



Departamento de
Producción Animal
y Ciencia de los Alimentos
Universidad Zaragoza



NUEVAS APORTACIONES EN EL ANÁLISIS SPE-HPLC DE RESIDUOS DE ACARICIDAS DE SÍNTESIS EN CERA DE ABEJAS



PARRÓN QUESADA, JOSÉ ANTONIO

Tutoras: D^a SUSANA BAYARRI FERNÁNDEZ y D^a CONSUELO PÉREZ ARQUILLUÉ

**MÁSTER EN INICIACIÓN A LA INVESTIGACIÓN EN CIENCIA Y
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**

CURSO 2011-12

ÍNDICE GENERAL

	<u>Páginas</u>
ÍNDICE GENERAL	I-II
ÍNDICE DE FIGURAS	III-IV
ÍNDICE DE TABLAS	V
RESUMEN	VII
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. La cera de abejas	
1.1.1. Características de la cera	3-4
1.1.2. Legislación aplicable a la cera	5
1.2. Enfermedades parasitarias: Varroosis	6
1.3. Tratamientos sanitarios en Apicultura. Acaricidas de síntesis	
1.3.1. Fluvalinato	7-8
1.3.2. Flumetrina	8
1.3.3. Cumafós	9
1.3.4. Bromopropilato y 4,4'-Dibromobenzofenona	10
1.4. Tratamientos fitosanitarios	
1.4.1. Clorfenvinfós	11
1.4.2. Clorpirifós	12-13
1.4.3. Terbutilazina	13-14
1.5. Problemática de la presencia de residuos de contaminantes abióticos en la cera de abejas ..	14-15
1.6. Métodos analíticos para la determinación de contaminantes abióticos en cera	
1.6.1. Acondicionamiento de la muestra	15
1.6.2. Extracción de los analitos	16-17
1.6.3. Purificación del extracto (clean-up)	17
1.6.4. Determinación por cromatografía	17-18
1.6.5. Confirmación	18
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAL Y MÉTODOS	
3.1. Material, reactivos y equipos	25-26
3.1.1. Material	
3.1.2. Reactivos	
3.1.3. Equipos	
3.2. Compuestos objeto de estudio	27

3.3. Puesta a punto de un método de análisis multiresiduo en cera	
3.3.1. Optimización de la determinación cromatográfica mediante HPLC	
3.3.1.1. Preparación de patrones	28
3.3.1.2. Identificación cromatográfica de los compuestos de interés	28-29
3.3.1.3. Longitud de onda óptima de cada compuesto	29
3.3.1.4. Mezcla de compuestos de interés	29-30
3.3.1.5. Optimización del gradiente de elución	30-36
3.3.1.6. Limpieza de la columna cromatográfica	36-37
3.3.2. Optimización de la técnica de extracción y purificación (SPE)	
3.3.2.1. Elección de una matriz de cera libre de residuos	37-38
3.3.2.2. Contaminación de la cera con una solución patrón	38
3.3.2.3. Optimización de la técnica de extracción	38-41
3.3.3. Validación de la metodología analítica optimizada	
3.3.3.1. Estudio de especificidad	42
3.3.3.2. Estudio de sensibilidad	42-43
3.3.3.3. Estudio de exactitud (recuperación y precisión)	
3.3.3.3.1. Veracidad (recuperación)	43
3.3.3.3.2. Precisión	44
3.3.3.4. Estudio de robustez	45-46
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. Condiciones óptimas de determinación por HPLC	
4.1.1. Longitud de onda óptima de cada compuesto	49
4.1.2. Gradiente de elución optimizado	49
4.1.3. Tiempos de retención y orden de elución de los analitos objeto de estudio	49-50
4.1.4. Condiciones cromatográficas establecidas	50-51
4.2. Condiciones óptimas de extracción y purificación (SPE)	
4.2.1. Recuperación de los analitos tras los distintos ensayos	51
4.2.2. Método analítico optimizado	52
4.3. Validación del método analítico	
4.3.1. Resultados del estudio de especificidad	53
4.3.2. Resultados del estudio de sensibilidad	54-56
4.3.3. Resultados del estudio de exactitud (recuperación y precisión)	56-57
4.3.4. Resultados del estudio de robustez	57-58
5. CONCLUSIONES	61
6. BIBLIOGRAFÍA	65-69

ÍNDICE DE FIGURAS

	<u>Páginas</u>
Figura 1: Contaminantes en productos de la colmena (Bogdanov, 2006)	3
Figura 2: Usos de la cera de abeja como aditivo (Codex Alimentarius, 2011)	5
Figura 3: Características de identidad y pureza de la cera como aditivo alimentario (RD. 1466/2009)	5
Figura 4: Varroa sobre panal de colmena afectada y sobre pupa de obrera	6
Figura 5: Estructura química del acaricida fluvalinato (Korta <i>et al.</i> , 2001)	8
Figura 6: Estructura química del acaricida flumetrina (Korta <i>et al.</i> , 2001)	8
Figura 7: Estructura química del acaricida cumafós (Korta <i>et al.</i> , 2001)	9
Figura 8: Límite Máximo de Residuos propuesto para el cumafós en cera (PMRA, Canadá, 2008)	9
Figura 9: Estructura química del acaricida bromopropilato y de su metabolito 4,4'-dibromobenzofenona (Korta <i>et al.</i> , 2001)	10
Figura 10: Límite Máximo de Residuos de bromopropilato en miel, jalea real y polen (Reglamento nº 310/2011)	10
Figura 11: Estructura química del insecticida clorfenvinfós (Korta <i>et al.</i> , 2001)	11
Figura 12: Estructura química del clorpirifós	12
Figura 13: Registro de productos fitosanitarios: usos autorizados del clorpirifós (MAGRAMA)	12
Figura 14: Registro de productos fitosanitarios: algunas marcas comerciales de clorpirifós (MAGRAMA)	12
Figura 15: Estructura química de la terbutilazina	13
Figura 16: Registro de productos fitosanitarios: usos autorizados de terbutilazina (MAGRAMA)	13
Figura 17: Registro de productos fitosanitarios: algunas marcas comerciales de terbutilazina (MAGRAMA)	13
Figura 18: Esquema de la técnica de extracción en fase sólida (SPE)	16
Figura 19: Algunos adsorbentes utilizados en la Extracción en Fase Sólida (SPE)	17
Figura 20: Diagrama de un equipo HPLC	18
Figura 21: Equipo de HPLC empleado en el presente trabajo	27
Figura 22: Ejemplo de cromatograma obtenido para 4,4'-Dibromobenzofenona a 272 nm	28
Figura 23: Espectros de absorción de los diferentes compuestos	29
Figura 24: Separación de los compuestos con gradiente inicial, a 210 nm	30
Figura 25: Cromatograma obtenido tras ensayo 1	31
Figura 26: Cromatograma obtenido tras ensayo 2	31
Figura 27: Cromatograma obtenido tras ensayo 3	32
Figura 28: Cromatograma obtenido tras ensayo 4	32
Figura 29: Cromatograma obtenido tras ensayo 5	32
Figura 30: Cromatograma obtenido tras ensayo 6	33
Figura 31: Cromatograma obtenido tras ensayo 7	33

Figura 32: Cromatograma obtenido tras ensayo 8	33
Figura 33: Cromatograma obtenido tras ensayo 9	34
Figura 34: Cromatograma obtenido tras ensayo 10	34
Figura 35: Cromatograma obtenido tras ensayo 11	34
Figura 36: Cromatograma obtenido tras ensayo 12	35
Figura 37: Cromatograma obtenido tras ensayo 13	35
Figura 38: Cromatograma obtenido tras ensayo 14	36
Figura 39: Optimización del gradiente de elución. Cromatograma obtenido tras ensayo 15	36
Figura 40: Cromatogramas obtenidos tras limpieza de la columna cromatográfica	37
Figura 41: Cromatograma de cera farmacéutica blanqueada obtenido tras extracción inicial	37
Figura 42: Equipos empleados en la extracción: Vacuum Manifold (izda.); TurboVap (dcha.)	38
Figura 43: Criterios de recuperación establecidos por AOAC (izda.) y Decisión 2002/657/CE (dcha.) .	43
Figura 44: Criterios de precisión en condiciones de repetibilidad (izda.) y reproducibilidad (dcha.) establecidos por AOAC	44
Figura 45: Separación de los compuestos con gradiente optimizado, a 210 nm	50
Figura 46: Cromatogramas de cera libre de impurezas (blanco) y cera contaminada artificialmente con los analitos de interés	53
Figura 47: Rango dinámico (izda.) y recta de regresión (dcha.) obtenidos para el clorfenvinfós	54
Figura 48: Rango dinámico (izda.) y recta de regresión (dcha.) obtenidos para el cumafós	55
Figura 49: Rango dinámico (izda.) y recta de regresión (dcha.) obtenidos para el bromopropilato	55
Figura 50: Rango dinámico (izda.) y recta de regresión (dcha.) obtenidos para el fluvalinato	55
Figura 51: Rango dinámico (izda.) y recta de regresión (dcha.) obtenidos para la flumetrina	55

ÍNDICE DE TABLAS

	<u>Páginas</u>
<i>Tabla 1:</i> Principales componentes de la cera de abejas (Bogdanov, 2004)	4
<i>Tabla 2:</i> Principales características sensoriales y fisico-químicas de la cera (Bogdanov, 2004)	4
<i>Tabla 3:</i> Gradiente de elución inicial	30
<i>Tabla 4:</i> Condiciones del gradiente de elución del ensayo 1	31
<i>Tabla 5:</i> Condiciones del gradiente de elución del ensayo 2	31
<i>Tabla 6:</i> Condiciones del gradiente de elución del ensayo 3	32
<i>Tabla 7:</i> Condiciones del gradiente de elución del ensayo 4	32
<i>Tabla 8:</i> Condiciones del gradiente de elución del ensayo 5	32
<i>Tabla 9:</i> Condiciones del gradiente de elución del ensayo 6	33
<i>Tabla 10:</i> Condiciones del gradiente de elución del ensayo 7	33
<i>Tabla 11:</i> Condiciones del gradiente de elución del ensayo 8	33
<i>Tabla 12:</i> Condiciones del gradiente de elución del ensayo 9	34
<i>Tabla 13:</i> Condiciones del gradiente de elución del ensayo 10	34
<i>Tabla 14:</i> Condiciones del gradiente de elución del ensayo 11	34
<i>Tabla 15:</i> Condiciones del gradiente de elución del ensayo 12	35
<i>Tabla 16:</i> Condiciones del gradiente de elución del ensayo 13	35
<i>Tabla 17:</i> Condiciones del gradiente de elución del ensayo 14	36
<i>Tabla 18:</i> Condiciones del gradiente de elución del ensayo 15	36
<i>Tabla 19:</i> Ensayos de extracción	39-41
<i>Tabla 20:</i> Factores modificados en el método de determinación de contaminantes abióticos en cera y magnitud de la modificación	45
<i>Tabla 21:</i> Combinaciones elaboradas para la configuración del estudio de robustez	45
<i>Tabla 22:</i> Descripción de las características del análisis para cada combinación	46
<i>Tabla 23:</i> Longitudes de onda óptimas de los diferentes compuestos (nm)	49
<i>Tabla 24:</i> Gradiente de elución optimizado	49
<i>Tabla 25:</i> Tiempos medios de retención de los compuestos	50
<i>Tabla 26:</i> Resultados de recuperación (%) de los ensayos de extracción	51
<i>Tabla 27:</i> Resumen del método analítico propuesto	52
<i>Tabla 28:</i> Tiempos medios de retención de los compuestos y coeficientes de variación (n=9)	53
<i>Tabla 29:</i> Rango dinámico y lineal en acetonitrilo	54
<i>Tabla 30:</i> Rango dinámico y lineal con efecto matriz	54
<i>Tabla 31:</i> Resultados del estudio de exactitud	56
<i>Tabla 32:</i> Recuperaciones medias obtenidas en el estudio de robustez, según el método de Youden	57
<i>Tabla 33:</i> Estudio de robustez. Aplicación de la prueba t	58

RESUMEN

La cera de abejas es un producto de la colmena que sirve para formar los panales donde las abejas depositan la miel, polen y cría, y también puede cumplir otros fines dentro de la industria alimentaria (E-901, aditivo alimentario), en industria farmacéutica y en cosmética.

Este producto apícola puede sufrir la contaminación de residuos químicos, principalmente debido a tratamientos sanitarios realizados en la colmena frente a la varroosis (principal enfermedad de las abejas), o por tratamientos fitosanitarios (aplicados frente a plagas en agricultura), con la subsiguiente contaminación de la miel y los demás productos apícolas que se hallan en contacto permanente con ella. De ahí surge la necesidad de implantar herramientas para el control de estos residuos por el riesgo para la salud humana que ello conlleva.

El principal objetivo de este trabajo ha sido contribuir con nuevas aportaciones en la determinación multiresiduo de acaricidas de síntesis en cera de abejas. Se ha procedido a la puesta a punto y validación de un método analítico para la determinación multiresiduo mediante SPE/HPLC-DAD de los principales acaricidas de síntesis que pueden contaminar la cera: fluvalinato, flumetrina, cumafós, bromopropilato y clorfenvinfós. Los acaricidas señalados fueron seleccionados de acuerdo a la bibliografía científica consultada a nivel mundial, a datos sobre contaminación de una empresa apícola aragonesa y a los datos aportados por el Departamento de Agricultura del Gobierno de Aragón.

Para poder alcanzar este objetivo, primeramente se optimizaron las condiciones cromatográficas por HPLC-DAD para el análisis multiresiduo de estos compuestos de interés, completándose el estudio con el compuesto 4,4'-Dibromobenzofenona, metabolito del bromopropilato, y con los compuestos clorpirifós y terbutilazina, que son utilizados en agricultura habitualmente como insecticidas y herbicidas, indistintamente.

Abordando los acaricidas de síntesis: fluvalinato, flumetrina, cumafós, bromopropilato y clorfenvinfós, se procedió con ellos a la optimización de la técnica de extracción y purificación (SPE).

Finalmente, se llevó a cabo la validación de la metodología analítica optimizada para estos compuestos mediante el estudio de especificidad, sensibilidad, exactitud (recuperación y precisión) y robustez.

El límite de detección para los distintos analitos varió entre 150-375 ng/g de cera y las recuperaciones presentaron valores comprendidos entre 83,3-94,5%. La desviación estándar relativa de la repetibilidad del método fue inferior al 5% y la de la reproducibilidad, inferior al 11,3%.

Los resultados de especificidad, sensibilidad, exactitud y robustez obtenidos, demuestran que la metodología analítica optimizada es capaz de proporcionar resultados satisfactorios en el análisis rutinario del conjunto de acaricidas estudiados en cera de abejas, cumpliendo los criterios establecidos por la Decisión 2002/657/CE.



1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, además de la miel como alimento, se tienen en cuenta otros productos de la colmena de gran interés, como la cera.

La cera es el material que utilizan las abejas para fabricar los panales de la colmena y depositar allí la miel, el polen y la cría. Sus usos son muy diversos, farmacéuticos, cosméticos, médicos e industriales, y en alimentación se emplea como aditivo (E-901) en frutas, dulces, etc.

En el ámbito sanitario apícola, frente a la varroosis, enfermedad parasitaria de las abejas, el uso no controlado de acaricidas químicos de síntesis, implica la presencia de residuos en los productos de la colmena. A esto hay que sumar la posible contaminación de la colmena por tratamientos fitosanitarios.

La acumulación de residuos químicos en la cera puede alterar la población de la colmena siendo una de las causas del llamado síndrome de despoblamiento. Este hecho se agrava a medida que transcurre el tiempo, a través del proceso de reciclado y reutilización de la misma, y al fenómeno de acumulación que tiene lugar. Además, la miel y los demás productos apícolas, estando en contacto permanente con la cera, pueden contaminarse a través de ella suponiendo un riesgo para la salud de los consumidores.

Todo esto hace necesario e importante implantar herramientas para el control de estos residuos, tanto en la miel como en otros productos apícolas como la cera, por el riesgo para la salud humana que ello conlleva.

Teniendo en cuenta la problemática anteriormente mencionada, en el presente trabajo se ha puesto a punto y validado un método de análisis multiresiduo para la detección y cuantificación de residuos de acaricidas de síntesis y productos fitosanitarios en cera de abejas.

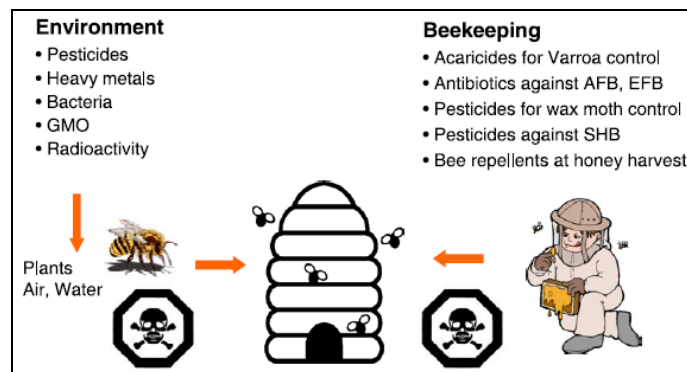


Figura 1. Contaminantes en productos de la colmena (Bogdanov, 2006).

1.1. La cera de abejas

1.1.1. Características de la cera

La cera de abeja es un producto natural segregado por cuatro pares de glándulas cereras ubicadas desde el cuarto al séptimo esternito en el lado ventral del abdomen de las abejas obreras y se biosintetiza a partir de los azúcares de su alimentación (fructosa, glucosa y sacarosa). Las actividades de producción de cera y construcción de los panales dependen de distintos factores tales como el flujo de néctar (cuanto mayor es la cantidad de néctar, más celdillas se necesitan para su almacenamiento), la puesta de huevos (a mayor puesta, más celdas de cría son necesarias), la presencia de la reina (sólo colmenas con reinas producen cera), o la temperatura (una temperatura superior a 15°C favorece la producción de cera junto con la presencia de polen como fuente proteica) (Bogdanov, 2004).

La cera que producen las abejas se segrega a modo de escamas de cera virgen de color blanco y 1mg de peso. Posteriormente, estas escamas adquieren un color amarillo gracias a los flavonoides del polen (Bogdanov, 2004).

La cera es un material complejo que contiene más de 300 sustancias diferentes (Tulloch, 1980). Consiste principalmente en ésteres de ácidos grasos de cadena larga. Además, la cera contiene hidrocarburos, ácidos, alcoholes y otras sustancias. La cera producida por las diferentes especies de *Apis mellifera* tiene la misma composición, pero difiere en la proporción de algunos componentes (Bogdanov, 2004).

La composición de la cera de la abeja *Apis mellifera* según Bogdanov (2004) queda reflejada en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Principales componentes de la cera de abejas (Bogdanov, 2004).

Componente	Cantidad g/100g	Número de componentes	
		Principales	Secundarios
Monoesteres	35	10	10
Diesteres	14	6	24
Triesteres	3	5	20
OH-monoesteres	4	6	20
OH-poliesteres	8	5	20
Esteres ácidos	1	7	20
Poliesteres ácidos	6	5	20
Total esterres	67	44	134
Hidrocarburos	14	10	66
Ácidos libres	12	8	10
Alcoholes libres	1	5	?
Otros	6	7	?
Total	100	74	Al menos 210

La cera de abejas es un producto natural y los aditivos no están permitidos. El examen de sus características sensoriales y fisico-químicas permite comprobar su calidad de forma simple y rápida. En la **Tabla 2** se detallan dichas características.

Tabla 2. Principales características sensoriales y fisico-químicas de la cera (Bogdanov, 2004).

PARÁMETROS	REQUERIMIENTOS
Color	De amarillo a amarillo-marrón
Olor	Como el de la miel
Consistencia	No se debe adherir al corte
Índice de refracción (75°C)	1440-1445
Punto de fusión	61-65°C
Densidad	0,950-0,965
Acidez	18-23
Número de esterificación	70-80
Número de Peróxidos	Al menos 8
Autenticidad	No adulteraciones
Contaminación	Lo más baja posible; según recomendaciones

1.1.2. Legislación aplicable a la cera

El Real Decreto 142/2002, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización, permite el uso de la cera de abejas como agente de recubrimiento para determinados alimentos, siempre y cuando no se supere el nivel máximo establecido. Así, la cera de abejas, blanca y amarilla (E-901), está autorizada, como agente de recubrimiento, para granos de café, goma de mascar, bollería fina (sólo recubrimientos de chocolate), pastelería, repostería y galletería (sólo recubrimientos de chocolate), productos de aperitivo (sólo frutos secos), frutas frescas (sólo cítricos, melones, manzanas, peras, melocotones y piñas), sin dosis máxima establecida (quantum satis).

