calibrado para el patrón del τ -Fluvalinato con el Clorfenvinfos como patrón interno

A continuación, se presenta una tabla en la que se pueden observar las ecuaciones de las rectas de calibrado obtenidas para cada patrón de plaguicida.

Tabla 11: Pendiente, ordenada y coeficiente de variación en el origen de la línea de calibrado correspondiente a cada plaguicida en relación con el Clorfenvinfos

Compuesto	Ecuación de la recta	R²	Intervalo pendiente
Atrazina	$y = 22,784x + 4,0004$	$R^2 = 0,9992$	21,5688714-23,9992365
Clorpirifos	$y = 11,326x + 2,3514$	$R^2 = 0,9991$	10,6926579-11,9588354
Clorfenvinfos	$y = 15,303x - 0,2928$	$R^2 = 1$	15,121944-15,4834159
α -Endosulfan	$y = 3,5669x + 0,8344$	$R^2 = 0,9987$	3,32877876-3,80510718
Bromopropilato	$y = 0,1745x - 0,0011$	$R^2 = 0,9999$	0,17081981-0,17808917
Cumafós	$y = 11,957x - 3,2704$	$R^2 = 0,9976$	10,8729967-13,040456
τ -Fluvalinato	$y = 48,495x - 12,01$	$R^2 = 0,9971$	43,6556182-53,334962

7.3 Tratamiento de muestra

A partir de la revisión bibliográfica se seleccionó como método para el aislamiento de los compuestos de interés la extracción líquido-líquido puesto que es un método sencillo y muy económico.

Para la optimización del proceso de extracción de los plaguicidas de la matriz de miel se tuvieron en cuenta tres variables: proporción de disolvente, utilización de sales de secado y tiempo de agitación.

Con el fin de facilitar el estudio, y una vez determinadas las variables a tener en cuenta, el proceso de optimización se llevó a cabo mediante la evaluación de cada una

de las variables manteniendo siempre dos de ellas fijas, y teniendo en cuenta continuamente el porcentaje de recuperación en cada caso.

En todos los casos se tomaron 3 g de miel a los que se añadió una concentración de 1 ppm de la mezcla de los siete compuestos objeto de estudio en ACN. La miel ya dopada con el mix se disolvió en 10 mL de agua, y una vez disuelta por completo se le añadieron 10 mL del disolvente extractante.

Inicialmente se consideró comprobar la influencia que pudiera ejercer sobre el rendimiento de la extracción el solubilizar la miel en agua acidulada con ácido acético en lugar de agua ultrapura, debido a que el pH de la miel de estudio fue ligeramente más básico que el de otras mieles cuyo proceso de extracción ya estaba optimizado. Se utilizaron para disolver los 3 g de miel 10 ml de agua ultrapura, 10 ml de agua ultrapura con 1% de HAcO y 10 ml de agua ultrapura con 2% de HAcO. En todos los ensayos, se agregaron 10 mL del extractante, AcOEt:C₆H₁₂ 50:50 (v/v), y el tiempo de agitación fue de 10 minutos. Una vez separadas las fases y centrifugada la fase orgánica, se tomaron 5 ml del sobrenadante, que se concentraron a sequedad. El residuo seco se reconstituyó con 1 ml del PI de concentración 0,1 ppm en AcOEt:C₆H₁₂ 50:50, y posteriormente se inyectó en el cromatógrafo en las condiciones anteriormente señaladas.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado, y de los cromatogramas obtenidos se pudo deducir que la utilización de agua con 1% de HAcO mejoraba la recuperación de los compuestos objeto de estudio y que la utilización de porcentajes mayores de HAcO no incrementaba la recuperación. Se decidió entonces disolver los 3 g de miel con 10 ml de agua con un 1% de HAcO para los siguientes ensayos.

