

76149

LEON GALLON, LINA MARCELA

Análisis de unidades de producción en el rol de algunas aves insectívoras de la selva

2017 **76149**

04197



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y
NATURALES

Tesis para acceder al título de Doctor
en Ciencias Químicas

**ANALISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN MIEL DE ABEJAS
COMO INDICADORES DE SU CALIDAD Y DE CONTAMINACION
AMBIENTAL**

Química Lina Marcela León Gallón

DIRECTOR: Dr. Juan Miguel Marioli

CODIRECTORA: Dra. Marcela Beatriz Moressi


04187

Río Cuarto, Mayo 2017


70149

MFN:
Clasif:
T-1105

COMISIÓN ASESORA Y JURADO

Nombre y Apellido: Stella M. Checchia Lugar de trabajo: UNRC
Firma:  Aclaración:

Nombre y Apellido: Lugar de trabajo:
Firma: Aclaración:

Nombre y Apellido:  Lugar de trabajo: UNRC
Firma: Edgardo Duranti Aclaración:

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha:

Calificación:

*A mi familia, a
mi madre y a
mi hermana.*

Agradecimientos

Creo que no alcanzaría una sola hoja para agradecer desde lo más profundo de mi ser nombrando uno por uno a las personas que me han apoyado de una manera u otra a que este día se haga realidad. Es una meta en la que hoy me llevo los elogios, los aplausos, las risas, los saludos, los besos y uno que otro obsequio que tambien aprovecho esta hoja para agradecerlo porque son los detalles que enamoran y que algún día en algun lugar del mundo recordaré.

La experiencia que he vivido durante estos cinco años va mucho mas allá de haber escrito este libro, que sinceramente no fue facil, pero tampoco fue imposible, por algo están plasmadas estas letras e impresas; porque fue la última hoja que escribí.

Quiero agradecerle a la vida por darme la oportunidad de realizar esta larga estancia en este maravilloso país que me abrió las puertas sin preguntas y con muchas respuestas.

Agradecer a mi familia que siempre me apoyó desde la distancia y me esperó y aún me esperan, siempre con los brazos abiertos, con las más sinceras sonrisas y el cariño y el amor que sólo te puede dar la familia.

A mi madre y a mi hermana que son el soporte más grande que tengo, la contención que me brindan desde la distancia es única, y son ellas el motor de mi vida. A mi madre que es una luchadora de la vida y una mujer maravillosa al igual que mi hermana, la vida no me pudo premiar de una mejor manera.

A mis tías hermanas que siempre han estado apoyandome, guiandome, y celebrando cada logro de mi vida conmigo, las amo con mi vida.

A mis amigos de la vida que me enseñaron el significado de la amistad y a los amigos que me han dejado estos cinco años. No puedo dejar de nombrar a mis familias adoptivas en estas tierras gauchas, la familia Menossi y Cagñetta que hasta el día de hoy son un regalo de la vida.

A mis directores Juan Miguel y Marcela por haberme aceptado sin conocerme y por brindarme su apoyo, su conocimiento, su dedicación y hasta sus retos.

A mis compañeros del gran becario que son otro regalo que me ha dejado esta experiencia. Los que estan y los que ya se han doctorado. A Angélica que se convirtió en una hermana mas para mi.

A la Poli que es una parcera en todo el sentido de la palabra, al igual que Silver, Airam y Lu que tambien lo son, la Flor y la Nati que son compañeros y amigos; a mi amigo Pacho de la vida, a Waiman, Rebe, Rush, y se me acaba la hoja para seguir escribiendo, pero todos tiene su lugar en mi.

Finalmente, a este hermoso país y esta hermosa ciudad, a la universidad y a todos sus miembros que hacen los días mas amenos.

Gracias Totales...

RESUMEN

Durante los últimos años se ha observado un enorme interés en realizar estudios medioambientales teniendo en cuenta el crecimiento de las actividades socioeconómicas a nivel mundial. Uno de los inconvenientes de dichas actividades es la generación de residuos y productos secundarios que afectan al medio ambiente. Dentro de estas actividades, está la actividad agrícola, la cual tiene un efecto directo sobre el medioambiente y a su vez sobre el hombre que es el principal consumidor de los productos finales de dichas actividades.

El desarrollo de la tesis se llevó a cabo en tres etapas diferentes. Inicialmente se realizó la selección de dos zonas ecológicamente diferentes. La primera zona se eligió teniendo en cuenta la alta actividad agrícola, en el área rural de Alcira (Gigena), provincia de Córdoba. Allí se instalaron 49 colmenas. Después, una segunda zona fue seleccionada por ser principalmente monte nativo, en donde hay baja actividad agrícola, ubicada en la zona rural de Merlo, provincia de San Luis, instalando 43 colmenas, y obteniendo así un total de 92 colmenas de estudio.

Las colmenas de estudio recibieron dos tipos de tratamientos diferentes durante un periodo de cuatro años. Un tratamiento con aplicación rotativa de amitraz y flumetrina y otro con aplicación de timol.

Se tomaron un total de 445 muestras de miel de abejas durante las campañas realizadas en verano de 2013, otoño, invierno y primavera de 2014 y otoño de 2015. Con el fin de realizar una comparación entre los tratamientos aplicados y minimizar el número de muestras se realizaron pool o mezclas de las muestras, teniendo en cuenta el lugar de muestreo, el momento de toma de la muestra etc. Las muestras fueron recolectadas en envases adecuados, debidamente rotulados, almacenados en frío para su conservación, y finalmente se realizó un análisis físico-químico y un análisis de residuos, por diferentes técnicas cromatográficas.

ABSTRACT

Over the last few years, there has been a great deal of interest in environmental studies taking into account the growth of socio-economic activities worldwide. One of the disadvantages of such activities is the generation of waste and secondary products that affect the environment. Within these activities, it can be found the agricultural activity, which has a direct effect on the environment and at the same time it has an impact on the man who is the main consumer of the final products of these activities.

The development of the thesis was accomplished in three different stages. Initially, the selection of two ecologically different zones was carried out. The first area was chosen taking into account the high agricultural activity, in the rural area of Alcira (Gigena), province of Córdoba. 49 hives were installed there. Then, a second area was selected because it is mainly native forest, where there is low agricultural activity, located in the rural area of Merlo, province of San Luis, installing 43 hives, obtaining a total of 92 study hives.

Study have received two different types of treatments over a four-year period. A treatment with rotary application of amitraz and flumethrin and another treatment with application of thymol.

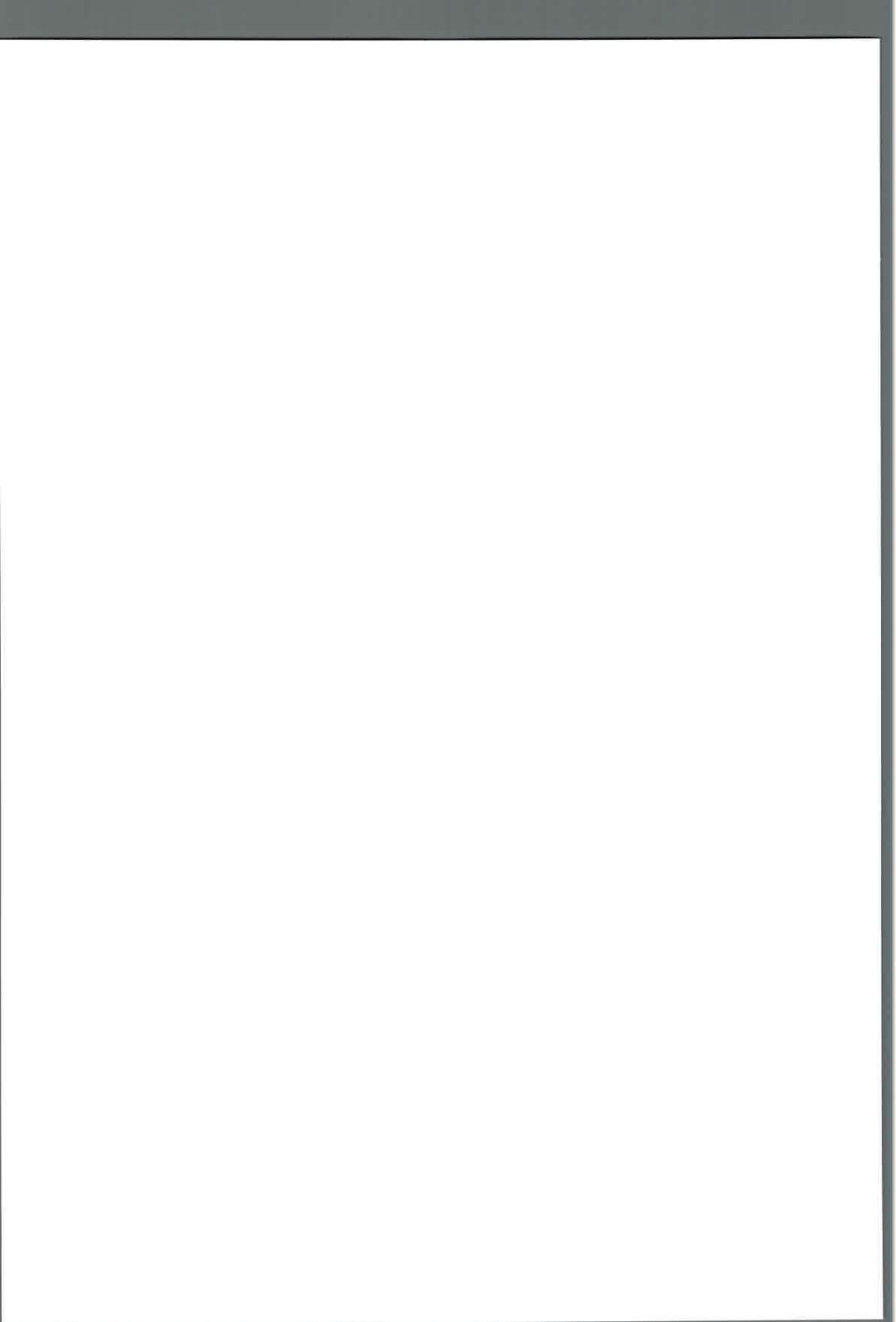
A total of 445 bee honey samples were taken during the campaigns conducted in summer 2013, autumn, winter and spring 2014 and autumn 2015. In order to make a comparison between the applied treatments and to minimize the number of samples, pool or mixtures of the samples were made, taking into account the place and the time of sampling, etc. The samples were collected in suitable containers, duly labeled, stored, reformed for storage, and finally analyzed by different chromatographic techniques.

An analysis of residues of agricultural use and medicines for bee use in honey of bees was carried out as indicators of quality and environmental contamination.



TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
TABLA DE CONTENIDOS.....	VI
INDICE DE TABLAS.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
GLOSARIO	XII
OBJETIVOS	1
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	3
1.1 LA COLMENA Y SUS PARTES.....	6
1.2 COSECHA Y EXTRACCIÓN DE LA MIEL	8
1.3 TRATAMIENTOS SANITARIOS EN APICULTURA.....	10
1.4 CRITERIOS Y CONTROL DE CALIDAD DE MIEL	12
1.4.1. Contaminantes en la miel.....	13
1.4.2. Calidad de la miel	14
1.5. PLAGUICIDAS: CLASIFICACIÓN	15
1.5.1. Acaricidas.....	16
1.5.2. Fungicidas	17
1.5.3. Herbicidas	17
1.5.4. Insecticidas	21
1.6 ANTIBIÓTICOS DE USO FRECUENTE EN APICULTURA.....	23
1.7. ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS Y MEDICAMENTOS DE USO APÍCOLA	24
1.7.1. Extracción de la muestra.....	25
1.7.2. Métodos de detección y cuantificación:	25
A) Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	25
Ionización por electrospray.....	27
b) Analizadores de espectrometría de masa	28
c) Sistemas tándem (ms/ms) triple cuadrupolo (qqq)	29
B) CROMATOGRAFÍA GASEOSA (GC).....	29
1.8. ANTECEDENTES	31
CAPÍTULO II: DISEÑO EXPERIMENTAL.....	34
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	36
2.1. FASE DE DIAGNÓSTICO	36
2.2. FASE DE INTERVENCIÓN A CAMPO	40
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1. Reactivos	45
3.2. Solventes	45
3.3. Equipos	45
3.4. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS PARA EVALUAR LA CALIDAD DE LA MIEL.....	50
3.5. ANÁLISIS MULTIRRESIDUO DE PLAGUICIDAS Y MEDICAMENTOS PREVIAMENTE SELECCIONADOS.....	56
3.6. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS POR EL MÉTODO DE EXTRACCIÓN “QUECHERS”	56





CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS	59
4.1. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS	61
CAPÍTULO V: DESARROLLO DE TÉCNICAS PARA ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS Y MEDICAMENTOS	75
5.1. ANÁLISIS DE TIMOL	77
5.3. ANÁLISIS MULTI-RESIDUO DE PLAGUICIDAS Y MEDICAMENTOS	86
5.4. ANALISIS POR GC-ECD:	97
CAPÍTULO VI: RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS ANÁLISIS MULTIRRESIDUOS	103
6.1. ANÁLISIS MULTIRRESIDUO DE PLAGUICIDAS Y MEDICAMENTOS PREVIAMENTE SELECCIONADOS	105
6.2. CURVAS DE CALIBRACIÓN CON PATRONES	107
6.3. OBTENCIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN EN MUESTRAS DE MIEL APLICANDO QUECHERS	110
6.4. OBTENCIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN EN MUESTRAS DE MIEL POR GC-MS/MS	115
CAPÍTULO VII: CONCLUSIÓN FINAL	123
CAPÍTULO VIII: BIBLIOGRAFÍA	127

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional de la miel.....	12
Tabla 2. Clasificación de plaguicidas.....	15
Tabla 3. Datos de geoposicionamiento de los apiarios de la zona de Monte Nativo (Merlo, San Luis).....	38
Tabla 4. Datos de geoposicionamiento de los apiarios de la Zona Agrícola (Alcira Gigena, Córdoba).....	38
Tabla 5. Valores de humedad según el índice de refracción medido.....	52
Tabla 6. Valores analíticos de color, humedad, acidez libre y HMF.....	61
Tabla 7. Condiciones del gradiente en UPLC.....	105
Tabla 8. Condiciones de la interfaz UPLC-MS/MS.....	107
Tabla 9. Parámetros de regresión, ordenada del origen y pendiente de las curvas de calibración en muestras contaminadas expofeso de atrazina, cumafós y amitraz.....	114
Tabla 10. Resultados obtenidos para las muestras de miel aplicando Quechers por UPLC-MS/MS (ppb).....	114
Tabla 11. Condiciones y parámetros analíticos GC-MS/MS.....	116
Tabla 12. Resultados obtenidos para las muestras de miel aplicando Quechers por GC-MS/MS (ppb).....	119
Tabla 13. Condiciones de gradiente en HPLC-DAD.....	88
Tabla 14. Condiciones de gradiente en HPLC-MS/MS.....	90
Tabla 15. Condiciones de Trabajo de HPLC-MS/MS.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes de una colmena, Foto tomada en salida de campo	7
Figura 2. Extractor de miel	10
Figura 3. Estructura general de las triazinas.....	18
Figura 4. Estructura química de la atrazina	19
Figura 5. Equilibrios ácido-base del glifosato con sus pKa correspondientes	20
Figura 6. Degradación de glifosato a AMPA	20
Figura 7. Estructura química general de los compuestos bifenilos policlorados.....	22
Figura 8. Estructura química general de los organofosforados	22
Figura 9. Esquema de funcionamiento de una Interface Electrospray Ionization (ESI), tomado capacitación de HENK	28
Figura 10. Fases del desarrollo del proyecto	36
Figura 11. Mapa de ubicación de las colmenas.....	37
Figura 12. Estructuras químicas de a) timol, b) diclorvos, c) clorpirifos, d) fipronil, e) atrazina, f) cumafós, g) amitraz, h) cipermetrina, i) endosulfan,	39
Figura 13. Toma de muestras para diagnóstico de enfermedades	40
Figura 14. Obtención de las muestras de miel.....	41
Figura 15. Equipo de HPLC-DAD acoplado a un detector de fluorescencia	45
Figura 16. Equipo de HPLC-MS/MS	46
Figura 17. Equipo HPLC-DE	46
Figura 18. Equipo UPLC-MS/MS	47
Figura 19, Equipo de GC-ECD	48
Figura 20. Agitador vortex mixter ARCANO	48
Figura 21. Centrifuga BOECO, U-320 R	49
Figura 22. Equipo Barnstead easy pure II	49
Figura 23. Refractómetro ABBE-REF 1	51
Figura 24. Colorímetro analizador de miel.....	53

Figura 25. Diagrama del procedimiento de extracción, Quechers	58
Figura 26. Humedad de las muestras, Merlo (n=32), Gigena (n=39).....	65
Figura 27. Análisis estadístico de Humedad, Merlo (n=32), Gigena (n=39). Cada barra representa la media \pm S.E.M. (* p >0,05) ente M y G.	66
Figura 28. Color de las muestras, Merlo (n=32), Gigena (n=39)	67
Figura 29. Análisis estadístico del color, Merlo (n=32), Gigena (n=39). Cada barra representa la medida \pm S.E.M. (*p <0,05) ente M y G.	68
Figura 30. Acidez de las muestras, Merlo (n=32), Gigena (n=39).....	69
Figura 31. Análisis estadístico para el contenido de Acidez, Merlo (n=32), Gigena (n=39). Cada barra representa la medida \pm S.E.M. (*p <0,05) ente M y G.	70
Figura 32. HMF de las muestras, Merlo (n=32), Gigena (n=39).	71
Figura 33. Análisis estadístico de HMF, Merlo (n=32), Gigena (n=39). Cada barra representa la medida \pm S.E.M. (*p <0,05) ente M y G.	72
Figura 43. Separación analítica por HPLC-DAD	89
Figura 44. Cromatograma de una mezcla de 5 patrones en (ES+)	92
Figura 45. Cromatograma representativo de Fipronil en modo en (ES-)	93
Figura 46. Cromatograma de una mezcla de 5 patrones más estándar interno (Doxyciclina) por ES+, el fipronil analizó por ES-.	94
Figura 47. Curva de calibración de Oxitetraciclina	95
Figura 48. Curva de calibración de la Atrazina	96
Figura 49. Curva de calibración del Fipronil	97
Figura 50. Cromatograma de mezcla de clorpirifos, fipronil y endosulfan en metanol (0,25-5,0 ppm).....	98
Figura 51. Curva de calibración de Endosulfan.	99
Figura 52. Curva de calibración de Clorpirifos	99
Figura 53. Curva de calibración de Fipronil.....	100
Figura 54. Cromatogramas de una mezcla de patrones atrazina (violeta), cumafós (rojo) y amitraz (verde).....	106
Figura 55. Curva de calibración de Atrazina	108
Figura 56. Curva de calibración de Cumafós.	109



Figura 57. Curva de calibración de Amitraz.....	110
Figura 58. Curva de calibración de atrazina extraída de miel.....	111
Figura 59. Curva de calibración de cumafós extraído de miel.....	112
Figura 60. Curva de calibración de amitraz extraída de miel.....	113
Figura 61. MRM de algunos de los analitos estudiados. a) Clorpirifos, b) Amitraz, c) Atrazina, d) Diclorvos, e) Endosulfan, f) Fipronil	117
Figura 62. MRM y las transiciones más abundantes para el Diclorvos	118



GLOSARIO

- (CAA)** Código Alimentario Argentino
- (CAC)** Comisión del Codex Alimentarius
- (FAO)** Organización para la Agricultura y la Alimentación de la Naciones Unidas
- (OMS)** La Organización Mundial de la Salud
- (EPA)** Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
- (AMPA)** Acido aminometilfosfónico
- (DDT)** DicloroDifenilTricloroetano
- (HCH)** hexaclorociclohexano
- (α -CM)** α -cipermetrina
- (dSPE)** Extracción en fase sólida dispersiva
- (QuEChERS)** Quick (rápido), Easy (fácil), Cheap (barato), Effective (efectivo), Rugged (robusto), Safe (seguro)
- (FDA)** Departamento de Agricultura de Estados Unidos
- (GC)** Cromatografía de gases
- (HPLC)** Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
- (SFC)** Cromatografía de fluidos supercríticos
- (TLC)** Cromatografía de capa fina
- (UV)** Ultravioleta de longitud de onda fija
- (DAD)** Detector de diodos en fila
- (HPLC-MS)** Espectrometría de masas
- (TSI)** Ionización por Thermospray
- (ESI)** Fotoionización a presión atmosférica (APPI), la ionización por electrospray
- (TOF)** Tiempo de vuelo
- (Q/T)** Quadrupole Ion Trap
- (ICR)** Ion Cyclotron Resonance
- (LIT).** Linear Ion Trap
- (DC)** Corriente continua
- (RF).** Voltaje de radiofrecuencia
- (MS/MS)** Sistemas tándem



- (qqq)** Triple cuadrupolo
- (FID)** Detector de ionización de llama
- (TCD)** Detector de conductividad térmica
- (FPD)** Detector fotométrico de llama
- (ECD)** Detector de captura electrónica
- (MSD)** Detector selectivo de masa
- (EI)** Impacto con electrones
- (CI)** Ionización química
- (LOQ)** Límite de cuantificación
- (RSDr)** Precisión
- (HMF)** Hidroximetilfurfural
- (LMRs)** Límite máximo permisible

OBJETIVOS

Recientemente se ha incrementado el interés, tanto de los consumidores como de los apicultores, hacia la determinación de residuos de antibióticos y contaminantes en la miel, ya que los productos de la colmena se pueden contaminar no solo en forma directa por los medicamentos que se utilizan para controlar las enfermedades propias de las abejas, sino también en forma indirecta por el contacto de las abejas con las sustancias utilizadas en la agricultura. Es por ello que el objetivo general de este trabajo es el análisis de residuos de plaguicidas de uso agrícola y medicamentos de uso apícola en miel como indicadores de su calidad y de contaminación ambiental y para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Determinar residuos de los plaguicidas y medicamentos de uso apícola en miel por métodos analíticos convencionales.
- ✓ Evaluar la calidad de la miel respecto a la presencia de residuos de medicamentos sintéticos y naturales de uso apícola.
- ✓ Evaluar indirectamente la contaminación ambiental a través de los residuos de plaguicidas determinados en la miel, identificando posibles tendencias.
- ✓ Utilizar metodologías estadísticas descriptivas uni y multivariadas para realizar objetivamente el análisis ambiental.
- ✓ Desarrollar métodos de análisis alternativos, de bajo costo, para la detección y cuantificación de los plaguicidas y medicamentos de uso apícola.





CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN



La evolución acelerada de las actividades socioeconómicas, en la mayoría de los casos, genera residuos de plaguicidas y contaminantes que afectan en diferentes grados de severidad y alcances a la salud humana. La acumulación de éstos en el ambiente, por el uso desprogramado e irracional de los mismos ha originado una serie de problemas tecnológicos y biológicos, entre las cuales se pueden señalar: la creciente resistencia adquirida por las plagas, la alteración del control natural, el resurgimiento de plagas secundarias, la destrucción de la fauna, la eliminación de insectos polinizadores, y finalmente, la contaminación en humanos y el medio ambiente.

Evaluar el impacto de un plaguicida es un proceso complejo ya que, en teoría aplicado sólo a un cultivo, puede distribuirse, en función de su persistencia, en distintos compartimentos ambientales como el agua, suelo y aire, y de esa manera puede afectar a diferentes organismos y a otros cultivos. El monitoreo del medio ambiente requiere de técnicas cada vez más costosas y complejas, por lo tanto, resulta muy interesante el desarrollo de técnicas sencillas, económicas y con grandes perspectivas como los indicadores ambientales. Un indicador ambiental es un parámetro claro y sencillo que aporta información para representar fenómenos que tengan que ver con el medio ambiente [1]. En este sentido, los indicadores ambientales han tomado impulso con el propósito de estandarizar metodologías y procesos que nos permitan desarrollar, analizar, evaluar y comparar el estado del ambiente y los recursos naturales. Las abejas melíferas y los productos de la colmena podrían muy bien cumplir con el papel de indicadores ambientales ya que durante su pecoreo las abejas se ponen en contacto con prácticamente todos los sectores medioambientales (suelo, vegetación, aire y agua) [2]. Las abejas exploran áreas de unos 30 km² para recolectar elementos para el desarrollo de su colonia (agua, propóleos, polen, néctar y mielatos) y, por consiguiente, la presencia de residuos en los productos de la colmena se puede relacionar con la contaminación local [3].

Por otra parte, es importante tener en cuenta que la contaminación de los productos de la colmena (principalmente miel y cera), no se deben únicamente al empleo de medicamentos y acaricidas para combatir las enfermedades propias de las abejas, sino también al uso de plaguicidas en agricultura. Diversos estudios realizados corroboran el impacto ecológico negativo que acarrea la utilización de todas las sustancias empleadas [4].