Por otra parte, el Codex Alimentarius establece una clasificación de usos de la cera en la alimentación (**Figura 2**).

Categoría de alimentos	Nivel máximo
Aperitivos listos para el consumo	BPF
Bebidas a base de agua aromatizadas, incluidas las bebidas para deportistas, bebidas energéticas o bebidas electrolíticas y bebidas con partículas añadidas	200 mg/kg
Café, sucedáneos del café, té, infusiones de hierbas y otras bebidas calientes a base de cereales y granos, excluido el cacao	BPF
Complementos alimenticios	BPF
Decoraciones (p. ej., para productos de pastelería fina), revestimientos (que no sean de fruta) y salsas dulces	BPF
Dulces, incluidos los caramelos duros y blandos, los turrone, etc., distintos de los indicados en las categorías de alimentos 05.1, 05.3 y 05.4	BPF
Frutas frescas tratadas en la superficie	BPF
Goma de mascar	BPF
Hortalizas (incluidos hongos y setas, raíces y tubérculos, legumbres y leguminosas y áloe vera), algas marinas y nueces y semillas frescas tratadas en la superficie	BPF
Productos de cacao y chocolate	BPF
Productos de imitación y sucedáneos del chocolate	BPF
Productos de panadería fina (dulces, salados, aromatizados) y mezclas	BPF

Figura 2. Usos de la cera de abeja como aditivo (Codex Alimentarius, 2011).

El Real Decreto 1466/2009, por el que se establecen las normas de identidad y pureza de los aditivos alimentarios distintos de colorantes y edulcorantes utilizados en productos alimenticios, establece las características que debe cumplir la cera de abejas utilizada como aditivo alimentario (**Figura 3**).

E 901 CERA DE ABEJAS	
Sinónimos	Cera blanca, cera amarilla
Definición	La cera de abejas amarilla es la que se obtiene fundiendo las paredes de los panales fabricados por la abeja melífera <i>Apis mellifera</i> L. con agua caliente y quitando los agentes foráneos. La cera de abejas blanca se obtiene blanqueando la cera de abejas amarilla.
Einecs	232-383-7 (cera de abejas)
Descripción	Trozos o láminas de grano fino y de fractura no cristalina, de color blanco amarillento (tipo blanco) o entre amarillento y marrón grisáceo (tipo amarillo), con un olor agradable a miel
Identificación	
A. Intervalo de fusión	Entre 62 °C y 65 °C
B. Peso específico	Aproximadamente 0,96
C. Solubilidad	Insoluble en agua Escasamente soluble en alcohol Muy soluble en clorofórmio y éter
Pureza	
Índice de acidez	No menos de 17 ni más de 24
Índice de saponificación	87-104
Índice de peróxido	No más de 5
Glicerol y otros polioles	No más del 0,5 % (expresado en glicerol)
Ceresina, parafinas y algunas otras ceras	Ausentes
Grasas, cera del Japón, colofonia y jabones	Ausentes
Arsénico	No más de 3 mg/kg
Plomo	No más de 2 mg/kg
Mercurio	No más de 1 mg/kg

Figura 3. Características de identidad y pureza de la cera de abeja como aditivo alimentario (Real Decreto 1466/2009).

1.2. Enfermedades parasitarias: Varroosis

Entre las enfermedades de origen biótico que afectan a las abejas, la varroosis es una de las más importantes y de mayor incidencia sanitaria y económica, siendo considerada como la enfermedad parasitaria principal.

En cuanto a su etiología en un principio se aceptó que *Varroa jacobsoni* Oud. infestaba a la abeja *Apis cerana* F. en Malasia e Indonesia, pero hoy en día se reconoce a *Varroa destructor* Anderson y Trueman como causa de la varroosis tanto en la abeja *Apis mellifera* L. (a nivel mundial) como en *Apis cerana* (en particular, en el continente asiático). El ácaro es un artrópodo ectoparásito que succiona la hemolinfa del hospedador, tanto de la cría operculada como de la abeja adulta. Hay dos tipos de daños que causa este parásito: uno directo y otro indirecto. El daño directo lo causa sobre la cría de las abejas, de cuya hemolinfa se alimentarán tanto la varroa progenitora como su descendencia, causando malformaciones durante el desarrollo y generando abejas de menor tamaño, cuerpo deforme y alas atróficas. Estas malformaciones invalidan a las abejas para el normal desarrollo de sus funciones en la colonia, por lo que acaban por ser eliminadas. El daño indirecto se genera al succionar la hemolinfa de sus hospedadores, lo que favorece la transmisión de enfermedades, especialmente de cuadros víricos (Ritter, 2001; Rosenkranz *et al.*, 2010). Probablemente estos virus pueden ser los responsables últimos de gran parte de las pérdidas atribuidas al parásito.

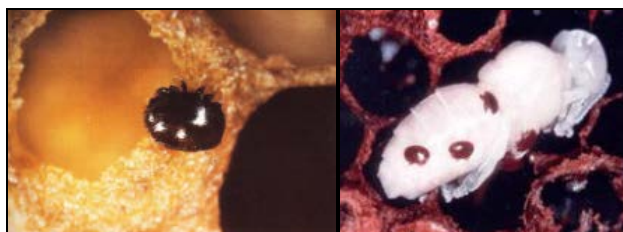


Figura 4. *Varroa* sobre panal de colmena afectada y sobre pupa de obrera.

El nivel de infestación de ácaros de varroa que causa daños en la colonia ha decrecido en el tiempo. En la década de 1980, en Europa, una colonia podía tener miles de ácaros sin síntomas dramáticos (Boecking y Genersch, 2008). Sin embargo, actualmente, una tasa de infección del 10% es crítica para la supervivencia de la colonia en invierno (Siede *et al.*, 2008).

El Real Decreto 608/2006 (modificado por Orden APA/735/2008) establece un programa nacional de lucha y control de las enfermedades de las abejas de la miel. En su artículo 6, señala la obligación anual de realizar un tratamiento frente a varroa, en el período septiembre-noviembre. Este tratamiento se llevará a cabo con un medicamento veterinario bajo la supervisión del veterinario de la explotación o, en su caso, del veterinario autorizado o habilitado. En caso necesario, se podrá realizar un nuevo tratamiento en otras épocas diferentes a las establecidas en el anexo II, en cuyo caso deberá efectuarse con las mismas pautas indicadas en el tratamiento obligatorio y previa notificación por parte del apicultor.

El Real Decreto 617/2007 (y posteriores modificaciones) establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y regula su notificación. La varroosis se incluye como enfermedad de declaración semestral.

Para la lucha frente al parásito *Varroa destructor* se aplican diversos compuestos de diferente naturaleza química, tal como se explica en los siguientes apartados.

1.3. Tratamientos sanitarios en Apicultura. Acaricidas de síntesis

Son muchos los productos autorizados en apicultura, para luchar contra la varroa, en los distintos países de la Unión Europea. En general, estos productos pueden ser acaricidas naturales o sintéticos. En el presente trabajo se ha trabajado únicamente con acaricidas de síntesis, por lo que, a continuación, se ha incluido una descripción de los mismos.

Los acaricidas de síntesis utilizados en el control de la varroosis son, principalmente, bromopropilato, amitraz, cumafós, fluvalinato y flumetrina (Wallner, 1999). Las vías de aplicación son pulverización, tiras plásticas situadas entre los cuadros de la cámara de cría que irrigan el acaricida sobre las abejas, o nebulización térmica.

Concretamente, en el presente trabajo se han incluido los siguientes acaricidas de síntesis:

- ✓ Fluvalinato
- ✓ Flumetrina
- ✓ Cumafós
- ✓ Bromopropilato y su metabolito 4,4'-Dibromobenzofenona

Los acaricidas de síntesis son mayoritariamente apolares, no volátiles, solubles en grasa y estables, excepto cimiazol (no incluido en el presente trabajo por ser soluble en agua) y amitraz (no incluido en el presente trabajo por ser altamente inestable). Flumetrina y fluvalinato tienen mayor tendencia a acumularse en la cera, en comparación a bromopropilato y cumafós, por su mayor carácter lipofílico.

En cuanto a los límites máximos de residuos de los acaricidas estudiados, cabe destacar que no hay establecido en la UE ningún LMR para estos acaricidas en cera. Por otra parte, sí se han establecido LMRs para algunos acaricidas en miel (amitraz, cumafós, bromopropilato y clorfenvinfós).

Mientras que los niveles de acaricidas encontrados en la miel están generalmente por debajo de los LMRs establecidos, en la cera los residuos tienden a acumularse (Bogdanov, 2006).

La acumulación de residuos en la cera está correlacionada con la cantidad de ingrediente usado y el número de aplicaciones realizadas a lo largo del año (Wallner, 1999). Además, esta acumulación depende de otros factores: uso de los acaricidas en condiciones adecuadas, la estación, el método de extracción usado, la polaridad y la estabilidad de estas sustancias.

Las estructuras químicas y principales características de los acaricidas de síntesis estudiados en el presente trabajo se especifican a continuación.

1.3.1. Fluvalinato

El fluvalinato ha sido uno de los tratamientos más utilizados desde la entrada de la varroa en nuestro país. Sin embargo, empezaron a aparecer problemas en las colmenas tratadas con este principio activo, los apicultores detectaron que tras su aplicación seguían con porcentajes altos de ácaros en sus colmenas, lo que llevó a la necesidad de plantearse un estudio sobre la sensibilidad real de *Varroa* al fluvalinato.

El plaguicida se ha utilizado tradicionalmente en cultivos de vegetales y plantas ornamentales. Está registrado para un solo alimento (colmenas-miel) y para usos no alimentarios, incluyendo plantas ornamentales (EPA, 2010).

El fluvalinato es un acaricida piretroide, apolar, no volátil, soluble en grasa y estable. Se acumula en la cera de abejas a lo largo del tiempo y, debido a su estabilidad, no se descompone (Lodesani *et al.*, 2007). Las principales marcas comerciales son Klartan® y Mavrik® (soluciones de goteo) y Apistan® (tiras).

La estructura química del fluvalinato se muestra en la **Figura 5**.

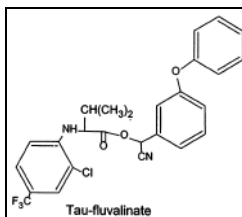


Figura 5. Estructura química del acaricida fluvalinato (Korta et al., 2001).

En relación a la toxicidad del piretroide fluvalinato, no hay ninguna evidencia de que este tipo de compuestos afecten a la capacidad de reproducción en seres humanos, si bien algunos estudios en animales han demostrado una reducción de la fertilidad en machos y hembras (ATSDR, 2003). La DL₅₀ del fluvalinato es de 100-300mg/kg de peso corporal tanto en ratón como en rata (EMEA, 1995).

La Agencia Europea de Evaluación de Medicamentos ha establecido una Ingesta Diaria Admisible (IDA) de 500ng/kg peso corporal para el fluvalinato (EMEA, 2001).

En el Reglamento (UE) N° 37/2010, relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal, encontramos que no se exige LMR para tau-fluvalinato en los productos apícolas.

1.3.2. Flumetrina

La utilización masiva y persistente de los acaricidas de síntesis como amitraz y fluvalinato ha dado lugar a la aparición de resistencias de los ácaros frente a ellos y, por tanto, a una pérdida de eficacia de estos principios activos, además del problema de residuos derivados de su utilización. Todo ello justifica la autorización de nuevos productos para el control de la varroosis, como es el caso de Bayvarol® (flumetrina).

La flumetrina es un piretroide similar al fluvalinato, apolar, no volátil, soluble en grasa y estable. Se utiliza como ectoacaricida en animales de abasto, en perros y caballos. En apicultura, se utiliza como varroacida. Su estructura química se incluye en la **Figura 6**.

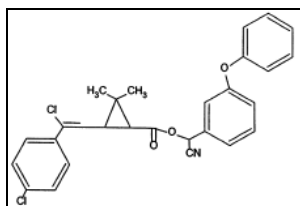


Figura 6 Estructura química del acaricida flumetrina (Korta et al., 2001).

La toxicidad del piretroide flumetrina puede considerarse similar a la del fluvalinato, debido a la similitud de sus estructuras químicas. La Agencia Europea para la Evaluación de los Medicamentos (EMEA), considera a la flumetrina como compuesto no genotóxico, ni potencialmente cancerígeno para los humanos, pero peligroso para la fauna acuícola y fetotóxico en ratas. Además, la Organización Mundial de la Salud (OMS) no incluye la flumetrina en la categoría de sustancias con toxicidad aguda.

La FAO ha establecido una Ingesta Diaria Admisible (IDA) para el hombre de 1,8µg flumetrina/kg peso vivo (EMEA, 2000).

En el Reglamento (UE) N° 37/2010, relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal, encontramos que no se exige LMR para flumetrina en los productos apícolas.

1.3.3. Cumafós

El cumafós pertenece a la familia de los organofosforados. Es apolar, no volátil, soluble en grasa y estable. Se emplea como acaricida e insecticida, siendo sus productos comerciales, Perizin® (goteo), ChekMite® (tiras) y Asuntol® (utilizado en ocasiones a pesar de estar prohibido su uso en apicultura).

La estructura química del cumafós se incluye en la **Figura 7**.

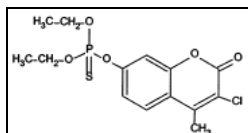


Figura 7. Estructura química del acaricida cumafós (Korta et al., 2001).

Bajo el punto de vista toxicológico, el cumafós es un acaricida organofosforado que podría provocar una inhibición de la colinesterasa. La dosis letal 50 (DL₅₀) es de 113mg/kg de peso corporal en ratón macho y 28mg/kg de peso corporal en ratón hembra (EMEA, 2001).

La Agencia Europea de Evaluación de Medicamentos ha establecido una IDA de 250ng/kg peso corporal para el cumafós (EMEA, 2001).

En el Reglamento (UE) N° 37/2010, relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal, encontramos que se ha establecido LMR para cumafós en miel de 100µg/kg. No se exige LMR para cumafós en los demás productos apícolas.

En la **Figura 8** se ha incluido una propuesta de LMR para el cumafós en cera de abejas, publicada el 26 de Febrero de 2008 en la Health Canada's Pest Management Regulatory Agency (PMRA). A nivel europeo no existe un LMR para cumafós en cera de abejas.

Common Name	Residue Definition	Proposed MRL (ppm)	Food Commodity
Coumaphos	<i>O</i> -(3-chloro-4-methyl-2-oxo-2 <i>H</i> -1-benzopyran-7-yl) <i>O,O</i> -diethyl phosphorothioate, including the oxygen analog <i>O</i> -(3-chloro-4-methyl-2-oxo-2 <i>H</i> -1-benzopyran-7-yl) <i>O,O</i> -diethyl phosphate	1.0	Beeswax

Figura 8. Límite Máximo de Residuos propuesto para el cumafós en cera (Pest Management Regulatory Agency, Canadá, 2008).

Actualmente, el cumafós no está autorizado en la Unión Europea (Reg. (CE) N° 1107/2009; EU Pesticide database; DG SANCO, 2008).

1.3.4. Bromopropilato y 4,4'-Dibromobenzofenona

El bromopropilato es un acaricida perteneciente a la familia de los benzilatos. Es apolar, no volátil, soluble en grasa y estable. El producto comercial de bromopropilato es el Folbex VA Neu®. Su aplicación se realiza mediante combustión de tiras fumígenas en el interior de la colmena.

Durante la combustión del bromopropilato se forma el metabolito 4,4-dibromobenzofenona (BBP), también apolar, no volátil, soluble en grasa y estable. Ampliamente utilizado en viñas y frutales, la problemática surgida por los residuos asociados a este acaricida hace que en muchos países este producto ya no se aplique en apicultura.

Las estructuras químicas del bromopropilato y de la BBP se incluyen en la **Figura 9**.

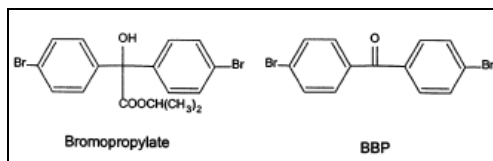


Figura 9. Estructura química del acaricida bromopropilato y de su metabolito 4,4'-dibromobenzofenona (Korta et al., 2001).

El perfil toxicológico del bromopropilato fue evaluado por el JMPR en 1973 y 1993. A raíz del último estudio se estableció una IDA de 0,03mg/kg peso corporal para bromopropilato (WHO, 2009). No existe IDA para 4,4'-dibromobenzofenona.

En la **Figura 10** puede observarse que, según el Reglamento (UE) n° 310/2011 de la Comisión de 28 de marzo de 2011 que modifica los anexos II y III del Reglamento (CE) n° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de aldicarb, bromopropilato, clorfenvinfós, endosulfán, EPTC, etión, fentiión, fomesafeno, metabenzotiazurón, metidatiión, simacina, tetradifón y triforina en determinados productos, el límite máximo de residuos de bromopropilato en miel (jalea real y polen) es de 100µg/Kg. A nivel europeo no existe un LMR para bromopropilato en cera de abejas.

Código n°	Grupos y tipos de productos individuales a los que se aplican los contenidos máximos de residuos a) (*)	Aldicarb (suma de aldicarb, su sulfóxido y su sulfona expresados como aldicarb)	Bromopropilato (L)
1040000	(iv) Miel (jalea real y polen)	0,01 (*)	0,01 (*)

Figura 10. Límite Máximo de Residuos de bromopropilato en miel, jalea real y polen (Reglamento n° 310/2011).

Actualmente, el bromopropilato no está autorizado en la Unión Europea (Reg. (CE) N° 1107/2009; EU Pesticide database; DG SANCO, 2008).

1.4. Tratamientos fitosanitarios

Existen productos fitosanitarios que, aunque no se usan directamente en apicultura, pueden contaminar la cera de abejas. En el presente trabajo se han incluido el clorfenvinfós, la terbutilazina y el clorpirifós, productos fitosanitarios de uso en frutales, hortalizas y cereales.

1.4.1. Clorfenvinfós

El clorfenvinfós es uno de los compuestos más peligrosos y frecuentemente encontrados en los análisis de residuos en todo tipo de ceras de abeja. Su uso está exclusivamente indicado para tratamientos frente a garrapatas, pulgas y piojos en perros de compañía, y se comercializa como Birlane®.

Su uso no está autorizado en abejas y tampoco en otros animales como ovejas, vacas, cabras o cerdos, que en algún momento irán al matadero para consumo humano, debido al alto poder residual y toxicidad de este compuesto para el ser humano. Se utiliza ilegalmente en apicultura (contra *Varroa*) en España debido a su mayor potencia acaricida, unas 50 veces superior a la del cumafós (Milani *et al.*, 2009). Como insecticida se utiliza principalmente en agricultura para el tratamiento de frutales, hortalizas, cereales, azúcar y semillas. También se ha utilizado como insecticida para combatir mosquitos palúdicos.

El clorfenvinfós pertenece a la familia de los organofosforados, es liposoluble y presenta la estructura química que se incluye en la **Figura 11**.

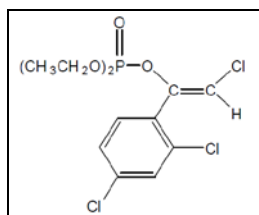


Figura 11. Estructura química del insecticida clorfenvinfós (Korta *et al.*, 2001).

Esta clase de pesticidas organofosforados deben su toxicidad, principalmente, a la capacidad de interferir en la transmisión de impulsos nerviosos por inhibición de la acetilcolinesterasa, provocando la parálisis y, consecuentemente, la muerte.

El comité JMPR estableció una IDA de 0,0005 mg/kg de peso corporal tras un estudio de toxicidad en ratas (WHO, 2009). No se ha demostrado que presente efectos cancerígenos.

Según el Reglamento (UE) n° 310/2011 de la Comisión de 28 de marzo de 2011 que modifica los anexos II y III del Reglamento (CE) n° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de aldicarb, bromopropilato, clorfenvinfós, endosulfán, EPTC, etión, fentiión, fomesafeno, metabenzotiazurón, metidatiión, simacina, tetradifón y triforina en determinados productos, el límite máximo de residuos de clorfenvinfós en miel (jalea real y polen) es de 100µg/Kg. A nivel europeo no existe un LMR para clorfenvinfós en cera de abejas.

Actualmente, el clorfenvinfós no está autorizado en la Unión Europea (Reg. (CE) N° 1107/2009; EU Pesticide database; DG SANCO, 2008).

1.4.2. Clorpirifós

El clorpirifós es un insecticida organofosforado, cristalino y liposoluble, que inhibe la acetilcolinesterasa. Su estructura química se incluye en la **Figura 12**.