La siguiente variable que se tuvo en cuenta fue la influencia que la proporción de AcOEt:C₆H₁₂ ejercía sobre la recuperación. Se ensayaron cuatro proporciones de la mezcla extractante, que fueron: 20:80, 30:70, 40:60 y 50:50 (v/v) de AcOEt:C₆H₁₂. Se inició el estudio utilizando una proporción 50:50 (v/v) de AcOEt:C₆H₁₂. A continuación, se comprobaron los resultados para una proporción 20:80 AcOEt:C₆H₁₂, 30:70 y finalmente, para una proporción 40:60 de AcOEt:C₆H₁₂. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 12: Porcentajes de recuperación obtenidos para las distintas mezclas extractantes utilizadas

Plaguicida	%R	%R	%R	%R
	AcOEt:C ₆ H ₁₂ 2 (20:80, v/v)	AcOEt:C ₆ H ₁₂ 2 (30:70, v/v)	AcOEt:C ₆ H ₁₂ 2 (40:60, v/v)	AcOEt:C ₆ H ₁₂ 2 (50:50, v/v)
Atrazina	85,0	108,1	107,7	107,3
Clorpirifos	43,1	82,8	99,4	95,1
Clorfenvinfos	76,4	91,4	108,5	95,4
α-Endosulfan	45,0	76,5	93,2	86,4
Bromopropilato	53,2	81,1	108,3	101,9
Cumafós	75,2	90,6	101,4	98,8
τ-Fluvalinato	25,4	49,0	82,4	74,7

Como se puede observar en la tabla, los mejores resultados en cuanto a recuperación (cerca del 100%) se obtuvieron con el uso de la proporción 40:60 de AcOEt:C₆H₁₂ como disolvente extractante. Por lo tanto, se seleccionó dicha proporción para su utilización en los siguientes pasos de optimización.

Posteriormente se comprobó que la adición de sales a la fase acuosa no mejoraba las recuperaciones por lo que se decidió no utilizarlas.

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. Los resultados se muestran en la **Tabla 13**.

Tabla 13 : Resultados de % R para cada uno de los plaguicidas a cada tiempo de agitación

Plaguicida	% R	% R	% R
	5 minutos	10 minutos	15 minutos
Atrazina	101,89	107,7	105,8
Clorpirifos	82,426	99,4	100,1
Clorfenvinfos	88,06	108,5	104,9
α-Endosulfán	82,592	93,2	93,8
Bromopropilato	83,927	108,3	100,9
Cumafós	85,25	101,4	100,0
τ-Fluvalinato	53,106	82,4	81,8

De los resultados obtenidos se concluyó que la utilización de cinco minutos de agitación proporcionaba recuperaciones bajas fundamentalmente para el τ -Fluvalinato mientras que la utilización de quince minutos no provocaba variaciones sustanciales con respecto a las recuperaciones alcanzadas con diez minutos. Por este motivo, se seleccionó un tiempo de agitación de diez minutos.

Una vez estudiadas todas las variables, el tratamiento de muestra propuesto para el análisis de los siete plaguicidas es el que se presenta en la siguiente ilustración.