En resumen, el análisis de residuos de plaguicidas y de medicamentos de uso apícola en miel, permitirá estimar el grado de contaminación de la zona de la cual proceden, como así también la calidad de los mismos estableciendo, de esta manera, a las abejas y los productos de la colmena como posibles indicadores de contaminación ambiental.

1.1 LA COLMENA Y SUS PARTES

Una colmena es el lugar en donde habita una colonia o familia de abejas, conformada por la reina, las abejas obreras y los zánganos. Existen diferentes tipos, como las colmenas naturales, que son las que forman las abejas en los orificios de los árboles, o entre piedras, están las colmenas rústicas que son aquellas en las que el hombre proporciona canastos o cajones a la abeja, y están las colmenas estándares (americana o Langstroth), que son las que surgieron a partir del descubrimiento del “Espacio Abeja”, por Langstroth, en el año 1951 y que permitió construir colmenas móviles [5,6].

La colmena está compuesta por diferentes partes intercambiables, generalmente de madera, aunque pueden ser de otros materiales como cemento, o cemento con lava volcánica. En la Figura 1 se muestran las principales partes de una colmena.



Figura 1. Partes de una colmena, Foto tomada en salida de campo

1. **Piso:** Es la base de la colmena, se utiliza generalmente *Eucalyptus saligne*. Se debe evitar el uso de maderas duras como el algarrobo y caldén teniendo en cuenta su alto costo y su peso.
2. **Cámara de Cría:** Es el primer cajón o alza, normalmente estándar en la cual van los cuadros con panales de cría y la reina. Tiene por lo general 10 bastidores, de los cuales, los centrales contienen crías y los laterales, miel y polen.
3. **Rejilla excluidora:** Es un bastidor de madera con un enrejado de alambre que deja separaciones de 4,2 mm donde sólo pasan las abejas obreras, cuyo uso principal es evitar que la reina ponga huevos en la parte superior de la colmena (alza melaria). Está ubicada sobre la cámara de cría.
4. **Alza:** Se denomina alza melaria a cada una de las alzas con cuadros destinados a la acumulación de la miel, normalmente se colocan de 9 a 10 cuadros. El alza que se

coloca sobre la cámara de cría se denomina primera alza melaria, después las alzas que se ponen a continuación, se denominan segunda, tercera, etc. En el caso de la colmena tipo Langstroth las alzas melarias estándares llegan a acumular 22 kilogramos de miel, y por este motivo los apicultores prefieren alzas de menor tamaño teniendo en cuenta de que el trabajo se hace manualmente y el esfuerzo físico es muy grande.

5. **Cuadros o Marcos:** Son los soportes de cada panal, que están ubicados dentro de cada alza, estos están reforzados por alambres para permitir el uso del extractor de miel y fijar la cera estampada.
6. **Entretapa:** Se coloca debajo del techo, compuesta por un bastidor de madera y una plancha de chapa dura. Esta deja un espacio de aire importante en el caso de las colmenas que están expuestas al sol y en lugares cálidos.
7. **Tapa:** Es la cubierta superior, que puede ser de diferentes tipos según las necesidades locales, generalmente tienen un bastidor de madera dura, plancha de chapa dura, y cubierta por chapa galvanizada. Actualmente se reemplaza esta doble cubierta superior por machimbre de madera dura, teniendo en cuenta que es más económica y con una caladura lateral permite evitar el uso de la entretapa, eliminando la posibilidad que entre el techo y la entretapa se alojen hormigas.
8. **Guarda-Piqueras:** Es una varilla con ranuras, que cierra parcialmente la entrada de la colmena, para protección del pillaje (es el hurto de las abejas melíferas de una determinada colmena).

1.2 COSECHA Y EXTRACCIÓN DE LA MIEL

La cosecha es el trabajo que se realiza en el campo en cada colmena, esta comienza en el periodo estival (verano), según la zona donde estén ubicadas las colmenas y el tipo de flora con la que ha contado la abeja para realizar el trabajo.

Existen diferentes maneras de realizar la cosecha de la miel, en nuestro caso, los apicultores retiran el alza completa. Se comienza aplicando bocanadas de humo en la piquera, se retiran la tapa y el entretecho para retirar los cuadros, observando si el panal está operculado (sellados con cera) por lo menos un 80% de su superficie. Si lo está, entonces está listo para ser cosechado. Cuando se tiene el cuadro se procede a quitar las abejas que hay en él, esto se hace por medio de una maquina soplando aire, colocando las abejas siempre dentro de la colmena. De esta forma se realiza el mismo procedimiento con los demás cuadros del alza melaria [7].

Para cosechar correctamente la miel es necesario tener en cuenta los factores que pueden alterar la calidad de la misma, como la humedad, ya que con el contenido de humedad de la miel extraída es posible determinar si el trabajo ha sido productivo o no.

Se considera que la extracción de la miel debe realizarse en un lugar fijo llamado sala de extracción, la cual es conveniente que esté ubicada en cercanía del colmenar para facilitar el traslado de las alzas. La sala de extracción es el espacio físico donde se tienen las maquinarias para extraer la miel. Esta sala se debe adecuar a la reglamentación vigente dispuesta por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca y Alimentos de la Nación [8,9]. En las salas de extracción se encuentran los extractores, que son las máquinas que permiten sacar la miel de los panales de una forma limpia y segura. El extractor, al ser puesto en marcha trabaja en forma centrífuga, es decir que la miel sale desde el centro hacia los costados del extractor. Una vez desoperculados los cuadros se los coloca en el extractor. Para obtener una mayor pureza y limpieza de la miel se colocan coladores que retengan las impurezas, como restos de cera, partes de abejas etc., y por último se colecta la miel en unos tambores, la miel se deja reposar de 12 a 15 días permitiendo que suban impurezas a la parte superior. En la Figura 2 se observa un extractor de miel que pertenece al apicultor de la ciudad de Merlo.



Figura 2. *Extractor de miel*

1.3 TRATAMIENTOS SANITARIOS EN APICULTURA

El desarrollo de la apicultura descansa sobre algunos pilares, que pueden ser manejados por los apicultores, tales como el manejo biológico, productivo, genético y de sanidad. Sin embargo, hay otro factor, que es imposible de modificar, el clima. Por ello, aquellos factores sobre los cuales el apicultor posee capacidad de intervención directa, resultan claves para lograr un incremento sustancial de la productividad y el éxito de la empresa apícola. En particular, el aspecto sanitario ha ido adquiriendo una importancia creciente. Otra característica que está presente en la actividad apícola, en los últimos años, es la diversificación de sus productos. Por un lado, la producción de miel y la cera siguen siendo las principales líneas productivas, sin embargo, otros productos se han ido desarrollando a un ritmo mayor, como ocurre con los servicios de polinización, producción de propóleos, jalea real, apiterapia, aumento de la producción y venta de abejas reinas, núcleos o paquetes. En este desarrollo, la sanidad juega también un rol clave. Considerando que la miel es el producto de mayor intensidad en la línea productiva y por tratarse de un alimento, éste se rige por normas nacionales e internacionales. A nivel internacional, se administra mediante la Comisión del Codex Alimentarius (CAC), el cual es operado a través de la Organización para la Agricultura y la Alimentación de la Naciones Unidas (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) por cuanto debe cumplir con un

concepto elemental, su inocuidad, es decir que no contenga elementos nocivos para la salud de los consumidores [10]. Lo anterior se suma a la tendencia actual de los mercados externos de consumir productos de naturaleza orgánica, lo cual reafirma la necesidad de que sean producidos bajo esas normas internacionales.

Las abejas en su estado natural viven formando panales y difícilmente se establecen una al lado de otra, pero un apiario moderno requiere de inspecciones constantes, movimiento de marcos entre colmenas y/o colmenares. Sin embargo, el uso de implementos comunes y movimiento de colmenas a grandes distancias e intercambio de materiales entre apicultores nacionales y extranjeros puede ocasionar inconvenientes sanitarios. Todo esto, indudablemente, colabora en la dispersión rápida de patologías o enfermedades entre las unidades productivas. Cuando ingresa una enfermedad en una unidad productiva, ésta tiende a difundirse rápidamente entre las colmenas vecinas, hacia otros colmenares cercanos y abarcar territorios que incluyen continentes completos. De lo anterior, existe una gran variedad de ejemplos, como la Varroosis (la cual ha invadido regiones aisladas como islas, ej.: Nueva Zelanda) [11]. La enfermedad de las abejas, es un proceso natural, y con el fin de lograr una mejora en los productos de la colmena el hombre ha alterado la actividad apícola moderna suministrando agentes exógenos a las mismas, aunque es necesario lograr un nivel de equilibrio entre la presencia de estos agentes (que no destruyan la colmena, ni afecten a las abejas en forma significativa) y la obtención de productos de la colmena con la mayor cantidad, calidad y rentabilidad [12].

El uso de medicamentos y acaricidas en las colmenas para prevenir o sanear las enfermedades de las abejas resulta una de las principales causas de contaminación de la miel argentina [13]. Por ejemplo, en la producción apícola, se ha generalizado el uso de antibióticos a partir de la aparición de serias enfermedades bacterianas de la cría, principalmente la Loque europea y Loque americana [14,15]. La Loque europea es una enfermedad bacteriana causada por el bacilo *Melissococcus pluton*, y afecta la cría en su período de larva. La Loque americana es mucho más grave, porque posee la capacidad de formar esporas, también de origen bacteriano, afecta el estado larval de las abejas y es provocada por *Paenibacillus larvae*.

Otra de las enfermedades importantes a tratar es la *Varroosis* que se lo detecta por primera vez en la Argentina en la provincia de Formosa en el año 1976. Producida por el ácaro *Varroa Destructor* que es un ectoparásito que se alimenta de la hemolinfa de su hospedador. La hembra se encuentra sobre abejas adultas y en desarrollo [16].

1.4 CRITERIOS Y CONTROL DE CALIDAD DE MIEL

La miel es una sustancia natural dulce producida por la abeja *Apis mellifera* o por diferentes subespecies, a partir del néctar de las flores y de otras secreciones extra florales que las abejas liban, transportan, transforman, combinan con otras sustancias, deshidratan, concentran y almacenan en panales para alimentar a sus larvas y asegurarse la subsistencia durante el invierno [17]. La tabla 1 muestra la composición promedio de la miel.

Tabla 1. *Composición nutricional de la miel*

Composición Química	Valores Comunes
Agua	14-22%
Fructosa	28-44%
Glucosa	22-40%
Sacarosa	0,2-7%
Maltosa	2-16%
Otros azúcares	0,1-8%
Proteínas y aminoácidos	0,2-2%
Vitaminas, enzimas, hormonas	0,5-1,0%
Ácidos grasos y otros	0,5-1-5%
Minerales	0,2-1,0%

Las abejas obreras ingieren el néctar u otros jugos dulces de las flores, a los que añaden sustancias propias de su organismo (enzimas) y comienzan a transformarse en miel en sacos especiales situados en su esófago. A continuación, se almacena y madura en panales dentro de sus colmenas. Las características de la miel dependen de diversos factores tales como las plantas de las que recolectan el néctar, el suelo, el clima y las condiciones ambientales. El producto no debe tener sabor ni aroma desagradables, debe estar exento de materia extraña y de contaminantes.

El color, aroma y sabor de la miel varía con el origen floral del néctar del cual proviene. La República Argentina es un importante productor de miel a nivel mundial, con más del 90% de la producción destinada al mercado externo. El aumento de las exigencias de calidad ha llevado a la implementación de medidas a nivel nacional para preservar la calidad de la misma. Entre estas medidas se destacan: la prohibición de la exportación de miel con residuos de medicamentos, la extracción de miel en salas inhabilitadas, la aplicación de un sistema de trazabilidad y la implementación de programas de control y erradicación de enfermedades. El Código Alimentario Argentino (CAA) en su Art 783 prohíbe expresamente la utilización de cualquier tipo de aditivo para que el producto sea denominado “MIEL” [18].

Tipos de mieles:

- *Miel de flores o miel de néctar:* Es la miel que procede del néctar de las plantas.
- *Miel monofloral:* Es la miel que proviene principalmente de una especie botánica.
- *Mieles multiflorares:* Compuesta por el néctar de varias especies vegetales, sin que ninguna de ellas pueda considerarse predominante.
- *Mieles de mielada:* Es la miel que procede principalmente de excreciones que los insectos succionadores dejan sobre las partes vivas de las plantas o secreciones de las partes vivas de las plantas.

1.4.1. Contaminantes en la miel

La producción apícola intensiva, así como cualquier otro tipo de actividad agrícola, requieren del uso de medicamentos veterinarios y plaguicidas registrados que se consideran necesarios para obtener una adecuada productividad y obtener productos inocuos para los consumidores finales. La incorrecta utilización de estas sustancias puede dejar residuos en la miel lo que constituye un riesgo para la salud pública.

En el caso específico de la apicultura podemos mencionar que en los últimos 15 años los tratamientos de control de varroa en Argentina, en su mayoría, se realizaron con acaricidas de síntesis. Los principales principios activos utilizados son piretroides (fluvalinato, flumetrina), fosforados (cumafós) y formamidinas (amitráz). El uso reiterado de estas sustancias puede conducir a la presencia de los mismos en miel, cera y propóleos con la consecuencia del desarrollo de resistencia de la población de ácaros.

Estos problemas han llevado a realizar investigaciones sobre métodos alternativos de control, tales como el uso de ácidos orgánicos y aceites esenciales. Estos últimos son destilados de plantas aromáticas, poseen un intenso olor, baja toxicidad en mamíferos, escasos efectos nocivos sobre el medio ambiente y una vasta aceptación entre los productores [19]. Ejemplo de este tipo de sustancias es el timol.

1.4.2. Calidad de la miel

A nivel internacional se ha recomendado tener en cuenta todos los aspectos de composición, pureza y características biológicas que son propias del producto. Ya que constituye uno de los alimentos más antiguos consumidos por el hombre sin ninguna interferencia tecnológica. Sin embargo, en los últimos años su comercialización ha exigido profundas transformaciones para asegurar una mejor presentación.

Tradicionalmente el concepto de calidad alimentaria era identificado con la seguridad para el consumidor y englobaba, fundamentalmente, los aspectos higiénicos-sanitarios y nutritivos de los alimentos. Las características de los productos alimentarios argentinos aptos para el consumo están básicamente reguladas a través Código Alimentario Argentino que contiene, esencialmente, la definición de los parámetros físicos-químicos y microbiológicos que brindan ante los consumidores garantía sanitaria [18]. Tanto la presentación, como el olor, sabor, consistencia y pureza son factores de mucha importancia en la valoración de la miel para la comercialización [20].

La evaluación de la calidad de la miel se hace mediante análisis físico-químicos. Por medio de estos análisis, es posible inferir el grado de madurez del producto al momento de la cosecha, la limpieza de los procedimientos tecnológicos empleados en el procesamiento, el ajuste a los tratamientos térmicos permitidos, adulteraciones, la facilidad de cristalización. Según el reglamento Técnico del Mercosur (15/94), la miel debe cumplir con ciertos requisitos que garanticen su calidad tales como humedad hasta un 20%, hidroximetil furfural (HMF) hasta 40 mg/Kg, acidez libre hasta 40 meq/kg, etc.

1.5. PLAGUICIDAS: CLASIFICACIÓN

La FAO, y la OMS, definen el término plaguicida, como cualquier sustancia o mezcla de ellas utilizada para prevenir o controlar cualquier especie de planta o animal indeseable, incluyendo las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores de crecimiento de las plantas, o como defoliantes o desecantes, durante la producción, almacenaje, transporte, comercialización o procesamiento de los alimentos para el hombre o los animales [21]. En la tabla 2 se puede observar la clasificación de los plaguicidas según el tipo de organismo que se desee controlar, según su grupo funcional y según su toxicidad y persistencia en el ambiente.

Tabla 2. Clasificación de plaguicidas

<u>El tipo de organismo que se desea controlar</u>	<u>El grupo químico del principio activo</u>	<u>Su persistencia en el medio ambiente</u>	<u>Su toxicidad aguda</u>
Acaricida	Organoclorados, Organofosforados		Muy tóxico
Fungicida	Carbamatos	Persistentes	Moderadamente tóxico
Herbicida	Triazinas, Derivados del ácido	Poco Persistentes	Poco tóxico
Insecticida	Fenoxiacético Antibióticos	No persistentes	Mínimamente tóxico

A continuación, se describen los principales grupos de plaguicidas de acuerdo al tipo de organismos que se desea controlar y los principios activos nombrados en la Tabla 2.

1.5.1. Acaricidas

Los acaricidas son plaguicidas que se utilizan para eliminar, controlar o prevenir la presencia o acción de los ácaros. El principal ácaro que causa enfermedades en las abejas obreras es la varroa, por lo tanto, los acaricidas destinados al control de esta enfermedad son la fuente más importante de contaminación de los productos de la colmena. Estos compuestos pueden ser divididos básicamente en dos grupos: El primer grupo es el de los sintéticos, son sustancias lipofílicas que persisten en ceras por un largo período de tiempo acumulándose en este sustrato y convirtiéndose en una potencial fuente de contaminación [22]. El segundo grupo es el de los acaricidas orgánicos, este grupo se divide a su vez en acaricidas lipofílicos, volátiles como el timol y en ácidos orgánicos solubles en agua, como el ácido oxálico. En la colmena las sustancias hidrofílicas quedan retenidas en la miel mientras que las lipofílicas lo harán en la cera [23]. El timol (5-metil-2-(1-metiletil) fenol), es una sustancia natural que se encuentra presente en un gran número de plantas, sobre todo en especies de la familia de las labiadas tales como romero, albahaca, menta, salvia, tomillo, ajedrea, entre otras. Pertenece al grupo de los terpenos, es el principal componente del aceite esencial del tomillo, presenta una gran actividad acaricida y es bien tolerado por las abejas. El timol, o mezclas de componentes que lo incluyan, son muy efectivos para el tratamiento de la infección de hongos, alcanzando eficacias cercanas al 100% [24]. Algunas de las formulaciones conocidas a base de timol son el Api Life Var®, Thymol Var® y Api Guard®. En apariencia, el problema más grande que podría ocasionar el uso masivo de timol para el control de *Varroa destructor* es que le confiera un sabor diferente a la miel, lo que se encuentra prohibido por las regulaciones internacionales y que se observaría cuando la concentración de timol supera los 50 mg/Kg [25]. Sin embargo, aparte del deterioro organoléptico que ello significa, es necesario realizar un control efectivo de la residualidad de dicho producto, tanto en la miel como en la cera de abejas. Los componentes de aceites esenciales como el timol, eucaliptol, alcanfor y mentol tienen un rango generalmente reconocido como seguro en concentraciones hasta 50 mg/kg en forma pura ya que concentraciones más altas pueden modificar el sabor de la miel [26].

1.5.2. Fungicidas

Los fungicidas son un tipo particular de plaguicidas que se utilizan extensamente en el control de enfermedades producidas por hongos en semillas, plantas y frutos. Se aplican tanto en el campo como para la protección durante el almacenamiento, el transporte y la comercialización. Los fungicidas se pueden clasificar en dos grandes grupos: inorgánicos y orgánicos. Los primeros son, principalmente, el azufre, los poli sulfuros y algunas sales de cobre. Los fungicidas orgánicos se empezaron a desarrollar en 1934, siendo en general, más efectivos y menos nocivos que los inorgánicos. Entre estos compuestos se encuentran los tiocarbamatos, los azoles, los benzimidazoles, las dicarboximidas, etc.

1.5.3. Herbicidas

Los herbicidas son compuestos químicos cuya finalidad es combatir las malezas que entorpecen el desarrollo de los cultivos. Los daños producidos por las malas hierbas pueden ser debidos a que éstas compiten por los nutrientes lo que puede llevar a un bajo rendimiento del cultivo, a que dificultan las labores agrícolas y también a que pueden ser focos de enfermedades que pasen luego a los cultivos. En los países industrializados los herbicidas se aplican sobre el 85-100% de todos los cultivos principales, habiendo reemplazado a la escarda manual utilizada en la agricultura tradicional, debido al elevado coste de la mano de obra. Dependiendo de su estructura química, actúan sobre el metabolismo de las plantas de diversas formas. Pueden ser clasificados en totales, si destruyen toda la vegetación sin discriminar, o selectivos, que son aquellos que solamente atacan a las malezas sin afectar a los cultivos.

También se clasifican según su estructura química, existiendo más de diez grupos distintos. Algunos de estos grupos se describen a continuación.

Fenoxiácidos: Estos herbicidas se introdujeron a mediados de los años cuarenta con el descubrimiento en 1942 del 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético) derivado del ácido fenoxiacético y son los más extensamente usados a nivel mundial. Este tipo de plaguicidas presenta una fuerte actividad herbicida por lo que se pueden emplear a dosis muy bajas con una gran selectividad.

Cloroacetamidas: son acetamidas halogenadas en el carbono α con sustituyentes orgánicos sobre el átomo de nitrógeno. Poseen actividad herbicida y se emplean en tratamientos de preemergencia. Este tipo de herbicidas de aplicación en suelo controlan gramíneas anuales en germinación y algunas malezas de hoja ancha al ser inhibidores de la división celular.

Dinitroanilinas: son algunos de los herbicidas más intensamente usados en la agricultura y se emplean frecuentemente incorporado en el suelo, como herbicidas selectivos en muchos cultivos. Tienen una solubilidad en agua muy baja, lo que reduce al mínimo la lixiviación.

Triazinas: Son una familia que químicamente tienen un anillo heterocíclico, análogo al anillo de benceno, pero con tres átomos de carbono reemplazados por átomos de nitrógeno. La mayoría de las triazinas comerciales son simétricas y de baja solubilidad en agua. Recientemente se han desarrollado triazinas no simétricas de mayor solubilidad y menor residualidad. Se ha encontrado resistencias de algunas malezas a estos herbicidas. La estructura general de la triazinas se observa en la Figura 3.

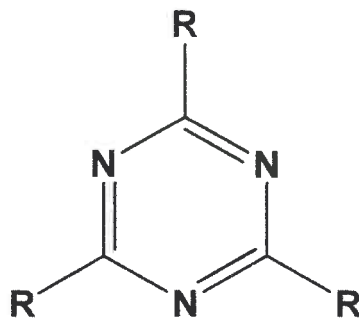


Figura 3. Estructura general de las triazinas

Entre las triazinas se encuentra la atrazina que es un herbicida que se ha utilizado durante los últimos cuarenta años. Se usa principalmente en cultivos de maíz, sorgo, caña de azúcar. Tiene una vida media de 60 a 100 días. Es uno de los herbicidas más usados en la región de América Central y el Caribe. La atrazina ha sido clasificada como un plaguicida de uso restringido en Estados Unidos, debido a su potencial para contaminar aguas subterráneas. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) ha establecido un límite recomendado de hasta 3 microgramos por litro en agua proveniente de napas freáticas que se utilicen para el consumo humano. Tal nivel no implicaría riesgos para la salud de los consumidores. Es un herbicida levemente tóxico para pájaros y peces; aunque se ha encontrado que no es tóxico para abejas [27]. En la Figura 4 se puede observar la estructura química de la atrazina.

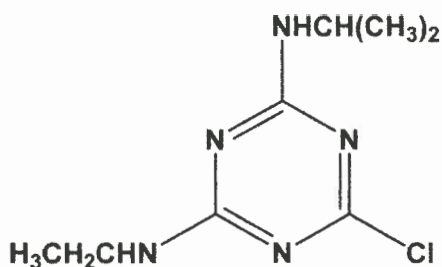


Figura 4. Estructura química de la atrazina

Glifosato: Los herbicidas más comercializados en la República Argentina incorporan dentro de su fórmula al glifosato, en razón de que algunos cultivos transgénicos, como la soja, por ejemplo, están manipulados genéticamente para desarrollar una resistencia a esa sustancia química. El glifosato (*N*-fosfometilglicina), es un ácido débil formado por una molécula de glicina y un radical fosfometilo sustituyendo un hidrogeno del grupo α -amino. Es un herbicida no selectivo protector de cultivos, desarrollado para eliminación de hierbas y de arbustos. Este producto constituye uno de los descubrimientos agroquímicos más importantes de este siglo, siendo el herbicida de mayor uso en el mundo por ser efectivo y porque permite su aplicación de diversas maneras. El compuesto es un polvo cristalino blanco e inodoro resistente a la volatilización y a la degradación solar, con un

peso específico 1,704 g/cm³ y una solubilidad en agua de 12 g/L (25 °C) en forma ácida, es insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos tales como acetona, etanol etc. [28]. Es un compuesto muy polar y anfotérico, que se puede encontrar formando sales iónicas diversas, en función del pH del medio. Las constantes de acidez para este herbicida son: pKa₁<2; pKa₂=2,4; pKa₃=5,5 y pKa₄=10,2. La ionización del glifosato se produce según las reacciones de la Figura 5 [29].