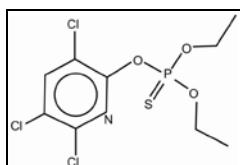


Figura 12. Estructura química del clorpirifós.

El clorpirifós se ha usado ampliamente en viviendas y en agricultura para controlar las plagas de insectos (**Figura 13**). En el hogar, se usa para controlar cucarachas, pulgas, y termitas; también se usa en ciertos collares de animales domésticos para controlar pulgas y garrapatas. En agricultura, se usa para controlar garrapatas en ganado y en forma de rocío para el control de plagas de cosechas. Se le conoce por muchos nombres comerciales (**Figura 14**).

Cultivo/Especie:	Plaga/Efecto:		
(1) Alcachofa	ORUGAS	(19) Maíz	ROSQUILLA NEGRA
(2) Alfalfa	ORUGAS	(20) Maíz	TALADRO
(3) Algodonero	ORUGAS	(21) Palmáceas ornamentales	TALADROS
(4) Cebolla	ORUGAS	(22) Patata	ESCARABAJOS
(5) Cereales	ZABRO	(23) Patata	POLLILLA
(6) Cítricos	COCHINILLAS	(24) Platanera	COCHINILLAS
(7) Cítricos	MOSCA BLANCA	(25) Platanera	LAPILLAS
(8) Cítricos	PRAYS	(26) Platanera	MOSCA BLANCA
(9) Cítricos	PULGONES	(27) Platanera	ORUGAS
(10) Coles de china	ORUGAS	(28) Platanera	PICUDO DE LA PLATANERA
(11) Eriales	ORTOPTEROS	(29) Platanera	TRIPS
(12) Frambueso	ORUGAS	(30) Rábano	ORUGAS
(13) Frambueso	ROSQUILLA NEGRA	(31) Remolacha azucarera	CASIDA
(14) Fresales	ORUGAS	(32) Remolacha azucarera	ORUGAS
(15) Fresales	ROSQUILLA NEGRA	(33) Repollo	ORUGAS
(16) Grosellero	ORUGAS	(34) Solanáceas	HELIOTIS
(17) Grosellero	ROSQUILLA NEGRA	(35) Solanáceas	ORUGAS
(18) Maíz	HELIOTIS	(36) Solanáceas	ROSQUILLA NEGRA
		(37) Vid	ALTICA
		(38) Vid	CASTAÑETA
		(39) Vid	GORGUJOS
		(40) Vid	GUSANOS GRISES

Figura 13. Registro de productos fitosanitarios: usos autorizados del clorpirifós (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio ambiente).

Nombre	Formulado
DURSBAN-48	CLORPIRIFOS 48% [EC] P/V
PYRINEX 48 EC	CLORPIRIFOS 48% [EC] P/V
DANFITO	CLORPIRIFOS 48% [EC] P/V
FOSTAN	CLORPIRIFOS 48% [EC] P/V
CHOKE	CLORPIRIFOS 48% [EC] P/V
LUQPIRIFOS	CLORPIRIFOS 48% [EC] P/V
PANDA 48 LE	CLORPIRIFOS 48% [EC] P/V
CLOSAR LE	CLORPIRIFOS 48% [EC] P/V
GUFOS	CLORPIRIFOS 48% [EC] P/V
CLORIFOS 48 EC	CLORPIRIFOS 48% [EC] P/V
SENATOR 48	CLORPIRIFOS 48% [EC] P/V
PIRITEC	CLORPIRIFOS 48% [EC] P/V

Figura 14. Registro de productos fitosanitarios: algunas marcas comerciales de clorpirifós (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio ambiente).

Desde el punto de vista toxicológico, cabe destacar que el clorpirifós es moderadamente tóxico y la exposición crónica se ha relacionado con efectos neurológicos, trastornos del desarrollo y trastornos autoinmunes. El comité JMPR estableció, en 2004, una IDA de 0,01 mg/kg de peso corporal (WHO, 2009).

Actualmente, el clorpirifós está autorizado en la Unión Europea, no existiendo un LMR para ningún producto apícola (Reg. (CE) N° 1107/2009; EU Pesticide database; DG SANCO, 2008).

1.4.3. Terbutilazina

La terbutilazina es un herbicida selectivo liposoluble, químicamente perteneciente al grupo de las clorotriazinas. Su estructura química puede observarse en la **Figura 15**.

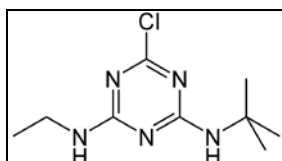


Figura 15. Estructura química de la terbutilazina.

La terbutilazina se usa en el tratamiento de preemergencia y postemergencia de una gran variedad de cultivos agrícolas, así como en la silvicultura (**Figura 16**). Se le conoce por muchos nombres comerciales (**Figura 17**).

<i>Cultivo/Especie:</i>	<i>Plaga/Efecto:</i>
(1) Cítricos	MALAS HIERBAS ANUALES
(2) Frutales de pepita	MALAS HIERBAS ANUALES
(3) Maíz	MALAS HIERBAS ANUALES
(4) Olivo	MALAS HIERBAS ANUALES
(5) Areas no cultivadas	MALAS HIERBAS ANUALES
(6) Vid	MALAS HIERBAS ANUALES

Figura 16. Registro de productos fitosanitarios: usos autorizados de terbutilazina (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio ambiente).

<i>Nombre</i>	<i>Formulado</i>
CUÑA	TERBUTILAZINA 50% [SC] P/V
TRALLA 50	TERBUTILAZINA 50% [SC] P/V
PASADENA	TERBUTILAZINA 50% [SC] P/V
TERBUTAN	TERBUTILAZINA 50% [SC] P/V
HERTURINA PRO 50 SC	TERBUTILAZINA 50% [SC] P/V
CILOTOR FLOW	TERBUTILAZINA 50% [SC] P/V
MEDINA	TERBUTILAZINA 50% [SC] P/V

Figura 17. Registro de productos fitosanitarios: algunas marcas comerciales de terbutilazina (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio ambiente).

Desde el punto de vista toxicológico, cabe destacar que no hay pruebas de que la terbutilazina sea cancerígena o mutágena. En estudios a largo plazo de alimentación en ratas, se observaron efectos sobre los parámetros eritrocíticos en las hembras, un aumento de la incidencia de lesiones no neoplásicas en el hígado, los pulmones, la glándula tiroidea y los testículos, así como una ligera ralentización del aumento de peso corporal. La EFSA estableció, en 2011, una IDA de 0,04 mg/kg de peso corporal-día (WHO, 2011).

Actualmente, la terbutilazina está autorizada en la Unión Europea, no existiendo un LMR para ningún producto de la colmena (Reg. (CE) N° 1107/2009; EU Pesticide database; DG SANCO, 2008).

1.5. Problemática de la presencia de residuos de contaminantes abióticos en la cera de abejas

La contaminación de la cera con residuos de productos químicos (acaricidas de síntesis y/o otros productos fitosanitarios) representa un problema muy común en el ámbito de la apicultura, a nivel mundial.

En España, en la cera se detectan principalmente residuos de tau-fluvalinato (26,5%) y clorfenvinfós (88,5%) (Orantes-Bermejo, 2008). La situación en España es similar a la descrita en otros países (Bernal *et al.*, 2010).

Como ejemplos, en EEUU, Frazier *et al.* (2008) encontraron altos niveles de acaricidas en la cera (100% tau fluvalinato y cumafós). Bogdanov (2006) encontró niveles de contaminación entre 0,5-2 mg/kg en cera de Suiza y Alemania, los acaricidas encontrados con mayor frecuencia en orden decreciente fueron cumafós, bromopropilato y tau-fluvalinato. En Francia, la cera suele estar contaminada con tau-fluvalinato (61,9%), cumafós (52,2%) y endosulfan (23,4%) (Chauzat, 2007). En Italia, el cumafós está presente en el 90,9% de las muestras de cera y clorfenvinfós en 51,5 % (Persano *et al.*, 2003).

La cera contaminada supone un riesgo potencial para la salud humana, por diferentes razones. Por un lado, puede ser una fuente de contaminación para la miel y, por tanto, representar un riesgo para la salud pública. Diversos estudios afirman que existe difusión de acaricidas lipofílicos de la cera a la miel (Wallner, 1992; Kochansky *et al.*, 2001). Además, la estabilidad de los acaricidas lipofílicos hace que no se degraden durante el tratamiento térmico que sufre la cera en su reciclado, lo que posibilita su difusión desde la cera a la miel (Bogdanov *et al.*, 1997).

Por otro lado, la cera es ampliamente usada en la industria alimentaria como agente de recubrimiento en productos de panadería, dulces, chicles y frutas frescas y congeladas, utilizándose además con fines farmacéuticos y cosméticos (Adamczyk *et al.*, 2010).

A parte del riesgo para la salud humana, también es importante el peligro de envenenamiento de las propias abejas. De hecho, abejas criadas en colmenas con cera contaminada no alcanzan el mismo peso que abejas con desarrollos normales, se produce menor cantidad de miel y se observa una mayor mortalidad (Rinderer *et al.*, 1999; Fell y Tignor, 2001).

Además de la contaminación directa a través de los tratamientos frente a *Varroa*, también puede producirse una contaminación indirecta por el uso de productos fitosanitarios en agricultura. Los pesticidas empleados pueden contaminar el suelo, el agua y las flores con las que las abejas entran en contacto, agravando el problema.

La situación se complica, aún más, por el desarrollo de resistencias de los ácaros a los diferentes tratamientos. En respuesta a este problema, los apicultores usan productos que no están autorizados, con frecuencia en cantidades excesivas (Martel *et al.*, 2007; Chauzat *et al.*, 2009).

En cuanto a la normativa legal Europea aplicable a estos compuestos, el Reglamento (CE) 37/2010 (relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal) no establece límites máximos en cera de abejas (sí en miel para algunos compuestos).

Este hecho constituye un problema añadido por el vacío legal existente, al ser utilizada la cera en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética.

Aunque la cera de abejas no está reglamentada en la Unión Europea, sí lo está en otros países como Estados Unidos, Canadá o Nueva Zelanda, que tienen normativas propias. Así, en EE.UU. se ha establecido para el fluvalinato en cera un LMR=6 µg/g, mientras que en Canadá se ha propuesto para el cumafós un LMR=1 µg/g, y en Nueva Zelanda LMR=1 µg/g para flumetrina.

Por último, cabe destacar que, actualmente, el uso de cumafós, bromopropilato y clorfenvinfós no está autorizado en la UE.

1.6. Métodos analíticos para la determinación de residuos de contaminantes abióticos en cera

A continuación se describe sucintamente la metodología analítica para la determinación de residuos de contaminantes abióticos (acaricidas de síntesis y productos fitosanitarios) en cera de abejas. Se ha hecho hincapié en las técnicas empleadas en el presente trabajo.

En general, las muestras a analizar son muy complejas, por lo que el análisis no se puede realizar en una sola etapa, siendo necesario efectuar varios pasos antes de llegar a la identificación y cuantificación del analito. El procedimiento de análisis de residuos de contaminantes abióticos en una muestra determinada, se puede dividir en las siguientes etapas:

1. Acondicionamiento de la muestra
2. Extracción de los analitos
3. Purificación del extracto
4. Determinación: identificación y cuantificación de los analitos
5. Confirmación

1.6.1. Acondicionamiento de la muestra

Aunque se observan algunas diferencias entre autores en cuanto al acondicionamiento de las muestras, en general se hace necesario retirar las partes de la muestra que no forman parte de la matriz: restos de cera, insectos y otras impurezas (en el caso de análisis de miel), o restos de miel e impurezas (en el caso de análisis de cera). A continuación, se limpia la muestra (filtrado por decantación en el caso de la miel; lavado con agua, filtrado y secado en estufa en el caso de la cera), se pesa y se somete a un procedimiento de preparación (disolución de miel en un solvente polar; disolución de cera en un solvente orgánico apolar, calentamiento y centrifugación) con el fin de favorecer las fases posteriores del análisis.

Para la determinación de residuos en miel, se pueden observar diferencias entre los autores en cuanto a la preparación de la muestra. Unos separan la miel de la cera mediante presión, mientras que otros la separan con un filtro o colador. En cera, se emplea a veces el calentamiento de la cera con agua para eliminar las impurezas, la separación de la muestra de cera de la miel por un filtro o colador, el lavado con agua o la compresión.

1.6.2. Extracción de los analitos

Se trata de combinar la máxima eficacia en la extracción de los analitos con la mínima coextracción de cualquier otro compuesto de la matriz que pueda interferir en la posterior determinación cromatográfica. Las principales técnicas de extracción utilizadas son las siguientes:

- Extracción en fase sólida (SPE)
- Extracción con solventes orgánicos
- Dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD)

Técnica de extracción en fase sólida (SPE)

Esta técnica es la que se ha empleado en el presente trabajo y consiste en aislar los analitos haciendo pasar la muestra a través de una columna cromatográfica que contiene una fase estacionaria adsorbente, para posteriormente eluirlos con un solvente apropiado. El principio en el que se basa la SPE es la diferente afinidad de los analitos entre una fase sólida, que es el adsorbente, y una líquida, que es la muestra.

Así, compuestos de alta a media polaridad se extraen de soluciones no polares mediante fases adsorbentes polares; de manera similar, compuestos de baja a media polaridad se extraen de soluciones polares con adsorbentes no polares. Los analitos se eluyen posteriormente con diferentes solventes orgánicos dependiendo de las características del compuesto de interés y el mecanismo de retención en la fase adsorbente. La elección del solvente apropiado para conseguir la completa elución es de gran importancia y depende tanto de la matriz como de los compuestos coextraídos y retenidos en la fase adsorbente junto con el analito.

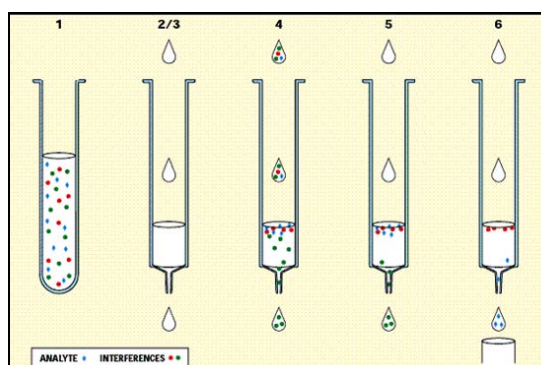


Figura 18. Esquema de la técnica de extracción en fase sólida (SPE). 1: Preparación de la muestra. 2/3: Acondicionamiento de la columna. 4: Introducción de la muestra en la columna. 5: Lavado. 6: Elución de los analitos.

Los diferentes tipos de fases sólidas utilizadas se comercializan como cartuchos o discos de extracción, diferenciándose básicamente en tres tipos: adsorbentes de fase normal (extracción de analitos polares en fase sólida polar con solvente de elución apolar), de fase reversa (extracción de analitos apolares en fase sólida apolar con solvente de elución polar) y de intercambio iónico (extracción de analitos ionizables en base a interacciones iónicas). La elección del adsorbente vendrá dada en función de los analitos que se quieren determinar.

En la **Figura 19** se muestran diferentes tipos de adsorbentes utilizados en la extracción en fase sólida.

	Fase Reversa		Fase Normal		Intercambio Iónico
C18	-O-Si-(CH ₂) ₁₇ CH ₃	Sílice	-O-Si-OH	NH ₂	-O-Si-(CH ₃) ₂ NH ₂
C8	-O-Si-(CH ₂) ₇ CH ₃	NH ₂	-O-Si-(CH ₃) ₂ NH ₂		
Fenil	-O-Si-C ₆ H ₅	Florisil	MgO ₃ ,6SiO ₂ ·0,1OH		
		Diol	-O-Si-(CH ₂) ₃ OCH ₂ CH(OH)CH ₂ (OH)		
		Ciano	-O-Si-(CH ₂) ₃ CN		

Figura 19. Algunos adsorbentes utilizados en la Extracción en Fase Sólida (SPE).

1.6.3. Purificación del extracto (clean-up)

En esta fase los analitos se recuperan completamente del extracto de la muestra eliminándose, al mismo tiempo, el material interferente coextraído. Puede realizarse mediante diferentes técnicas.

Una de las más utilizadas es la de purificación del extracto en fase sólida, basada en el mismo principio de la extracción en fase sólida (SPE).

La cromatografía de permeación sobre gel (GPC) es una técnica de exclusión molecular en la que los analitos se separan de la muestra en base a su tamaño molecular, no existiendo interacciones entre la fase estacionaria y los analitos. Como fase estacionaria se utilizan geles de estructura porosa y, como fase móvil para la elución, disolventes orgánicos.

1.6.4. Determinación por Cromatografía

En esta fase se realiza la identificación y cuantificación de los residuos de interés.

Para la determinación de residuos de acaricidas se utiliza frecuentemente la cromatografía gaseosa (GC), que permite la separación y análisis de mezclas de sustancias volátiles, aunque la cromatografía líquida (técnica empleada en este trabajo) es muy buena alternativa, por ser más económica y simple.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Esta técnica se fundamenta en la utilización de una fase móvil y una fase estacionaria líquidas para separar los componentes de una mezcla. La muestra se inyecta en una columna cromatográfica sometida a alta presión y se separan sus componentes. Existen distintos tipos de cromatografía líquida de alta resolución, tales como la cromatografía líquida de fase normal, de fase reversa, de intercambio iónico, de exclusión molecular o de afinidad.

La HPLC de fase normal consiste en una fase estacionaria fuertemente polar y una fase móvil apolar. Las sustancias polares permanecen en la superficie de la columna retenidas durante un período más prolongado que las menos polares. Esta técnica es apropiada para analitos insolubles en agua.

La HPLC de fase reversa (técnica empleada en el presente trabajo) funciona, tal y como su nombre indica, a la inversa de la cromatografía en fase normal. Es decir, la fase estacionaria es apolar (hidrofóbica), mientras que la fase móvil es polar, tal como agua o mezclas de agua y metanol o acetonitrilo. Cuanto más baja es la diferencia de polaridad entre la fase estacionaria y los analitos, mayor es el tiempo de retención.

Para la determinación de los analitos por HPLC se pueden utilizar diferentes detectores diferenciándose unos de otros en función de la propiedad medida del analito. Así, algunos miden cambios en el índice de refracción (detector de índice de refracción), la absorción de luz ultravioleta/visible (UV-VIS) (detector de luz ultravioleta-visible) o la fluorescencia emitida después de la activación con una longitud de onda adecuada (detector de fluorescencia). También puede utilizarse el espectrofotómetro de fotodiodos dispuestos paralelamente (detector de diode array, DAD) así como un detector de espectrometría de masas acoplado al HPLC.

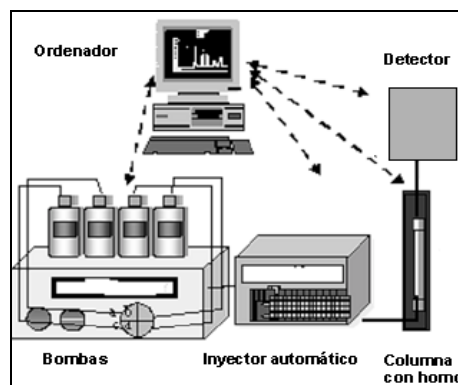


Figura 20 Diagrama de un equipo HPLC.

Para la determinación cromatográfica de los residuos de contaminantes en cera, la técnica mayoritariamente empleada es GC-ECD (Slabezki *et al.*, 1991; Lodesani *et al.*, 1992; Zimmermann *et al.*, 1993; Fries *et al.*, 1998; Bogdanov *et al.*, 1998b; Szerletics-Túri 1999; Tsigouri *et al.*, 2003; Persano *et al.*, 2003; Jiménez *et al.*, 2004a,b) utilizando mayoritariamente columnas capilares de polisiloxano, 100% metil (Slabezki *et al.*, 1991; Fries *et al.*, 1998; Bogdanov *et al.*, 1998b; Persano *et al.*, 2003) y polisiloxano, 5% fenil 95% metil (Lodesani *et al.*, 1992; Zimmermann *et al.*, 1993; Jiménez *et al.*, 2004a) como fase estacionaria.

Además, se utilizan como técnicas de determinación cromatográfica GC-MS (Fries *et al.*, 1998; Frison *et al.*, 1999; Korta *et al.*, 2003; Jiménez *et al.*, 2005), HPLC-UV (Korta *et al.*, 2001; Adamczyk *et al.*, 2007) y HPLC-Fluorescencia (Van Buren *et al.*, 1992), GC-FPD (Thrasyvoulou *et al.*, 1988) y GC-NPD (Klein *et al.*, 1986).