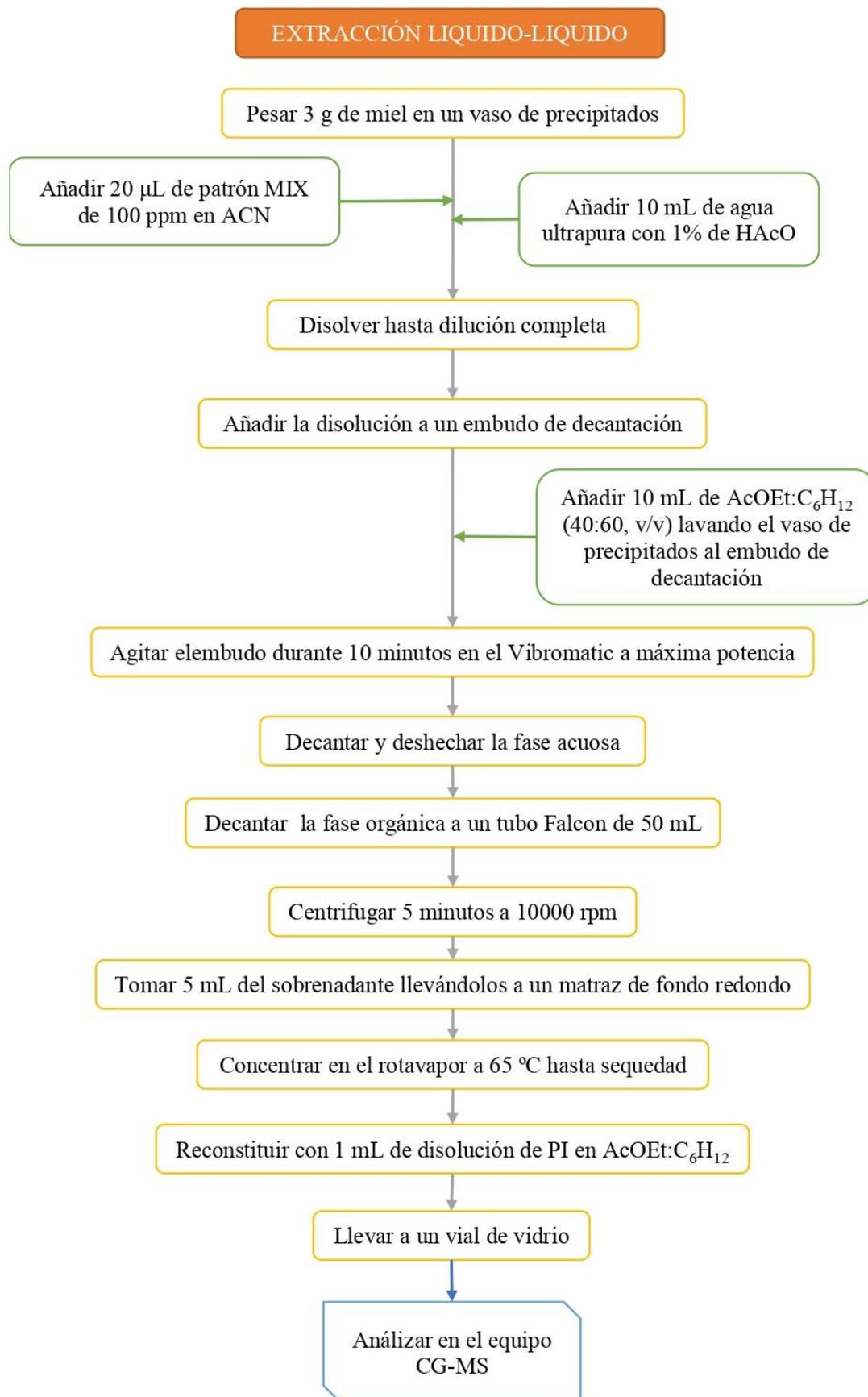


Ilustración 10: Esquema general de trabajo

7.4 Obtención de líneas de calibrado en matriz

El siguiente paso fue la obtención de las líneas de calibrado en matriz. Para ello, se procedió a la preparación de una serie de muestras de miel de biércol 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 5 ppm.

En la siguiente figura se puede observar el cromatograma para la muestra dopada antes de proceder a la extracción.