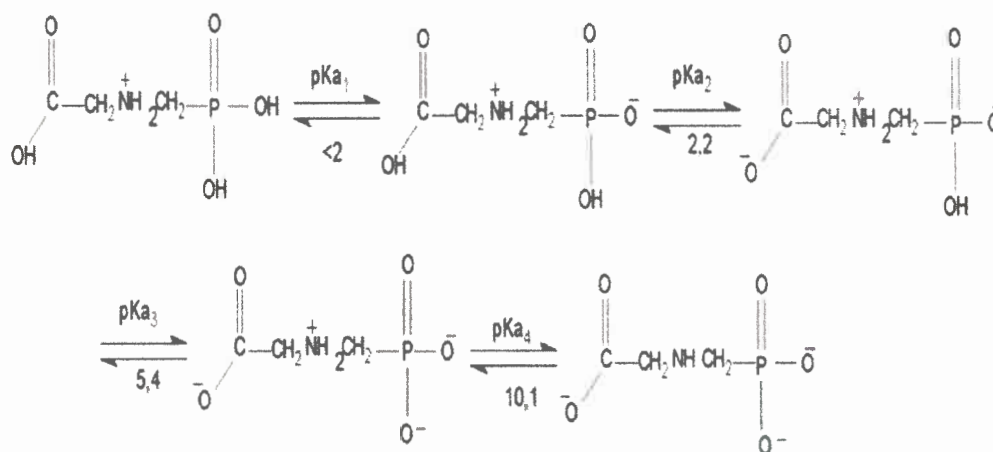


Figura 5. Equilibrios ácido-base del glifosato con sus pKa correspondientes

La degradación del glifosato en el ambiente tiene lugar principalmente por la vía microbiana, siendo el principal metabolito el ácido aminometilfosfónico (AMPA) el cuál es más persistente que el propio glifosato, en la Figura 6 se puede observar el glifosato y su metabolito principal AMPA.

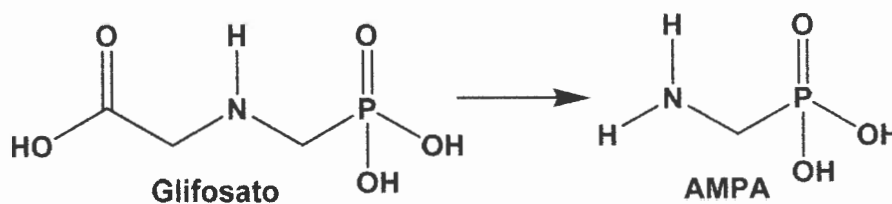


Figura 6. Degradación de glifosato a AMPA

1.5.4. Insecticidas

Los insecticidas son sustancias ampliamente utilizadas en el medio agrícola para controlar y erradicar insectos que afectan cultivos, por lo que permiten mejorar la producción y proteger los productos almacenados, siendo considerados como uno de los principales factores del incremento de la productividad en el siglo XX. Se emplean para erradicar los insectos en cualquiera de sus etapas de desarrollo, tanto los huevos, las larvas como los adultos.

En la clasificación de los insecticidas según su estructura química se pueden destacar cinco grandes familias de compuestos:

Carbamatos: Este grupo presenta un gran interés en el campo de los plaguicidas por su gran actividad biológica. Todos estos productos derivan del ácido carbámico, de fórmula HO-CO-NH_2 . Podemos distinguir tres grandes familias de compuestos: los *aril-N-metilcarbamatos*, los *carbamatos heterocíclicos* y las *oximas*.

Organoclorados: Estos productos constituyen un grupo de compuestos de importancia histórica, desarrollados durante la segunda Guerra Mundial, el más conocido es el DDT (DicloroDifenilTricloroetano). Cuando Müller descubrió las propiedades del DDT se inició una revolución en el campo de los plaguicidas, desencadenando la incorporación de productos derivados de la síntesis orgánica a la lucha contra plagas y enfermedades [30]. No obstante, la mayoría de estos compuestos están actualmente prohibidos en países industrializados debido a su elevada persistencia en el medio ambiente, por tener una marcada capacidad de biomagnificación, y por ser posibles carcinógenos. Sin embargo, todavía se emplean en países en vías de desarrollo para luchar contra el mosquito *Anopheles*, transmisor de la malaria.

Entre los insecticidas organoclorados se pueden distinguir fundamentalmente tres familias: la del DDT y análogos, la del *hexaclorociclohexano* (HCH), también conocido como lindano, y la de los *ciclodienos clorados*, en la Figura 7 se puede observar la estructura química general de los bifenilos policlorados.

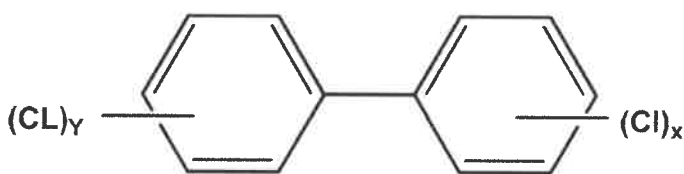


Figura 7. Estructura química general de los compuestos bifenilos policlorados

Organofosforados: Los derivados fosforados ocupan hoy en día un lugar preponderante entre los plaguicidas más conocidos y utilizados, ya que constituyen un grupo con una elevada eficacia insecticida. Su actividad fue descubierta por el químico alemán Gerhard Schrader durante la segunda Guerra Mundial. Junto a su toxicidad para los mamíferos pronto se descubrió su actividad como insecticidas. Los plaguicidas organofosforados pueden considerarse como derivados del ácido fosfórico, expresado por su fórmula desarrollada como se observa en la Figura 8.

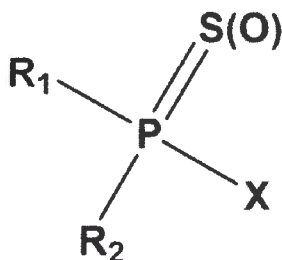


Figura 8. Estructura química general de los organofosforados

Según se remplacen los distintos sustituyentes, se van construyendo los distintos tipos de insecticidas organofosforados, que son: *ortofosfatos*, *tiofosfatos*, *tiolfosfatos*, *ditiofosfatos*, *fosfonatos* y *pirofosforamidas*.

Piretroides: Los piretroides son moléculas con actividad insecticida que se aplican a cosechas, plantas de jardines, animales domésticos y también directamente a seres humanos. La α -cipermetrina (α -CM) se deriva de los estereoisómeros que juntos componen

el piretroide cipermetrina, que es uno de los piretroides más comunes que se utilizan en la agricultura en todo el mundo [31]. Permanecen durante más tiempo en el medio ambiente que las piretrinas (constituyente principal del derivado vegetal pelitre) ya que la modificación química en su fórmula los hace más estables a la luz solar y el calor. Las características más favorables de estos compuestos son las de ser fácilmente degradables en el suelo y no presentar efectos tóxicos notables sobre la salud humana. En general son moléculas bastante estables en la atmósfera y a la exposición solar.

Neonicotinoides: son una familia de insecticidas que actúan en el sistema nervioso central de los insectos y, con menor toxicidad, en vertebrados (aves y mamíferos). Los neonicotinoides están entre los insecticidas más usados a nivel mundial, pero recientemente el uso de ciertos productos químicos de esta familia está siendo restringido en muchos países debido a una posible conexión con el desorden del colapso de colonias apícolas [32].

1.6 ANTIBIÓTICOS DE USO FRECUENTE EN APICULTURA

Los antibióticos de uso apícola generalmente son moléculas complejas que pueden poseer distintos grupos funcionales en su estructura química. Pueden ser divididos en diferentes sub-grupos tales como:

Tetraciclinas: Son agentes básicamente bacteriostáticos, con actividad frente a una gran variedad de microorganismos, por lo que se han convertido en uso habitual en seres humanos, en animales y en algunas áreas de la agricultura [33]. Las tetraciclinas constituyen un conjunto conformado por clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina. También pueden ser semisintéticos (metaciclina, demeclociclina, doxiciclina, minociclina, limeciclina, rolitetraciclina y tigeciclina) derivados de diferentes especies de *Streptomyces*. Se caracterizan por compartir el mismo núcleo tetracíclico naftaceno, espectro antimicrobiano, mecanismo de acción y toxicidad. Las principales diferencias radican en su perfil farmacocinético [34,35]. La más utilizada en apicultura es la oxitetraciclina y por ello la aparición en miel de ésta resulta común, pese a que su efecto desaparece tras 2 meses de estar almacenada.

Macrólidos: Los macrólidos son antibióticos básicos y lipofílicos que son potentes contra una variada cantidad de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas usadas para el tratamiento de enfermedades infecciosas en animales de granja. Algunos de estos compuestos son: tilosina, eritromicina y lincomicina. La tilosina, muy difundida en el campo de la medicina veterinaria, es utilizada como terapéutico y promotor del crecimiento [36]. Junto con la lincomicina han sido identificadas como efectivas en el tratamiento de las cepas de Loque americana resistentes a la oxitetraciclina [37].

Aminoglicósidos: Los aminoglicósidos son antimicrobianos de uso habitual en la práctica clínica. Su estructura química se compone de aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un alcohol cíclico hexagonal con grupos amino. Estos muestran actividad bactericida frente a bacilos gramnegativos aerobios, entre ellos, *Enterobacteriaceae* y los bacilos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter spp* [38]. La estreptomycinina ha mostrado ser un antibiótico efectivo para el tratamiento de Loque americana.

1.7. ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS Y MEDICAMENTOS DE USO APÍCOLA

El incremento continuo de plaguicidas y sustancias tóxicas en el medio ambiente nos obligan a disponer de métodos analíticos que sean rápidos, económicos, selectivos y suficientemente sensibles para poder llevar un control sobre estas sustancias en el ambiente o sobre diferentes matrices, teniendo en cuenta que algunas son muy complejas. Por ejemplo, el análisis de residuos y contaminantes en los alimentos supone la determinación de sustancias que se encuentran en cantidades muy pequeñas (del orden de ppm) en matrices muy complejas, como en el caso de la miel. Por lo tanto, es necesario realizar en primer lugar una extracción cuantitativa de la sustancia y posteriormente purificar y/o concentrar el extracto obtenido antes de proceder a su detección y cuantificación. Por esta razón se han desarrollado diferentes procesos de extracción, concentración y análisis, implementando una gran variedad de técnicas, teniendo en cuenta las propiedades químicas de cada molécula como son su hidrofiliidad, pH, volatilidad etc.

1.7.1. Extracción de la muestra

La preparación de la muestra, es una etapa muy importante. En general las metodologías de extracción empleadas por años utilizan grandes cantidades de solventes y largos tiempos, como la extracción líquido-líquido, la extracción por soxhlet, entre otras. Por lo cual el desarrollo de nuevas técnicas de extracción que permitan disminuir el tiempo en el proceso de preparación de la muestra y utilizar un bajo consumo de disolventes es de gran interés para la consecución de métodos analíticos rápidos y de alta fiabilidad, siendo a su vez más amigables con el medio ambiente. Algunos de estos métodos implican la utilización de fases sólidas, como la extracción en fase sólida (SPE), técnica que consiste en la adsorción de los analitos en un adsorbente sólido y en la posterior desorción de los compuestos mediante la utilización de un pequeño volumen de disolvente orgánico.

Anastasiades y colaboradores [39] desarrollaron una metodología para el análisis de residuos de plaguicidas en material vegetal denominada “QuEChERS”, acrónimo en inglés de Quick (rápido), Easy (fácil), Cheap (barato), Effective (efectivo), Rugged (robusto), Safe (seguro). La metodología “QuEChERS” permite una extracción simplificada de un gran número de residuos de plaguicidas en un amplio rango de matrices con características muy diferentes. Este procedimiento, aunque fue desarrollado inicialmente por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (FDA) para la determinación de plaguicidas en vegetales, ha sido también aceptado por la Association of Official Analytical Chemists (AOAC 2007.01) y en Europa adaptado mediante la Norma EN 15662 [40].

1.7.2. Métodos de detección y cuantificación:

A) *Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)*

La HPLC, es uno de los métodos ampliamente utilizado para el análisis de plaguicidas. En particular se emplea para la determinación de plaguicidas polares o térmicamente lábiles [41]. La mayoría de los métodos de HPLC desarrollados para el análisis de plaguicidas son en fase reversa, con columnas rellenas de una fase estacionaria no polar como la C8 o C18, mientras que la fase móvil es relativamente polar. El detector más utilizado en HPLC es el ultravioleta de longitud de onda fija (UV), el de onda variable y el

detector de diodos en serie, (DAD). El detector UV, aunque se puede utilizar para la mayoría de los plaguicidas, presenta el inconveniente de su baja sensibilidad y selectividad, por lo que cada vez es más habitual la detección por espectrometría de masas (LC-MS). La LC-MS presenta la ventaja de analizar los plaguicidas sin la necesidad de derivatizar los compuestos para aumentar su sensibilidad, a la vez que se obtiene información estructural que permite su correcta identificación [41].

Espectrometría de masa acoplada a cromatografía líquida

La espectrometría de masas acoplada a la HPLC ha sido una de las técnicas analíticas que más se ha extendido en los últimos años, en el campo de la química analítica aplicada al análisis de alimentos, la salud y el medio ambiente. La detección está basada en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo con relación masa: carga, y finalmente se detectan por medio de un dispositivo adecuado. Los detectores de espectrometría de masa presentan la gran ventaja que pueden analizar una gran variedad de compuestos en diversas matrices con una gran certeza en la asignación de estructuras químicas.

En general un detector por espectrometría de masas debe realizar las siguientes tareas: 1) debe ionizar a los analitos, ya que esta técnica sólo detecta especies cargadas; 2) los iones que poseen diferentes relaciones masa-carga (m/z) deben ser separados para poder ser luego enfocados hacia el detector y, 3) ser detectados en forma individual. Por tanto, todos los detectores espectrométricos de masa poseen tres características particulares: a) la fuente de ionización; b) el analizador de iones y, c) el detector de especies cargadas. Son las diferencias en esos componentes las que caracterizan a los distintos tipos de detectores espectrométricos de masa para HPLC [42]

a) Métodos de ionización

La ionización de los analitos es el paso más importante porque es la base del masa, ya que como se mencionó anteriormente esta técnica sólo detecta especies cargadas, es eficiente y sencilla utilizando la aplicación de campos eléctricos y magnéticos. A lo largo

de los últimos años, se han utilizado diferentes técnicas para ionizar en fase líquida, como la ionización por Termospray (TSI), la fotoionización a presión atmosférica (APPI), la ionización por electrospray (ESI), entre otras. Pero a lo largo de este texto solo describiremos esta última, que fue la utilizada.

Ionización por electrospray

Es la técnica de ionización más suave, ideal para compuestos lábiles, que presenta una alta aplicabilidad y sensibilidad. Esta interface debe cumplir con tres funciones que son: 1) formación de los iones, 2) nebulización y, 3) eliminación del solvente. La formación de iones en la interface de electrospray puede realizarse de varias maneras.

La ionización del analito ocurre cuando avanza el proceso de evaporación del disolvente y se expulsan iones de la gota. Este proceso de evaporación y expulsión de iones genera grandes campos eléctricos en la superficie de la gota que generalmente inducen la ionización de los analitos. *La nebulización* del eluyente se realiza mediante un flujo elevado de gas (generalmente nitrógeno) en combinación con un fuerte campo eléctrico establecido entre la aguja por la que fluye el eluyente y un electrodo conectado a tierra. Esta combinación permite la formación de un fino spray que a continuación es sometido a *evaporación del solvente* mediante el flujo a contra corriente de gas. A medida que se evapora el solvente que forma estas gotitas las mismas reducen su tamaño y los iones incluidos en ellas se repelen más fuertemente hasta que estallan (estallido Coulómbico). Todos estos procesos llevan a la obtención de una gran cantidad de iones del analito (y de otras moléculas que puedan encontrarse en el eluyente) en fase gaseosa. Los iones son luego transportados mediante enfocado iónico hacia el analizador de masas a través de un capilar de vidrio que separa las zonas de vacío de aquellas de mayor presión. La interface de spray eléctrico generalmente opera con flujos entre 1 y 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. La ionización por spray eléctrico puede producir iones de carga múltiple, particularmente en las macromoléculas como los péptidos y las proteínas. Esta característica es sumamente ventajosa para el análisis de compuestos de alto peso molecular ya que el analizador de masas basa su accionar en la relación masa/carga (m/z) (Figura 9) [43].

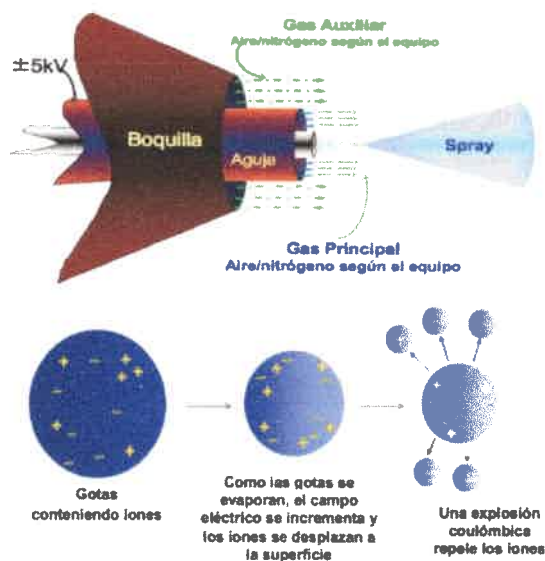


Figura 9. Esquema de funcionamiento de una Interface Electro spray Ionization (ESI), tomado capacitación de HENK

b) Analizadores de espectrometría de masa

Existen diversos analizadores de masa (MS), entre los más utilizados están: los de tiempo de vuelo, Time of Flight (TOF), las trampas iónicas o trampa de iones cuadrupolares, Quadrupole Ion Trap, (Q/T), los de resonancia iónica ciclotrónica por transformada de Fourier, Ion Cyclotron Resonance, (ICR), trampa de iones lineales ó Linear Ion Trap, (LIT). Quizás uno de los detectores selectivos de masas más usados en combinación con la cromatografía de gases, es el analizador cuadrupolar (Q) coloquialmente llamado cuadrupolo o filtro de masas [44]. Un analizador de iones del tipo cuadrupolo consiste en cuatro barras cilíndricas ubicadas en paralelo en un arreglo simétrico con una alta precisión. A las barras situadas en posición opuesta se les aplica una corriente continua (DC) y un voltaje de radiofrecuencia (RF). De esta manera el paso de los iones que son enfocados eléctricamente ingresa a la zona del cuadrupolo influenciados por los efectos combinados y estos empezarán a oscilar en un plano perpendicular a las cuatro barras. La trayectoria de los iones depende de la relación masa: carga (m/z).

c) Sistemas *tándem* (MS/MS) triple cuadrupolo (qqq).

Poder acoplar dos analizadores de espectrometría de masa y combinar tres cuadrupolos en serie aumenta la sensibilidad y la selectividad, los dos cuadrupolos de los extremos funcionan como analizadores de iones y el tercer cuadrupolo (el del medio) permite el aislamiento de un ion en la celda de colisión, eliminando otros iones o fragmentos que pueden interferir. Es posible producir la fragmentación de los iones aislados en el cuadrupolo del medio y en este caso se produce por la colisión del ion seleccionado con moléculas de un gas inerte (por ejemplo, argón). Esta técnica supera a la espectrometría de masas “unidimensional” (con un solo analizador de masas). También puede alcanzar altos límites de resolución, sensibilidad, rango de masas y, sobre todo, de volumen de información requerida para elucidar una estructura molecular [45].

B) Cromatografía gaseosa (GC)

Junto a la HPLC la cromatografía de gases es probablemente la técnica de más amplia aplicación. Esta puede ofrecer una excelente capacidad de separación y sensibilidad a la hora de analizar compuestos volátiles. El principio de esta técnica se basa en la volatilización de la muestra y su posterior elución, que se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte, que transporta el analito a través de la columna, recubierta con la fase estacionaria. Una de las dificultades que presenta el método, es que las moléculas poco volátiles y termolábiles, generalmente no se pueden analizar [46].

A continuación, se describen brevemente los principales componentes de un equipo de cromatografía gaseosa.

Inyector

La muestra es inyectada con una jeringa especial a través de un septum de goma (o hule) de silicona autosellante, a un alineador de vidrio (*glass insert*) contenido en un bloque metálico, donde es vaporizada y barrida hacia la columna. El bloque se calienta a una temperatura que se fija en un valor suficientemente alto para convertir prácticamente en forma instantánea la muestra líquida en vapor. La cantidad de muestra inyectada es del orden de μL para líquidos y algo superior para gases.

Columna y horno del GC

Las columnas del GC se encuentran dentro de un horno de temperatura controlada. Por lo general, un extremo de la columna está unido al inyector y el otro extremo está unido al detector. Las columnas varían en longitud, diámetro y recubrimiento interno. Cada columna está diseñada para su uso con diferentes compuestos.

Detectores

Existe una selección completa de detectores como el FID (*detector de ionización de llama*), TCD (*detector de conductividad térmica*), FPD (*detector fotométrico de llama*), ECD (*detector de captura electrónica*). El tipo de detector se elegirá en función del tipo de analito y de análisis que se requiera. Los más utilizados son FID y ECD cuyo funcionamiento se describe a continuación.

Detector de ionización de llama

Este tipo de detector es, en la práctica, el más utilizado, ya que es sensible a compuestos que presentan enlaces C-H, por lo que son muy pocos los compuestos que no dan señal en él. En un detector de ionización de llama, el gas procedente de la columna se mezcla con hidrógeno y ésta mezcla se quema en una cámara con exceso de aire. Por encima de la llama, se dispone un colector cilíndrico polarizado con el fin de recoger los iones generados; y se mide la corriente iónica que se establece entre la punta del quemador y el electrodo colector.

Detector de captura electrónica

El detector de captura electrónica ocupa probablemente el segundo lugar entre los detectores más utilizados, debiéndose este hecho a su excepcional sensibilidad [46]. Este hecho junto a su selectividad hacia compuestos de enorme interés (fundamentalmente en los campos de medio ambiente y toxicología), hacen que sea enormemente utilizado para la detección y cuantificación a nivel de trazas. En un detector de captura electrónica se utiliza una fuente de radiación β para bombardear el gas portador que pasa a través de una cámara de ionización, generándose de esta forma un plasma de iones positivos, radicales libre y

electrones térmicos. Cuando un compuesto activo entra a este detector, penetra junto con el gas portador, en la celda de medida, puede capturar a los electrones térmicos para generar bien los iones negativos de menor movilidad que los electrones, bien fragmentos neutros por recombinación con los iones positivos del plasma generado en el proceso primario; este proceso de captura origina una disminución de la corriente del fondo del detector, que puede relacionarse de forma cuantitativa con la cantidad de analito que está pasando a través del detector.

Espectrometría de masa acoplada a cromatografía gaseosa

Las técnicas de cromatografía de gases y espectrometría de masas, unidas en un poderoso tándem, GC-MS, son herramientas imprescindibles en los análisis ambientales, forense, de productos naturales, control de doping, alimentos, toxicología y en muchas más áreas de investigación [47]. Un detector selectivo de masa MSD consta de una fuente de ionización; un analizador de iones y un detector de especies cargadas.

Principalmente, existen dos métodos para producir la ionización de la muestra en estado gaseoso, la ionización por bombardeo o impacto electrónico EI, (Electron Impact, por sus siglas en inglés), que es mucho más utilizada, y la ionización química CI, (Chemical Ionization, por sus siglas en inglés) de iones positivos o de iones negativos, como un método de ionización “complementario”, “suave”. La CI se usa cuando en los espectros de masas obtenidos por el EI, no se registran iones moleculares, puesto que su fragmentación es excesivamente intensa, debido a su labilidad muy alta (tiempo de vida extremadamente corto, $< 10^{-6}$ s) y ello no permite realizar su determinación [47].

1.8. ANTECEDENTES

Tal como se mencionó anteriormente los análisis de residuos tanto en miel como en matrices ambientales y otros alimentos se realizan en la mayoría de los casos, empleando técnicas cromatográficas, ya sea HPLC o GC

Pirard y colaboradores [52] reportaron en el 2007 el desarrollo y la validación de un método multiresiduos para identificar y cuantificar 17 plaguicidas insecticidas: (carbofuran, metiocarb, pirimicarb, dimetoato, fipronil, imidacloprid;) herbicidas: (amidosulfurón, rimsulfuron, atrazina, simazina, cloroturon, linuron, isoxaflutol, metosulam); fungicidas: (dietofencarb) y 2 metabolitos (Methiocarbsulfóxido y 2-Hydroxytertbutylazine) en miel. Estos autores propusieron un método basado en la extracción líquido-líquido y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en modo tándem. La robustez del método fue probada analizando más de 100 muestras de miel y cera de abeja de diferentes puntos de Bélgica.

Por otro lado, Bernal y colaboradores estudiaron un procedimiento que implica una etapa de extracción y posterior análisis mediante cromatografía de gases con detección de ionización de llama para determinar los residuos de acrinatrina y su principal metabolito, 3-fenoxibenzaldehído, en la miel, encontrando un nivel de trazas de los analitos de interés [53].