1.6.5. Confirmación

Se trata de confirmar la identidad de los compuestos detectados en la fase anterior. Para ello, la técnica más recomendada es la espectrometría de masas (Decisión 2002/657/CE; AOAC, 2002).



2.OBJETIVOS

El **principal objetivo** de este trabajo es contribuir con nuevas aportaciones en la determinación multirresiduo de acaricidas de síntesis y otros productos fitosanitarios de importancia actual en cera de abejas. Para ello se han perseguido los siguientes **objetivos específicos**:

- ✓ Poner a punto un método analítico para la determinación multirresiduo mediante SPE/HPLC-DAD de los principales acaricidas de síntesis que pueden contaminar la cera: fluvalinato, flumetrina, cumafós, bromopropilato y clorfenvinfós.
- ✓ Validar la metodología analítica optimizada para el análisis de acaricidas de síntesis en cera de abejas, estudiando los parámetros establecidos por organismos internacionales: especificidad, sensibilidad, exactitud (recuperación y precisión) y robustez.
- ✓ Completar el estudio con la optimización de las condiciones cromatográficas por HPLC-DAD para el análisis de 4,4'-dibromobenzofenona (metabolito del bromopropilato), clorpirifós y terbutilazina, que son utilizados en agricultura como insecticidas y herbicidas indistintamente.



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material, reactivos y equipos

3.1.1. Material

El material empleado ha sido:

- Tijeras, pinzas y espátulas de acero inoxidable.
- Vasos de precipitados de vidrio de diferentes volúmenes (50ml, 100ml).
- Matraces aforados de vidrio de diferentes volúmenes.
- Matraces Erlenmeyer de vidrio con tapón de cierre esmerilado, de 250 y 500ml.
- Probetas de vidrio graduadas de diferentes volúmenes (50ml y 100ml).
- Tubos de ensayo de vidrio con tapón de rosca de 10 ml, 15ml y 50ml.
- Tubos para centrífuga de vidrio cónicos, graduados, de 10ml.
- Pipetas Pasteur de vidrio.
- Varillas de vidrio.
- Pipetas de vidrio graduadas de diferentes volúmenes (1ml, 5ml, 10ml y 25ml).
- Micropipetas (5-25, 10-50, 60-100 y 100-200µl) con capilares de vidrio Socorex (Suiza).
- Viales de vidrio de 2ml con tapón de rosca.

Para evitar cualquier interferencia en la determinación cromatográfica de los analitos, en todo momento se ha utilizado material de vidrio, acero inoxidable o teflón, evitando el material de plástico.

La limpieza del material es fundamental, por lo que todo el material de vidrio y acero inoxidable se ha lavado con agua y detergente, aclarado con agua destilada y, finalmente, lavado tres veces con acetona. Para comprobar la eficacia de la limpieza del material, se pone en contacto acetónitrilo con el material lavado y se inyecta en el cromatógrafo. La ausencia de picos interferentes con los analitos demuestra una buena limpieza.

3.1.2. Reactivos

Los reactivos empleados han sido:

- Solventes orgánicos:
 - Acetona Lab Scan grado HPLC (Irlanda).
 - n-Hexano 95% Lab Scan grado Pestiscan (Irlanda).
 - Metanol Lab Scan grado HPLC (Irlanda).
 - Acetonitrilo Lab Scan grado HPLC (Irlanda).
 - Isooctano Lab Scan grado Pestiscan (Irlanda).
- Agua destilada ultrapura MilliQ.
- Columna de 1g de Florisil 6ml, de Isolute (International Sorbent Technology, Inglaterra).

- Patrones
 - ✓ **Tau-fluvalinato** del laboratorio Dr. Ehrenstorfer (Alemania), 91,0% pureza.
 - ✓ **Flumetrina** del laboratorio Dr. Ehrenstorfer (Alemania), 95,5% pureza.
 - ✓ **Cumafós** del laboratorio Dr. Ehrenstorfer (Alemania), 97,5% pureza.
 - ✓ **Bromopropilato** del laboratorio Dr. Ehrenstorfer (Alemania), 99,5% pureza.
 - ✓ **4,4'-dibromobenzofenona** del laboratorio Dr. Ehrenstorfer (Alemania), 99,0% pureza.
 - ✓ **Clorfenvinfós** del laboratorio Dr. Ehrenstorfer (Alemania), 94,5% pureza.
 - ✓ **Clorpirifós** del laboratorio Dr. Ehrenstorfer (Alemania), 99,5% pureza.
 - ✓ **Terbutilazina** del laboratorio Dr. Ehrenstorfer (Alemania), 99,0% pureza.

Todos los reactivos utilizados en el análisis de residuos de acaricidas deben estar exentos de sustancias susceptibles de causar interferencias en el análisis cromatográfico y, por ello, se han utilizado sólo reactivos de la mayor calidad.

3.1.3. Equipos

Los equipos empleados han sido:

- Bomba de vacío Millipore modelo XX5522050 (máximo 100kPa de vacío) (EE.UU.).
- Agitador oscilante TK3S Techno Kartell (Italia).
- Balanza analítica monoplato Sartorius A200 S (Alemania), con precisión de 0,00001g.
- Equipo de concentración SPE Vacuum Manifold Visiprep™ para la extracción en fase sólida de Supelco (EE.UU.).
- Turbovap II, Zymark (Alemania).
- Centrífuga Meditronic 7000599 de Selecta P (España).
- Centrífuga refrigerada Jouan CR 411 de Jouan S.A. (Francia).
- Congelador Liebherr -24°C GS 5211 (Alemania).
- Frigorífico Catalan S.A. (Valencia, España).
- Baño de ultrasonidos, Selecta (España)
- Bloque calentador de tubos Tembloc de P Selecta (España).
- Cromatógrafo líquido de alta resolución HP Series 1100 con sistema de bombeo binario, inyector manual con loop de 20µl y detector de barrido de espectros (DAD):
 - Estación de trabajo HP-Chemstation de Agilent (Alemania) controlado por un ordenador HP71.
 - Microjeringa Hamilton (Suiza) 75 SNR, 50µl.
 - Columna cromatográfica ACE de fase reversa octadecyl (ODS2), de 250mm de longitud, 4,6mm de diámetro interno, y 5µm de tamaño de partícula, de Symta (España).
 - Horno para columna cromatográfica 90-2215 SSI Lab-Alliance (EE.UU.).

3.2. Compuestos objeto de estudio

En el presente trabajo se han estudiado los siguientes compuestos: fluvalinato, flumetrina, cumafós, bromopropilato, 4,4'-dibromobenzofenona, clorfenvinfós, clorpirifós y terbutilazina.

La elección de los compuestos se basó en diferentes criterios:

- Acaricidas ampliamente utilizados en apicultura (fluvalinato, flumetrina).
- Acaricidas no autorizados en la UE (cumafós, bromopropilato, clorfenvinfós).
- Productos fitosanitarios (acaricidas/insecticidas/herbicidas) de uso en frutales, hortalizas y cereales que pueden contaminar la cera (clorfenvinfós, clorpirifós, terbutilazina).

3.3. Puesta a punto de un método de análisis multiresiduo en cera

Se ha procedido a la puesta a punto y validación de un método analítico para la determinación multiresiduo mediante SPE/HPLC-DAD de los principales acaricidas de síntesis que pueden contaminar la cera: fluvalinato, flumetrina, cumafós, bromopropilato y clorfenvinfós.

Para poder alcanzar este objetivo, primeramente se optimizaron las condiciones cromatográficas por HPLC-DAD para el análisis multiresiduo de estos compuestos de interés, completándose el estudio con los compuestos clorpirifós y terbutilazina, que son utilizados habitualmente en agricultura como insecticidas y herbicidas, indistintamente.

Abordando los acaricidas de síntesis: fluvalinato, flumetrina, cumafós, bromopropilato y clorfenvinfós (todos ellos de uso apícola salvo clorfenvinfós), se procedió con ellos a la optimización de la técnica de extracción y purificación (SPE).

3.3.1. Optimización de la determinación cromatográfica mediante HPLC

Se ensayaron distintas condiciones cromatográficas con vistas a optimizar la identificación y resolución de los compuestos químicos de interés en cera, mediante HPLC-DAD.

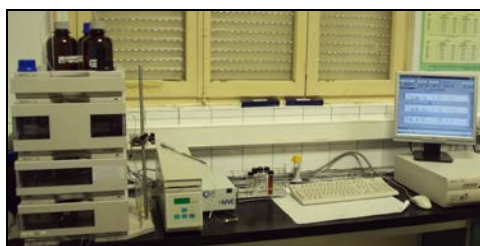


Figura 21. Equipo de HPLC empleado en el presente trabajo.

3.3.1.1. Preparación de patrones

A partir de los patrones comerciales de acaricidas y fitosanitarios (Dr. Ehrenstorfer) se prepararon disoluciones de cada analito en acetonitrilo a diferentes concentraciones.

El fluvalinato, la flumetrina, el cumafós, el bromopropilato y el clorfenvinfós se adquirieron en estado puro, preparándose a posteriori diluciones de los mismos de 1000µg/ml en acetonitrilo y almacenándose a -18°C en oscuridad según recomendaciones establecidas por el fabricante para minimizar la evaporación y mantener la estabilidad. A partir de éstas, se prepararon las disoluciones de trabajo a distintas concentraciones (10, 2, 1, 0,5, 0,2, 0,1, 0,075, 0,06, 0,05, 0,04, 0,03, 0,025 y 0,02 µg/ml), que también se conservaron en oscuridad a -18°C, previamente etiquetadas.

El clorpirifós, la terbutilazina y la 4,4'-dibromobenzofenona se adquirieron ya en solución de 10 µg/ml en acetonitrilo, a partir de las cuáles se prepararon las disoluciones de trabajo a distintas concentraciones (1, 0,5, 0,2, 0,1, 0,075, 0,06, 0,05, 0,04, 0,03, 0,025 y 0,02 µg/ml), que se etiquetaron y conservaron en oscuridad a -18°C.

3.3.1.2. Identificación cromatográfica de los compuestos de interés

La identificación cromatográfica se realizó inyectando los patrones individuales de acaricidas a concentraciones de 1 y 10 µg/ml, comparando sus tiempos de retención y observando la proporcionalidad de áreas.

En la **Figura 22** puede observarse cómo el patrón inyectado (4,4'-Dibromobenzofenona) queda identificado por su tiempo de elución (en condiciones preestablecidas).

En el apartado 4.1.3., se incluye la tabla de tiempos de retención de los distintos compuestos objeto de estudio y su orden de elución.

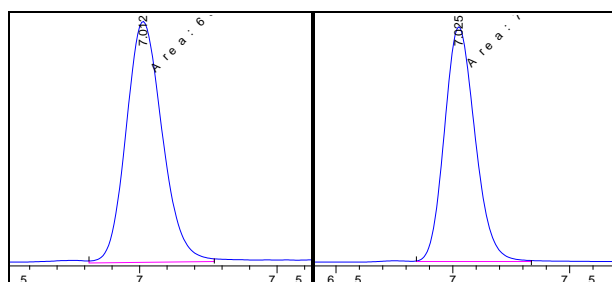


Figura 22. Ejemplo de cromatograma obtenido para la 4,4'-Dibromobenzofenona (1 y 10µg/ml).

La identidad de los picos de los diferentes compuestos se confirmó a través de sus espectros de absorción (ver **Figura 23**).

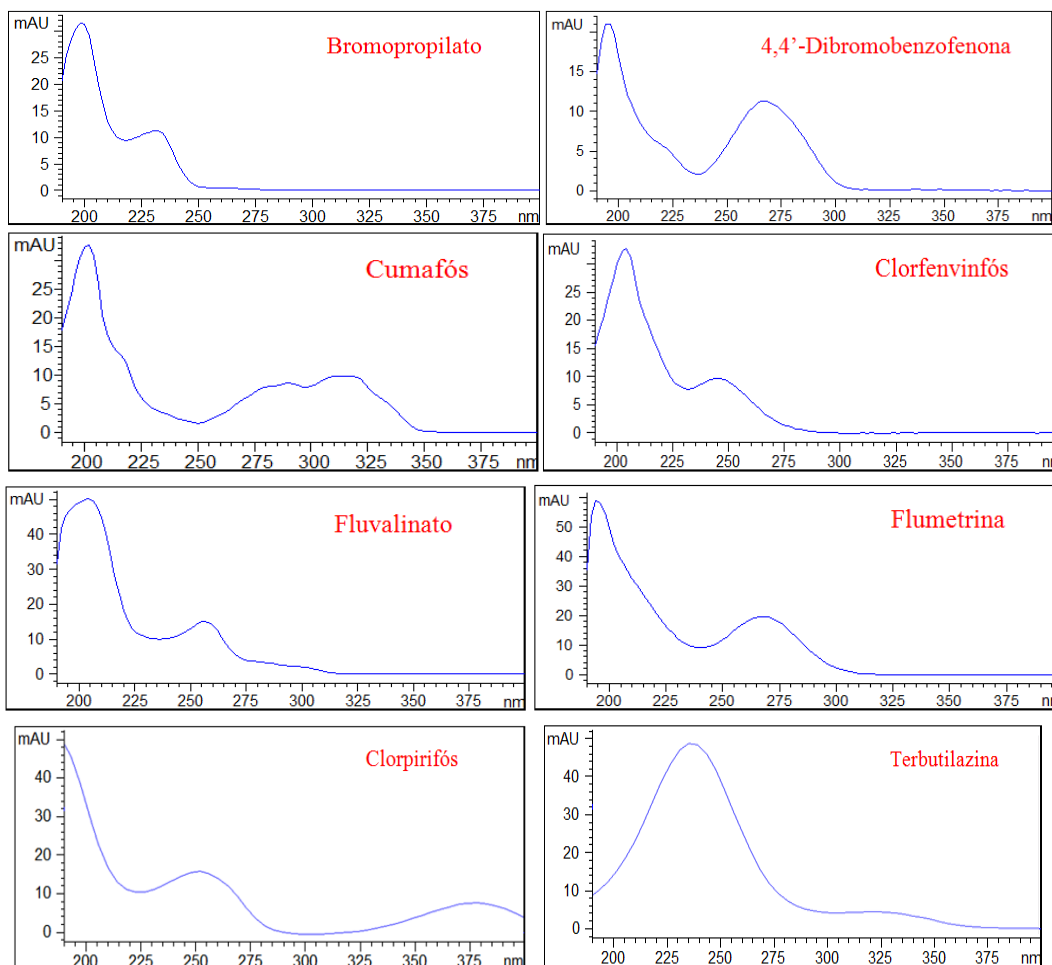


Figura 23. Espectros de absorción de los diferentes compuestos.

3.3.1.3. Longitud de onda óptima de cada compuesto

Se inyectaron los patrones individuales de los diferentes compuestos (1 $\mu\text{g/ml}$) y se analizó la respuesta a diferentes longitudes de onda en base a la bibliografía científica (210, 233, 254, 274, 289nm) con vistas a establecer la longitud de onda óptima para cada analito (máxima respuesta con buena resolución de los picos). Las longitudes de onda óptimas se incluyen en el apartado 4.1.1.

3.3.1.4. Mezcla de compuestos de interés

Se preparó una mezcla de todos los compuestos a una concentración de 1ppm (1 μg de cada analito/ml de acetonitrilo) y se inyectó en el equipo de HPLC (condiciones iniciales descritas a continuación), con vistas a valorar la separación entre los picos de cada analito.

Para preparar la mezcla de los 8 analitos a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ se partió de sus soluciones patrón de 10 $\mu\text{g/ml}$ (en acetonitrilo) previamente preparadas.

Tras la inyección de la mezcla de analitos en el equipo de HPLC se encontraron una serie de dificultades que hicieron que los resultados obtenidos no fueran satisfactorios. Como puede observarse en la **Figura 24**, el principal problema fue el solapamiento de los picos de 4,4'-dibromobenzofenona (DBBF), bromopropilato y clorpirifós. Además, se observó la aparición de un pico interferente coincidente con dos de los analitos, fluvalinato y flumetrina.

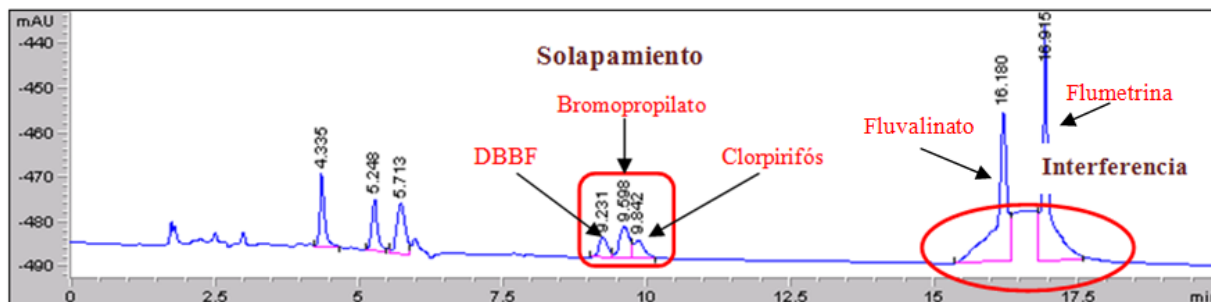


Figura 24. Separación de los compuestos con gradiente inicial, a 210nm.

Con vistas a solventar los problemas anteriormente citados y, consecuentemente, a mejorar la separación entre los picos de los analitos de interés, se realizó el estudio de diferentes gradientes de elución y, además, se procedió a la limpieza de la columna cromatográfica mediante diferentes métodos (se describe a continuación).

3.3.1.5. Optimización del gradiente de elución

Se ensayaron diversas opciones con vistas a optimizar la separación de la mezcla de compuestos. Se modificó la concentración de solventes en la fase móvil y el flujo de la misma (ml/min).

En los diversos ensayos se mantuvieron constantes los siguientes parámetros:

- Columna empleada: ACE 5µm, C18, 250mm x 4'6mm.
- Fase móvil: Acetonitrilo y agua.
- Detector: DAD.
- Volumen inyectado: 50µl (loop de 20µl).

Las condiciones del gradiente de elución empleado inicialmente están resumidas en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Gradiente de elución inicial

TIEMPO (min)	ACETONITRILLO (%)	AGUA (%)	FLUJO (ml/min)
0	80	20	1
12	80	20	1
13	100	0	1
25	100	0	1

Como ya se ha comentado anteriormente, empleando el gradiente original algunos de los picos de los analitos se solapaban y apareció una interferencia coincidente con dos de los compuestos de interés (**Figura 24**), por lo que se modificó dicho gradiente en busca de una mejor resolución.

Inicialmente se ensayó modificando la proporción de solventes en la fase móvil en el tiempo, modificando así su polaridad y, por tanto, la separación cromatográfica de los analitos. Además, se modificó el flujo para comprobar cómo influía en la separación cromatográfica de los analitos de interés.

A continuación se detallan los ensayos realizados con vistas a optimizar la separación cromatográfica de los analitos.

Tabla 4. Condiciones del gradiente de elución del ensayo 1

TIEMPO (min)	ACETONITRILLO (%)	AGUA (%)	FLUJO (ml/min)
0	80	20	1
6	85	15	1
12	80	20	1
13	100	0	1
20	100	0	1



Figura 25. Cromatograma obtenido tras ensayo 1.

Tabla 5. Condiciones del gradiente de elución del ensayo 2

TIEMPO (min)	ACETONITRILLO (%)	AGUA (%)	FLUJO (ml/min)
0	80	20	1
6	90	10	1
7	100	0	1
20	100	0	1

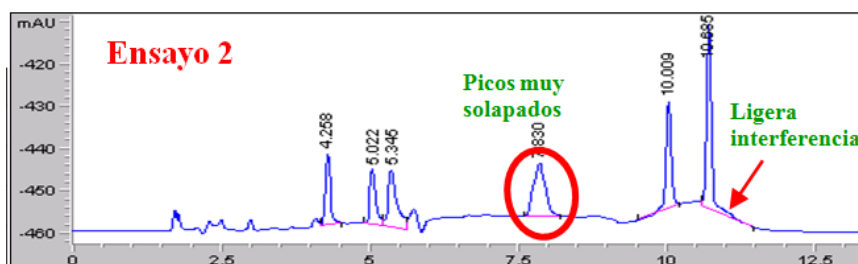


Figura 26. Cromatograma obtenido tras ensayo 2.

Tabla 6. Condiciones del gradiente de elución del ensayo 3

TIEMPO (min)	ACETONITRILO (%)	AGUA (%)	FLUJO (ml/min)
0	80	20	1
5	80	20	1
6	50	50	1
12	80	20	1
13	100	0	1
20	100	0	1



Figura 27. Cromatograma obtenido tras ensayo 3.