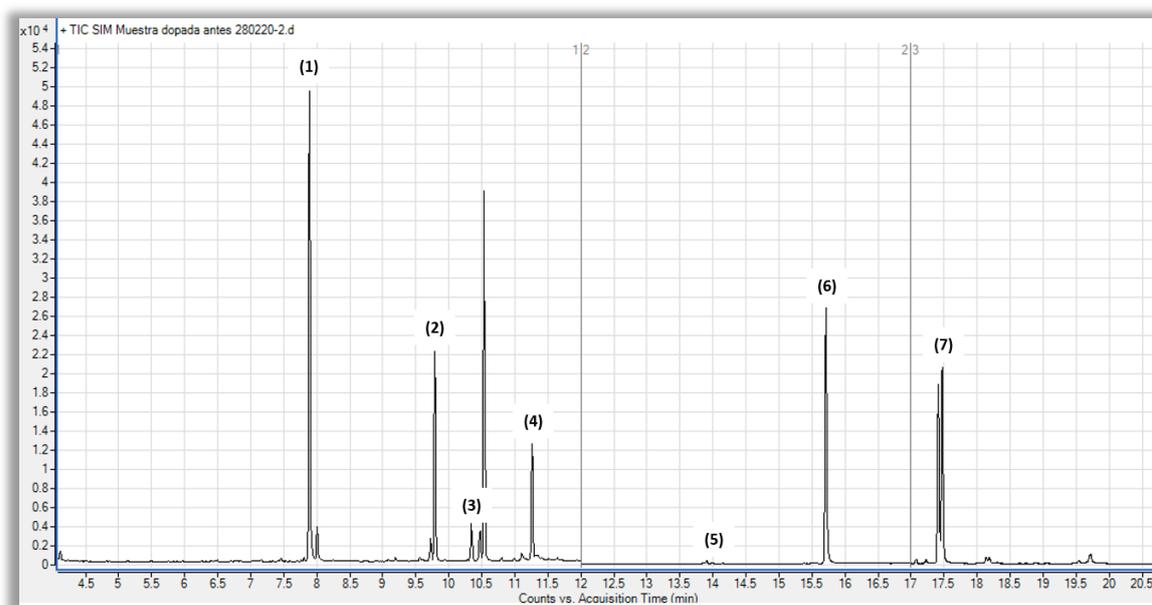


Ilustración 11: Cromatograma en modo SIM de una muestra dopada antes: (1) Atrazina, (2) Clorpirifos, (3) Clorfenvinfos, (4) α -Endosulfán, (5) Bromopropilato, (6) Cumafós y (7) τ -Fluvalinato

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

De los cromatogramas que se obtuvieron se calcularon las relaciones de áreas las cuales se representaron frente a la concentración de patrón 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 Cumafos y para el τ -Fluvalinato (**ilustración 11** e **ilustración 12** respectivamente).

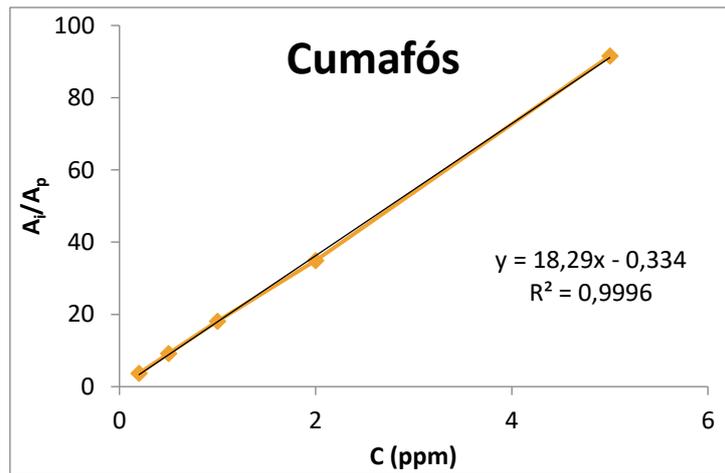


Ilustración 12: Línea de calibrado para el patrón del Cumafós con el Clorfenvinfos como patrón interno

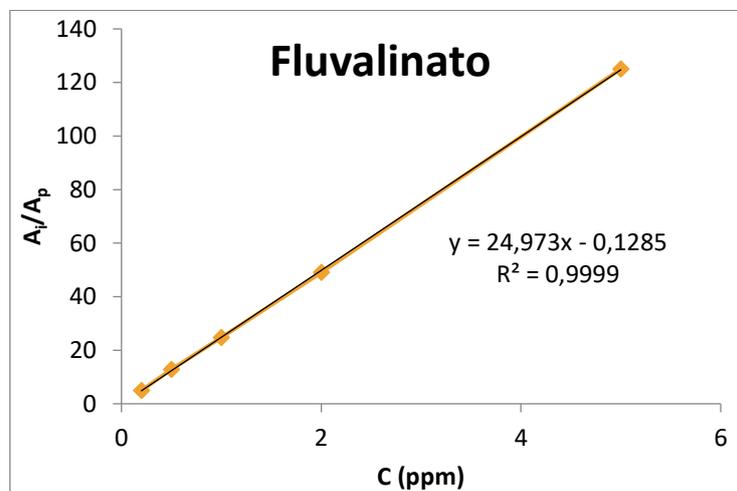


Ilustración 13: Línea de calibrado para el patrón del τ -Fluvalinato con el Clorfenvinfos como patrón interno