Por su parte Sillard, y Annette, [54] determinaron la presencia de residuos del acaricida fluvalinato en 141 muestras de cera de abejas. A partir de los niveles detectados determinaron el porcentaje de muestras que reviste peligro potencial de traspaso de residuos a la miel. Los resultados obtenidos los relacionaron con el tiempo que permanece la cera en la colmena. En la metodología utilizada contemplaron la extracción líquido-líquido, purificación y cromatografía de gases, con un límite de detección de 1ppb y una recuperación media de 96,14%. Determinaron la presencia de residuos de fluvalinato en un 87,2% de muestras, en un rango de 5 a 8 ppb. Mientras que, Alberio Romano [27], desarrolló una metodología analítica para la determinación en miel de los residuos de plaguicidas y otros contaminantes orgánicos, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, basada en el empleo de la dispersión de matriz en fase sólida y en la determinación cromatográfica empleando detectores selectivos de nitrógeno-fósforo y captura de electrones, así como la espectrometría de masas, se analizaron mieles de distinto origen botánico y geográfico y no se detectaron residuos a niveles por encima de sus límites de detección.



Por otra parte, Kiljanek y colaboradores desarrollaron y validaron un método para la determinación de 200 plaguicidas y metabolitos de plaguicidas en muestras de abejas. Casi el 98% de los compuestos incluidos en este método están aprobados para el uso dentro de la Unión Europea, como sustancias activas de productos fitosanitarios o de medicamentos veterinarios, utilizados por los apicultores para controlar los ácaros de *Varroa destructor* en las colmenas. La preparación de la muestra se basó en el método QuEChERS. La mayoría de los plaguicidas, incluyendo neonicotinoides y sus metabolitos, se analizaron por LC-MS/MS, pero algunos de los plaguicidas, insecticidas, especialmente piretroides, fueron analizados por GC-MS. El análisis de las muestras de miel de abejas enriquecidas hasta el límite de cuantificación (LOQ) mostró aproximadamente el 98% de recuperación y un 97% de los analitos mostraron una recuperación en el rango requerido de 70-120%. También se establecieron linealidad y el efecto de matriz. Los LOQ de plaguicidas estaban en el rango de 1 a 10 ppb. El método desarrollado permite la determinación de los insecticidas a concentraciones de 10 ppb o menos, excepto abamectina y tebufenozida. El método se utilizó para investigar incidentes con envenenamiento de abejas [55].



CAPÍTULO II: DISEÑO EXPERIMENTAL



DISEÑO EXPERIMENTAL

El estudio realizado en este trabajo de tesis incluyó tres fases como se muestra a continuación

- Fase de diagnóstico
- Fase de intervención (campo)
- Fase de laboratorio

Cada una de las fases se resume en la Figura 10.

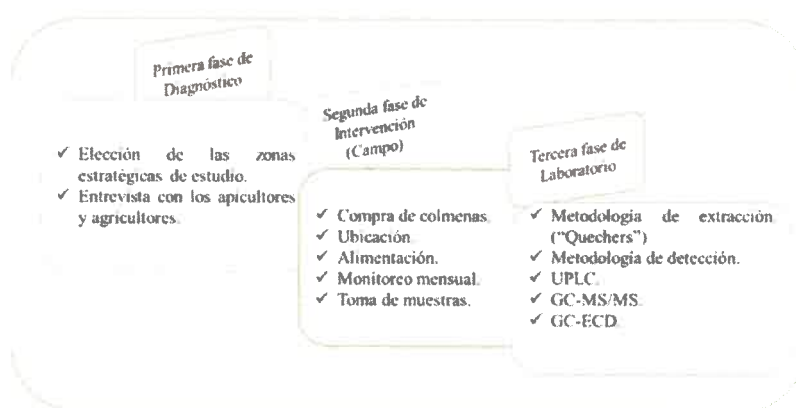


Figura 10. Fases del desarrollo del proyecto

2.1. FASE DE DIAGNÓSTICO

Teniendo en cuenta que uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar la contaminación ambiental a través de los residuos que pueden quedar en la miel se seleccionaron dos zonas ecológicas diferenciadas: una zona agrícola en donde hay una alta actividad o aplicación de agroquímicos y otra zona de monte nativo en donde la actividad agrícola es mucho menor o casi nula. Inicialmente la población muestra está constituida por 92 colmenas ubicadas en ambas zonas, durante el proyecto se fueron muriendo algunas de las colmenas. La zona donde hay alta actividad agrícola se ubica en la zona rural cercana a la localidad de Alcira (Gigena) en la provincia de Córdoba (49 colmenas) y la zona con baja actividad agrícola está ubicada en la zona rural cercana a la localidad de Merlo en la provincia de San Luis (43 colmenas).

Elección de las zonas estratégicas de estudio y ubicación: Los apiarios de la zona de MONTE NATIVO, ubicados en las inmediaciones de la localidad de Merlo, provincia de San Luis, pertenecen al apicultor Iván Severini, y los apiarios de la zona AGRÍCOLA, ubicados en las inmediaciones de la localidad de Alcira Gigena, provincia de Córdoba, pertenecen al apicultor Raúl Putero. En la Figura 11 se muestra un mapa con la ubicación de las colmenas.

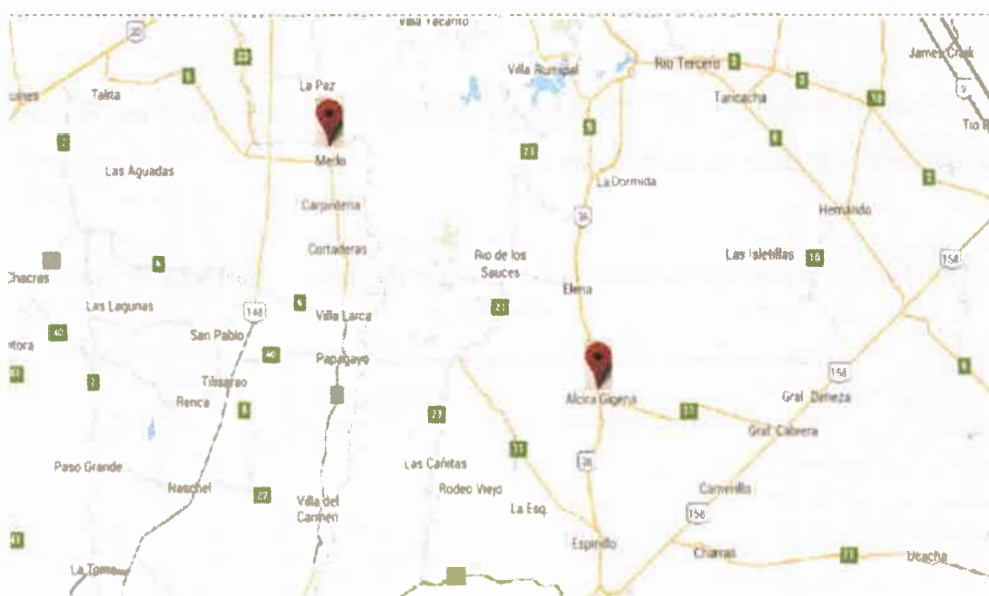


Figura 11. Mapa de ubicación de las colmenas.

Los apiarios que pertenecen al apicultor Iván Severini se denominan como se observa en la tabla 3 de la zona de Merlo.

Tabla 3. Datos de geoposicionamiento de los apiarios de la zona de Monte Nativo (Merlo, San Luis)

DON COTO	32° 21' 46.27" S 65° 01' 18.84" O 829 msnm
EL AGUARIBAY	32° 25' 10.64" S 65° 01' 03.22" O 811 msnm
LA COLONIA	32° 24' 25.07" S 65° 03' 17.98" O 747 msnm

Los apiarios de la zona AGRÍCOLA, que pertenecen a Raúl Putero, por su parte son identificados como se observa en la Tabla 4.

Tabla 4. Datos de geoposicionamiento de los apiarios de la Zona Agrícola (Alcira Gigena, Córdoba)

CAMINO CABRERA	32° 49' 40.35" S 64° 13' 08.55" O 474 msnm
ARROYO TEGUA	32° 41' 23.10" S 64° 22' 02.35" O 558 msnm
CAPILLA TEGUA	32° 38' 53.53" S 64° 21' 02.82" O 578 msnm

Entrevista con los apicultores y agricultores: Se convocó a productores de ambas regiones para tener conocimiento de los productos aplicados en los alrededores de los apiarios. En cada zona, se trabajó en 3 apiarios, que ya habían sido previamente seleccionados con los apicultores. Las colmenas del ensayo recibieron tratamientos con

acaricida orgánico (timol), mientras que las de los apicultores fueron tratadas con moléculas sintéticas principalmente amitraz.

De la gran cantidad de plaguicidas agrícolas y medicamentos de uso apícola que se utilizan en la actualidad fueron seleccionados los siguientes teniendo en cuenta que son los más utilizados en las zonas de estudio: timol, clorpirifos, fipronil, atrazina, cumafós, amitraz, diclorvos, endosulfan y cipermetrina. En la Figura 12, se muestran las estructuras químicas de los analitos seleccionados para el objeto de estudio.

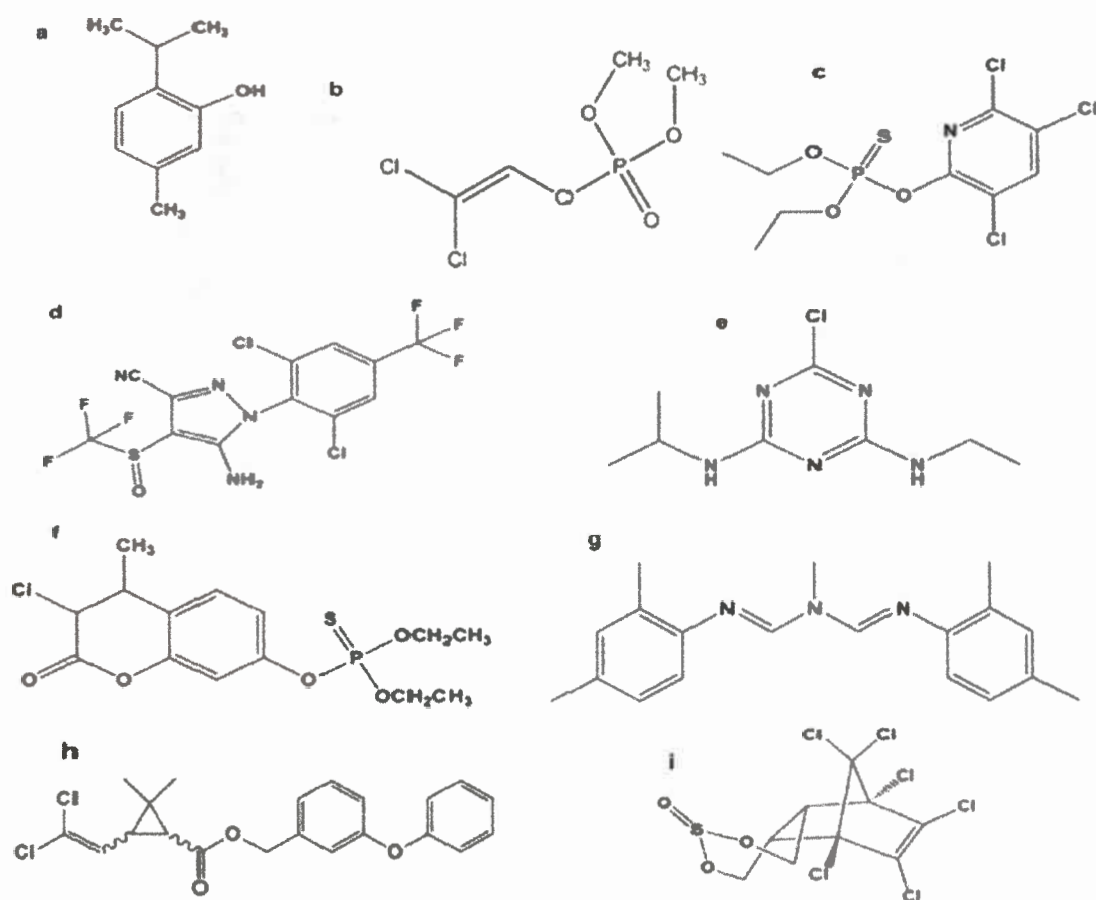


Figura 12. Estructuras químicas de a) timol, b) diclorvos, c) clorpirifos, d) fipronil, e) atrazina, f) cumafós, g) amitraz, h) cipermetrina, i) endosulfan.,

2.2. FASE DE INTERVENCIÓN A CAMPO

Alimentación y monitoreo: El manejo integral de las colmenas fue similar en todos los casos, y consistió en la regulación de espacio, control de reservas alimenticias, inspecciones sanitarias, monitoreo de Loque americana, varroa y nosemosis mensualmente, para su posterior análisis en el Laboratorio de sanidad de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la UNRC. Estos análisis fueron realizados por la doctoranda Lic. Paula Andrea Melegatti, como parte de su tesis de Doctorado. Para nuestros análisis se tomaron en las colmenas dos trozos de panal para su posterior análisis como se describe más adelante (Figura 13).



Figura 13. Toma de muestras para diagnóstico de enfermedades

Toma de muestras: Para nuestros objetivos, la toma de las muestras de miel para la detección de residuos de plaguicidas se realizó extrayendo una cantidad del marco (preferiblemente operculado) de la cámara de cría y del alza melaría como se muestra en la Figura 14.



Figura 14. *Obtención de las muestras de miel*

Se tomaron un total de 445 muestras de miel durante los 5 muestreos realizados, en: verano 2013; otoño; invierno y primavera del 2014 y otoño 2015. El muestreo de verano 2015 no se pudo llevar a cabo principalmente por las condiciones climáticas de abundantes lluvias.

Con el fin de minimizar el número de muestras y teniendo en cuenta la ubicación de las colmenas (zonas), el tipo de tratamiento (sintético u orgánico), la fecha de recolección, el número del alza, y teniendo en cuenta de que la cantidad de muestra no era suficiente para realizar los ensayos, se realizaron pools o mezclas de las mismas. Estos pools involucran 206 muestras que fueron escogidas al azar, pero abarcando los 5 muestreos realizados desde el verano de 2013 hasta el verano de 2015. Se trabajó solamente con la miel, obteniendo un total de 85 pools que involucran las 206 muestras seleccionadas. Estas muestras se recolectaron en envases adecuados de plástico, rotuladas e inmediatamente almacenadas en frío para su conservación. Se tuvo en cuenta los datos referentes a la ubicación geográfica del colmenar, fecha de recolección, condiciones de recolección y entorno vegetal, el análisis sanitario brindado, si era orgánico o sintético cómo se mencionó anteriormente, y también se tuvo en cuenta la posición de los cajones, alza



melaria o cámara de cría. Se llevó un registro de cada visita. Se analizaron un total de 85 pools en total, los cuales fueron enumerados teniendo en cuenta el orden de su análisis.

2.3. FASE DE LABORATORIO

En la tercera fase de laboratorio se realizó un análisis fisicoquímico y se pusieron a punto diferentes técnicas cromatográficas para la determinación de residuos de plaguicidas y medicamentos como de describirá detalladamente en el capítulo III. Además, se puso a punto la metodología de extracción para los analitos estudiados.



CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS



3.1. Reactivos

Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich y se utilizaron sin ningún tratamiento previo. Los estándares se mantuvieron refrigerados a 4 °C y protegidos de la luz.

3.2. Solventes

Como solventes se emplearon: acetona, acetonitrilo, metanol, ácido fórmico y agua grado HPLC. Las fases móviles fueron preparadas en el laboratorio, filtradas a través de filtros de 47 mm de diámetro y 0,45 μm de poro (Phenomenex, USA) desgasada con una bomba de vacío (Yamato, Handy Aspirator Wp 15).

3.3. Equipos

Se utilizó un espectrofotómetro UV/Vis marca Jenway modelo 6705 para llevar a cabo la caracterización espectroscópica de los analitos. Para el análisis de cromatografía líquida (HPLC), se empleó un cromatógrafo marca Waters, modelo 2695 acoplado a un detector Waters 2998 (photodiode array detector) y a un detector de fluorescencia (FD) (Figura 15).



Figura 15. Equipo de HPLC-DAD acoplado a un detector de fluorescencia.

También se utilizó un HPLC marca Waters, modelo Alliance 2695 (USA) acoplado a un detector de arreglo de diodos marca Waters, modelo 2998 y un detector espectrométrico de masas en tándem marca Micromass Quattro UltimaTM Pt (Manchester, UK). (Figura 16)



Figura 16. *Equipo de LC-MS/MS*

Para los experimentos por HPLC con detección electroquímica (HPLC-DE), se utilizó un cromatógrafo que consistió en una bomba Gilson modelo 307, un inyector Rheodyne modelo 7125 y un detector amperométrico de construcción local (Figura 17).



Figura 17. *Equipo HPLC-DE*

Se utilizó un sistema ACQUITY UPLC, para realizar el análisis multiresiduo. Ubicado en laboratorio INQUISAL (Instituto de Química de San Luis), en la Universidad Nacional de San Luis, con una columna ACQUITY, C18 1,7 μm , 5 cm x 2,1 mm, (Figura 18).



Figura 18. Equipo UPLC-MS/MS

Los análisis de cromatografía gaseosa se realizaron en un cromatógrafo gaseoso marca HP (Hewlett Packard) modelo 6890, con detector de captura de electrones. Se trabajó con una columna marca Agilent J&W HP5 ms [(5%-phenyl)-methylpolysiloxane], medianamente polar de 30 x 0,25 mm x 0,25 micrones. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: el horno se programó con una temperatura inicial de 200 °C, después incrementa a 270 °C a una velocidad de 20 °C/min por (3,5 min), y se mantiene por tres minutos más a esta temperatura, con un tiempo final de corrida de 6,50 minutos. Se utilizó como gas de arrastre (Nitrógeno), a presión constante, velocidad de flujo 1,07 mL/min. Temperatura del detector 300 °C, temperatura del inyector 250 °C, (Figura 19).



Figura 19. *Equipo de GC-ECD*

Se utilizó un agitador vortex mixer marca ARCANO, a una velocidad de 50 rpm, durante un minuto aproximadamente (Figura 20).



Figura 20. *Agitador vortex mixer ARCANO*

Para llevar a cabo la centrifugación de las muestras se utilizó una centrifuga marca BOECO, modelo U-320 R (Figura 21).



Figura 21. Centrifuga BOECO, U-320 R

Por otro lado, se utilizó un equipo de purificación de agua Thermo Scientific, Barnstead Easy Pure II para obtener el agua grado HPLC (Figura 22).



Figura 22. Equipo Barnstead easy pure II

3.4. Análisis estadístico

Los datos se analizaron estadísticamente por medio del paquete estadístico STATISTICA, creado por StatSoft empresa que lo desarrolla y mantiene. Las comparaciones se realizaron por un análisis de la varianza (ANOVA). Como test a *posteriori* se usó el test de Duncan cuando fueron apropiadas las comparaciones post-hoc. Se consideraron diferencias significativas con un $p < 0,05$.

3.4. ANALISIS FISICO-QUÍMICOS PARA EVALUAR LA CALIDAD DE LA MIEL

Según el código alimentario argentino, la miel debe cumplir con ciertos requisitos que garanticen su calidad [18]. A continuación, se mencionan algunos de los principales parámetros físico-químicos a evaluar. Estos parámetros son exigidos por SENASA y son indicadores del estado del producto, de su conservabilidad y del grado de higiene, y limpieza empleados en la extracción. Los análisis físico-químicos realizados fueron: humedad, color, acidez libre, hidroximetilfurfural.

En primer lugar, debe tenerse en cuenta la preparación de la muestra, como se describe a continuación.

Mieles total o parcialmente cristalizadas: se colocó una cantidad pequeña de miel en un recipiente hermético y se calentó en un baño de agua que no sobrepase los 60 °C, ya que a temperaturas más elevadas se pueden descomponer los azúcares presentes en la miel. Es sumamente importante agitar en forma periódica. Cuando se haya producido la disolución de los cristales se mezcla perfectamente y se enfría rápidamente. Si se observa alguna sustancia extraña, como cera, palillos, abejas, partículas de panal, etc., se calienta la muestra nuevamente en un baño de agua a 40 ± 2 °C y se filtra a través de un filtro adecuado con circulación de agua caliente, antes de tomar la muestra.

Miel líquida sin impurezas: la muestra debe homogenizarse lo suficiente mediante agitación intensiva durante por lo menos 3 minutos, evitando la incorporación de aire para el posterior análisis físico-químicos.

Miel líquida con impurezas: luego de quitar las impurezas de mayor tamaño, se agita suavemente la miel, a temperatura ambiente, y se filtra a través de un tamiz IRAM 500 μm .

Miel en panal: en el caso de estar cerrados aún los panales, se desoperculan. Con ayuda de un tamiz de acero inoxidable IRAM 500 μm , se separa la miel de los panales, sin calentamiento.

3.4.1. Determinación de humedad

La humedad es un parámetro importante para la conservación del producto, ya que un nivel alto de humedad favorecería a la fermentación de los azúcares por levaduras que pudiesen estar presentes. En mieles con un porcentaje de humedad de 17% las levaduras no se desarrollan. Por el contrario, con porcentajes entre 17 y 18% las levaduras prosperan si la miel está sucia y tiene una cristalización no compacta, con separación de fases. Las mieles con más del 20% de humedad fermentan casi siempre, si no se conservan adecuadamente [56].

La determinación de la humedad se determinó por medio del índice de refracción y mediante la utilización de una tabla se estableció la humedad que se detallará más adelante. Para medir el índice de refracción se utilizó un refractómetro de mesa marca ABBE-REF 1 (Figura 23) [56].



Figura 23. Refractómetro ABBE-REF 1

Procedimiento: Se determinó el índice de refracción de las muestras de ensayo utilizando un refractómetro a temperatura constante, próxima a los 20 °C. Se adicionó una gota de miel líquida en el prisma del refractómetro y observó la lectura, esta se convierte en contenido de humedad utilizando la tabla Chataway que se muestra a continuación en la Tabla 5 [57].

Tabla 5. Valores de humedad según el índice de refracción medido

Índice de Refracción a 20 °C	% de Humedad	Índice de Refracción a 20 °C	% de Humedad	Índice de Refracción a 20 °C	% de Humedad
1.5044	13.0	1.4935	17.2	1.4830	21.4
1.5038	13.2	1.4930	17.4	1.4825	21.6
1.5033	13.4	1.4925	17.6	1.4820	21.8
1.5028	13.6	1.4920	17.8	1.4815	22.0
1.5023	13.8	1.4915	18.0	1.4810	22.2
1.5018	14.0	1.4910	18.2	1.4805	22.4
1.5012	14.2	1.4905	18.4	1.4800	22.6
1.5007	14.4	1.4900	18.6	1.4795	22.8
1.5002	14.6	1.4895	18.8	1.4790	23.0
1.4997	14.8	1.4890	19.0	1.4785	23.2
1.4992	15.0	1.4885	19.2	1.4780	23.4
1.4987	15.2	1.4880	19.4	1.4775	23.6
1.4982	15.4	1.4875	19.6	1.4770	23.8
1.4976	15.6	1.4870	19.8	1.4765	24.0
1.4971	15.8	1.4865	20.0	1.4760	24.2
1.4866	16.0	1.4860	20.2	1.4755	24.4
1.4861	16.2	1.4855	20.4	1.4750	24.6
1.4856	16.4	1.4850	20.6	1.4745	24.8
1.4851	16.6	1.4845	20.8	1.4740	25.0
1.4846	16.8	1.4840	21.0	-	-
1.4840	17.0	1.4835	21.2	-	-

3.4.2. Determinación de color

El color de las mieles es medido con un criterio puramente comercial. Existe el concepto de que las mieles claras son de mejor calidad que las oscuras, lo que no se corresponde desde el punto de vista nutricional, ya que las oscuras contienen más hierro y otros minerales que las claras. Según el origen botánico del néctar, la miel tendría un cierto contenido de minerales, y en consecuencia un determinado color. Almacenamientos inadecuados y calentamientos excesivos provocarán, también cambios de color en el producto. Por ello este es un parámetro muy variable y aun no existe un consenso nacional sobre cuál es el mejor color para la miel.

El método instrumental consiste en el uso de técnicas en las cuales se mide la reflectancia o transmitancia de la muestra. Se utilizan instrumentos como espectrofotómetros o colorímetros específicos. Estos métodos requieren que la superficie del material cuyo color se va a medir, debe estar homogénea y tienen la desventaja de que

se mide sobre un área muy pequeña (2 cm^2) lo que hace poco representativo el resultado [58].

Para realizar los análisis de color a las muestras de miel, se utilizó un colorímetro para miel marca HANNA Instruments (Figura 24).



Figura 24. Colorímetro analizador de miel

Procedimiento: Se adicionaron 5,0 g de muestra aproximadamente en una celda de plástico limpia y seca, con ayuda de una varilla de vidrio, se dejó reposar un rato para que la miel quede libre de burbujas y se realizó la lectura en el colorímetro. Se realiza la lectura y se compara con los parámetros establecidos para el color que van desde mieles extra claras hasta mieles oscuras como se explicara más adelante.