Tabla 7. Condiciones del gradiente de elución del ensayo 4

TIEMPO (min)	ACETONITRILO (%)	AGUA (%)	FLUJO (ml/min)
0	80	20	1
6	80	20	1
7	70	30	1
13	100	0	1
20	100	0	1



Figura 28. Cromatograma obtenido tras ensayo 4.

Tabla 8. Condiciones del gradiente de elución del ensayo 5

TIEMPO (min)	ACETONITRILO (%)	AGUA (%)	FLUJO (ml/min)
0	80	20	1
6	80	20	1
7	70	30	1
11	70	30	1
13	100	0	1
20	100	0	1



Figura 29. Cromatograma obtenido tras ensayo 5.

Tabla 9. Condiciones del gradiente de elución del ensayo 6

TIEMPO (min)	ACETONITRILLO (%)	AGUA (%)	FLUJO (ml/min)
0	80	20	1
7	100	0	1
20	100	0	1

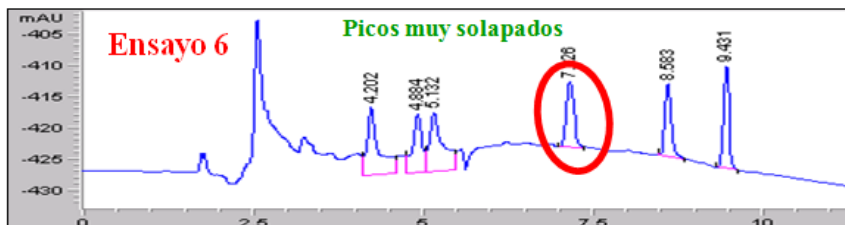


Figura 30. Cromatograma obtenido tras ensayo 6.

Tabla 10. Condiciones del gradiente de elución del ensayo 7

TIEMPO (min)	ACETONITRILLO (%)	AGUA (%)	FLUJO (ml/min)
0	80	20	1
6	80	20	1
7	100	0	1
20	100	0	1

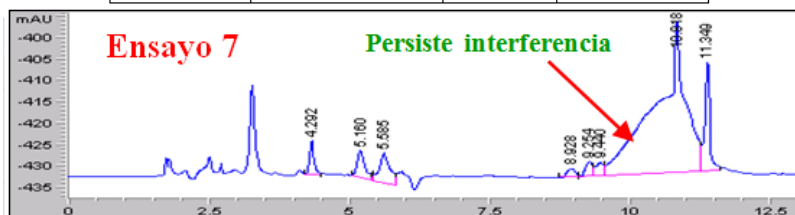


Figura 31. Cromatograma obtenido tras ensayo 7.

Tabla 11. Condiciones del gradiente de elución del ensayo 8

TIEMPO (min)	ACETONITRILLO (%)	AGUA (%)	FLUJO (ml/min)
0	80	20	1'3
6	80	20	1'3
7	100	0	1'3
20	100	0	1'3

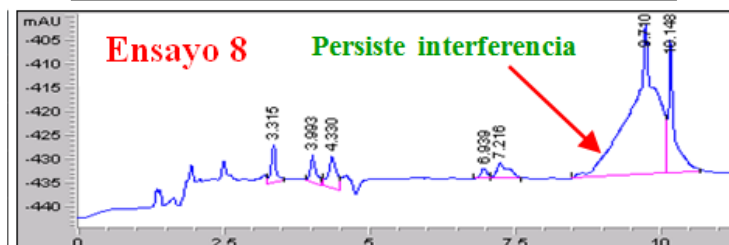


Figura 32. Cromatograma obtenido tras ensayo 8.

Tabla 12. Condiciones del gradiente de elución del ensayo 9

TIEMPO (min)	ACETONITRILO (%)	AGUA (%)	FLUJO (ml/min)
0	70	30	1
8	70	30	1
13	90	10	1
20	100	0	1

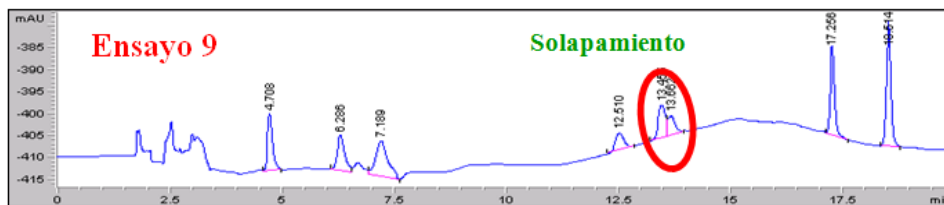


Figura 33. Cromatograma obtenido tras ensayo 9.

Tabla 13. Condiciones del gradiente de elución del ensayo 10

TIEMPO (min)	ACETONITRILO (%)	AGUA (%)	FLUJO (ml/min)
0	70	30	1
9	70	30	0.5
13	90	10	1
20	100	0	1

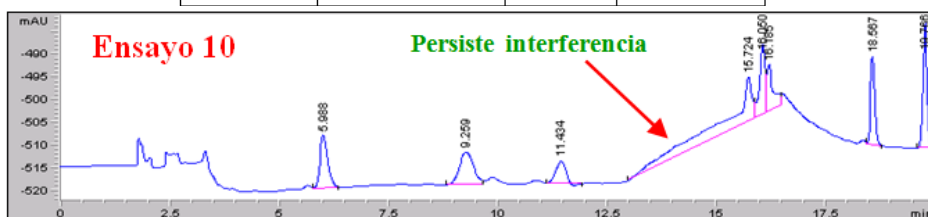


Figura 34. Cromatograma obtenido tras ensayo 10.

Tabla 14. Condiciones del gradiente de elución del ensayo 11

TIEMPO (min)	ACETONITRILO (%)	AGUA (%)	FLUJO (ml/min)
0	80	20	1
12	80	20	1
20	100	0	1

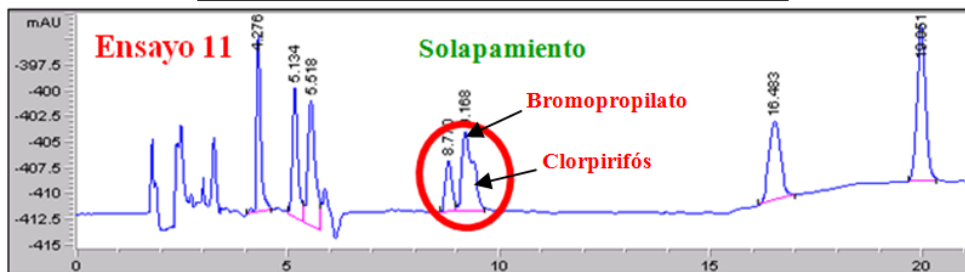


Figura 35. Cromatograma obtenido tras ensayo 11.

Mediante la modificación de la proporción de solventes en la fase móvil se consiguió mejorar la separación de los analitos, obteniendo, tras el ensayo 11, un cromatograma sin picos interferentes y con una separación aceptable entre compuestos, con excepción de dos de ellos (bromopropilato y clorpirifós), que se solapaban (**Figura 35**). Por lo tanto, con vistas a mejorar todavía más la separación cromatográfica, los posteriores ensayos se centraron en modificar el flujo de la fase móvil (ensayos 12-15).

Tabla 15. Condiciones del gradiente de elución del ensayo 12

TIEMPO (min)	ACETONITRILO (%)	AGUA (%)	FLUJO (ml/min)
0	80	20	0,8
13	90	10	0,8
20	100	0	0,8

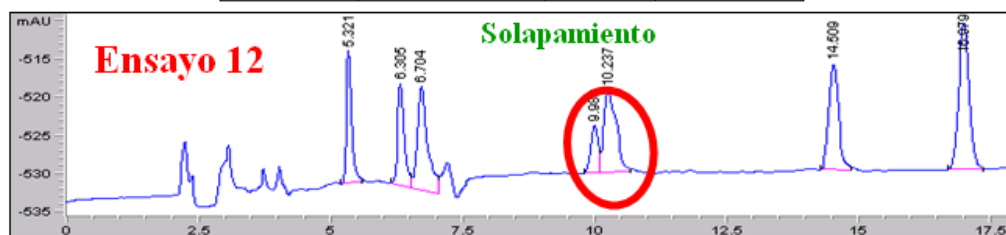


Figura 36. Cromatograma obtenido tras ensayo 12.

Tabla 16. Condiciones del gradiente de elución del ensayo 13

TIEMPO (min)	ACETONITRILO (%)	AGUA (%)	FLUJO (ml/min)
0	80	20	0,5
11	80	20	0,5
12	80	20	1
25	100	0	1

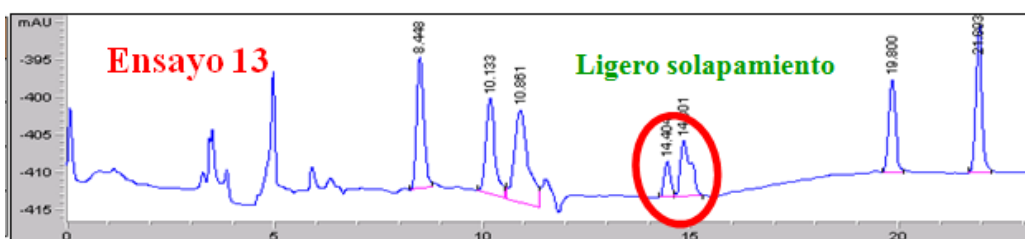


Figura 37. Cromatograma obtenido tras ensayo 13.

En la **Figura 40** puede observarse cómo los métodos de limpieza de la columna cromatográfica ensayados (metanol a 0,2ml/min durante 12 horas (A); y metanol a 0,8ml/min durante 4 horas (B)) no consiguieron eliminar la interferencia existente a tiempo 9-12min.

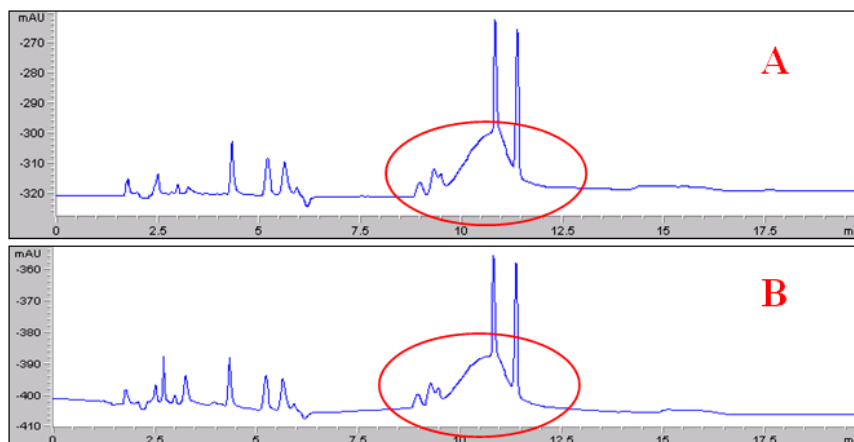


Figura 40. Cromatogramas obtenidos tras limpieza de la columna cromatográfica.

Tras estudiar la posible causa de la interferencia, esta se atribuyó al acetonitrilo, pues es el disolvente que se emplea como fase móvil (junto al agua) y absorbe a 210nm. Para eliminar, pues, la interferencia, se modificó el gradiente (explicado anteriormente) de manera que no se alcanzara un 100% de acetonitrilo (causante de la interferencia) hasta la elución de los analitos de interés.

3.3.2. Optimización de la técnica de extracción y purificación (SPE)

3.3.2.1. Elección de una matriz de cera libre de residuos

Para llevar a cabo la optimización y posterior validación de la técnica de extracción de los contaminantes presentes en la cera, es necesario realizar estudios de recuperación (porcentaje de la concentración real de una sustancia recuperado durante el procedimiento analítico) utilizando material certificado de referencia (material al que se ha asignado un contenido de analito especificado).

Los estudios de recuperación son esenciales para determinar la exactitud del método analítico, es decir, el grado de concordancia entre el resultado del ensayo (valor obtenido de la concentración del analito) y un valor de referencia aceptado (el valor real de concentración).

No existe Material de Referencia Certificado de cera con los analitos objeto de estudio disponible en los distintos organismos internacionales (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, etc), por lo que para proceder a los distintos ensayos, necesitamos disponer de una matriz de cera libre de interferencias coincidentes con los analitos de interés para contaminarla de forma artificial.

Para ello, se adquirió cera farmacéutica blanqueada (Fagrón®) y se analizó mediante cromatografía líquida (condiciones previamente optimizadas), tras someterse a extracción en fase sólida (condiciones de partida establecidas en nuestro laboratorio con anterioridad, Adamczyk *et al.*, 2007). El cromatograma obtenido se muestra en la **Figura 41**.

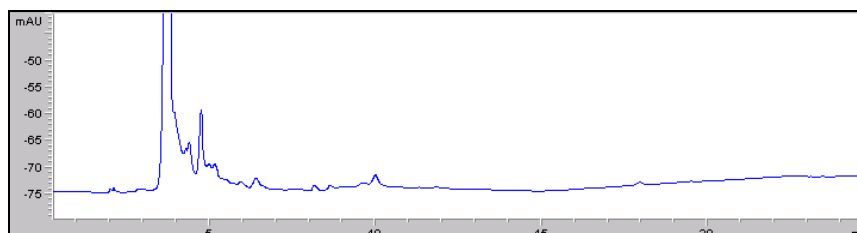


Figura 41. Cromatograma de cera farmacéutica blanqueada obtenido tras extracción inicial.

Tras analizar el cromatograma obtenido y comprobar que no presentaba impurezas coincidentes con los analitos objeto de estudio, se decidió utilizar la cera farmacéutica blanqueada (Fagrón®) como matriz para los estudios de recuperación.

El ensayo de extracción que mejores resultados de recuperación proporcione (según la Decisión de la Comisión 657/2002/CE, ver punto 3.3.3.3.1) será el que se emplee en el posterior estudio de validación.

3.3.2.2. Contaminación de la cera con una solución patrón

La cera, debido a su composición y características físicas, es una matriz compleja. Esa complejidad dificulta su manejo y, por ende, su contaminación de manera artificial con los analitos de interés. El principal problema es que la cera solidifica a temperaturas inferiores a 60°C, lo que dificulta la distribución y homogeneización de los analitos en la misma.

Para la contaminación de la cera con los analitos de interés se empleó un método ya optimizado en nuestro laboratorio con anterioridad (Adamczyk *et al.*, 2007). Se funden 5 gramos de cera en un envase de vidrio en un baño de agua a 70°C y se mantiene a esa temperatura. Bajo estas condiciones, la cera fundida es contaminada con una disolución de trabajo que contiene los analitos y se agita vigorosamente. La cera se deja enfriar a temperatura ambiente.

3.3.2.3. Optimización de la técnica de extracción

Una vez elegida la matriz de cera libre de residuos, se procedió a optimizar la técnica de extracción en fase sólida. Se ensayaron distintas condiciones con vistas a optimizar la extracción (recuperación) de los contaminantes añadidos a la cera.

Para los diversos ensayos de extracción se contaminó cera libre de interferencias a diferentes niveles: 1 y 10µg/g.

Para la obtención de los resultados de recuperación, se inyectaron en el cromatógrafo los extractos obtenidos en los diversos experimentos. La señal obtenida del cromatógrafo se comparó con la señal obtenida al inyectar una disolución patrón de los analitos, con efecto matriz, con una concentración igual a aquella con la que se fortificó la muestra de cera antes de realizar la extracción, siendo esta concentración, y por tanto su señal, el 100% del analito en la cera.

El efecto matriz en la disolución patrón de contaminantes (100%) se logra dejando evaporar el disolvente de un vial con 100 µl de la disolución de un extracto de cera sin fortificar (blanco), tras realizar el método de extracción completo. Al residuo que queda en el vial se añaden 100 µl de una disolución patrón de analitos (en acetonitrilo) con concentración equivalente a la cera fortificada.



Figura 42. Equipos empleados en el proceso de extracción: Vacuum Manifold (izquierda); TurboVap (derecha).

Tabla 19. Ensayos de extracción (continuación).

1° PREPARACIÓN CERA	ENSAYO 5°	ENSAYO 6°	ENSAYO 7°	ENSAYO 8°
Matriz	Cera farmacéutica contaminada 10µg/g	=	=	=
Extracción con solvente	0,2g de cera en tubo. Añadir 10ml isooctano. Calentamiento 70°C, 5min en baño. Centrifugar en frío (3800rpm, 15min, 0°C) Recoger sobrenadante en tubo de vidrio. Repetir dos veces más añadiendo 6ml isooctano y unir sobrenadantes.	=	0,2g de cera en tubo. Añadir 10ml isooctano. Calentamiento 70°C, 5min en baño. Centrifugar en frío (3800rpm, 25min , 0°C) Repetir dos veces más añadiendo 6ml isooctano y centrifugando 15min, y unir sobrenadantes.	=
2° SPE				
Adsorbente	Florisil (1g)	=	=	=
Acondicionamiento de la columna SPE	20ml hexano	=	=	=
Carga de muestra	El extracto de isooctano se pasa a través de la columna	=	=	=
Lavado	10ml hexano	=	=	=
Secado columna	Vacío 5 min. Se descarta. Se cambia la guía.	Sin vacío	Vacío 5 min. Se descarta. Se cambia la guía.	=
Elución	10ml Acetona/Hexano (3:1) (se recoge en tubo graduado) Se hace vacío para terminar	=	=	=
Concentración	Se evapora con corriente nitrógeno hasta sequedad (TurboVap a 55°C). Acetonitrilo en exceso para arrastrar. Enrasar a 0,5ml y añadir otros 0,5ml de acetonitrilo (1ml total). Rotatubos y sobrenadante a vial, sin filtrar. Almacenamiento -18°C Se inyecta en HPLC el sobrenadante.	=	Se evapora con corriente nitrógeno hasta sequedad. Acetona/Hexano (3:1) en exceso para arrastrar. Redisolver añadiendo 1ml acetonitrilo. Sobrenadante a vial, sin filtrar. Almacenamiento -18°C. Se inyecta en HPLC el sobrenadante.	Se evapora con corriente nitrógeno hasta sequedad. Acetona/Hexano (3:1) en exceso para arrastrar. Redisolver añadiendo 1ml acetonitrilo. Sobrenadante a vial, sin filtrar. Almacenamiento -18°C. Se inyecta en HPLC después de agitar el vial y sin esperar decantación.

Tabla 19. *Ensayos de extracción (continuación).*

1º PREPARACIÓN CERA	ENSAYO 9º	ENSAYO 10º	ENSAYO 11º
Matriz	Cera farmacéutica contaminada 10µg/g	=	=
Extracción con solvente	0,2g de cera en tubo Añadir 10ml isooctano. Calentamiento 70°C, 5min en baño. Centrifugar en frío (3800rpm, 25min, 0°C) Recoger sobrenadante en tubo de vidrio. Repetir dos veces más añadiendo 6ml isooctano y centrifugando 15min y unir sobrenadantes.	=	=
2º SPE			
Adsorbente	Florisil (1g)	=	=
Acondicionamiento de la columna SPE	20ml hexano	=	=
Carga de muestra	El extracto de isooctano se pasa a través de la columna	=	=
Lavado	10ml hexano	=	=
Secado columna	Vacío 5 min. Se descarta. Se cambia la guía.	=	=
Elución	10ml Acetona/Hexano (3:1) (se recoge en tubo graduado) Se hace vacío para terminar	=	=
Concentración	Se evapora con corriente nitrógeno hasta sequedad. Acetona/Hexano (3:1) en exceso para arrastrar. Redisolver añadiendo 1ml acetonitrilo. Sobrenadante a vial, filtrando con filtro Whatman nº4 . Almacenamiento -18°C. Se inyecta en HPLC el sobrenadante.	Se evapora con corriente nitrógeno hasta sequedad (TurboVap a 55°C). Acetonitrilo en exceso para arrastrar. Enrasar a 0,5ml y añadir otros 0,5ml de acetonitrilo (1ml total). Rotatubos y sobrenadante a vial, sin filtrar. Almacenamiento -18°C Se inyecta en HPLC el sobrenadante .	Se evapora con corriente nitrógeno hasta sequedad (TurboVap a 55°C). Acetonitrilo en exceso para arrastrar. Enrasar a 0,5ml y añadir otros 0,5ml de acetonitrilo (1ml total). Rotatubos y sobrenadante a vial, sin filtrar. Almacenamiento -18°C Se inyecta en HPLC después de agitar el vial y sin esperar decantación.

3.3.3. Validación de la metodología analítica optimizada

Una vez optimizada la metodología analítica, se ha validado (intralaboratorialmente) basándonos en la Decisión de la Comisión 657/2002/CE, determinando los parámetros de especificidad, sensibilidad, exactitud (recuperación y precisión) y robustez.