Los resultados de las líneas de calibrado se recogen en la siguiente tabla.

Tabla 14: Pendiente, ordenada y coeficiente de variación en el origen de la línea de calibrado correspondiente a cada plaguicida

Compuesto	Ecuación de la recta	R ²	Intervalo pendiente
Atrazina	$y = 26,053x - 0,463$	R ² = 0,9953	25,662814-26,4423039
Clorpirifos	$y = 8,1972x - 0,3661$	R ² = 0,9981	7,54627196-8,84815942
Clorfenvinfos	$y = 24,33x - 1,1639$	R ² = 0,9992	23,0440802-25,6165874
α -Endosulfán	$y = 1,998x - 0,0268$	R ² = 0,9999	1,95555457-2,04048114
Bromopropilato	$y = 0,1836x - 0,0129$	R ² = 0,999	0,17288504-0,19422634
Cumafós	$y = 18,29x - 0,334$	R ² = 0,9996	17,5863411-18,9939637
τ -Fluvalinato	$y = 24,973x - 0,1285$	R ² = 0,9999	24,5123312-25,4343783

De la observación de los resultados de las ecuaciones de las rectas obtenidas con patrones y en matriz, se deduce que los intervalos de confianza de las pendientes no se superponen por lo que se para realizar la cuantificación exacta y correcta se debe de utilizar el calibrado en matriz.

8. CONCLUSIONES

- ❖ Se ha desarrollado un método para la determinación de siete plaguicidas en muestras de miel de biércol 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 40:60 (v/v) de AcOEt:C₆H₁₂.
- ❖ La utilización de MgSO₄ y NaCl como sales de secado no mejora el procedimiento.
- ❖ 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 biércol adicionadas con los plaguicidas, proporcionando porcentajes de recuperación muy adecuadas (próximos al 100%)
- ❖ Para una cuantificación exacta es necesario utilizar el calibrado en matriz.

9. ABREVIATURAS

- TESEA = Grupo de Técnicas de Separación y Análisis Aplicado
- UE = Unión Europea
- LIDA = Límite Inferior de Determinación Analítica
- GC = Cromatografía de gases
- QuEChERS = Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (Rápido, Fácil, Barato, Efectivo, Robusto y Seguro).
- MS = Espectrometría de masas
- PESTANAL® = Patrón para análisis de pesticidas
- PESTIPUR = Pureza de disolventes compatible con el análisis de pesticidas
- EI = Ionización de impacto electrónico
- MSD = Detector selectivo de masas
- ppm = Partes por millón
- ACN = Acetonitrilo
- H₂O = Agua
- HAcO = Ácido acético
- AcOEt = Acetato de etilo
- C₆H₁₂ = Ciclohexano
- A_i = Área del pico de la muestra
- A_p = Área del patrón interno
- rpm = Revoluciones por minuto
- % R = Porcentaje de recuperación
- % ME = Porcentaje de efecto matriz
- TIC = Total Ion Chromatogram (Cromatograma de iones totales)
- NIST = Instituto nacional de estándares y tecnología
- PI = Patrón Interno