3.4.3. Determinación de acidez libre

La miel básicamente es una solución concentrada de azúcares aproximadamente en un 80% y un 18% de agua. En el escaso porcentaje restante se agrupan pequeñas cantidades de proteínas (fundamentalmente enzimáticas), granos de polen, sales minerales y ácidos orgánicos. Son estos últimos los que le dan el carácter ácido a la miel. La acidez de la miel se mide por su pH o su valor de acidez actual [59].

Procedimiento: Se pesaron 10,0 g de muestra en un vaso de precipitado limpio, seco, y se disolvieron con 75 mL de agua en un erlenmeyer de 250 mL, con ayuda de una varilla

de vidrio. Se agregaron 3 o 4 gotas de solución de fenolftaleína como indicador y se valoró gota a gota con una solución de hidróxido de sodio 0,1 N, agitando el erlenmeyer continuamente, hasta que el color rosado persistiera durante 10 s. En caso de mieles oscuras, se puede tomar menor cantidad de muestra o emplear un pH-metro valorando la muestra hasta pH 8,5.

3.4.4. Determinación de hidroximetilfurfural (HMF)

El hidroximetilfurfural es uno de los compuestos formados por la degradación de los productos azucarados, en particular por deshidratación de la fructosa. Su aparición en la miel está directamente relacionada con alteraciones de color y el desarrollo de sabores y olores extraños. Este compuesto aparece en forma espontánea y natural en la miel debido al pH ácido en presencia de agua y a la composición rica en monosacáridos (fructosa y glucosa), su concentración aumenta con el tiempo y con la temperatura, siendo el factor que más influye [60].

Para el análisis de HMF se utilizó un espectrofotómetro en la región ultravioleta. La determinación constó en utilizar dos alícuotas clarificadas de una muestra. Una de ellas, a la que se le adicionó agua, fue medida frente a otra (blanco), a la que se le añadió igual volumen de bisulfito de sodio, que destruye el HMF. La determinación se llevó a cabo midiendo las absorbancias a 284 y 336 nm. [61].

Procedimiento de clarificación: Se pesa, aproximadamente 5 g de miel en un vaso de precipitación de 50 mL y se disuelven con agua, hasta completar 25 mL, las que se trasvasan cuantitativamente a un matraz aforado de 50 mL. A continuación, se agregan 0,5 mL de reactivo de clarificante Carrez I, se agita bien, se agregan 0,5 mL de reactivo de clarificante Carrez II, se agita nuevamente y se completa con agua hasta el aforo. La formación eventual de espuma puede ser evitada agregando una gota de etanol. A continuación, se filtra a través de un papel de filtro seco. Se desechan los primeros 10 mL del filtrado. El ensayo se realiza por duplicado.

Reactivo clarificante Carrez I: En un matraz aforado de 100 mL se colocan 15,0 g de hexacianoferrato (II) de potasio trihidratado, $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$, se disuelve en agua hervida y se completa a 100 mL.

Reactivo Clarificante Carrez II: en un matraz aforado de 100 mL se colocan 30,0 g de acetato de zinc dihidratado $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ y se enrasa.

Se toman dos tubos de ensayo, uno se lo rotula como (M) muestra y el otro (R) referencia. Se colocan 5 mL de la solución de miel clarificada en cada uno de los tubos. Se colocan 5 mL de agua en el tubo de ensayo de la muestra (M) y 5 mL de solución de sulfito ácido de sodio a 0,20 g/100 mL en el tubo de referencia (R). Se agita cada tubo. Se determinan las absorbancias de la muestra (M) y de la referencia (R) con respecto al agua recién hervida y enfriada en celdas de 10 mm a 284 nm y 336 nm. Si la absorbancia obtenida con la muestra es mayor que 0,6, para obtener mayor exactitud, se diluye la solución de la muestra con el agua hervida y enfriada, hasta que sea necesario y la solución de referencia en la misma proporción, pero con solución de bisulfito de sodio diluida en la relación 1:1 y se corrigen las absorbancias por el factor de dilución utilizado.

Cálculo

La parte en masa de HMF en miel, en mg/kg se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$HMF = (E_{284} - E_{336}) * 149,7 * m_N * V_m / m_E * V_N$$

Siendo:

E_{284} : Absorbancia a 284 nm, medida con respecto al blanco.

E_{336} : Absorbancia de fondo a 336 nm, medida con respecto al blanco.

m_N : masa de muestra nominal de miel, $m_N = 5$ g aproximadamente

V_m : volumen de la solución de medición, en mL

m_E : masa de la muestra de miel en gramos

V_N : volumen nominal de la solución de medición, $V_N = 10$ mL

Al calcularse el factor 149,7, se considera que la masa molar del HMF es de 126 g/mol y el coeficiente de extinción molar a 284 nm es 16830.

3.5. ANÁLISIS MULTIRRESIDUO DE PLAGUICIDAS Y MEDICAMENTOS PREVIAMENTE SELECCIONADOS

En cuanto al análisis de residuos de plaguicida y medicamentos de uso apícola, los mismos se realizaron mediante dos técnicas cromatográficas, UPLC-MS/MS y GC-MS/MS. La primera técnica, se desarrolló en colaboración con el instituto de química analítica de San Luis (INQUISAL). Esta técnica fue puesta a punto para el análisis de: atrazina, amitraz y cumafós. Por su parte la técnica GC-MS/MS fue utilizada para la determinación simultánea de: diclorvos, timol, atrazina, clorpirifos, fipronil, endosulfan, amitraz, cumafós y cipermetrina, y en este caso la misma se llevó a cabo en colaboración con el centro de alta tecnología analítica, Analytical Technologies SA (CATA) en la ciudad de Buenos Aires.

Cómo se mencionó anteriormente el análisis de residuos consta en una primera etapa de la extracción del analito. La metodología de extracción empleada fue la misma para todas las muestras.

3.6. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS POR EL MÉTODO DE EXTRACCIÓN “QUECHERS”

La determinación de residuos de plaguicidas es un proceso analítico complejo que implica un conjunto de etapas que van desde la toma de muestra hasta la interpretación de los resultados obtenidos. Una de las fases más importantes en este proceso es la extracción de los analitos de la muestra, para que estos puedan ser analizados correctamente. Como se mencionó anteriormente, uno de los métodos de extracción más utilizados en la actualidad es la extracción en fase sólida dispersiva- “QuEChERS”, el que se define a continuación [40].

En la primera etapa, se realizó una extracción con un disolvente orgánico, generalmente acetonitrilo, en presencia de diferentes sales. Las sales que pueden ser empleadas en esta etapa son: sulfato de magnesio anhidro ($MgSO_4$), cloruro de sodio ($NaCl$), citrato tribásico de sodio dihidrato y citrato de sodio dibásico sesquihidrato y cada una tiene una función diferente. El sulfato de magnesio mejora la recuperación del analito al facilitar la partición de los plaguicidas en la fase orgánica (acetonitrilo) gracias a que retiene agua. El cloruro de sodio ayuda a controlar la polaridad favoreciendo la separación de las fases acuosas y la orgánica. El acetato de sodio ayuda a la regulación del pH. Las sales de citrato se emplean para ajustar el pH a valores de 5,5 donde se extraen la mayoría de los componentes ácidos y básicos de la muestra. El PSA es un absorbente que se utiliza para remover azúcares y ácidos grasos. La selección de las sales a emplear va a depender de los compuestos que se desean analizar y el tipo de protocolo de análisis a utilizar, teniendo en cuenta que existen dos métodos que son los más utilizados. El método AOAC (AOAC 2007.01): emplea sulfato de magnesio y acetato de sodio y el método EN 15662: combina sulfato de magnesio, cloruro de sodio, citrato^[11] tribásico de sodio dihidrato y citrato de sodio dibásico sesquihidrato. ^[12]

A continuación, tras la extracción y concentración de los analitos, puede realizarse la identificación y cuantificación de los compuestos de interés por análisis cromatográfico.

En la Figura 25 se muestra el diagrama de flujo donde se esquematiza el procedimiento de extracción aplicado.

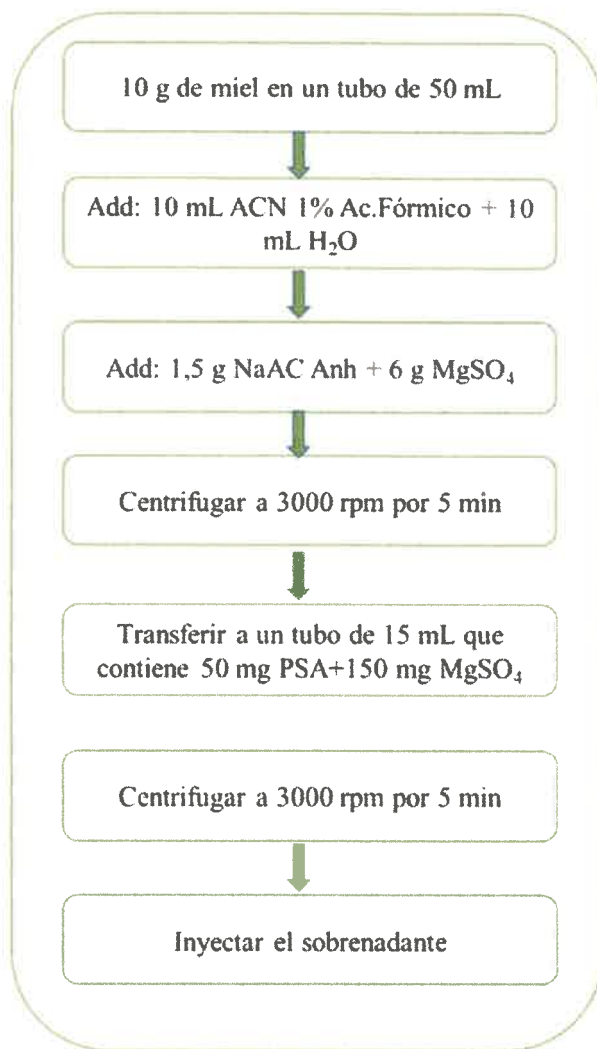


Figura 25. Diagrama del procedimiento de extracción, *Quechers*



CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS ANÁLISIS FÍSICO- QUÍMICOS



Tal como se indicó en el punto (2.2 Toma de muestra) se recolectaron un total de 445 muestras de miel, de las cuales se analizó una cantidad representativa. Se realizaron 85 pool que involucran 206 muestras las cuales fueron clasificadas, teniendo en cuenta las dos zonas seleccionadas al inicio del proyecto. Se debe recordar que en Alcira Gigena se eligieron tres subzonas de muestreo y en Merlo otras tres, como se muestra a continuación en la tabla 6 que se muestra en la consigna Análisis Físicoquímicos.

Los números de las muestras que tienen un asterisco (*) al lado, corresponden a la cámara de cría, y los otros números representan las muestras de las alzas melarias.

4.1. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS

Se determinaron los parámetros físico-químicos definidos anteriormente (color, humedad, acidez e hidroximetilfurfural) a los diferentes pools armados como se indica en la tabla 6. Esta resume los valores encontrados para un total de 71 pooles analizados. Los otros 10 pooles que corresponden a los números (14, 51, 52, 56, 57, 60, 61, 66, 69, 70) no se analizaron, considerando que la cantidad de muestra recogida no sería suficiente para realizar los análisis de residuos en forma paralela a los físico-químicos.

Tabla 6. *Valores analíticos de color, humedad, acidez libre y HMF*

(pool)	Fecha	Lugar	Color mm Pfund	Humedad%	Acidez meq/kg	HMF
1	14/08/14	Gigena/Camino Cabrera/ AP	45,0	20,6	21,5	12,4
2	14/08/14	Gigena/Camino Cabrera/ PICT	68,0	20,8	19,7	62,5
3	12/03/14	Gigena/Camino Cabrera/ PICT	74,0	18,2	15,8	1,9
4	12/03/14	Gigena/Camino Cabrera/ AP	44,0	17,0	19,9	0,4
5	3/12/14	Gigena/Camino Cabrera/ AP	49,0	18,2	19,8	19,9
6	3/12/14	Gigena/Camino Cabrera/ AP	48,0	19,4	25,9	3,4
7	20/08/14	Merlo/El Aguariabay/ AP	53,0	20,0	24,0	15,7
8	20/08/14	Merlo/El Aguariabay/ PICT	41,0	21,6	17,7	7,8
9	23/02/14	Merlo/El Aguariabay/ AP	40,0	18,2	27,5	3,8
10	23/02/14	Merlo/El Aguariabay/ PICT	48,0	18,0	23,8	6,1

11	5/12/13	Gigena/Camino Cabrera/ PICT	37,0	18,6	23,6	1,0
12	5/12/13	Merlo/El Aguaribay/ AP	42,0	20,6	17,8	8,4
13	7/08/13	Gigena/Camino Cabrera/ PICT	39,0	19,8	19,6	4,4
14	19/05/15	Gigena/Camino Cabrera/ PICT	-	-	-	-
15	19/05/15	Gigena/Camino Cabrera/ PICT	45,0	19,4	19,9	16,5
16	19/05/15	Gigena/Camino Cabrera/ AP	41,0	22,2	17,3	21,1
17	5/12/13	Merlo/El Aguaribay/ PICT	40,0	22,0	27,7	3,2
18	5/12/13	Merlo/El Aguaribay/ AP	36,0	19,4	25,9	2,3
19	28/08/13	Merlo/El Aguaribay/ PICT	53,0	20,2	23,8	5,5
20	28/08/13	Merlo/El Aguaribay/ AP	77,0	19,2	31,8	9,7
21	16/04/14	Merlo/El Aguaribay/ PICT	41,0	20,1	21,7	7,7
22	16/04/14	Merlo/El Aguaribay/ AP	92,0	23,4	25,7	15,4
23	11/05/15	Merlo/El Aguaribay/ PICT	82,0	20,0	37,7	8,7
24	11/05/15	Merlo/El Aguaribay/ AP	75,0	21,2	29,5	14,7
25	23/02/15	Merlo/Don Coto/ PICT	62,0	21,8	15,6	ND
26	5/12/13	Merlo/Don Coto/ AP	82,0	20,6	23,7	0,4
27	14/08/14	Gigena/Aroyo Tegua/ AP	41,0	22,2	12,0	2,2
28	3/12/14	Gigena/Aroyo Tegua/ PICT	31,0	21,4	13,8	ND
29	11/05/15	Merlo/Don Coto/ AP	62,0	19,4	17,6	ND
30	23/02/14	Merlo/Don Coto/ AP	70,0	21,4	20,0	1,0
31	16/04/14	Merlo/Don Coto/ PICT	53,0	18,4	19,5	1,6
32	11/05/15	Merlo/La Colina/ AP	44,0	21,6	15,8	ND
33	28/08/13	Merlo/Don Coto/ AP	54,0	20,6	19,5	ND
34	28/08/13	Merlo/Don Coto/ AP	78,0	22,0	21,9	2,3
35	7/08/13	Gigena/Aroyo Tegua/ PICT	60,0	21,6	21,5	2,5
36	11/05/15	Merlo/Don Coto/ PICT	88,0	20,0	25,5	6,7
37	5/12/13	Merlo/Don Coto/ AP	79,0	23,0	27,3	1,3
38	3/12/14	Gigena/Aroyo Tegua/ PICT	119,0	23,8	23,9	0,8
39	3/12/14	Gigena/Aroyo Tegua/ PICT	31,0	17,8	13,3	28,3
40	5/12/13	Gigena/Aroyo Tegua/ PICT	31,0	21,0	19,4	27,6
41	14/05/15	Gigena/Aroyo Tegua/ AP	63,0	22,0	19,6	34,7



42	5/12/13	Gigena/Aroyo Tegua/ PICT	26,0	19,2	17,8	15,9
43	28/08/13	Merlo/Don Coto/ PICT	73,0	16,8	19,8	6,0
44	28/08/13	Merlo/El Aguaribay/ AP	150,0	20,8	39,2	2,9
45	23/02/15	Merlo/El Aguaribay/ PICT	47,0	19,4	21,9	1,6
46	23/02/15	Merlo/Don Coto/ PICT	78,0	18,2	17,8	2,3
47	23/02/15	Merlo/El Aguaribay/ AP	59,0	19,0	21,9	8,5
48	23/02/15	Merlo/El Aguaribay/ Ivan	55,0	21,2	19,9	ND
49	20/08/14	Merlo/Don Coto/ PICT	47,0	17,6	11,8	5,2
50	20/08/14	Merlo/La Colina/AP	40,0	23,6	17,6	17,6
51	5/12/13	Merlo/La Colina/AP	-	-	-	-
52	5/12/13	Merlo/El Aguaribay/ PICT	-	-	-	-
53	2/04/14	Gigena/AP	38,0	25,0	27,2	11,7
54	5/12/13	Merlo/El Aguaribay/ PICT	115,0	17,8	21,9	5,8
55	12/03/14	Gigena/Aroyo Tegua/ PICT	75,0	22,0	27,8	6,5
56	14/05/15	Gigena/Camino Cabrera/ PICT	-	-	-	-
57	14/05/15	Gigena/Camino Cabrera/ PICT	-	-	-	-
58	23/02/15	Merlo/Don Coto/ AP	41,0	24,5	13,9	4,9
59	5/12/13	Gigena/Capilla Tegua/ PICT	124	25,0	39,6	ND
60			-	-	-	-
61			-	-	-	-
62	23/02/13	Merlo/El Aguaribay/ PICT	70,0	22,0	39,0	5,6
63	3/12/14	Gigena/Aroyo Tegua/ AP	32,0	21,8	29,9	13,9
64	14/08/13	Gigena/Aroyo Tegua/ PICT	45,0	21,2	17,6	6,8
65	14/05/14	Gigena/Aroyo Tegua/ PICT	37,0	21,8	23,9	10,9
67	20/08/14	Merlo/La Colina/PICT	45,0	20,6	25,8	14,2
68	5/12/13	Merlo/La Colina/PICT	42,0	21,6	21,8	4,0
69			-	-	-	-
70			-	-	-	-
71	14/08/14	Gigena/Capilla Tegua/ PICT	41,0	19,2	24,0	27,9
72	5/12/13	Merlo/La Colina/PICT	65,0	20,0	25,7	7,6
73	14/08/14	Gigena/Capilla Tegua/ AP	31,0	18,8	19,8	9,2
74	3/12/14	Gigena/Capilla Tegua/ AP	44,0	18,6	19,8	2,1
75	3/12/14	Gigena/Capilla Tegua/ PICT	96,0	21,8	21,9	3,2

76	3/12/14	Gigena/Capilla Tegua/ PICT	40,0	24,6	15,9	13,4
77	3/12/14	Gigena/Capilla Tegua/ AP	40,0	19,8	21,9	16,9
78	14/05/15	Gigena/Capilla Tegua/ AP	79,0	21,8	19,8	63,9
79	14/05/15	Gigena/Capilla Tegua/ AP	40,0	23,8	9,9	3,4
80	11/05/15	Merlo/La Colina/AP	62,0	21,2	13,9	10,1
81	28/08/13	Merlo/Don Coto/ PICT	48,0	22,0	17,8	13,4

Determinación de humedad: en general, la miel presenta diversas características que han sido estudiadas para reconocer diferentes tipos de miel, características que varían por factores tales como el contenido floral disponible para la obtención de polen y néctar [62]. El contenido de humedad en mieles es variable y depende del entorno geográfico, del manejo del producto, de la maduración de la miel y los procesos físicos y químicos que ocurren para que esto ocurra, etc. A partir de los valores calculados para los 71 pooles analizados, 39 pooles de Merlo y 32 pooles de Alcira Gigena podemos concluir que el contenido de humedad de las muestras correspondientes a Merlo contiene un 18% (7 muestras) valores entre 16-19 % y un 82% (32 muestras) comprende valores >19 como se puede observar en la Figura 26. Por otro lado, podemos observar que en las colmenas ubicadas en Alcira Gigena un 25 % (8 muestras) contienen valores comprendidos entre 16-19% y un 75 % (24 muestras) comprende valores > 19%. Este alto contenido de humedad en la miel, se debe a que la miel analizada es mayormente miel verde. Aquí es necesario considerar que en el proceso de elaboración de la miel se incluyen dos procesos diferentes que consisten en un cambio químico en el azúcar y un cambio físico, mediante el cual se elimina el excedente de agua. Este proceso lo realizan las abejas mediante su complejo sistema glandular que culmina una vez que la miel está "madura". Entonces es sellada dentro de las celdas con opérculo de cera, que también es producida por las abejas [63]. Por lo tanto, la miel recolectada no había sufrido estos procesos de maduración

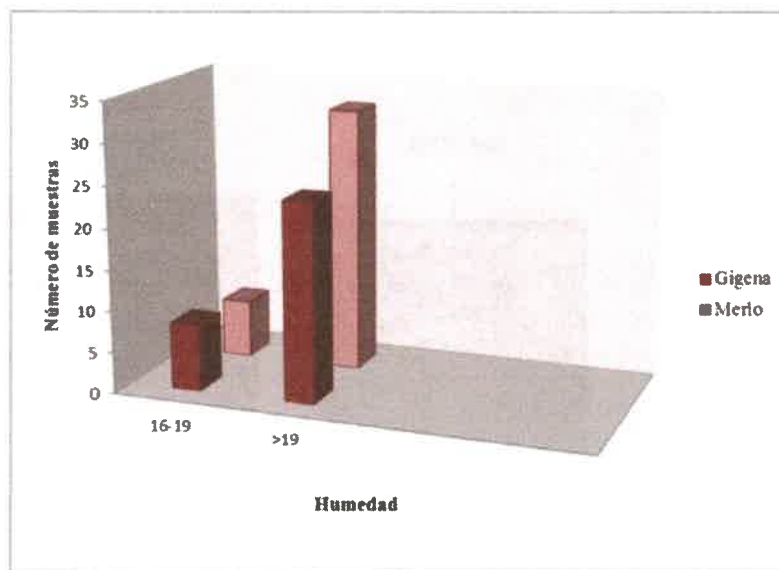


Figura 26. Humedad de las muestras, Merlo ($n=32$), Gigena ($n=39$)

A su vez, se realizó un análisis estadístico, aplicando un ANOVA en donde la variable humedad no mostró diferencia significativa ($F(1,62) = 0,35$; $P < 0,5568$). Si se comparan los valores promedio de cada lugar, en Gigena se obtuvo un valor promedio de 15% y en Merlo se obtuvo un valor promedio de 18%, como se puede observar en la Figura 27.

El valor límite o máximo establecido por la reglamentación del Mercosur es 20 % como se mencionó anteriormente, por lo cual, los porcentajes encontrados en las muestras analizadas se encuentran por debajo del valor de tolerancia máxima exigida [18]. Sin embargo, se debe resaltar nuevamente que el análisis se realizó mayormente en miel verde, por lo que el resultado no es completamente inesperado (Figura 27).

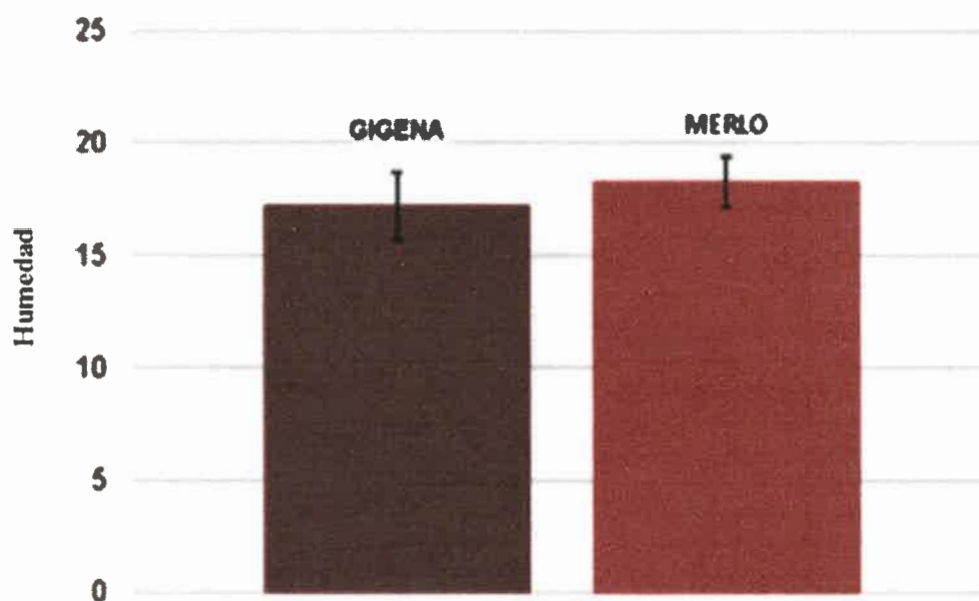


Figura 27. Análisis estadístico de Humedad, Merlo ($n=32$), Gigena ($n=39$). Cada barra representa la media \pm S.E.M. (* $p > 0,05$) ente M y G.