El estudio de validación se ha llevado a cabo con muestras de cera contaminadas de forma artificial a 10 µg/g de cera.

3.3.3.1. Estudio de especificidad

La Decisión de la Comisión 657/2002/CE define el parámetro **especificidad** como la capacidad de un método para distinguir entre el analito que se está midiendo y otras sustancias presentes en condiciones experimentales. Esta característica es, ante todo, función de la técnica de medición, pero puede variar en función del tipo de compuesto o de la matriz.

El objetivo del estudio de especificidad es comprobar que no existe en la matriz ningún pico que pueda inducir a confusión con el analito (falsa identificación), que la identificación del analito no se ve dificultada por la presencia de una o más interferencias, y que la cuantificación no sufre una influencia apreciable.

Para ello, en el presente trabajo, una vez establecido el método de extracción definitivo, se analizaron 6 muestras de cera blanco y de cera contaminada artificialmente con la mezcla de analitos de interés, en busca de interferencias (constantes en tiempo de retención y área) coincidentes con los analitos de interés.

Se verificaron posibles interferencias en las regiones de interés en las que cabe esperar analitos, cuya identificación cromatográfica se llevo a cabo comparándolos con los tiempos de retención de los patrones puros. El coeficiente de variación de los tiempos de retención de los analitos no ha de superar el 2,5% (Decisión 657/2002/CE).

Finalmente, se comprobó que los picos estaban formados por un único componente y para ello se obtuvo información de la pureza de los picos a partir de la información espectral previamente almacenada.

Los resultados obtenidos se incluyen en el apartado 4.3.1.

3.3.3.2. Estudio de sensibilidad

Sensibilidad es la capacidad para detectar la presencia de un analito y discernir pequeñas diferencias en la concentración de éste. Se estima mediante los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ).

Para establecer los LOD y LOQ se determinaron los rangos de respuesta dinámico y lineal.

El **intervalo dinámico** es el intervalo de concentraciones en el que el sistema es capaz de emitir una respuesta, mientras que el **intervalo lineal** es aquella porción del intervalo dinámico en la que un cambio en la concentración del analito provoca una modificación proporcional en la respuesta del detector. Dentro del intervalo dinámico puede haber varios intervalos de respuestas lineales (rangos lineales) (FDA, 1994).

Los intervalos dinámico y lineal se pueden obtener gráficamente, representando, para cada analito, en el eje de ordenadas el factor respuesta (área del pico/masa inyectada) y en el eje de abscisas el logaritmo de la masa inyectada (FDA, 1994). En este estudio se ha considerado lineal el intervalo de masas o concentraciones de analito en que el factor de respuesta es constante $\pm 10\%$.

El **LOD** es la concentración más pequeña detectada (que da señal), es decir, el valor mínimo del intervalo dinámico, mientras que el **LOQ** es el valor mínimo del intervalo lineal.

Para realizar este estudio se inyectaron en el HPLC, por duplicado, diferentes concentraciones de las disoluciones patrón de los analitos en solución de acetonitrilo y con efecto matriz, siguiendo la metodología analítica optimizada (se describe en apartado 4.2.2.). El rango de concentraciones estudiado fue de 10, 2, 1, 0,5, 0,2, 0,1, 0,075, 0,06, 0,05, 0,04, 0,03, 0,025 y 0,02 µg/ml.

Los resultados del estudio de sensibilidad se incluyen en el apartado 4.3.2.

3.3.3.3. Estudio de exactitud (recuperación y precisión)

Exactitud es el grado de concordancia entre el resultado del ensayo (valor obtenido de la concentración de analito) y un valor de referencia aceptado (el valor real de concentración), aplicando un determinado número de veces el procedimiento experimental a un conjunto de muestras homogéneas. Se obtiene determinando la veracidad y la precisión.

3.3.3.3.1. Veracidad (recuperación)

La **veracidad** es el grado de concordancia existente entre el valor medio obtenido de una gran serie de resultados y un valor de referencia aceptado. Se expresa normalmente como sesgo.

Al no disponer, en nuestro caso, de material certificado de referencia, se determinó la recuperación (porcentaje de la concentración real de una sustancia recuperado durante el procedimiento analítico) mediante experimentos con matriz en blanco a la que adicionamos la mezcla patrón a concentración conocida.

Los ensayos de recuperación se realizaron, por sextuplicado, contaminando la cera libre de impurezas, con la mezcla de analitos, a 10 µg/g. Para ello, a 5 gramos de cera blanca se añadieron 5ml de la mezcla de patrones de contaminantes (en acetonitrilo) de 10 µg/ml, previamente preparada.

Veracidad (%) ≈ Recuperación (%) = [concentración media detectada (tras introducción del factor corrector de recuperación) × 100]/valor fortificación.

Dicha recuperación se evaluó según los criterios establecidos por la Decisión de la Comisión 2002/657/CE y por la AOAC (2002). Para el nivel de contaminación empleado (10 µg/g) la Decisión 2002/657/CE establece que debemos recuperar entre 80-110%. Según el criterio de la AOAC, la recuperación debe estar comprendida entre un 80-115%.

Concentration	Recovery limits
100 %	98-101%
10 %	95-102%
1 %	92-105%
0.1 %	90-108%
0.01%	85-110%
10 µg/g (ppm)	80-115%
1 µg/g	75-120%
10 µg/kg (ppb)	70-125%

Concentration	Recovery limits
≤ 1 µg/kg	- 50 % a + 20 %
> 1 µg/kg a 10 µg/kg	- 30 % a + 10 %
≥ 10 µg/kg	- 20 % a + 10 %

Figura 43. Criterios de recuperación establecidos por la AOAC (izquierda) y por la Decisión 2002/657/CE (derecha).

3.3.3.3.2. Precisión

La **precisión** es el grado de concordancia entre resultados de ensayos independientes obtenidos en condiciones predeterminadas. La precisión suele expresarse como imprecisión y calcularse como desviación estándar relativa (coeficiente de variación, CV) de los resultados de los ensayos. Cuanto mayor es la desviación estándar menor es la precisión.

Se evaluó la precisión del método en **condiciones de repetibilidad** (mismo método analítico, mismo equipo, mismo laboratorio y mismo día) y de **reproducibilidad** (3 días diferentes).

Para el estudio de repetibilidad se procedió al análisis de 6 muestras de cera contaminadas, en condiciones idénticas. Se determinó la concentración (recuperación) media, la desviación estándar y el coeficiente de variación (%) de cada una de las muestras enriquecidas y se compararon los resultados obtenidos con los criterios establecidos por la Decisión 2002/657/CE y la AOAC (2002).

Para el estudio de reproducibilidad se realizó el estudio de repetibilidad otros dos días más y se calcularon los valores promedio de los tres días (concentración media, desviación estándar y coeficiente de variación promedio de los tres días).

El coeficiente de variación (CV) se calcula teniendo en cuenta el promedio de las concentraciones (X) y su desviación estándar (SD), mediante la siguiente fórmula:

$$CV = (SD \times 100)/X$$

Según la Decisión de la Comisión 2002/657/CE, el coeficiente de variación (CV) interlaboratorios para el análisis repetido de un material de referencia o enriquecido, en condiciones de reproducibilidad, no superará el nivel calculado mediante la ecuación de Horwitz, a saber:

$$CV = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

donde C es la fracción de masa expresada como potencia (exponente) de 10.

Con fracciones de masa inferiores a 100 µg/kg, la aplicación de la ecuación de Horwitz conduce a valores inaceptablemente elevados. Por ello, los CV de las concentraciones inferiores a 100 µg/kg serán lo más bajos posible.

En análisis realizados en condiciones de repetibilidad, los CV intralaboratorio suelen arrojar valores situados entre la mitad y los dos tercios de los CV calculados mediante la ecuación de Horwitz.

En análisis realizados en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio, los CV intralaboratorio no deben ser superiores a los CV de reproducibilidad interlaboratorio.

Por lo tanto, en condiciones de repetibilidad, para un nivel de enriquecimiento de 10 µg/g, el CV interlaboratorios no superará el 11,3% (ecuación de Horwitz) y el CV intralaboratorios deberá presentar valores en torno a 5,6-7,5%.

En la **Figura 44** se muestran los criterios de precisión establecidos por la AOAC para los métodos analíticos, en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad.

Concentration	Repeatability (RSD _r)	Concentration, C	Reproducibility (RSD _R)
100 %	1 %	100 %	2 %
10 %	1.5%	10 %	3 %
1 %	2 %	1 %	4 %
0.1 %	3 %	0.1 %	6 %
0.01%	4 %	0.01%	8 %
10 µg/g (ppm)	6 %	10 µg/g (ppm)	11 %
1 µg/g	8 %	1 µg/g	16 %
10 µg/kg (ppb)	15 %	10 µg/kg (ppb)	32 %

Figura 44. Criterios de precisión en condiciones de repetibilidad (izquierda) y reproducibilidad (derecha) establecidos por la AOAC.

3.3.3.4. Estudio de robustez

La Decisión de la Comisión 657/2002/CE define el parámetro de **robustez** como la susceptibilidad de un método analítico a los cambios de las condiciones experimentales.

Con el estudio de robustez se pretende introducir deliberadamente en el método ligeras variaciones razonables y observar sus consecuencias. Para ello, se determinaron previamente siete factores del análisis de la muestra que podían influir en los resultados de la medición y se modificaron en un orden de magnitud razonable.

Como primer paso para poder realizar los cálculos, a los valores nominales de estos siete factores elegidos se les asignó una letra mayúscula de la A a la G, asignando por otro lado a sus modificaciones una letra minúscula de la a a la g. Los factores modificados y la magnitud de las modificaciones se muestran en la **Tabla 20**.

Tabla 20. Factores modificados en el método de determinación de contaminantes abióticos en cera y magnitud de la modificación.

Tipo de cambio	Magnitud del cambio	
	Referencia	Modificación
Lavado del material de vidrio con agua destilada y acetona	Si (A)	No (a)
Calentamiento de la muestra con isoocetano a 70°C	5 min (B)	7 min (b)
Tiempo de secado de la columna SPE	5 min (C)	10 min (c)
Volumen de elución con acetona:hexano (3:1)	10 ml (D)	9'5 ml (d)
Aplicación de vacío suave tras elución	Sí (E)	No (e)
Tiempo transcurrido desde la obtención del extracto con los analitos hasta su inyección cromatográfica	1 día (F)	Inmediato (f)
Tª de la columna cromatográfica	Tª controlada (25°C) (G)	Tª no controlada (g)

Se ha diseñado el experimento según el método de Youden (Decisión de la Comisión 657/2002/CE), ya que este reduce al mínimo el tiempo y el esfuerzo requeridos. Este método es un diseño factorial fraccional que permite estudiar diversas variaciones simultáneamente, aunque no permite detectar interacciones entre los diversos factores. Se ha tomado un subconjunto equilibrado y representativo de 8 de las 128 combinaciones posibles (ver **Tabla 21**).

Tabla 21. Combinaciones elaboradas para la configuración del estudio de robustez.

Valor del factor F	Combinación de determinaciones							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado observado R	S	T	U	V	W	X	Y	Z

Las características del análisis para cada combinación se describen en la **Tabla 22**.

Tabla 22. Descripción de las características del análisis para cada combinación.

Combinación	Características del análisis
1	Lavado del material de vidrio con agua destilada y acetona, calentamiento de la muestra con isooctano a 70°C/5 min, 5 min de secado de la columna SPE, elución con 10 ml de acetona:hexano (3:1), aplicación de vacío suave tras elución, 1 día de tiempo transcurrido desde la obtención del extracto hasta su inyección cromatográfica, Tª de la columna cromatográfica controlada (25°C)
2	Lavado del material de vidrio con agua destilada y acetona, calentamiento de la muestra con isooctano a 70°C/5 min, 10 min de secado de la columna SPE, elución con 10 ml de acetona:hexano (3:1), no aplicación de vacío suave tras elución, tiempo transcurrido desde la obtención del extracto hasta su inyección cromatográfica nulo, Tª de la columna cromatográfica no controlada
3	Lavado del material de vidrio con agua destilada y acetona, calentamiento de la muestra con isooctano a 70°C/7 min, 5 min de secado de la columna SPE, elución con 9,5 ml de acetona:hexano (3:1), aplicación de vacío suave tras elución, tiempo transcurrido desde la obtención del extracto hasta su inyección cromatográfica nulo, Tª de la columna cromatográfica no controlada
4	Lavado del material de vidrio con agua destilada y acetona, calentamiento de la muestra con isooctano a 70°C/7 min, 10 min de secado de la columna SPE, elución con 9,5 ml de acetona:hexano (3:1), no aplicación de vacío suave tras elución, 1 día de tiempo transcurrido desde la obtención del extracto hasta su inyección cromatográfica, Tª de la columna cromatográfica controlada (25°C)
5	No lavado del material de vidrio con agua destilada y acetona, calentamiento de la muestra con isooctano a 70°C/5 min, 5 min de secado de la columna SPE, elución con 9,5 ml de acetona:hexano (3:1), no aplicación de vacío suave tras elución, 1 día de tiempo transcurrido desde la obtención del extracto hasta su inyección cromatográfica, Tª de la columna cromatográfica no controlada
6	No lavado del material de vidrio con agua destilada y acetona, calentamiento de la muestra con isooctano a 70°C/5 min, 10 min de secado de la columna SPE, elución con 9,5 ml de acetona:hexano (3:1), aplicación de vacío suave tras elución, tiempo transcurrido desde la obtención del extracto hasta su inyección cromatográfica nulo, Tª de la columna cromatográfica controlada (25°C)
7	No lavado del material de vidrio con agua destilada y acetona, calentamiento de la muestra con isooctano a 70°C/7 min, 5 min de secado de la columna SPE, elución con 10 ml de acetona:hexano (3:1), no aplicación de vacío suave tras elución, tiempo transcurrido desde la obtención del extracto hasta su inyección cromatográfica nulo, Tª de la columna cromatográfica controlada (25°C)
8	No lavado del material de vidrio con agua destilada y acetona, calentamiento de la muestra con isooctano a 70°C/7 min, 10 min de secado de la columna SPE, elución con 10 ml de acetona:hexano (3:1), aplicación de vacío suave tras elución, 1 día de tiempo transcurrido desde la obtención del extracto hasta su inyección cromatográfica, Tª de la columna cromatográfica no controlada

Para estudiar cómo influyen los parámetros modificados en la robustez del método, se procedió a realizar 8 determinaciones (una por cada combinación de factores resultante), de muestras de cera contaminadas de forma artificial a una concentración de 10 µg/g, por triplicado.

Una vez realizado el estudio, se analizó el efecto de cada factor comparando las medias de los resultados de las mayúsculas (AA a AG) con las medias de las minúsculas correspondientes (Aa a Ag). Si uno de los factores tiene un efecto, la diferencia será significativamente mayor que las diferencias de los otros factores. Tras comprobar que los resultados se ajustaban a una distribución normal, utilizando un test Kolmogorov-Smirnov, se realizó una prueba t ($\alpha=0,05$), que permite determinar si las diferencias de las recuperaciones medias obtenidas con las mayúsculas son estadísticamente significativas en comparación con las recuperaciones obtenidas con las minúsculas.

Por otra parte, el efecto del conjunto de los factores estudiados se analizó comparando la desviación estándar de las diferencias (S_{Di}) con la desviación estándar del método en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio. Si el valor S_{Di} obtenido es significativamente mayor que la desviación estándar del método hallada en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio expuestas, puede deducirse que el conjunto de los factores influye en el resultado, aunque cada factor aislado no presente una influencia significativa, y que el método no es lo suficientemente robusto frente a las modificaciones escogidas.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Condiciones óptimas de determinación por HPLC

4.1.1. Longitud de onda óptima de cada compuesto

Las longitudes de onda óptimas se muestran en la **Tabla 23**.

Tabla 23. Longitudes de onda óptimas de los diferentes compuestos (nm).

Analito	Longitud de onda óptima (nm)
Terbutilazina	233
Clorfenvinfós	210
Cumafós	210
4,4'-Dibromobenzofenona	272
Bromopropilato	210
Clorpirifós	210
Fluvalinato	210
Flumetrina	210

Diversos autores optan por emplear longitudes de onda diferentes a las empleadas en el presente estudio, con vistas a reducir la presencia de interferencias, aunque disminuyendo, también, la sensibilidad del método. Así, las longitudes de onda 254, 313, 233 y 272 nm, han sido empleadas para fluvalinato, cumafós, bromopropilato y 4,4'-Dibromobenzofenona, respectivamente (Adamczyk *et al.*, 2007; Martel *et al.*, 2002; Korta *et al.*, 2001; Gomis *et al.*, 1996). Cossu *et al.*, (2001), determinan fluvalinato y cumafós a 200 nm. Korta *et al.*, (2001), emplean las longitudes de onda 254 y 272 nm, en el análisis de clorfenvinfós y flumetrina, respectivamente. Gutiérrez Valencia *et al.*, (2011), determinan clorpirifós y clorfenvinfós a 287 y 244 nm, respectivamente.

4.1.2. Gradiente de elución optimizado

Las condiciones cromatográficas que permitieron una mejor resolución de los analitos se muestran en la **Tabla 24**.

Tabla 24. Gradiente de elución optimizado.

TIEMPO (min)	ACETONITRILO (%)	AGUA (%)	FLUJO (ml/min)
0	80	20	0'8
11	80	20	0'8
12	80	20	1
25	100	0	1

4.1.3. Tiempos de retención y orden de elución de los analitos objeto de estudio

Los tiempos de elución definitivos de los diferentes analitos se muestran en la **Tabla 25**.

Tabla 25. Tiempos medios de retención de los compuestos.

Analito	Tiempo medio de retención (min)
Terbutilazina	5,3
Clorfenvinfós	6,3
Cumafós	6,8
4,4'-Dibromobenzofenona	11,2
Bromopropilato	11,6
Clorpirifós	11,9
Fluvalinato	17,5
Flumetrina	20,4

La separación de los picos cromatográficos obtenida con el gradiente optimizado puede observarse en la **Figura 45**.

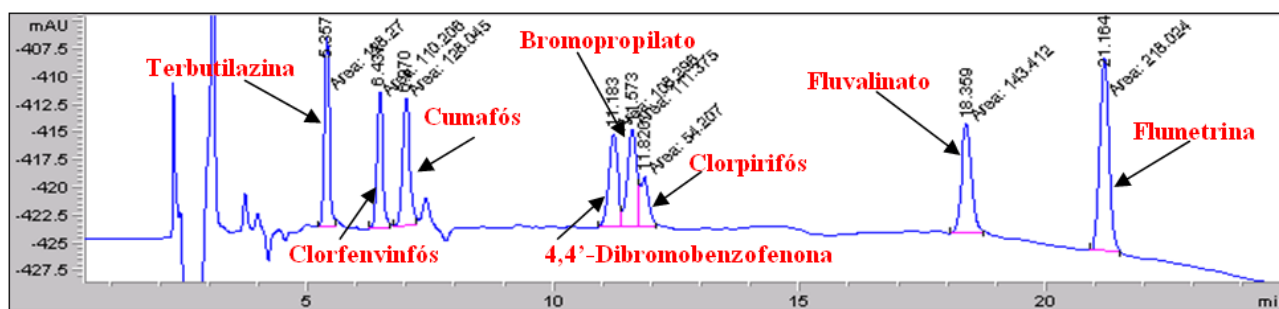


Figura 45. Separación de los compuestos con gradiente optimizado, a 210nm.

4.1.4. Condiciones cromatográficas establecidas

Tras los diversos ensayos realizados con vistas a optimizar la identificación y separación cromatográfica de los analitos de interés, se establecieron los siguientes parámetros:

- Columna empleada: ACE 5 μ m, C18, 250mm x 4,6mm.
- Fase móvil: Acetonitrilo y agua.
- Gradiente de elución:
 - 0 min / 80% ACN-20% H₂O / 0,8ml/min
 - 11 min / 80% ACN-20% H₂O / 0,8ml/min
 - 12 min / 80% ACN-20% H₂O / 1ml/min
 - 25 min / 100% ACN / 1ml/min
- Detector: DAD.
- Volumen inyectado: 50 μ l (loop 20 μ l).
- Longitudes de onda óptimas: 210, 233, 272nm.

Distintos autores, al igual que nosotros, utilizan en sus investigaciones la técnica de determinación por HPLC (Adamczyk *et al.*, 2007; Martel *et al.*, 2002; Korta *et al.*, 2001; Cossu *et al.*, 2001; Gomis *et al.*, 1996).