10. LISTADO DE TABLAS

<i>Tabla 1: Componentes de la miel según su origen</i> ³	8
<i>Tabla 2: Nombre, nombre comercial, fórmula molecular, masa molecular, familia, actividad y límite inferior de detección analítica (LIDA) de la atrazina</i> ¹³	11
<i>Tabla 3: Nombre, nombre comercial, fórmula molecular, masa molecular, familia, actividad y límite inferior de detección analítica (LIDA) del clorpirifos</i> ¹³	11
<i>Tabla 4: Nombre, nombre comercial, fórmula molecular, masa molecular, familia, actividad y límite inferior de detección analítica (LIDA) del clorfenvinfos</i> ¹³	12
<i>Tabla 5: Nombre, nombre comercial, fórmula molecular, masa molecular, familia, actividad y límite inferior de detección analítica (LIDA) del α-endosulfán</i> ¹³	13
<i>Tabla 6: Nombre, nombre comercial, fórmula molecular, masa molecular, familia, actividad y límite inferior de detección analítica (LIDA) del bromopropilato</i> ¹³	13
<i>Tabla 7: Nombre, nombre comercial, fórmula molecular, masa molecular, familia, actividad y límite inferior de detección analítica (LIDA) del cumafós</i> ¹³	14
<i>Tabla 8: Nombre, nombre comercial, fórmula molecular, masa molecular, familia, actividad y límite inferior de detección analítica (LIDA) del τ-fluvalinato</i> ¹³	15
<i>Tabla 9: Gradiente térmico empleado</i>	21
<i>Tabla 10: Tiempo de retención, m/z cuantificador y m/z de confirmación de cada plaguicida</i> .	22
<i>Tabla 11: Pendiente, ordenada y coeficiente de variación en el origen de la línea de calibrado correspondiente a cada plaguicida en relación con el Clorfenvinfos</i>	25
<i>Tabla 12: Porcentajes de recuperación obtenidos para las distintas mezclas extractantes utilizadas</i>	27
<i>Tabla 13 : Resultados de % R para cada uno de los plaguicidas a cada tiempo de agitación</i> ..	27
<i>Tabla 14: Pendiente, ordenada y coeficiente de variación en el origen de la línea de calibrado correspondiente a cada plaguicida</i>	31

11. LISTADO DE ILUSTRACIONES

<i>Ilustración 1: Planta de Calluna vulgaris</i> ⁵	8
<i>Ilustración 2: Cromatógrafo de gases Agilent Technologies series 7890 A acoplado a detector de espectrometría de masas Agilent Technologies 5975 C</i>	17
<i>Ilustración 3. Rotavapor R-3 de BÜCHI</i>	18
<i>Ilustración 4: Micropipetas utilizadas</i>	19
<i>Ilustración 5: Espectro de masas del τ-Fluvalinato en que se observan los tres iones de m/z distinta</i>	21
<i>Ilustración 6: Cromatograma en modo SIM de los siete plaguicidas en una concentración de 0,5 ppm</i>	22
<i>Ilustración 7: 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</i>	24
<i>Ilustración 8: Línea de calibrado para el patrón del Cumafós con el Clorfenvinfos como patrón interno</i>	24
<i>Ilustración 9: Línea de calibrado para el patrón del τ-Fluvalinato con el Clorfenvinfos como patrón interno</i>	25
<i>Ilustración 10: Esquema general de trabajo</i>	29
<i>Ilustración 11: 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</i>	30
<i>Ilustración 12: Línea de calibrado para el patrón del Cumafós con el Clorfenvinfos como patrón interno</i>	31
<i>Ilustración 13: Línea de calibrado para el patrón del τ-Fluvalinato con el Clorfenvinfos como patrón interno</i>	31