Determinación de color: El color es una propiedad óptica de la miel, resultante de los diferentes grados de absorción de la luz, de distintas longitudes de onda, por parte de los constituyentes en la miel [20]. Del total de muestras analizadas en Merlo, 38,5% (15 muestras) corresponden a mieles de color ámbar claro, (50-85 mm Pfund); después un 51,3% (20 muestras) corresponden a un color ámbar extra claro, (34-50 mm pfund), un 5,12% (2 muestras) corresponden al color ámbar, (85-114 mm Pfund), y solamente (2 muestras) corresponden a un color oscuro dentro de la escala internacional, (>114 mm pfund). En el caso de las muestras de Alcira Gigena un 72% (23 muestras) corresponden a color ámbar extra claro, un 18,7% (6 muestras) corresponden a ámbar claro, y un 9,3% (3 muestras) corresponde a color ámbar como se observa en el gráfico de barras en la Figura 28.

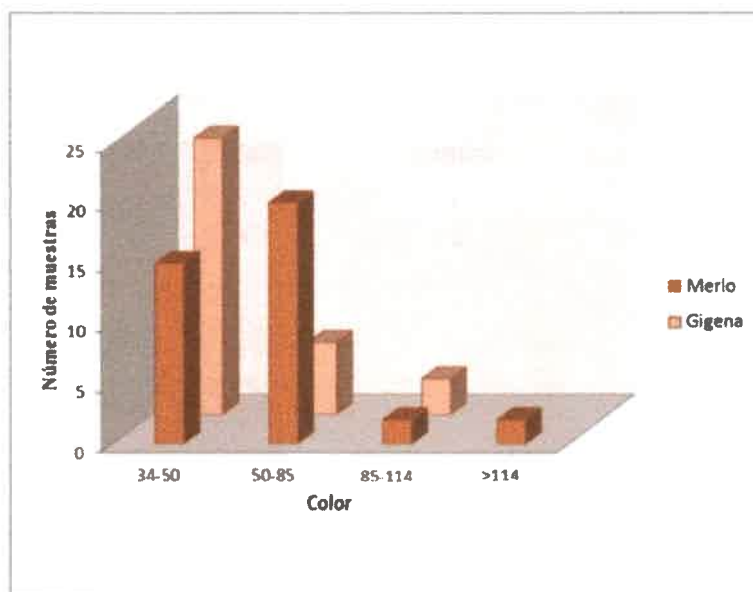


Figura 28. Color de las muestras, Merlo ($n=32$), Gigena ($n=39$)

De la misma manera se aplicó un ANOVA para el color, encontrando que hay diferencia significativa ($F(1,62) = 5,36$; $p < 0,0239$) entre las localidades de Merlo y Gigena. Las diferencias significativas se indican con un $p < 0,05$. Siendo los valores promedio 49,9 y 63,3 respectivamente, como se puede observar en la Figura 29. Esta diferencia se debería a la diversidad de cultivos y plantas existentes en las diferentes zonas [64]. En Gigena predominan las plantaciones de maíz, soja, maní, alfalfa, pradera natural, mientras que en Merlo predominan las plantaciones de algarrobo, chañar, espinillo, quebracho, sombra de toro, según los registros que fuimos llevando durante las salidas de campo. La legislación argentina no establece un color determinado para las mieles, sin embargo, es de nuestro conocimiento que los consumidores prefieren las mieles claras. Comparando estos valores con estudios realizados en la provincia del Chaco, encontramos que en ambas provincias predominan las mieles de color ámbar extra claro [65]. Esta coincidencia está sujeta a la probabilidad de que existan floraciones similares en las diferentes zonas, y aunque en nuestros objetivos no estaba realizar un estudio botánico o de calidad polínica, podemos comparar con estudios previos que nos brindan información ya que el color es uno de los parámetros más estudiados [66].

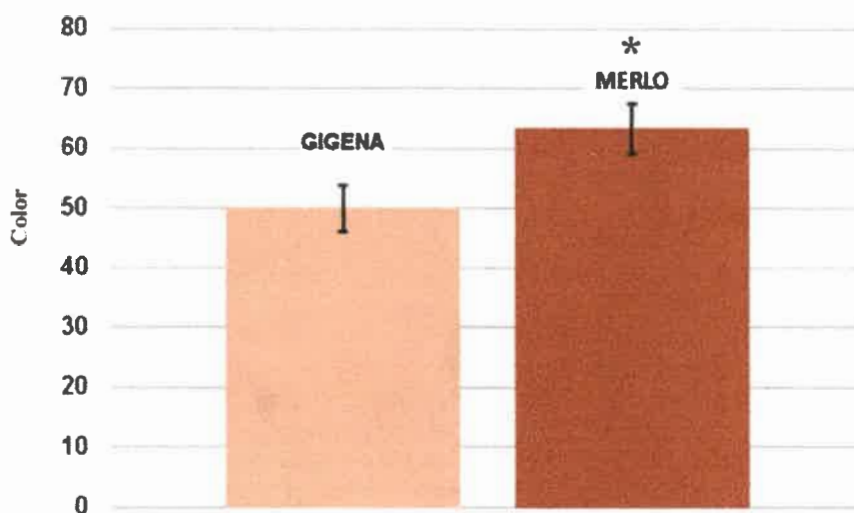


Figura 29. Análisis estadístico del color, Merlo ($n=32$), Gigena ($n=39$). Cada barra representa la medida \pm S.E.M. (* $p < 0,05$) ente M y G.

Determinación de acidez: La acidez es un importante criterio de calidad ya que contribuye a la estabilidad microbiológica del producto final. La acidez libre valora principalmente los ácidos orgánicos libres presentes en la miel. El más importante es el ácido glucónico, que se forma a partir de la glucosa [67]. La acidez normal en mieles frescas comprende valores de 10 a 12 meq/Kg. En el presente estudio se encontraron que tanto en Merlo como en Gigena predominan los valores de acidez superiores a 20 meq/Kg, seguido de valores comprendidos entre 16 y 20 meq/Kg, (Figura 30). Los valores de acidez encontrados en todas las mieles analizadas se encuentran por debajo del máximo establecido por la reglamentación del Mercosur (máx. 40 meq/Kg). Se tiene conocimiento de que las mieles de mieladas presentan por lo general, contenidos naturales de ácidos mayores que las mieles de las flores.

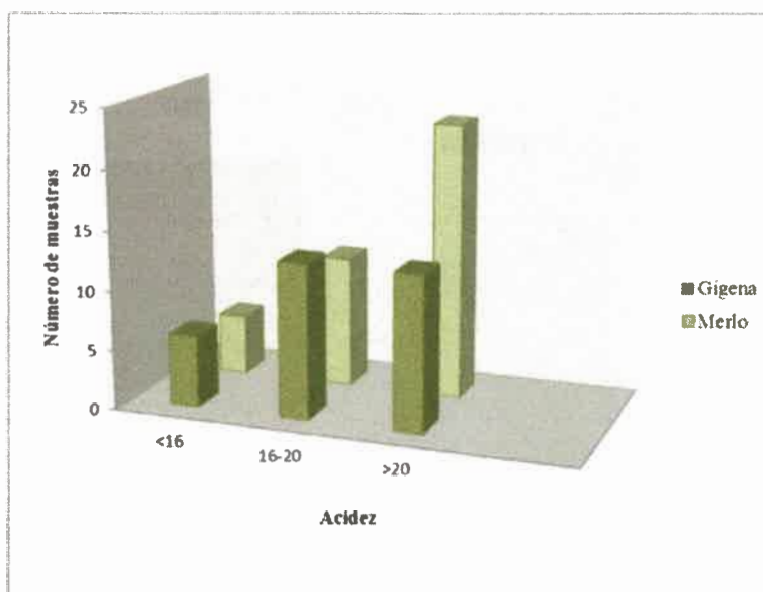


Figura 30. Acidez de las muestras, Merlo ($n=32$), Gigena ($n=39$).

Se aplicó un análisis ANOVA para el contenido de acidez como se muestra en la Figura 31, encontrando diferencia significativa entre Merlo y Gigena ($F(1,62) = 5,41$; $p < 0,233$). Las diferencias significativas se indican con un $p < 0,05$ entre Gigena y Merlo. Siendo los valores promedio (23,7 y 20,4 respectivamente). Siendo la localidad de Merlo la que posee valores de acidez más elevados. Los resultados anteriores pueden ser atribuidos a que no todas las mieles poseen los mismos ácidos ya que esto depende de la naturaleza del néctar que la abeja tome para elaborar la miel [68].

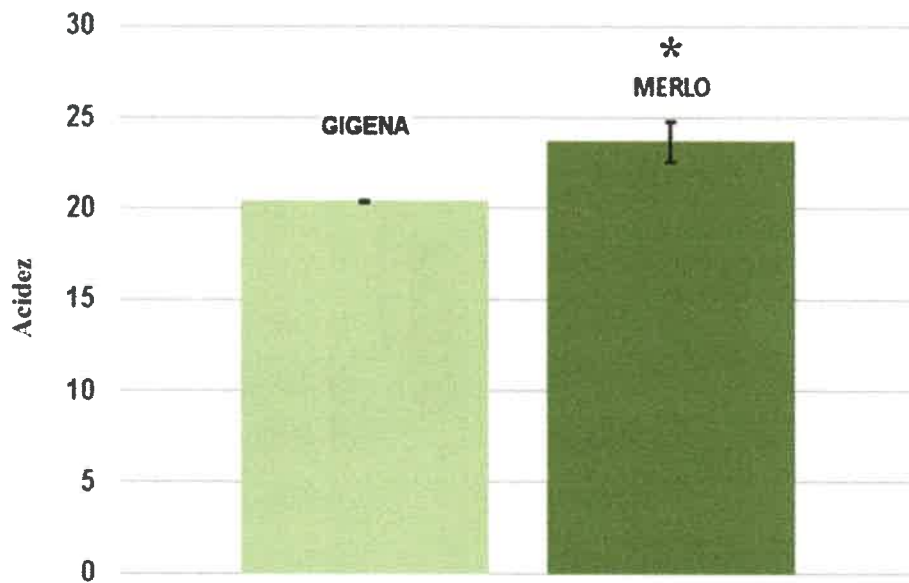


Figura 31. Análisis estadístico para el contenido de Acidez, Merlo (n=32), Gigena (n=39). Cada barra representa la medida \pm S.E.M. (* $p < 0,05$) ente M y G.

Determinación de HMF: Este parámetro es fundamentalmente un indicador de calidad. Las mieles frescas tienen apenas trazas, que se elevan a 10 mg/kg poco después de ser extraídas. Como se mencionó anteriormente el HMF es un compuesto formado por la degradación de los productos azucarados, y aparece en forma espontánea y natural en la miel. Los valores de HMF encontrados en Merlo y en Gigena están entre 0,1 y 20 mg/Kg⁻¹ alejados de los valores máximos establecidos por el CAA y el Mercosur (40 mg/Kg⁻¹), como se observa en la Figura 32.

Estudios realizados por otros autores en la provincia de Santa Fe, han informado valores de hidroximetil furfural en rangos que van de 0,4 a 9,5 mg/kg [69]. inferiores a los encontrados en el presente trabajo. Varios estudios regionales presentan información sobre características físicoquímicas acorde al Código Alimentario Argentino y tienen más el objetivo de enfatizar la calidad que el de identificar tipos de miel [70,71].

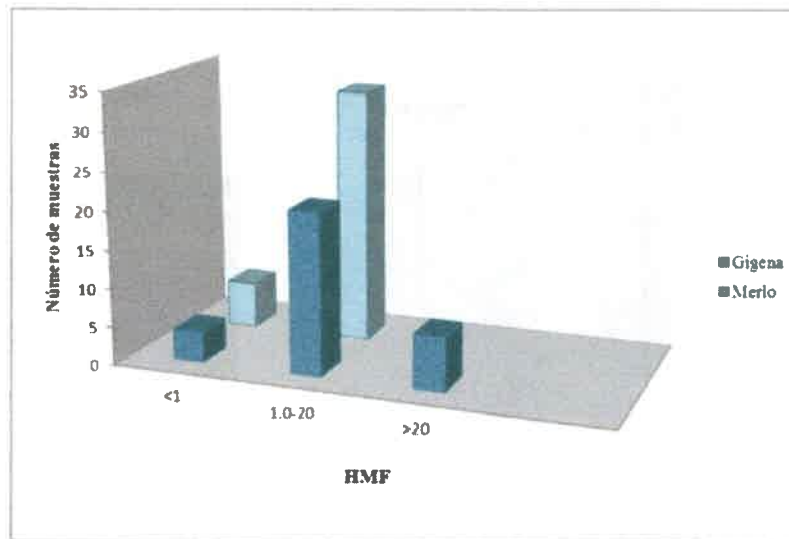


Figura 32. HMF de las muestras, Merlo ($n=32$), Gigena ($n=39$).

Se realizó el respectivo análisis estadístico, ANOVA, como se muestra en la Figura 33, encontrando que hay diferencia significativa entre los valores de HMF ($F(1,60) = 48$; $p < 0,4932$). El contenido de HMF en la miel es un indicativo de las condiciones en que la misma fue almacenada, tratamiento que ha recibido y edad [72]. El contenido de HMF de las mieles registró niveles variables en las zonas estudiadas, y se estima que estas variaciones están dadas principalmente por el tiempo, la estación o el clima y las condiciones reales del medio en que fueron cosechadas las mieles, debido a que las condiciones ambientales variaron entre una extracción y otra.

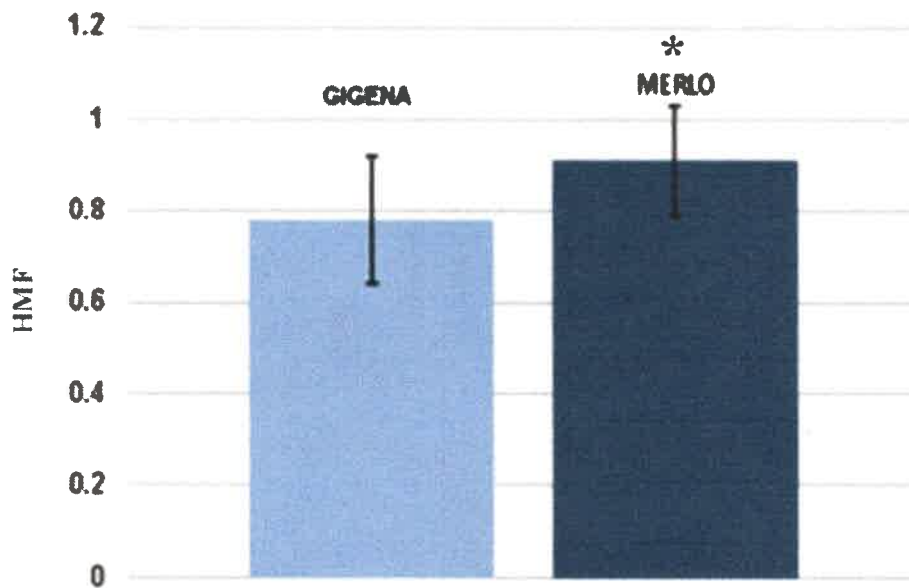


Figura 33. Análisis estadístico de HMF, Merlo ($n=32$), Gigena ($n=39$). Cada barra representa la medida \pm S.E.M. (* $p < 0,05$) ente M y G.

De acuerdo a estos resultados se puede decir que el contenido de HMF en todas las mieles analizadas, es muy bajo teniendo en cuenta los valores dados como máximos en las actuales normas establecidas por el CAA [18]. Esto permite afirmar, en esta evaluación, que son mieles de muy buena calidad.

CONCLUSION PARCIAL

Las mieles analizadas pertenecen a las diferentes áreas apícolas de las provincias de Córdoba y San Luis, Argentina, pueden corresponder a mieles poliflorales. En el análisis de humedad predominan los valores superiores al 19%. En los resultados de color predominan en las dos zonas el color ámbar extra claro, seguido por el ámbar claro, ámbar y por último y en menor porcentaje las mieles oscuras. En cuanto a los valores de la acidez, predominan los valores cercanos a 20 meq/kg. Por último, los valores de HMF están en un rango de 1,0-20 mg/Kg⁻¹. Esto permite afirmar en esta evaluación, que son mieles de excelente calidad teniendo en cuenta los valores dados como máximos en las actuales normas establecidas por el CAA, a pesar de que los ensayos fueron realizados en mieles



mayormente verde. Se encontraron diferencias significativas en los valores de color, acidez y HMF.





**CAPÍTULO V:
DESARROLLO DE
TÉCNICAS PARA
ANÁLISIS DE RESIDUOS
DE PLAGUICIDAS Y
MEDICAMENTOS**



Inicialmente se trabajó en la puesta a punto de diferentes técnicas haciendo uso del equipo instrumental disponible. En este capítulo se describen todas las técnicas que se estudiaron.

5.1 ANÁLISIS DE TIMOL

En primer lugar, se trabajó con timol teniendo en cuenta la experiencia adquirida por el personal del laboratorio de investigación que habían realizado estudios previos con aceites esenciales. Se estudiaron diferentes métodos de detección por cromatografía líquida y gaseosa como se muestra a continuación.

Para evaluar el mejor método de detección se llevó a cabo el análisis de timol por diferentes métodos cromatográficos, tanto en cromatografía gaseosa como en cromatografía líquida. También se analizó, en algunos casos, el 1,8-cineol (eucaliptol) ya que generalmente timol y eucaliptol se los encuentra juntos en el aceite esencial. Para todos los casos se realizaron inyecciones por triplicado.

Detección y cuantificación

Para la cuantificación de timol se probaron diferentes métodos en cromatografía gaseosa y cromatografía líquida con diferentes detectores para comparar los límites de detección de las técnicas utilizadas.

5.1.1. HPLC-DAD

En este caso, se empleó una columna de fase inversa marca Luna C18, con una longitud de 15 cm y un diámetro interno de 4,6 mm. El tamaño de partícula fue de 5 μm . La fase móvil consistió de una mezcla de acetonitrilo: buffer (ACN: buffer fosfato) en proporción 55:45 (v/v) y a pH=3. El flujo empleado fue de 1 mL/min.

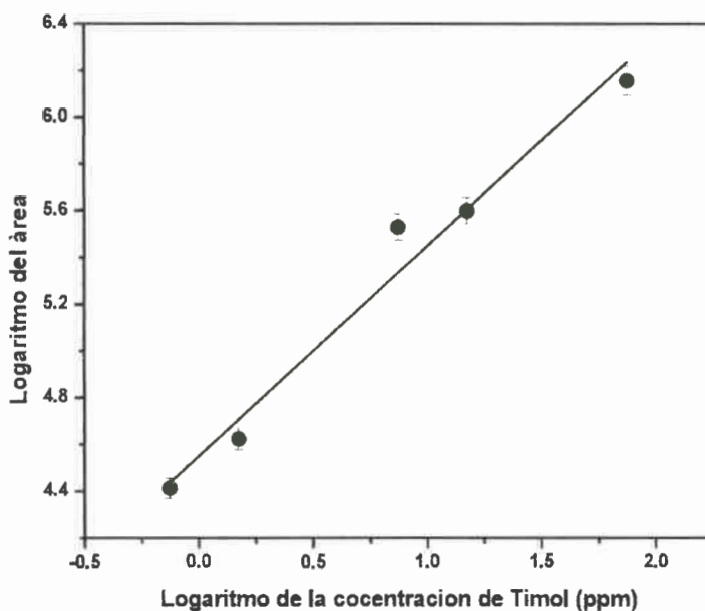


Figura 34. Curva de calibración de timol HPLC-DAD

Se analizó Timol mediante HPLC-DAD, se logró analizar por este método, concentraciones del orden de (0,7511 ppm). En la Figura 34 se puede observar la respectiva curva de calibración, y los datos que arrojó la ecuación de la recta fueron: un coeficiente de correlación $R^2 = 0,993$, la pendiente de la recta $= 0,59 \pm 0,02$, y una ordenada del origen de la curva $= 1,52 \pm 0,01$.

5.1.2. HPLC-DE

Se empleó un cromatógrafo que consistió en una bomba Gilson modelo 307, un inyector Rheodyne modelo 7125 y un detector amperométrico de construcción local (HPLC-DE). La adquisición de datos se realizó con el programa Peak Simple. Se empleó la misma columna Luna C18, de longitud de 15 cm y un diámetro interno de 4,6 mm. El tamaño de partícula fue de 5 μm .

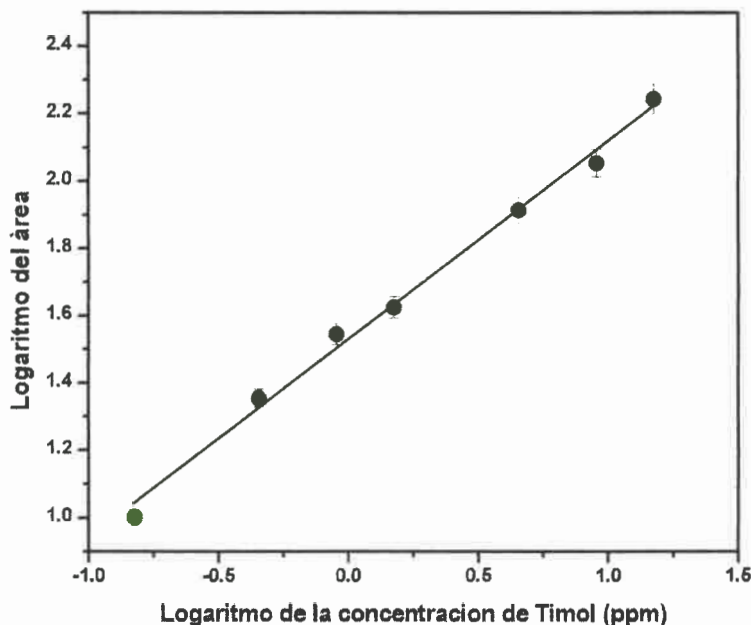


Figura 35. Curva de calibración de timol en HPLC-DE.

Se procedió a realizar una curva de calibración por HPLC-DE, ya que resulta muy interesante esta técnica que es muy sensible para compuestos que se oxidan y se reducen (Figura 35).

El timol en su virtud de carácter fenólico produce multitud de derivados de sustitución, todos los ácidos que se derivan del Timol tienden a oxidarse y por ello es viable esta técnica. Los valores de la regresión lineal son: coeficiente de correlación de $R^2 = 0,988$, la ordenada del origen $0,92 \pm 1$, y una pendiente de $3,54 \pm 0,01$

5.1.3. CG-FID

Se utilizaron dos tipos de columnas: una columna HP Innovax de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor de película y una HP-5, de 50 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor de película. Las inyecciones fueron realizadas en forma manual y se inyectó un volumen de 1 microlitro.

Se procedió a poner a punto la técnica por GC-FID y para ello se realizó una curva de calibración con las soluciones preparadas, se observa una tendencia lineal con un como se muestra en la (Figura 36). Los valores de la regresión lineal son: coeficiente de correlación de $R^2=0,997$, la ordenada del origen = $2,8 \pm 0,03$ y una pendiente = $1,0 \pm 0,02$

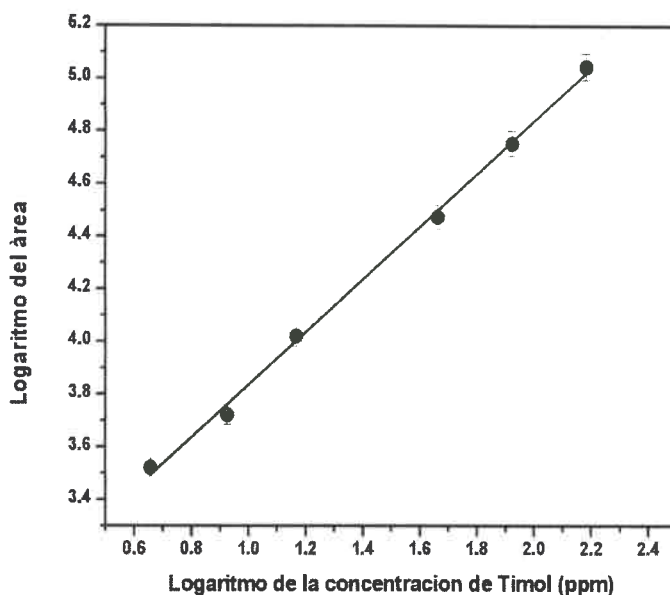


Figura 36. Curva de calibración de timol en GC-FID

Cabe mencionar aquí que los tres métodos utilizados para la construcción de las curvas de calibración de timol demostraron tener una dependencia lineal entre la señal y la concentración de timol. Además, los coeficientes de correlación de la regresión lineal empleadas estuvieron siempre por encima de ($R^2=0,987$). Se logró analizar concentraciones del orden de (0,15 ppm), siendo por tanto el método HPLC-DE el más sensible de los tres empleados.

Etapa de extracción

Algunos autores estudiaron diferentes técnicas para la extracción de residuos de timol, eucaliptol, mentol y alcanfor en miel y en cera de abejas [73]. Teniendo en cuenta este tipo de estudio se siguió la misma metodología de extracción. También compararon las

eficacias logradas mediante la extracción con solventes (cloruro de metileno), la extracción en fase sólida y la destilación por arrastre con vapor de agua a baja presión. Concluyeron que esta última técnica, acoplada a la retención de los analitos en cartuchos de extracción en fase sólida rellenos con fase de octadecil silano (ODS) resultó ser la más eficiente para el análisis de residuos de timol en cera y miel de abejas. En nuestro estudio se emplearon dos métodos diferentes para la extracción de timol en muestras fortificadas. El primero consistió en la extracción por arrastre con vapor de agua y retención en cartuchos de extracción en fase sólida; finalmente se eluyó el timol retenido en el cartucho, empleando un pequeño volumen de metanol (Figura 37).