En cuanto a los solventes empleados como fase móvil, en el presente estudio se ha empleado una mezcla de agua-acetonitrilo, solventes también seleccionados por Adamczyk *et al.* (2007) y Cossu *et al.* (2001), entre otros. Algunos autores destacan la importancia de un pH ácido de la fase móvil para la estabilidad y resolución de los analitos (Martel *et al.*, 2002; Korta *et al.*, 2001), pero en el presente estudio no se ha considerado.

El flujo de la mezcla empleado en cromatografía puede ser isocrático (Martel *et al.*, 2002) o en gradiente, utilizado por Adamczyk *et al.* (2007), Korta *et al.* (2001), Gomis *et al.* (1996), entre otros, y también en el presente trabajo.

En lo que respecta a la fase estacionaria en HPLC, la columna de C₁₈ de 250 mm de longitud, 4,6 mm de grosor y 5 µm de diámetro de partícula de relleno, es la utilizada en nuestra metodología y en la mayoría de las descritas en la literatura.

Finalmente, entre los detectores más usados para determinar residuos de acaricidas en cera o miel, está el detector de barrido de espectros (DAD), empleado en este estudio y, también, por otros autores como Adamczyk *et al.* (2007), Martel *et al.* (2002), Korta *et al.* (2001) y Gomis *et al.* (1996).

4.2. Condiciones óptimas de extracción y purificación (SPE)

4.2.1. Recuperación de los analitos tras los distintos ensayos

En la **Tabla 26** se muestran los resultados de recuperación de los distintos ensayos de extracción realizados. Como la Decisión 657/2002/CE establece entre 80-110% la recuperación aceptable, fue el ensayo nº8 el que se escogió para el estudio de validación posterior.

Tabla 26. Resultados de recuperación (%) de los ensayos de extracción.

Analito	RECUPERACIÓN (%)										
	Cera contaminada a 1µg/g				Cera contaminada a 10µg/g						
	Ensayo 1°	Ens 2°	Ens 3°	Ens 4°	Ens 5°	Ens 6°	Ens 7°	Ens 8°	Ens 9°	Ens 10°	Ens 11°
Clorfenvinfós	86	79	106	53	-	-	115	110	67	130	157
Cumafós	67	45	121	26	79	74	64	83	56	69	76
Bromopropilato	59	18	95	16	76	74	78	91	57	60	73
Fluvalinato	70	46	91	20	56	46	68	83	48	46	52
Flumetrina	63	27	88	14	73	67	79	91	55	55	67
Observaciones			Interferencias					Mejor opción			

4.2.2. Método analítico optimizado

El método de análisis de residuos de clorfenvinfós, cumafós, bromopropilato, fluvalinato y flumetrina en cera se basa en una preparación y extracción líquido-líquido de la muestra seguida de una purificación en fase sólida del extracto obtenido. Por último, se determinan los compuestos de interés por HPLC-DAD. El método propuesto se esquematiza en la **Tabla 27**.

Tabla 27. Resumen del método analítico propuesto.

1° PREPARACIÓN CERA	Método PROPUESTO
Matriz	Cera farmacéutica blanqueada contaminada
Extracción con solvente	0,2g de cera (sin preparación previa) en tubo. Añadir 10ml isooctano. Calentamiento 70°C, 5min en baño. Centrifugar en frío (3800rpm, 25min, 0°C) Recoger sobrenadante en tubo de vidrio. Repetir dos veces más añadiendo 6ml isooctano y centrifugando 15min, y unir sobrenadantes (3 por muestra).
2° SPE	
Adsorbente	Florisil (1g)
Acondicionamiento de la columna SPE	20ml hexano
Carga de muestra	El extracto de isooctano se pasa a través de la columna
Lavado	10ml hexano
Secado columna	Vacío 5 min. Se descarta. Se cambia la guía
Elución	10ml acetona/hexano (3:1)
Concentración	Se evapora con corriente nitrógeno hasta sequedad. Añadir acetona: hexano (3:1) en exceso para arrastrar. Redissolver añadiendo 1ml de acetonitrilo. Rotatubos. Sobrenadante a vial sin filtrar. Almacenamiento en viales a -18°C Se inyecta en HPLC después de agitar el vial y sin esperar decantación
3° HPLC	
Columna	ACE 5µm, C18, 250mm x 4,6mm.
Fase móvil	Acetonitrilo y agua
Gradiente elución	0 min / 80% ACN-20% H ₂ O / flujo fase móvil 0,8ml/min 11 min / 80% ACN-20% H ₂ O / flujo fase móvil 0,8ml/min 12 min / 80% ACN-20% H ₂ O / flujo fase móvil 1ml/min 25 min / 100% ACN / flujo fase móvil 1ml/min
Detector	Diode Array (DAD)
Volumen inyectado	50µl (loop de 20 µl)
Longitudes de onda	210nm

4.3. Validación del método analítico

4.3.1. Resultados del estudio de especificidad

En la **Figura 46** puede observarse cómo, tras aplicar a muestras de cera el método analítico previamente optimizado, existe en la matriz algún pico que puede inducir a confusión con los analitos. No obstante, teniendo en cuenta, en primer lugar, que los picos interferentes presentan áreas reducidas y, en segundo lugar, que los analitos de interés se han identificado con éxito (ver **Tabla 28**) y se han confirmado mediante sus espectros de absorción, podemos considerar que la identificación de éstos no se ve dificultada por la presencia de interferencias.

Por otro lado, la cuantificación de los analitos no se ha visto dificultada por la presencia de interferencias coincidentes en tiempo de retención debido a que, en el estudio de recuperación, se han comparado medidas de área que incluían la interferencia, anulándose, por tanto, el efecto aditivo.

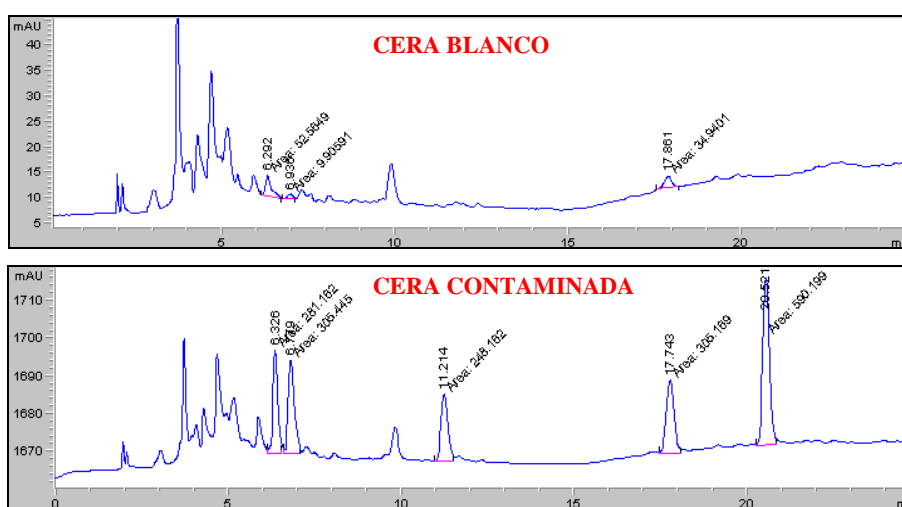


Figura 46. Cromatogramas de cera libre de impurezas (blanco) y cera contaminada artificialmente con los analitos de interés.

Cabe destacar que el coeficiente de variación de los tiempos de retención de los analitos no ha sido superior al 2,5% (**Tabla 28**).

Tabla 28. Tiempos medios de retención de los compuestos y coeficientes de variación ($n=9$).

Analito	Tiempo medio de retención (min)	Coefficiente de variación (%)
Clorfenvinfós	6,3	0,65
Cumafós	6,8	0,88
Bromopropilato	11,1	1,18
Fluvalinato	17,7	1,56
Flumetrina	20,4	1,10

Puede afirmarse, por tanto, que el método optimizado en este estudio distingue entre los analitos y otras sustancias presentes en las condiciones experimentales, es decir, es específico para la determinación de los contaminantes estudiados.

4.3.2. Resultados del estudio de sensibilidad

La **Tabla 29** muestra los intervalos dinámico y lineal de concentraciones, así como los límites de detección y cuantificación establecidos para cada compuesto

Tabla 29. Rango dinámico y lineal en acetonitrilo.

Analito	Rango dinámico (µg/ml)	Rango lineal (µg/ml)	LOD (ng/g cera)	LOQ (ng/g cera)
Clorfenvinfós	0,075-10	0,075-10	375	375
Cumafós	0,06-10	0,06-10	300	300
Bromopropilato	0,05-10	0,05-10	250	250
Fluvalinato	0,05-10	0,06-10	250	300
Flumetrina	0,02-10	0,02-10	100	100

Los resultados del rango dinámico y lineal con efecto matriz se muestran en la **Tabla 30**.

Tabla 30. Rango dinámico y lineal con efecto matriz.

Analito	Rango dinámico (µg/ml)	Rango lineal (µg/ml)	LOD (ng/g cera)	LOQ (ng/g cera)
Clorfenvinfós	0,075-10	0,075-10	375	375
Cumafós	0,06-10	0,075-10	300	375
Bromopropilato	0,05-10	0,05-10	250	250
Fluvalinato	0,05-10	0,075-10	250	375
Flumetrina	0,03-10	0,03-10	150	150

Comparando los resultados de la **Tabla 30** con los de la **Tabla 29**, podemos observar que hay diferencias en algunos casos. De hecho, el efecto matriz ha hecho que aumente ligeramente el LOQ en el caso de cumafós y fluvalinato, aumentando el LOD y el LOQ en el caso de la flumetrina.

A continuación, en las **Figuras 47-51**, se presenta gráficamente el rango dinámico, el rango lineal (encuadrado en rojo) y la recta de regresión obtenidos para cada uno de los compuestos estudiados, con efecto matriz.

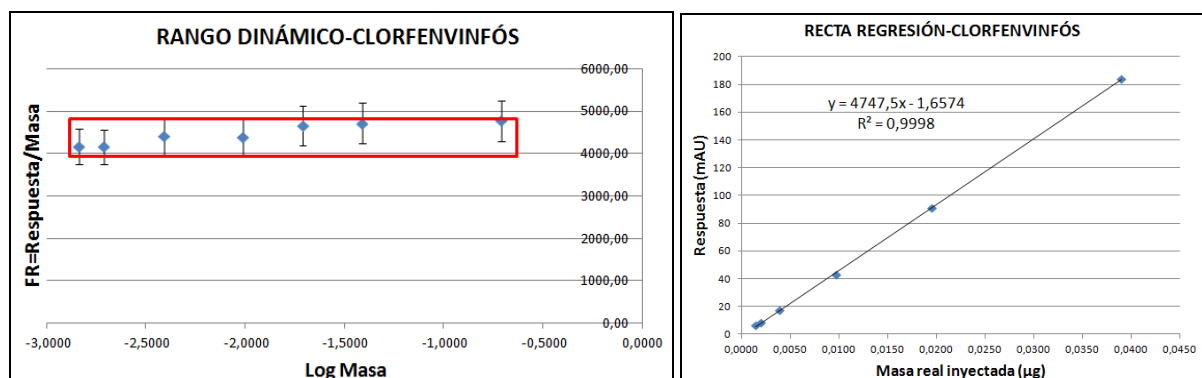


Figura 47. Rango dinámico (izquierda) y recta de regresión (derecha) obtenidos para el clorfenvinfós.

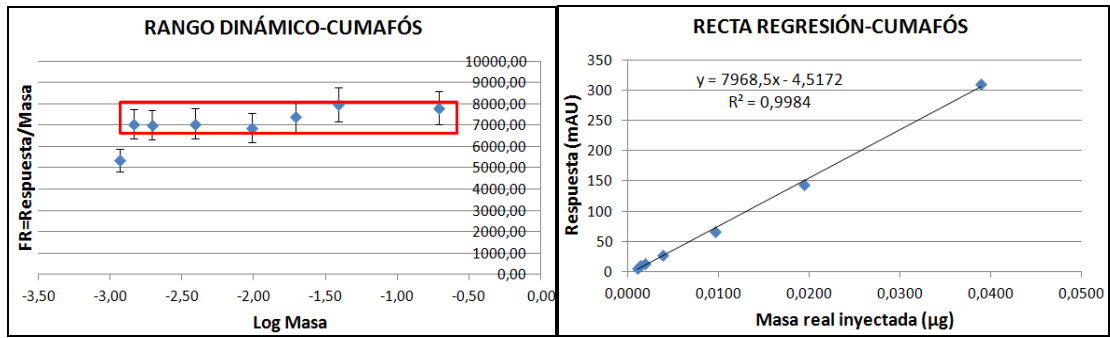


Figura 48. Rango dinámico (izquierda) y recta de regresión (derecha) obtenidos para el cumafós.

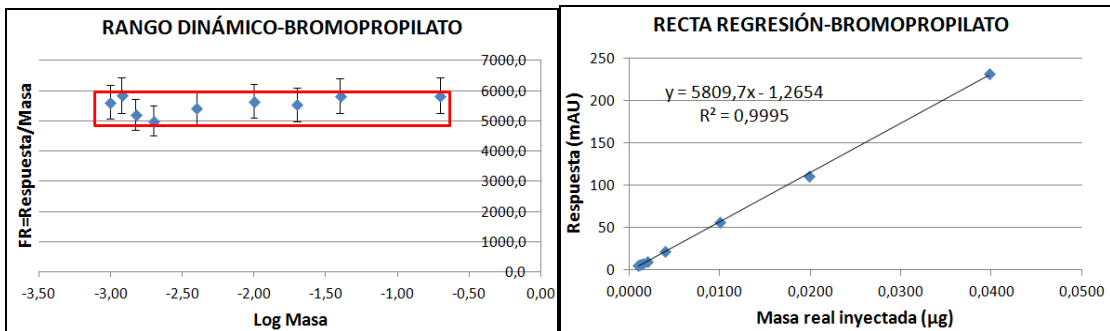


Figura 49. Rango dinámico (izquierda) y recta de regresión (derecha) obtenidos para el bromopropilato.

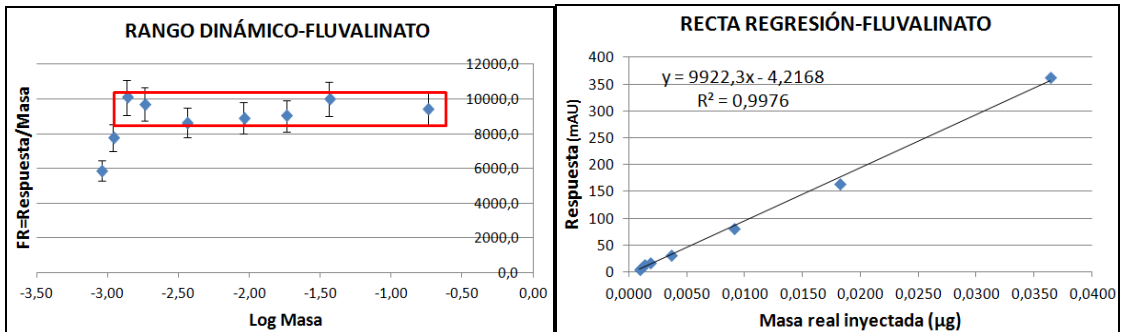


Figura 50. Rango dinámico (izquierda) y recta de regresión (derecha) obtenidos para el fluvalinato.

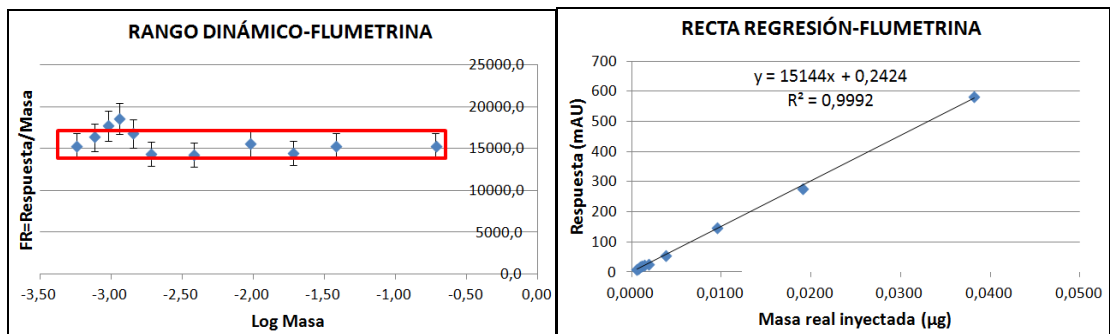


Figura 51. Rango dinámico (izquierda) y recta de regresión (derecha) obtenidos para la flumetrina.

La cromatografía líquida de alta resolución, técnica empleada en el presente trabajo, es muy poco habitual para la determinación de acaricidas en cera (Adamczyk *et al.*, 2007; Martel *et al.*, 2007), siendo la cromatografía gaseosa la técnica más empleada para ello (Lodesani *et al.*, 2008; Jiménez *et al.*, 2004; Persano *et al.*, 2003; Korta *et al.*, 2003; Frison *et al.*, 1999).

Los resultados del estudio de sensibilidad obtenidos en el presente trabajo (LOD comprendidos entre 150-375 ng/g cera) son similares a los obtenidos por Adamczyk *et al.* (2007), que determinaron cumafós, bromopropilato y fluvalinato en cera mediante HPLC-DAD (LOD comprendidos entre 100-200 ng/g cera).

Los resultados de sensibilidad obtenidos por otros autores (Lodesani *et al.*, 2008; Jiménez *et al.*, 2004; Persano *et al.*, 2003; Korta *et al.*, 2003) que emplean la cromatografía gaseosa (acoplada a espectrometría de masas, en muchos casos) como técnica de determinación de acaricidas en cera, son mejores que los obtenidos en el presente trabajo, estando los LOD comprendidos entre 5-50 ng/g cera, para los diversos analitos de interés.

Se puede concluir que, a pesar de que la sensibilidad de nuestro método es inferior a la de otros autores, nuestra técnica SPE/HPLC-DAD es más sencilla y económica que la cromatografía gaseosa (GC) y de sensibilidad aceptable.

4.3.3. Resultados del estudio de exactitud (recuperación y precisión)

Los resultados del estudio de recuperación y precisión de los compuestos de interés se incluyen en la **Tabla 31**.

Tabla 31. Resultados del estudio de exactitud.

Analito	Recuperación (%)	Repetibilidad (%CV)	Reproducibilidad (%CV)
Clorfenvinfós	94,2	4,8	5,0
Cumafós	89,6	2,3	4,4
Bromopropilato	91,2	4,0	4,9
Fluvalinato	83,3	3,1	4,6
Flumetrina	94,5	4,8	5,5

En la **Tabla 31** puede observarse que con el método optimizado se han obtenido resultados de recuperación comprendidos en el intervalo establecido por la Decisión 2002/657/CE (80-110%, para el nivel de contaminación de 10 µg/g) y por la AOAC (80-115%).

Por otro lado, en lo que respecta a la precisión del método, en la **Tabla 31** puede observarse que, en condiciones de repetibilidad, los CV intralaboratorios presentan valores inferiores a los previamente calculados según criterio de la Decisión 2002/657/CE (5,6-7,5%, ver punto 3.3.3.3.2.), lo que significa que el método optimizado es repetitivo.

En la **Tabla 31** observamos, además, que, en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio, los CV intralaboratorio no son superiores a los CV de reproducibilidad interlaboratorio (previamente calculado mediante la ecuación de Horwitz para un nivel de enriquecimiento de 10 µg/g, siendo 11,3%), lo que supone que el método optimizado es reproducible.

Cabe destacar, también, que nuestro método se ajusta bien a los criterios de precisión establecidos por la AOAC para los métodos analíticos, en cuanto a repetibilidad (para un nivel de enriquecimiento de 10 µg/g, el CV debe ser inferior al 6%) y reproducibilidad (CV debe ser inferior al 11%).

Debido a la escasez, en la literatura científica, de estudios sobre metodología analítica en cera de abejas y de datos referentes a parámetros de validación, los resultados obtenidos en este trabajo difícilmente pueden ser comparados con los de otros autores.

No obstante, los valores de recuperación y precisión (repetibilidad y reproducibilidad) obtenidos en el presente estudio son similares a los obtenidos por otros investigadores. Así, Adamczyk *et al.* (2007), que validaron su metodología analítica para el análisis de residuos de fluvalinato, cumafós, bromopropilato y 4,4'-dibromobenzofenona en cera de abejas, obtuvieron unos porcentajes de recuperación entre 70-110%, siendo las desviaciones estándares relativas de la repetibilidad y reproducibilidad del método inferiores al 15 y 31%, respectivamente.

Otros autores, si bien no realizan una validación completa, han llevado a cabo estudios de exactitud de métodos analíticos para la determinación de alguno de los acaricidas estudiados en el presente trabajo, en miel.