12. BIBLIOGRAFÍA

- (1) ¿Cómo elaboran la miel las abejas? <https://www.mielarlanza.com/como-elaboran-la-miel-las-abejas/> (accessed 2021 -04 -23).
- (2) ¿Cómo hacen la miel las abejas? <https://apiculturaymiel.com/miel/como-hacen-las-abejas-la-miel/> (accessed 2021 -04 -22).
- (3) Bogdanov, S. Honey Composition. *The Honey Book* **2017**, No. 5.
- (4) Bogdanov, S. Honey as Nutrient and Functional Food. *The Book of Honey* **2017**, No. 8.
- (5) Miel de Calluna o Biércol. Segunda mejor miel del mundo. <http://www.abellaxana.com/es/news/18523-miel-de-calluna-o-biercol-segunda-mejor-miel-del-mundo-> (accessed 2021 -07 -10).
- (6) Martínez-Ghersa, M. A. Consecuencias Ambientales Del Uso de Pesticidas. *Ciencia hoy* **2011**, 21 (122), 30–35.
- (7) Wolansky, M. J. Plaguicidas y Salud Humana. *Ciencia hoy* **2011**, 21 (122), 23–29.
- (8) Lozano, A.; Hernando, M. D.; Uclés, S.; Hakme, E.; Fernández-Alba, A. R. Identification and Measurement of Veterinary Drug Residues in Beehive Products. *Food Chemistry* **2019**, 274, 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.055>.
- (9) Wallner, K. Varroacides and Their Residues in Bee Products. *Apidologie* **1999**, 30, 235–248.
- (10) Medici De Mattos, I.; Soares, A. E. E.; Tarpy, D. R.; Effects of Synthetic Acaricides on Honey Bee Grooming Behavior against the Parasitic Varroa Destructor Mite. *Apidologie* **2017**, 48 (4), 483–494. <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0491-9i>.
- (11) Gracia, M. J.; Moreno, C.; Ferrer, M.; Sanz, A.; Peribáñez, M. A. ; Estrada, R. Field Efficacy of Acaricides against Varroa Destructor. *PLoS ONE* **2017**, 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171633>.
- (12) Bedmar, F. ¿Qué Son Los Plaguicidas? *Ciencia hoy* **2011**, 21 (122), 11–16.
- (13) Arechavaleta Velasco, M. E.; Guzmán Novoa, E. Producción de Miel de Colonias de Abejas (*Apis Mellifera* L.) Tratadas y No Tratadas Con Fluvalinato Contra

- Varroa Jacobsoni Oudemans En Valle de Bravo, Estado de México. **2000**, *31* (4), 381–384.
- (14) Base de datos de plaguicidas de la UE <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/mrls/?event=search.pr> (accessed 2021 -06 -02).
- (15) Rodríguez García D. Impacto Social de La Presencia de Residuos Químicos de Síntesis En Los Productos de La Colmena. *Revista electrónica de Veterinaria* **2007**, *810*, 1695–7504.
- (16) Jiménez, J. J.; Bernal, J. L.; del Nozal, M. J.; Martín, M. T. Residues of Organic Contaminants in Beeswax. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2005**, *107* (12), 896–902. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200500284>.
- (17) Zhen, J.; Zhuguang, L.; Meiyu, C.; Yu, M. A.; Jun, T.; Yulan, F.; Jiachen, W.; Zhaobin, C.; Fengzhang, T. U. Determination of Multiple Pesticide Residues in Honey Using Gas Chromatography-Electron Impact Ionization-Mass Spectrometry. *CHINESE JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY* **2006**, *24* (5), 440–446.
- (18) Almeida, M. O.; Oloris, S. C. S.; Faria, V. H. F.; Ribeiro, M. C. M.; Cantini, D. M.; Soto-Blanco, B. Optimization of Method for Pesticide Detection in Honey by Using Liquid and Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometric Detection. *Foods* **2020**, *9* (10). <https://doi.org/10.3390/foods9101368>.
- (19) Blasco, C.; Fernández, M.; Pena, A.; Lino, C.; Silveira, M. I.; Font, G.; Picó, Y. Assessment of Pesticide Residues in Honey Samples from Portugal and Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51* (27), 8132–8138. <https://doi.org/10.1021/jf034870m>.
- (20) Yáñez, K. P.; Bernal, J. L.; del Nozal, M. J.; Martín, M. T.; Bernal, J. Determination of Seven Neonicotinoid Insecticides in Beeswax by Liquid Chromatography Coupled to Electrospray-Mass Spectrometry Using a Fused-Core Column. *Journal of Chromatography A* **2013**, *1285*, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.032>.
- (21) Wiest, L.; Buleté, A.; Giroud, B.; Fratta, C.; Amic, S.; Lambert, O.; Pouliquen, H.; Arnaudguilhem, C. Multi-Residue Analysis of 80 Environmental Contaminants in Honeys, Honeybees and Pollens by One Extraction Procedure Followed by Liquid and Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometric