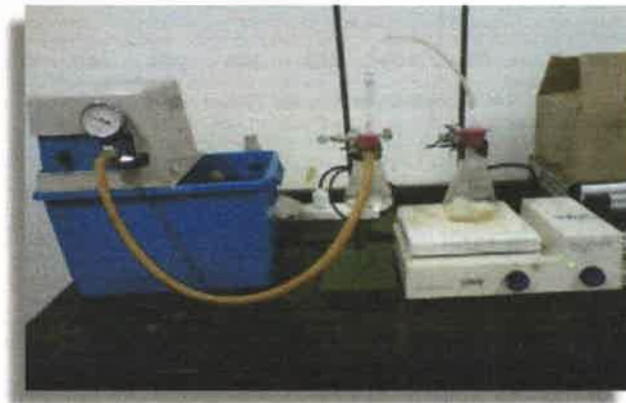


Figura 37. *Equipo empleado en la extracción por arrastre con vapor de agua.*

El segundo método empleado consistió en la extracción directa del metanol haciendo pasar la muestra fortificada a través del cartucho y la posterior elución del compuesto retenido mediante el empleo de metanol.

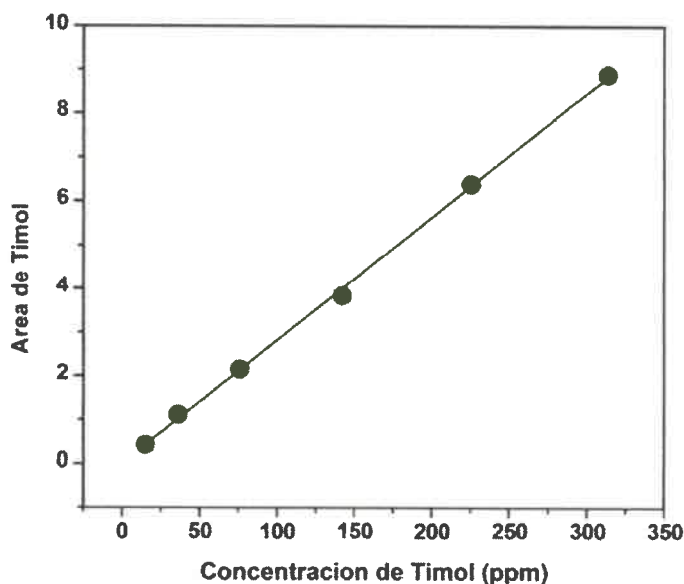


Figura 38. Curva de calibración de las extracciones realizadas en la miel contaminada con timol.
($R^2=0,999$, Ordenada del origen= $-0,005 \pm 0,07$, Pendiente= $0,028 \pm 0,0004 \text{ ppm}^{-1}$)

Se construyeron curvas de calibración a partir de muestras de miel (Figura 38) contaminadas ex profeso. Para ello se tomaron muestras de miel se las contaminó con concentraciones crecientes de timol y se las sometió a la extracción mediante arrastre con vapor de agua mencionado en la parte experimental. Posteriormente, se inyectó en el HPLC-DE.

Se obtuvo una respuesta lineal en el intervalo de concentraciones analizadas. Los coeficientes de correlación fueron ambos superiores a ($R^2=0,978$) mostrando una buena correlación entre la señal y la concentración de timol. Los límites de detección fueron del orden de 10 ppm en ambos casos.

5.2. ANÁLISIS DE GLIFOSATO

De manera simultánea se trabajó con glifosato que, como se mencionó anteriormente es una molécula muy inestable en el ambiente y se descompone en su principal metabolito el ácido aminometilfosfónico (AMPA), [74,75]. De manera que en el método analítico desarrollado se contempló la determinación de ambos.



La técnica generalmente empleada para la determinación de glifosato es cromatografía líquida HPLC con detección UV o fluorescencia. En el caso de la detección por UV la señal es pobre y presenta mediana sensibilidad, no obstante, se realizan reacciones que generen derivados que pueden detectarse por fluorescencia con una sensibilidad mucho mejor en comparación con la que se obtiene por UV. Existen diferentes métodos de derivatización:

Derivatización postcolumna: Debido a su carácter ácido-base, el glifosato puede determinarse sobre una columna de intercambio catiónico fuerte, con una fase móvil con buffer fosfato a pH: 2. En este caso, una vez efectuada la separación, se debe derivatizar el analito postcolumna siendo la reacción más utilizada la de o-ftalaldehído-2-mercaptoetanol (OPA/2-ME). Para ello se necesita una hidrólisis previa del glifosato con hipoclorito cálcico para obtener una amina primaria que reacciona con el OPA para generar un derivado altamente fluorescente [76].

Derivatización pre-columna: Con otros reactivos derivatizantes, el glifosato forma productos que presentan buena estabilidad y no es necesario llevar a cabo la reacción on-line o post-columna. El reactivo más utilizado es el 9-fluorenilmetilcloroformiato (FMOC) el cual no necesita una hidrólisis previa del glifosato. La reacción se lleva a cabo en un medio tamponado de borato, con un tiempo de reacción de 30 minutos. La derivatización también es aplicable al AMPA. La única desventaja es la elevada fluorescencia del propio FMOC lo que requiere su extracción antes de ser inyectado en el cromatógrafo [76].

Procedimiento utilizado Se utilizó la derivatización pre-columna aplicada como se describe a continuación: Se prepararon soluciones stock de glifosato y AMPA por separado de concentración 10 ppm. A partir de las soluciones stock se prepara un conjunto de patrones en el rango de concentración de 0,05 a 2,0 ppm en cada uno de los analitos. Posteriormente se procede a la derivatización de los mismos.

Derivatización: se toma 1,7 ml de solución de cada patrón, se le adiciona 2 ml de la

solución de FMOC y 0,3 ml del buffer borato. Se agita la mezcla durante 30 segundos y posteriormente se lo deja reposar durante 30 minutos para que se lleve a cabo la reacción de derivatización. Posteriormente se trasvasa la mezcla a una ampolla de decantación y se extrae el resto de FMOC que no reaccionó con dos porciones de 2 ml de acetato de etilo. La capa superior se descarta, es la que contiene el FMOC. La capa inferior se inyecta directamente en el cromatógrafo para su determinación.

Para el análisis cromatográfico se utiliza una columna C18 y como fase móvil una mezcla de 30% acetonitrilo y 70% solución buffer de fosfato de pH 2. El volumen de inyección fue de 5 μ l. La detección se realiza a $\lambda_{ex} = 266$ nm y $\lambda_{em} = 315$ nm.

Los tiempos de retención fueron de 8 y 11 minutos para glifosato y AMPA respectivamente. A continuación, se muestran las curvas de calibración obtenidas tanto para glifosato (Figura 39). Con un coeficiente de correlación de $R^2=0,997$, una ordenada del origen = $-14844,800 \pm 7400$ y una pendiente = $1,92e7 \pm 5400$.

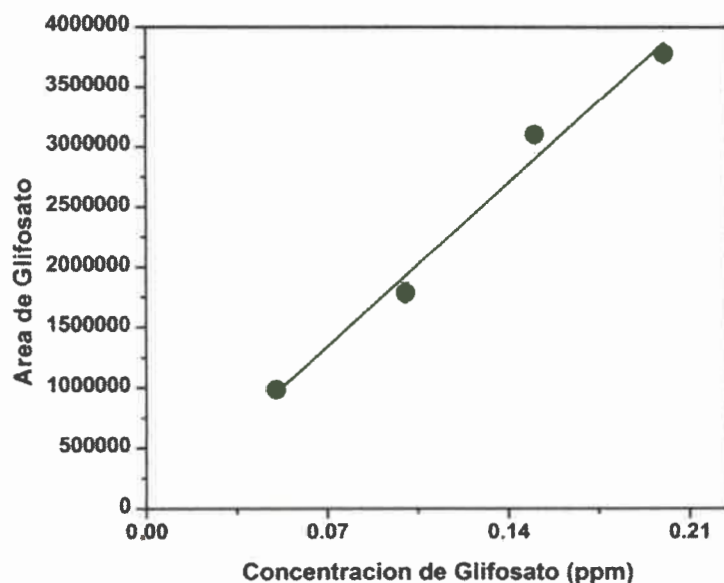


Figura 39. Curva de calibración de Glifosato

Así mismo para AMPA (Figura 40) se obtuvo un coeficiente de correlación de

$R^2=0,998$, una ordenada del origen $=-5,51 \pm 2$ y una pendiente $= 4,08 \pm 5$. Las curvas se obtuvieron graficando el área de los picos cromatográficos vs la concentración de cada patrón.

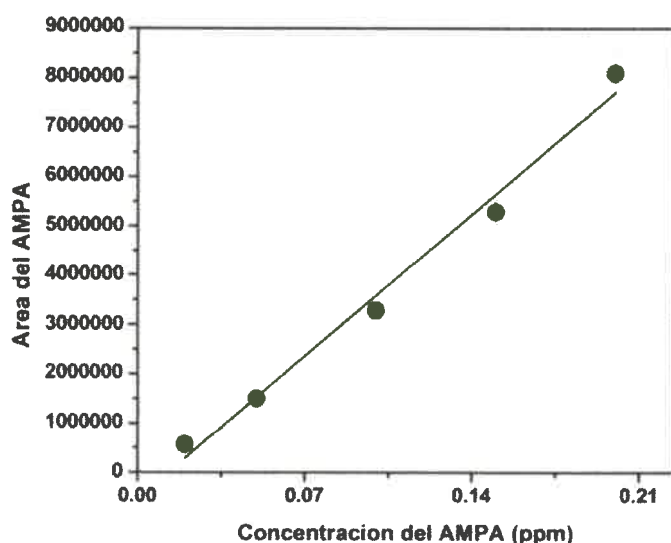


Figura 40. Curva de calibración del AMPA

Como puede observarse mediante este método puede determinarse simultáneamente glifosato y AMPA obteniéndose muy buenos calibrados para ambos y límites de detección aceptablemente bajos.

5.2.1. Etapa de extracción del Glifosato y AMPA

De la misma manera, se ensayó un método de extracción para el glifosato y el AMPA, teniendo en cuenta uno de los objetivos de nuestro estudio, por lo cual se llevó a cabo adaptando una técnica en suelos y aguas superficiales [77]

Se pesan 5 gr de miel y se disuelven en 10 mL de agua, después se filtra a través de un papel filtro común y el filtrado se derivatiza como se mencionó anteriormente.

Para poner a punto la etapa de extracción se contaminan diferentes soluciones de miel

con concentraciones de una mezcla de glifosato y AMPA en concentraciones de (0,5-4,0 ppm). Se aplicó el mismo procedimiento de derivatización descrito anteriormente.

Como se observa en la Figura 41, la curva de calibración para el glifosato extraído de la miel, muestra una respuesta lineal entre las concentraciones trabajadas y el área obtenida. Se calculó el porcentaje de recuperación obteniéndose porcentajes del 90%, para el glifosato, pero muy bajos porcentajes de recuperación para el AMPA. Si bien se avanzó considerablemente en la puesta a punto del análisis de residuos de glifosato y de AMPA queda pendiente mejorar la técnica de extracción y analizarlas por técnicas más sensibles.

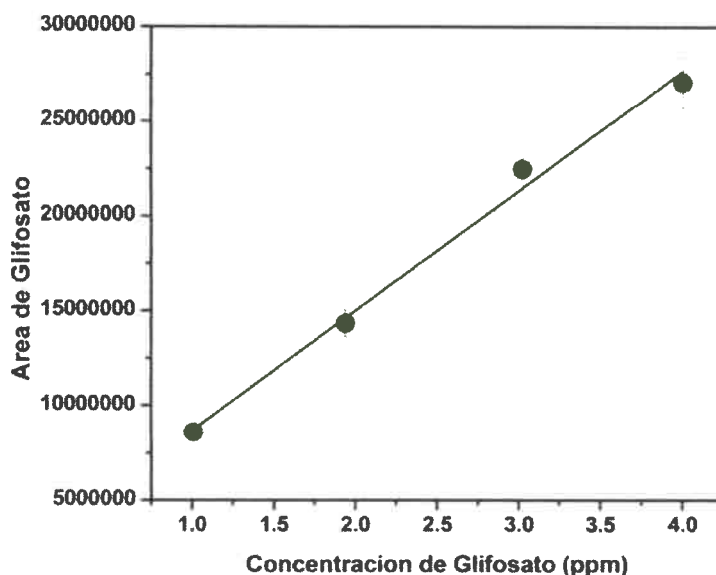


Figura 41. Glifosato extraído de la miel ($R^2 = 0,989$, Ordenada del origen = $2,3^{e6} \pm 5$ $P = 6,3e6 \pm 3800$)

5.3. ANÁLISIS MULTI-RESIDUO DE PLAGUICIDAS Y MEDICAMENTOS

En este punto se muestran los primeros análisis realizados para una metodología multiresiduo. Inicialmente se comenzó a trabajar con las tetraciclinas teniendo en cuenta que en el laboratorio ya se habían realizado estudios anteriores con estas sustancias y resaltando la importancia que han tenido en el tratamiento de las enfermedades de la abeja

durante años, aunque los apicultores con los que se trabajó no las utilizan. Así mismo, se decidió incorporar algunos plaguicidas de uso agrícola y apícola para desarrollar una nueva metodología ya que no había hasta el momento bibliografía que reportara un estudio de medicamentos y plaguicidas en un mismo estudio.

Los analitos que se determinaron por análisis multi-residuo fueron: oxitetraciclina, tetraciclina, atrazina, fipronil y cumafós. Inicialmente se determinaron los espectros de absorción UV individuales de cada uno de los compuestos para conocer los máximos de absorción y poder fijar las longitudes de onda de trabajo. Los espectros se registraron en un intervalo de 200 a 400 nm.

Inicialmente se tomaron espectros de absorción para cada uno de los analitos para conocer las absorbancias máximas y después trabajar con estas por HPLC-DAD. La Figura 42 muestra el espectro para la oxitetraciclina como ejemplo, presentando un máximo característico a 270 nm y otro de menor intensidad a 360 nm, el espectro de la tetraciclina es similar.

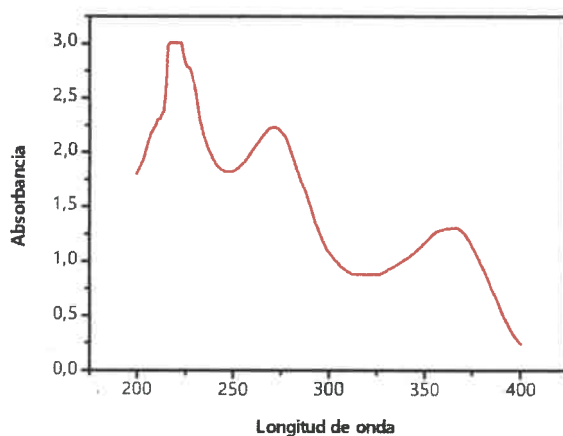


Figura 42. Espectro de absorción de la tetraciclina

Una vez que se tomó el espectro y se obtuvieron los máximos se procedió a verificar la ley de Lambert y Beer.



Una vez obtenidos los espectros de cada compuesto, se procedió al desarrollo de un método analítico para la detección simultánea de varios analitos. Para ello, inicialmente se realizaron corridas en modo isocrático para cada analito, y así fijar los tiempos de retención correspondientes. Una vez obtenidos los tiempos de retención para cada uno, se creó un método en modo gradiente para analizar la mezcla de los analitos y obtener una buena separación y resolución.

La columna utilizada fue marca Luna de 5 μ C18,100 Å de 150 x 4,60 mm, el gradiente creado se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de gradiente en HPLC-DAD

Tiempo(min)	Velocidad de Flujo (mL/min)	%A (Ac. Oxálico)	%B (ACN)
0	0,5	80	20
15	0,5	10	90
20	0,5	10	90
22	0,5	80	20
25	0,5	80	20

La Figura 43 muestra un cromatograma característico, observándose una buena separación en un tiempo relativamente corto. El orden de elución es el siguiente: 1) oxitetraciclina, 2) tetraciclina, 3) atrazina, 4) fipronil y 5) cumafós.

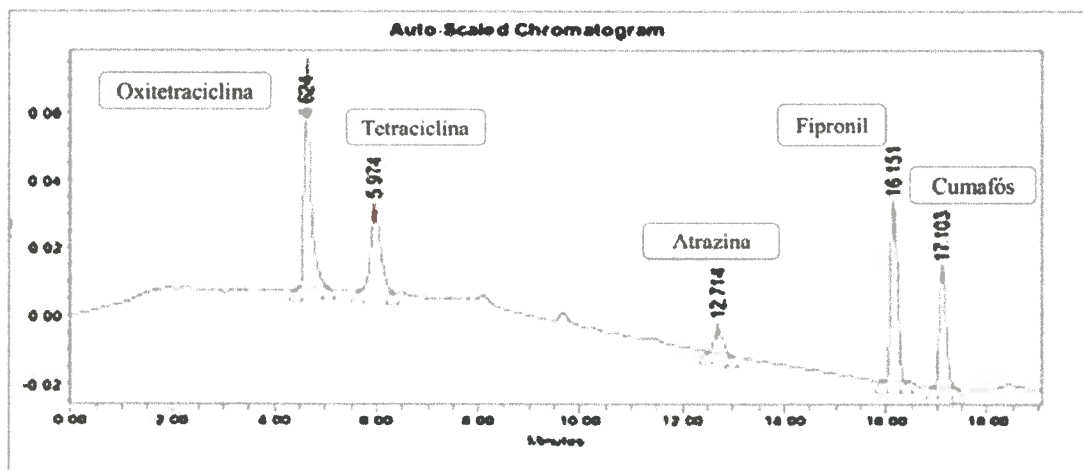


Figura 43. Separación analítica por HPLC-DAD

Como se mencionó anteriormente, en los últimos años la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) se ha implantado en la determinación de plaguicidas. Tanto es así, que en la Unión Europea es un requisito que la espectrometría de masas sea la técnica empleada para la confirmación de residuos de pesticidas en alimentos de origen animal en los laboratorios autorizados para el control oficial de residuos.

Para llevar a cabo los estudios se prepararon soluciones patrones (1×10^{-2} M) para cada una de las sustancias estudiadas, y se hicieron diluciones de cada uno para obtener una concentración de (1×10^{-5} M). Se preparó una mezcla que contiene los cinco analitos nombrados anteriormente. En el análisis de LC-MS/MS se utilizó como estándar interno una solución de Doxiciclina, en una concentración de (1×10^{-5} M).

5.3.1. Condiciones cromatográficas

Para llevar a cabo la separación de los analitos se utilizó una columna Luna C18 (Phenomenex) 150 x 3,00 mm, 5 μ m, empleando una mezcla de acetonitrilo/ácido oxálico 0,01 M (15:85) como fase móvil. Se aplicó una velocidad de flujo 0,2 mL/min y el tiempo de corrida en modo gradiente fue de 40 minutos, como se muestra a continuación en la Tabla 7.

Tabla 7. Condiciones de gradiente en LC-MS/MS

Tiempo (min)	Velocidad de Flujo (mL/min)	%A (ACN)	%B (A. Oxálico 0,01M)
0.00	0,2	15	85
0.01	0,2	15	85
10.0	0,2	25	75
12.0	0,2	50	50
20.0	0,2	90	10
30.0	0,2	90	10
32.0	0,2	15	85
40.0	0,2	15	85

Por otra parte, se hicieron ensayos en el LC-MS/MS, utilizando el mismo gradiente que se utilizó en HPLC-DAD, pero no se obtuvieron buenos resultados por lo cual se buscó el mejor que fue el descrito.

5.3.2. Condiciones de la interfaz y espectrómetro de masa-masa

Los análisis fueron realizados en modo positivo y negativo. El voltaje aplicado en el capilar correspondió a 3,25 kV, y el voltaje de cono a 35 volt Dwell 0,1 seg. Todos los análisis fueron realizados en modo MRM (monitoreo de reacciones múltiples). La Tabla 8 muestra los iones seleccionados y el modo de ionización para cada uno de los compuestos.

Tabla 8. Condiciones de Trabajo de LC-MS/MS

Compuesto	Modo	E capilar	E cono	E colisión	Ionización	Precursor	Hijo 1	Hijo 2	Hijo 3
Oxitetraciclina	MRM	3,25	35	15	EP +	461	426	443	381
Tetraciclina	MRM	3,25	35	15	EP +	445	445	410	428
Atrazina	MRM	3	46	20	EP +	216	174	146	132
Fipronil	MRM	2	35	25	EP -	435	250	330	-
Cumafós	MRM	2	35	25	EP +	363	227	307	-

5.3.3. Metodología de extracción

Una vez obtenido el método de separación, se procedió a realizar la extracción en de las muestras de miel.

El pre tratamiento de la muestra se realizó según la metodología descrita por Hamscher, G, y col; 2002 [78]. Este consistió en dos etapas de extracción en fase sólida. La primera se realizó empleando cartuchos Oasis HLB Waters, USA, que es un sorbente de fase reversa con balance hidrofílico-lipofílico, acondicionado con la adición de 5 mL de metanol seguido de 10 mL de agua. La muestra (6 g) se disolvió en 30 mL de buffer EDTA (pH: 4) y la solución se cargó en el cartucho a una velocidad de 3 mL/ min mediante la aplicación de vacío a la cámara de extracción (Phenomenex, USA). Luego se lavó con 5 mL de una mezcla H₂O: MeOH (95:5) y finalmente se eluyó con 15 mL de acetato de etilo para obtener la (solución 1).

La segunda etapa de extracción se realizó empleando cartuchos Sep-Pak (Waters, USA) que tienen un intercambiador débil de cationes y está basado en sílice. Están diseñados para la extracción de analitos catiónicos en disoluciones acuosas y no-acuosas, acondicionados con la adición de 5 mL de acetato de etilo. Se cargó la (solución 1) en el cartucho a una velocidad de 3 mL/ min mediante la aplicación de vacío. Se lavó con 5 mL de metanol y finalmente se eluyó con 4 mL de fase móvil (ACN: Acido Oxálico 0,01 M 15:85).

Inicialmente se inyectaron los analitos por separados para observar los tiempos de retención. Después se preparó una mezcla que contenía todos los analitos. Se pudo observar una buena separación con un tiempo de corrida relativamente corto (Figura 44).

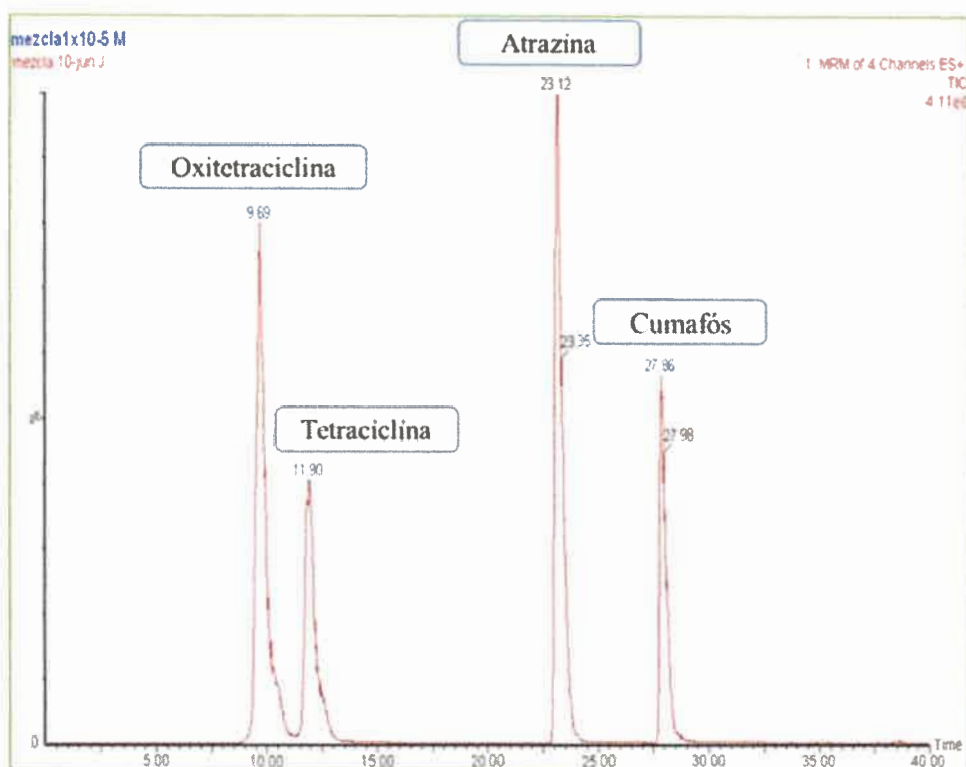


Figura 44. Cromatograma de una mezcla de 5 patrones en (ES+)

El fipronil se analizó simultáneamente con los demás analitos en el mismo modo de MRM pero en modo (ES-). Como se puede apreciar hay una señal mucho más alta, para el fipronil comparada con inyecciones realizadas en (ES+) para el mismo, eluyendo en el mismo tiempo de retención (Figura 45).