Por ejemplo, Martel *et al.* (2002) para fluvalinato, cumafós y bromopropilato mediante HPLC-LLE (extracción líquido-líquido), obtuvieron unas recuperaciones entre 86-103%. Cossu *et al.* (2001) obtuvieron, mediante HPLC-SPE, unas recuperaciones medias de 83 y 101% para cumafós y fluvalinato, respectivamente, siendo la desviación estándar relativa de la repetibilidad del método inferior al 2%. Korta *et al.* (2001) obtuvieron, mediante HPLC-SPE, unas recuperaciones medias de 84, 76, 69, 63, 68 y 71% para clorfenvinfós, cumafós, bromopropilato, 4,4'-dibromobenzofenona, fluvalinato y flumetrina, respectivamente, siendo la desviación estándar relativa de la repetibilidad del método inferior al 8%.

4.3.4. Resultados del estudio de robustez

Los resultados de recuperación media de los compuestos de interés obtenidos en el estudio de robustez se incluyen en la **Tabla 32**.

Tabla 32. Recuperaciones medias obtenidas para cada analito en el estudio de robustez, según el método de Youden.

Analito	Recuperación media (%) para cada combinación							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Clorfenvinfós	98,84	96,38	98,59	91,44	101,02	79,12	93,98	100,56
Cumafós	91,64	83,90	91,17	85,56	92,04	91,22	84,20	89,56
Bromopropilato	91,19	89,55	96,71	88,00	90,83	93,87	92,39	89,31
Fluvalinato	86,82	74,81	78,75	80,32	88,03	84,39	77,33	86,92
Flumetrina	89,25	91,57	96,03	87,92	98,62	92,38	88,99	91,98

En la **Tabla 33** se incluyen los valores p obtenidos en el análisis estadístico tras la aplicación de la prueba t para cada factor estudiado y cada compuesto objeto de estudio. Los valores inferiores a 0,05 (marcados con asterisco) indican que el factor en cuestión puede tener una influencia significativa en el resultado.

Tabla 33. Estudio de robustez. Aplicación de la prueba t.

Analito \ Factor	A	B	C	D	E	F	G	S _{Di}	SR
Clorfenvinfós	0,64	0,69	0,25	0,38	0,80	0,27	0,10	6,01	5,00
Cumafós	0,67	0,44	0,42	0,32	0,06	0,44	0,72	3,51	4,37
Bromopropilato	0,92	0,91	0,21	0,42	0,22	0,10	0,91	2,80	4,97
Fluvalinato	0,29	0,49	0,78	0,72	0,28	0,05	0,98	5,02	4,65
Flumetrina	0,53	0,55	0,42	0,23	0,83	0,92	0,04*	3,66	5,52

*Valores < 0,05

S_{Di}: desviación estándar de las diferencias; SR: desviación estándar en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio.

Como puede observarse en la **Tabla 33**, de los 35 resultados obtenidos, sólo uno de ellos, correspondiente a la variable T^a de la columna cromatográfica (factor G) en la flumetrina, muestra un valor p significativo. De esto se puede deducir que con el método analítico utilizado, con determinación por HPLC, la temperatura de la columna cromatográfica es un factor que puede influir en los resultados cuantitativos para la flumetrina. Por lo tanto, la temperatura de la columna debe mantenerse siempre constante siempre que se incluya en el estudio el análisis de este compuesto. No se han encontrado estudios de otros autores, respecto a la influencia de este factor en el método analítico, con los que contrastar los resultados del presente estudio.

En la **Tabla 33** puede comprobarse que el valor de S_{Di} obtenido para cumafós, bromopropilato y flumetrina es inferior al de la desviación estándar hallada en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio (SR), mientras que la S_{Di} para el clorfenvinfós y el fluvalinato no es significativamente mayor ($\alpha=5\%$) que la SR. Por lo tanto, puede concluirse que el conjunto de los 7 factores elegidos no influye en el resultado y, por consiguiente, el método es suficientemente robusto frente a las condiciones seleccionadas.

La realización de estudios completos de robustez es algo poco común en la literatura científica y, de hecho, no se han encontrado estudios de este tipo que se centren en el análisis de los contaminantes estudiados en cera, siendo muy escasos en el caso de otras matrices alimentarias.



5. CONCLUSIONES

Primera

Se ha puesto a punto y validado, con buenos resultados, un método analítico multirresiduo mediante SPE/HPLC-DAD de los principales acaricidas de síntesis que pueden contaminar la cera de abejas: fluvalinato, flumetrina, cumafós, bromopropilato y clorfenvinfós.

Segunda

Se han conseguido optimizar las condiciones cromatográficas por HPLC-DAD para la determinación (identificación y cuantificación) de estos compuestos de interés, completándose el estudio con los compuestos 4,4'-dibromobenzofenona (metabolito del bromopropialto), clorpirifós y terbutilazina, utilizados los dos últimos habitualmente en agricultura como insecticidas y herbicidas, y que pueden contaminar la cera de abejas a través de una vía medioambiental.

Tercera

La metodología analítica optimizada es capaz de proporcionar resultados satisfactorios en el análisis rutinario del conjunto de acaricidas estudiados en cera de abejas, siguiendo las directrices exigibles en la Decisión 2002/657/CE para validar métodos analíticos, cumpliendo con los criterios de especificidad, sensibilidad, exactitud y robustez establecidos a nivel internacional.

Cuarta

Se han conseguido buenos resultados de recuperación, repetibilidad y reproducibilidad, así como optimizar la sensibilidad del método analítico puesto a punto en nuestro laboratorio, siendo éste más sencillo y económico que otros métodos publicados en la literatura científica para el análisis de estos compuestos.

Quinta

Este trabajo aborda, por primera vez, un estudio completo de robustez de un método analítico para acaricidas de síntesis en cera de abejas. En este estudio se ha demostrado que el método es suficientemente robusto frente a las condiciones seleccionadas, sin embargo la temperatura de la columna cromatográfica es un factor que puede influir en los resultados cuantitativos para la flumetrina.

Sexta

El presente trabajo sienta la base a futuros estudios sobre análisis multirresiduo de pesticidas que pueden contaminar la cera de abeja, bien por uso apícola o por tratamientos fitosanitarios, y con ello contribuir al proceso de evaluación del riesgo e instar a las autoridades sanitarias a que establezcan Límites Máximos de Residuos para esta matriz tan poco estudiada.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ADAMCZYK S., LÁZARO R., PÉREZ-ARQUILLUÉ C., HERRERA A. (2007). Determination of synthetic acaricides residues in beeswax by high-performance liquid chromatography with photodiode array detector. *Analytica Chimica Acta* 581, pp.95–101.
- ADAMCZYK S., LÁZARO R., PÉREZ-ARQUILLUÉ C., BAYARRI S., HERRERA A. (2010). Impact of the use of fluvalinate on different types of beeswax from Spanish hives. *Arch Environ Contam Toxicol* 58, pp. 733-739.
- AOAC (2002). Requirements for Single Laboratory Validation of Chemical Methods. DRAFT 2002-11-07.
- BERNAL J, GARRIDO-BAILÓN E., DEL NOZAL M.J., GÓNZALEZ-PORTO A.V., MARTÍN-HERNÁNDEZ R., DIEGO J.C, JIMÉNEZ J.J, BERNAL J.L., HIGES M. (2010). Overview of pesticide residues in stored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain. *Journal Econ. Entomology* 103, pp. 1964-1971.
- BOGDANOV S., KILCHENMANN V., IMDORF A. (1997). Acaricide residues in beeswax and honey. In A. Mizarhi & Y.Lensky, *Bee products properties, applications, apitherapy*, New York: Plenum Press, 239-246.
- BOGDANOV S., IMDORF A., KILCHENMANN V. (1998). Acaricide residues in some bee products. *Journal of Apicultural Research* 37, 2, 57-67.
- BOGDANOV S. (2004). Beeswax: quality issues today. *Bee World* 85, 3, 46-50.
- BOGDANOV S. (2006). Contaminants of bee products. *Apidologie* 37, pp.1-18.
- CHAUZAT M. P. (2007). Pesticide residues in beeswax samples collected from honey bee colonies (*Apis Mellifera L.*) in France. *Pest Management Science* 63, pp. 1100-1106.
- CHAUZAT M-P., CARPENTIER P., MARTEL A-C., BOUGEARD S., COUGOULE N., PORTA P., LACHAIZE J., MADEC F., AUBERT M., FAUCON J-P. (2009). Influence of pesticide residues on honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony health in France. *Environmental Entomology* 38, pp. 514-523.
- CORREDEIRA L., BAYARRI S., PÉREZ-ARQUILLUÉ C., LÁZARO R., MOLINO F., HERRERA A. (2011). Multiresidue Determination of Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Honey by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Food Protection*, Vol. 74, No. 10, 2011, pp. 1692–1699.
- COSSU M., ALAMANNI M. C., SCANO F. (2001). Uso del metodo SPE-HPLC per la ricerca di residui di acaricidi sintetici e naturali in una indagine sulla qualità dei mieli prodotti in Sardegna. *La Rivista di Scienza dell' Alimentazione*, anno 30, nº 2, pp. 125-132.
- DECISIÓN DE LA COMISIÓN de 12 de Agosto del 2002 (657/2002/CE), por la que se aplica la directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados.
- EFSA (2011). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance terbutylazine. *EFSA Journal* 2011; 9(1):1969.
- EMEA (1995). Tau Fluvalinate Summary Report. Committee for veterinary medicinal products. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Veterinary Medicines Evaluation Unit. www.emea.eu.int.
- EMEA (1998). Flumethrin Summary Report (1).
- EMEA (2000). Flumethrin Summary Report (2).
- EMEA. (2001). Coumaphos Summary report.
- EPA (2010). Tau-fluvalinate Summary Document Registration Review.

- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1990). Coumaphos (51). 29-61. www.fao.org.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1993). Bromopropylate (70). 29-61. www.fao.org.
- FELL, R. D., TIGNOR K. (2001). Miticide effects on the reproductive physiology of queens and drones. *Am.Bee.J* 28, pp.134-139.
- FERNÁNDEZ M., PICÓ Y., MAÑES J. (2002). Analytical Methods for Pesticide Residue Determination in Bee Products. *J. Food Protec.* 65, 9, pp.1502-1511.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), (1994). "Pesticide Analytical Manual. Volume I. Methods which detect multiple residues". U. S. Department of Health and Human Services. 3rd edition.
- FRAZIER M., MULLIN C., FRAZIER J., ASHCRAFT S. (2008). What have pesticides got to do with it?. *American Bee Journal*, june.
- FRIES I., WALLNER K., ROSENKRANZ P. (1998). Effects on *Varroa jacobsoni* from acaricides in beeswax, *Journal of Apicultural Research* 37, 2, 85-90.
- FRISON S., BREITKREITZ W., ROBERT CURRIE R., NELSON D., SPORNS P. (1999). The analysis of fluvalinate in beeswax using GC/MS. *Food Research International* 32, pp. 35-41.
- GÓMEZ PAJUELO A. (1994). La cera de abejas y su recuperación. *Vida Apícola* 63, 20-24.
- GÓMEZ PAJUELO A. (2005). Seguridad alimentaria y medicamentos veterinarios en apicultura (I). *Vida Apícola* 133, 51-58.
- GOMIS D.B., MANGAS J.J., CASTAÑO A., GUTIÉRREZ M.D. (1996). Determination of acaricides in honey by liquid chromatography with ordinary, narrowbore, and microbore columns. *Anal.Chem.*68, 3867-3870.
- GUTIÉRREZ VALENCIA T., GARCÍA DE LLASERA M. (2011). Determination of organophosphorus pesticides in bovine tissue by an on-line coupled matrix solid-phase dispersion-solid phase extraction-high performance liquid chromatography with diode array detection method. *Journal of Chromatography A*. 1218, pp. 6869-6877.
- [HTTP://WWW.ATSDR.CDC.GOV/SPL/index.html](http://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html). Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- [HTTP://WWW.CODEXALIMENTARIUS.NET/gsfaonline/index.html?lang=es](http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/index.html?lang=es).
- [HTTP:// EC.EUROPA.EU/sanco_pesticides/public/index.cfm](http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm).
- [HTTP://WWW.PMRA-ARLA.GC.CA](http://www.pmra-arla.gc.ca). Health Canada Pest Management Regulatory Agency, November 2008.
- [HTTP://WWW.MAGRAMA.GOB.ES/ES/agricultura/temas/medios de produccion/productos-fitosanitarios/fitos.asp](http://www.magrama.gob.es/ES/agricultura/temas/medios_de_produccion/productos-fitosanitarios/fitos.asp).
- JIMÉNEZ J.J., BERNAL J.L., NOZAL M.J., ALONSO C. (2004a). Liquid-liquid extraction follows by solid-phase extraction for the determination of lipophilic pesticides in beeswax by gas chromatography-electron-capture detection and matrix-matched calibration. *Journal of Chromatography A*, 1048, 89-97.
- JIMÉNEZ J.J., BERNAL J.L., NOZAL M.J., ALONSO C. (2004b) Extraction and cleanup methods for determination of amitraz total residues in beeswax by gas chromatography with electron capture detection. *Analytical Chimica Acta* 524, 271-278.
- JIMÉNEZ J.J., BERNAL J.L., NOZAL M.J., MARTÍN M.T. (2005). Residues of organic contaminants in beeswax. *Eu. J. Lipid Sci. Technol.* 107, 896-902.

- KLEIN, E., WEBER, W., HURLER, E., MAYER, L. (1986). "Gaschromatographische Bestimmung von Isopropyl-4,4-dibrombenzilat (Brompropylat), 4,4-Dibromobenzophenon und verschiedenen Akariziden in Honig und Warbenwachs". Deutsche Lebensmittel-Rundschau 82, 6, pp. 185-187.
- KOCHANSKY J., WILZER K. AND FELDLAUFER M. (2001) Comparison of the transfer of coumaphos from beeswax into syrup and honey. *Apidologie* 32, pp.119-125.
- KORTA E., BAKKALI A., BARRANCO A., BERRUETA L.A., GALLO B., VICENTE F., BOGDANOV S. (2000). Study of the degradation products of bromopropylate, chlordimeform, coumaphos, cymiazole, flumethrin and tau-fluvalinate in aqueous media. *Talanta*, 52, pp.169-180.
- KORTA E., BAKKALI A., BERRUETA L.A., GALLO B., VICENTE F. (2001). Study of semi-automated solid-phase extraction for the determination of acaricide residues in honey by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 930, pp.21-29.
- KORTA E., BAKKALI A., BERRUETA L.A., GALLO B., VICENTE F., KILCHENMANN, BOGDANOV S. (2003). Determination of amitraz and other acaricide residues in beeswax. *Analytical Chimica Acta* 475, 97-103.
- KUJAWSKI M., NAMIESNIK J. (2011). Levels of 13 multi-class pesticide residues in Polish honeys determined by LC-ESI-MS/MS. *Food Control* 22, pp. 914-919.
- LODESANI M., PELLACANI A., BERGOMI S., CARPANA E., RABITTI T., LASAGNI P. (1992). Residue determination for some products used against *Varroa* infestation in bees. *Apidologie* 23, 257-272.
- LODESANI M., COSTA C., BIGLIARDI M., SERRA G., COLOMBO R., SABATINI A.N. (2007). Acaricide residues in beeswax after conversion to organic beekeeping methods. *Apidologie* 39, 324-333.
- MARTEL A-C., ZEGGANE S. (2002). Determination of acaricides in honey by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Journal of Chromatography A*, 954, pp.173-180.
- MARTEL A-C., ZEGGANE S., AURIÈRES C., DRAJNUDEL P., FAUCON J-P., AUBERT M. (2007). Acaricide residues in honey and wax after treatment of honey bee colonies with Apivar^R or Asuntol^R 50. *Apidologie* 38, 534-544.
- MENKISSOGLU-SPIROUDI U., TSIGOURI A.D., DIAMANTIDIS G.C., THRASYVOULOU A.T., (2001). Residues in honey and beeswax caused by beekeeping treatments, *Fresenius Environmental Bulletin* 10, 5, 445-450.
- MILANI N. (1999). The resistance of *Varroa Jacobsoni* Oud. to acaricides. *Apidologie* 30, pp.229-234.
- PERSANO L., PULCINI P., MORGIA C., MARINELLI E., ALLEGRINI F., DE PACE F., RICCI L. (2003). Acaricide residues in wax: research in Central Italy. *Proceeding of XXXVII Congress Apimondia Ljubliana 2003*.1-3.
- REAL DECRETO 142/2002, de 1 de febrero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización.
- REAL DECRETO 608/2006, de 19 de mayo, por el que se establece y regula un programa nacional de lucha y control de las enfermedades de las abejas de la miel.
- REAL DECRETO 617/2007, de 16 de mayo, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación.
- REAL DECRETO 1466/2009, de 18 de septiembre, por el que se establecen las normas de identidad y pureza de los aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes utilizados en los productos alimenticios.

- REGLAMENTO (CE) 2377/90 del Consejo, de 26 de junio, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal.
- REGLAMENTO (CE) 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de febrero, relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CE del Consejo.
- REGLAMENTO (CE) 1107/2009 del Parlamento y del Consejo, de 21 de octubre, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios y por el que se derogan las Directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE del Consejo.
- REGLAMENTO (UE) N° 37/2010 de la Comisión, de 22 de diciembre de 2009, relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. Sustancias autorizadas.
- REGLAMENTO (UE) 310/2011 de la Comisión, de 28 de marzo, que modifica los anexos II y III del Reglamento (CE) 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de aldicarb, bromopropilato, clorfenvinfos, endosulfán, EPTC, etión, fentión, fomesafeno, metabenzotiazurón, metidatión, simacina, tetradifón y triforina en determinados productos.
- RINDERER T. E., DE GUZMAN L.I, LANCASTER V.A, DELATIE G.T., STELZER A. (1999). Varroa in the mating yard: I. The effects of Varroa Jacobsoni and Apistan drone honey bees. *Am. Bee J.* 28, pp. 134-139.
- RITIER W. (2001). Enfermedades de las abejas. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza (España).
- ROSENKRANZ P., AUMEIER P., ZIEGELMANN B. (2010). Biology and control of Varroa destructor. *Journal of Invertebrate Pathology* 103, pp. 96-119.
- SERRA J., CAÑAS S., GÓMEZ PAJUELO A. (1989). Características físico-químicas de la cera de abejas producida en España. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 213-216.
- SIEDE, R., KONIG, M., BÜCHLER, R., FAILING, K., THIEL, H.J., (2008). A real-time PCR based survey on acute bee paralysis virus in German bee colonies. *Apidologie* 39, 650-661.
- SLABEZKI Y., GAL H., LENSKY Y. (1991). The effect of fluvalinate application in bee colonies on population levels of Varroa jacobsoni and honey bees (*Apis mellifera* L.) and on residuos in honey and wax. *Bee Science* 1, 4, 189-195.
- SZERLETICS-TÚRI M. (1999A). Determination and control of bee-acaricide flumethrin in honey and beeswax. *Acta Alimentaria* 28, 1, 85-94.
- THRASYVOULOU A.T., PAPPAS, N. (1988). Contamination of honey and wax with malathion and coumaphos used against the varroa mite. *Journal of Apicultural Research* 27, 1, 55-61.
- TSIGOURI A., MENKISSOGLU-SPIROUDI U., THRASYVOULOU A., DIAMANTIDIS G., (2003). Fluvalinate residues in Greek honey and beeswax. *Apiacta* 38, 50-53.
- TULLOCH A.P. (1980). Beeswax-Composition and analysis. *Bee World* 61, 2, 47-62.
- VAN BUREN N., MARIEN J., VELTHUIS H.H.W., OUDEJANS R.C.H.M. (1992). Residues in beeswax and honey of Perizin, an acaricide to combat the mite Varroa Jacobsoni Oudemans (Acari: Mesostigmata). *Environ. Entmol.* 21, pp. 860-865.
- WALLNER K. (1992) Diffusion of active varroacide constituents from beeswax into honey. *Apidologie* 23, pp. 387-389.
- WALLNER K. (1999). Varroacides and their residues in bee products, *Apidologie* 30, 235-248.
- WHO (2009). Technical Report Series, N° 954. Evaluation of certain veterinary drug residues in food.

WHO (2011) The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification. International Programme on Chemical Safety (IPCS).

ZIMMERMANN S., GIERSCHNER K.H., VORWOHL G. (1993). Bestimmung von Brompropylat, 4,4'-Dibrombenzophenon, Coumaphos und Fluvalinat in Bienenwachs. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 89, 11, 341-343.