- Detection. *Journal of Chromatography A* **2011**, *1218* (34), 5743–5756. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.079>.
- (22) Pirard, C.; Widart, J.; Nguyen, B. K.; Deleuze, C.; Heudt, L.; Haubruge, E.; de Pauw, E.; Focant, J. F. Development and Validation of a Multi-Residue Method for Pesticide Determination in Honey Using on-Column Liquid-Liquid Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1152* (1–2), 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.035>.
- (23) 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>.
- (24) Tian, H.; Fu, H.; Xu, C.; Xu, C. Simultaneous Determination of Three Herbicides in Honey Samples Using an Aqueous Biphasic System Coupled with HPLC–MS/MS. *Chromatographia* **2019**, *82* (10), 1571–1577. <https://doi.org/10.1007/s10337-019-03781-2>.
- (25) Bonzini, S.; Tremolada, P.; Bernardinelli, I.; Colombo, M.; Vighi, M. Predicting Pesticide Fate in the Hive (Part 1): Experimentally Determined τ -Fluvalinate Residues in Bees, Honey and Wax. *Apidologie* **2011**, *42* (3), 378–390. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0011-2>.
- (26) Salami, F. H.; Queiroz, M. E. C. Microextraction in Packed Sorbent for the Determination of Pesticides in Honey Samples by Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry. *Journal of Chromatographic Science* **2013**, *51* (10), 899–904. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms187>.
- (27) Li, Y.; Kelley, R. A.; Anderson, T. D.; Lydy, M. J. Development and Comparison of Two Multi-Residue Methods for the Analysis of Select Pesticides in Honey Bees, Pollen, and Wax by Gas Chromatography-Quadrupole Mass Spectrometry. *Talanta* **2015**, *140*, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.03.031>.
- (28) Gawęł, M.; Kiljanek, T.; Niewiadowska, A.; Semeniuk, S.; Goliszek, M.; Burek, O.; Posyniak, A. Determination of Neonicotinoids and 199 Other Pesticide Residues in Honey by Liquid and Gas Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry. *Food Chemistry* **2019**, *282*, 36–47. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.003>.

- (29) Paoloni, A.; Alunni, S.; Pelliccia, A.; Pecorelli, I. Rapid Determination of Residues of Pesticides in Honey by MGC-ECD and GC-MS/MS: Method Validation and Estimation of Measurement Uncertainty According to Document No. SANCO/12571/2013. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* **2016**, *51* (3), 133–142. <https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1108748>.
- (30) Jiménez, J. J.; Bernal, J. L.; del Nozal, M. J.; Alonso, C. Liquid-Liquid Extraction Followed by Solid-Phase Extraction for the Determination of Lipophilic Pesticides in Beeswax by Gas Chromatography- Electron-Capture Detection and Matrix-Matched Calibration. In *Journal of Chromatography A*; 2004; Vol. 1048, pp 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.07.034>.
- (31) Albero, B.; Sánchez-Brunete, C.; Tadeo, J. L. Analysis of Pesticides in Honey by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52* (19), 5828–5835. <https://doi.org/10.1021/jf049470t>.
- (32) Jansson, C. Multiresidue Method for the Gas Chromatographic Determination of Pesticides in Honey after Solid-Phase Extraction Cleanup. *Journal of AOAC international* **2000**, *83* (3), 714–719.
- (33) Rissato, S. R.; Galhiane, M. S.; de Almeida, M. V.; Gerenutti, M.; Apon, B. M. Multiresidue Determination of Pesticides in Honey Samples by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Application in Environmental Contamination. *Food Chemistry* **2007**, *101* (4), 1719–1726. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.034>.
- (34) Mena Serna, M^a. Determinación de Plaguicidas En Miel, Valladolid, 2020.