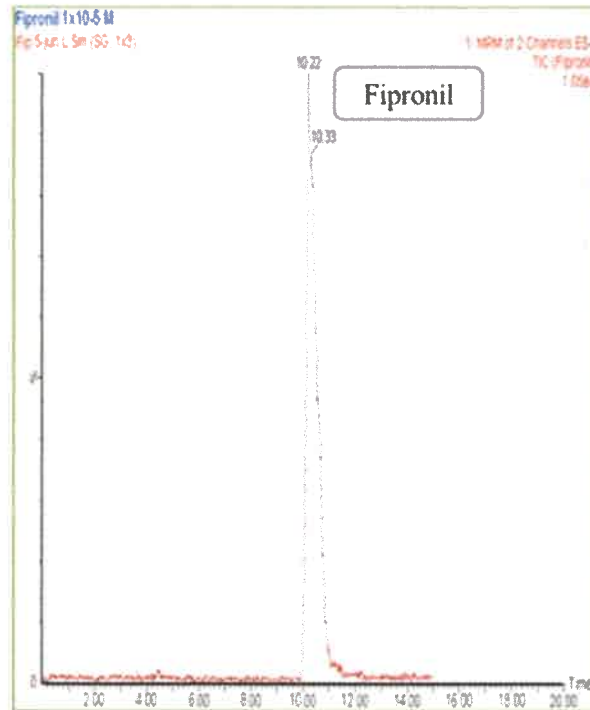


Figura 45. Cromatograma representativo de Fipronil en modo en (ES-)

En esta etapa de separación se utilizó doxiciclina como estandar interno para las tetraciclinas, y en la (Figura 46) podemos apreciar la separación sin ninguna interferencia.

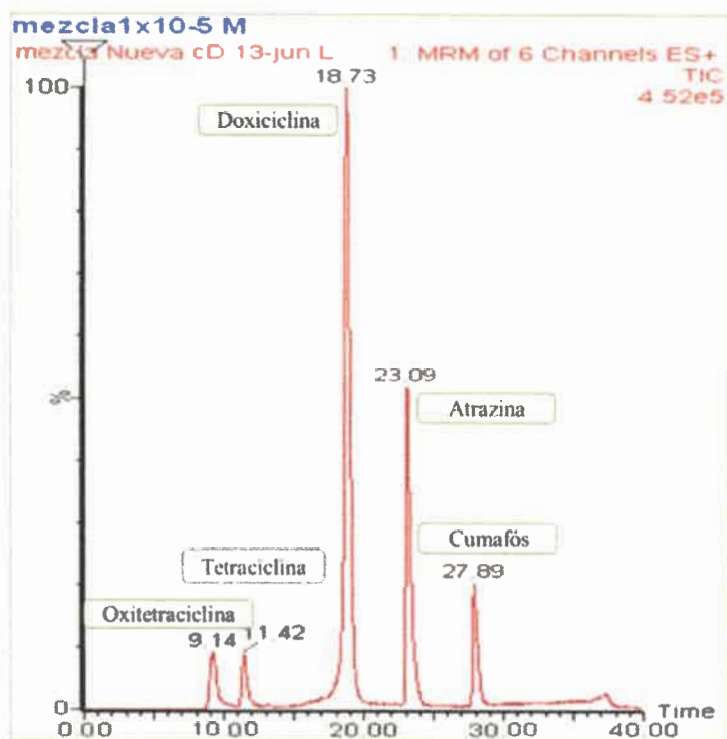


Figura 46. Cromatograma de una mezcla de 5 patrones más estándar interno (Doxiciclina) por ES+, el fipronil analizó por ES-.

5.3.4. Análisis de las curvas de calibración

Para la determinación cualitativa y cuantitativa se realizaron curvas de calibración a partir de soluciones preparadas de cada uno de los analitos, obtenidos en las condiciones mencionadas anteriormente. Trabajando en concentraciones comprendidas entre (3×10^{-5} M hasta 1×10^{-7} M). Como podemos observar, para la oxytetraciclina hay un comportamiento lineal entre el logaritmo del área y el logaritmo de la concentración. Cabe aclarar que en estas curvas se trabajó con el logaritmo teniendo en cuenta el amplio rango de trabajo (Figura 47). Los valores correspondientes a la curva de calibración son de $R^2 = 0,999$, la ordenada del origen = $6,5 \pm 0,02$ y una pendiente = $0,89 \pm 0,02$

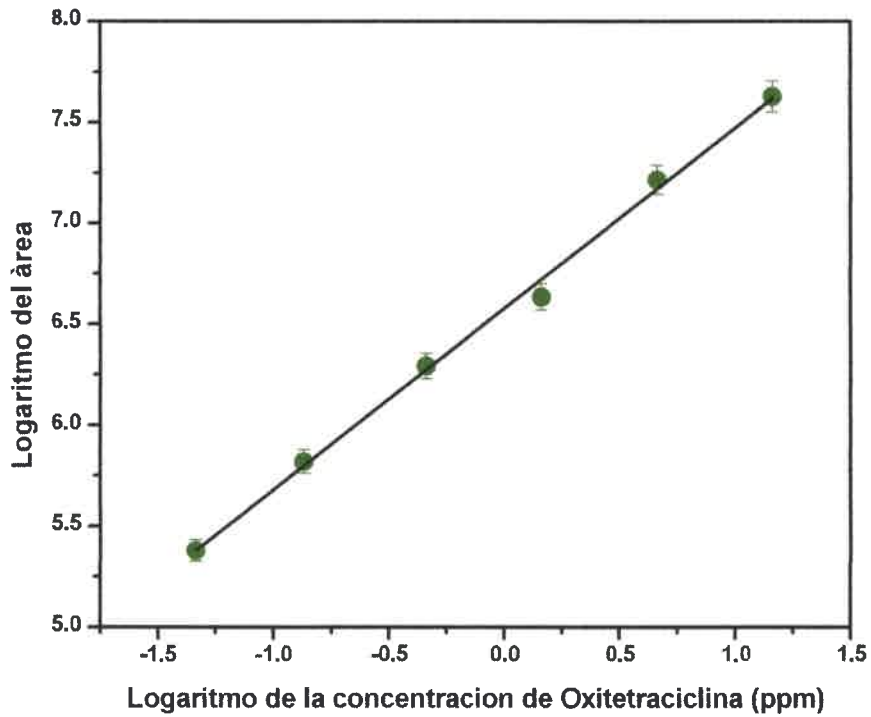


Figura 47. Curva de calibración de Oxitetraciclina

También se puede observar el calibrado para la Atrazina (Figura 48) con un $R^2=0,999$, una ordenada del origen = $6,69 \pm 0,01$ y una pendiente = $0,98 \pm 0,01$.

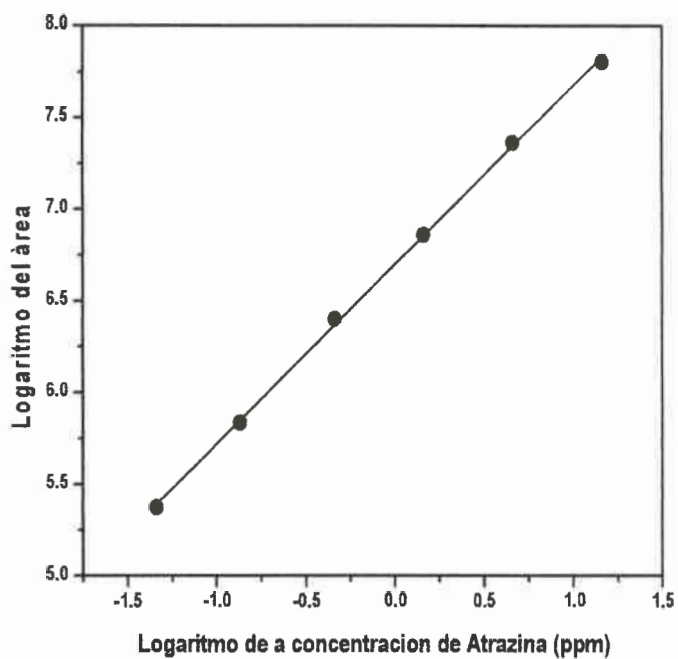


Figura 48. Curva de calibración de la Atrazina

En la Figura 49, se puede observar la curva de calibración para el fipronil. Su coeficiente de correlación $R^2=0,998$ ordenada del origen = $4,28 \pm 0,01$, pendiente = $0,59 \pm 0,02$.

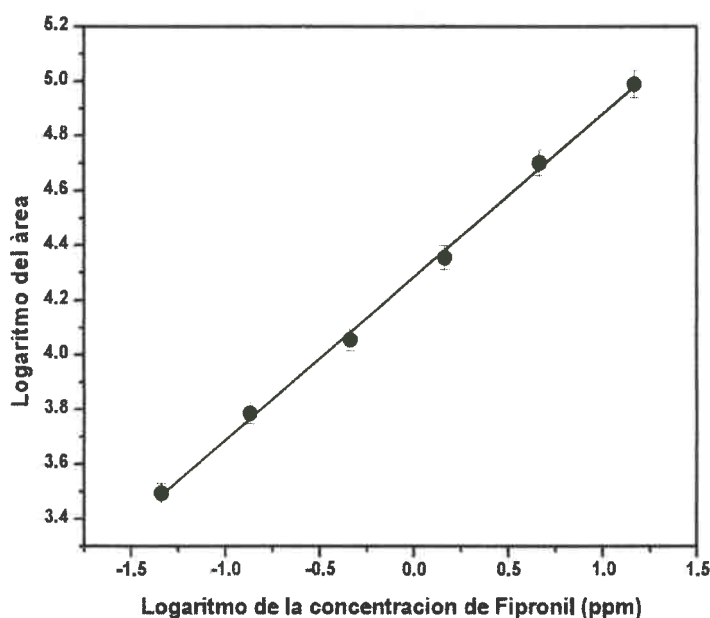


Figura 49. Curva de calibración del Fipronil

5.4. ANALISIS POR GC-ECD:

Por otra parte, y teniendo en cuenta la sensibilidad que se puede obtener con el GC-ECD, se realizaron ensayos con otros analitos: Clorpirifos, Fipronil y Endosulfan.

Se procedió de la misma manera en la que trabajamos, preparando soluciones de cada analito, para conocer el tiempo de retención de cada uno. Se realizaron inyecciones individuales para confirmar los tiempos de retención. Se puede observar una buena separación y los tiempos de retención de los analitos (Figura 50). El orden de elución es el siguiente: el primer tiempo de retención se le atribuye al clorpirifos, seguido por el fipronil y por último el endosulfan, presentando dos picos característicos, teniendo en cuenta que el patrón es una mezcla de isómeros. Inicialmente se trabajó con una rampa que duraba 15 minutos, pero se hicieron ajustes teniendo en cuenta que los analitos tenían una buena separación entre los 200 y 270°C, de esta manera se logró realizar ensayos en tan solo 6,5

minutos, observándose una buena separación y obteniendo una respuesta lineal en las diferentes concentraciones con las que se trabajó.

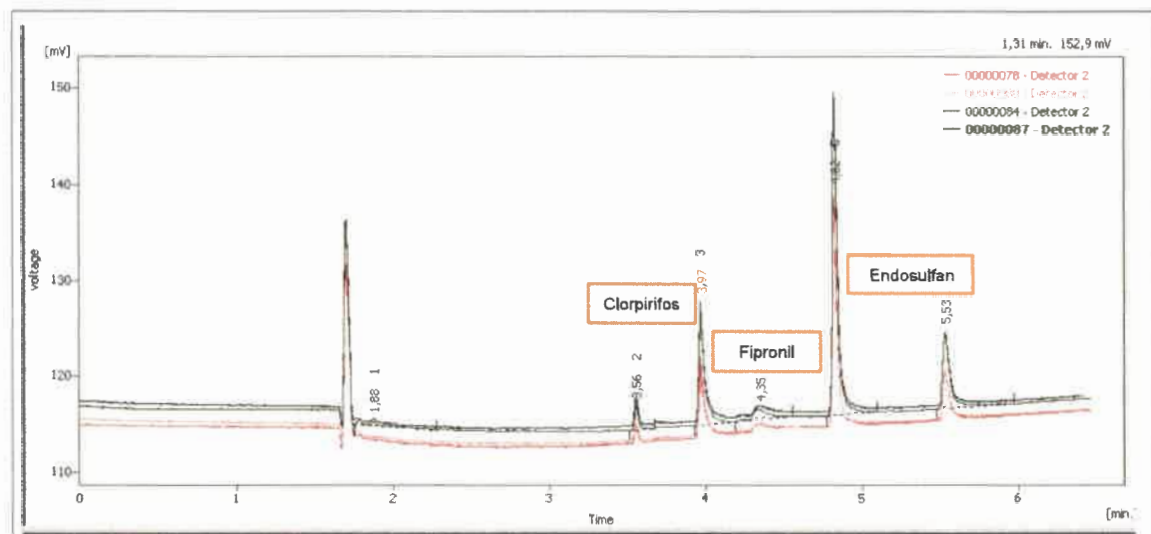


Figura 50. Cromatograma de mezcla de clorpirifos, fipronil y endosulfan en metanol (0,25-5,0 ppm)

Se escogió un rango de trabajo en donde se puedan estudiar los LMRs para cada compuesto. Cabe destacar que el endosulfan está prohibido en el país hasta agotar existencia. A continuación, se puede observar el calibrado para el endosulfan (Figura 51). Obteniéndose un $R^2 = 0,986$, una ordenada del origen = $1,7 \pm 0,03$ y una pendiente = $1,3 \pm 0,07$

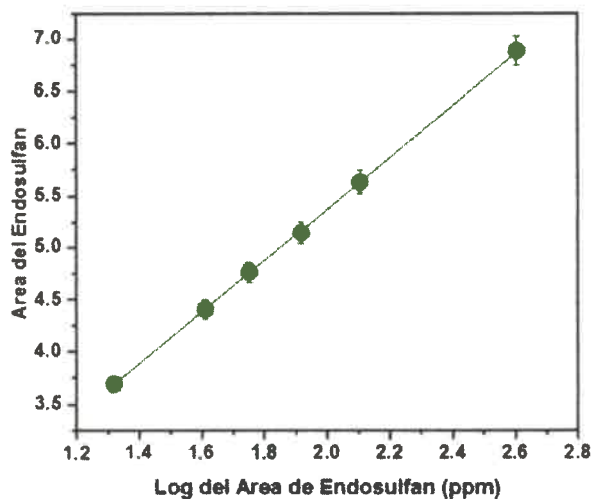


Figura 51. Curva de calibración de Endosulfan.

Como podemos observar en la (Figura 52) se muestra la curva de calibración para el Clorpirifos. Igualmente se realizaron inyecciones por triplicado observándose una linealidad entre la concentración y el área, un coeficiente de correlación $R^2= 0,992$, la ordenada del origen = $1,43 \pm 0,02$ y una pendiente = $1,50 \pm 0,06$. Ppm^{-1}

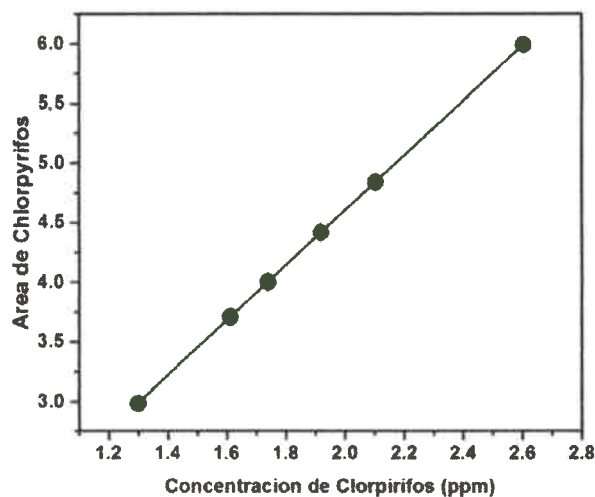


Figura 52. Curva de calibración de Clorpirifos

De la misma manera se muestra la curva de calibración para el fipronil, observando la linealidad entre el logaritmo de concentración y el logaritmo del área (Figura 53).

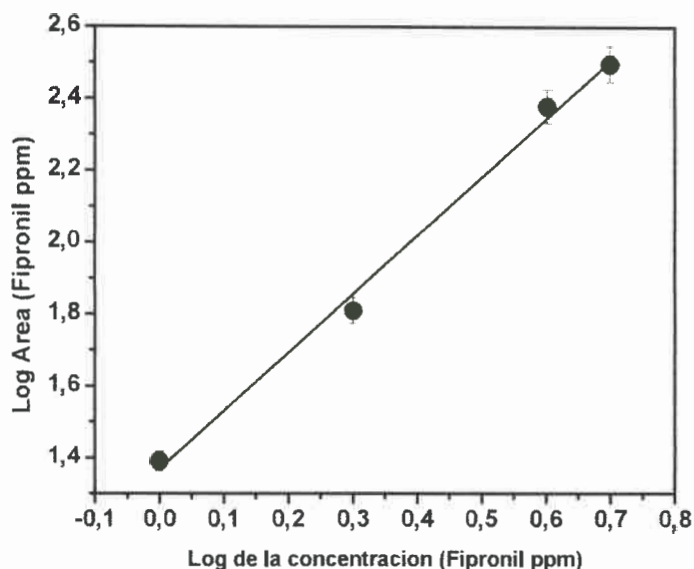


Figura 53. Curva de calibración de Fipronil

CONCLUSION PARCIAL

Se realizó un estudio muy amplio de las diferentes técnicas cromatográficas y se pusieron a punto las mismas. Por lo cual podemos concluir que el timol puede ser determinado fácilmente mediante cualquiera de las tres técnicas empleadas (GC-FID, HPLC-UV o HPLC-DE).

Comparando las tres técnicas cromatográficas empleadas para la determinación de timol en miel, se obtuvo resultados más reproducibles mediante la técnica de cromatografía líquida con detector electroquímico, ya que, de los tres, es el método más sensible, lográndose respuestas reproducibles a niveles relativamente bajos (5 ppm). Por último, la extracción usando el método directo con cartuchos de extracción en fase sólida es rápida y confiable.



También se logró poner a punto una técnica más sencilla de las existentes para la determinación de glifosato y su principal metabolito AMPA. La técnica puesta a punto mostró que es posible obtener muy buenos calibrados, reproducibles y con límites de detección aceptablemente bajos.

Se logró poner a punto la técnica para el análisis multi-residuo de plaguicidas y medicamentos, tanto en HPLC-DAD como en LC-MS/MS, lo cual resulta muy interesante porque no hay bibliografía reportada donde se estudien en conjunto. Casi siempre se estudian los medicamentos por separado y por técnicas muchos más costosas.





**CAPÍTULO VI:
RESULTADOS Y
DISCUSIÓN DE LOS
ANÁLISIS
MULTIRRESIDUOS**



6.1. ANÁLISIS MULTIRRESIDUO DE PLAGUICIDAS Y MEDICAMENTOS PREVIAMENTE SELECCIONADOS

En este capítulo se describen dos metodologías instrumentales empleadas para el análisis multirresiduo de los diferentes analitos estudiados, que fueron UPLC-MS/MS y GC-MS/MS.

OBTENCION DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN POR UPLC-MS/MS

Inicialmente se realizaron inyecciones individuales de los analitos seleccionados (atrazina, cumafós y amitraz), para confirmar los tiempos de retención de cada uno.

Se tuvieron en cuenta las condiciones cromatográficas como la fase móvil, columna, interfaz, energía capilar, energía de cono, energía de fragmentación entre otras. En la tabla 9 se muestran las condiciones cromatográficas que se utilizaron en el análisis UPLC-MS/MS.

Tabla 9. Condiciones del gradiente en UPLC

<i>Columna ACQUITY, C18 1,7 µm, 5 cm* 2,1mm</i>			
Tiempo (min)	Velocidad de flujo (mL/min)	%A (H ₂ O)	%B(ACN/0,1%Formico)
0	0,2	90	10
4	0,2	0	100
5.2	0,2	0	100
6.5	0,2	90	10
7.0	0,2	90	10

Posteriormente se hicieron mezclas de los tres en diferentes concentraciones, observándose una excelente separación entre los tres, siendo orden de elución: atrazina, cumafós y amitraz respectivamente (Figura 54).

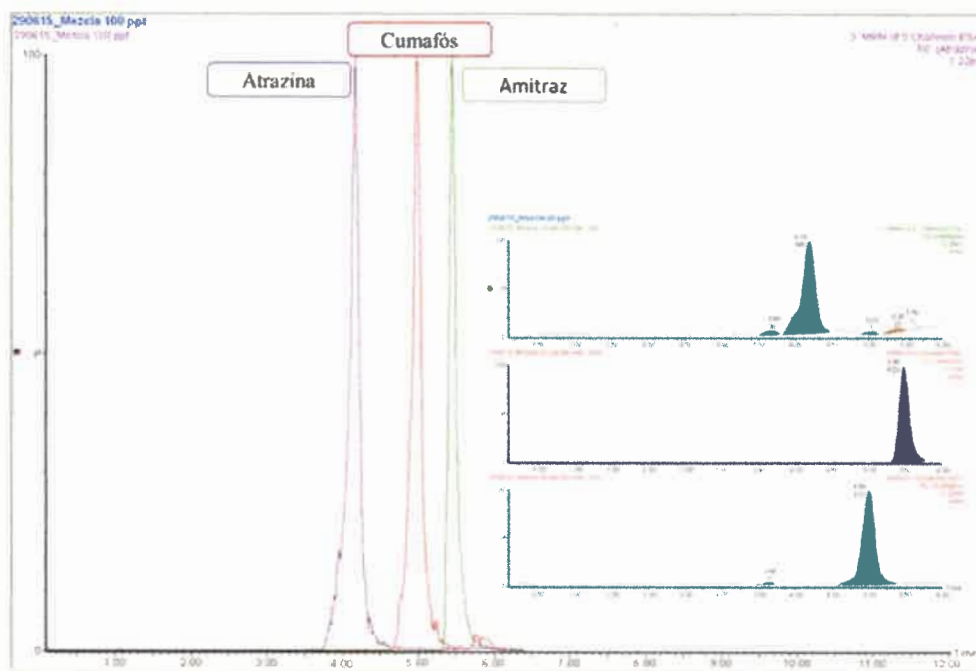


Figura 54. Cromatogramas de una mezcla de patrones atrazina (violeta), cumafós (rojo) y amitraz (verde).

Como se mencionó anteriormente, la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas se basa en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo con su relación masa/carga, y finalmente se detectan por medio de un dispositivo adecuado. De esta manera partiendo de las condiciones de la interfaz y las condiciones espectrométricas de la masa/masa, con las que se trabajó anteriormente, se realizaron ajustes para la optimización de los parámetros establecidos. Inicialmente se buscó el ion padre partiendo del conocimiento de la masa de cada analito, por ejemplo, para atrazina su masa molecular es 215,0938 g/mol, se preparó una solución a baja concentración y se inyectó directamente en la interfaz, con el fin de obtener la mejor señal. Una vez obtenido el valor del ion molecular o ion padre en este caso $216,1[M+H]^+$. Se buscaron los fragmentos o hijos más abundantes. A continuación, optimizamos los parámetros para obtener una mayor sensibilidad. Para ello se tuvieron en cuenta, la energía de cono, la energía de colisión y la energía capilar. Se realizó el mismo procedimiento para cada uno de los analitos. En la tabla 10 se resumen las condiciones óptimas de trabajo, con las cuales se pudo obtener una altísima sensibilidad.

Tabla 10. Condiciones de la interfaz UPLC-MS/MS

Compuesto	Modo	E (Capilar kV)	E de cono (V)	E de colisión (eV)	Precursor [M+H] ⁺	Hijo1	Hijo2	Hijo3
Atrazina	MScan	3,0	30	20,25,25	216	174	146	132
Amitraz	MScan	3,19	20	15,30,38	294	163,2	122,2	107,1
Cumafós	MScan	3,30	34	23,23,17	363	227	335	307

6.2 CURVAS DE CALIBRACIÓN CON PATRONES

Como se mencionó anteriormente, se realizaron inyecciones de las mezclas preparadas en diferentes concentraciones, para construir un calibrado de cada analito. La cuantificación se hizo por calibración externa, construyendo una gráfica de respuesta en función de las concentraciones. Los niveles de concentración de la curva de calibración son expresados en mg/Kg (ppb). En la Figura 55 se puede observar el calibrado para la atrazina construido con patrones que fueron preparados en acetonitrilo en concentraciones que iban de (1-30 ppb), con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0,999$, una ordenada del origen $= 270 \pm 1$ y una pendiente de $1181 \pm 1 \text{ ppm}^{-1}$.

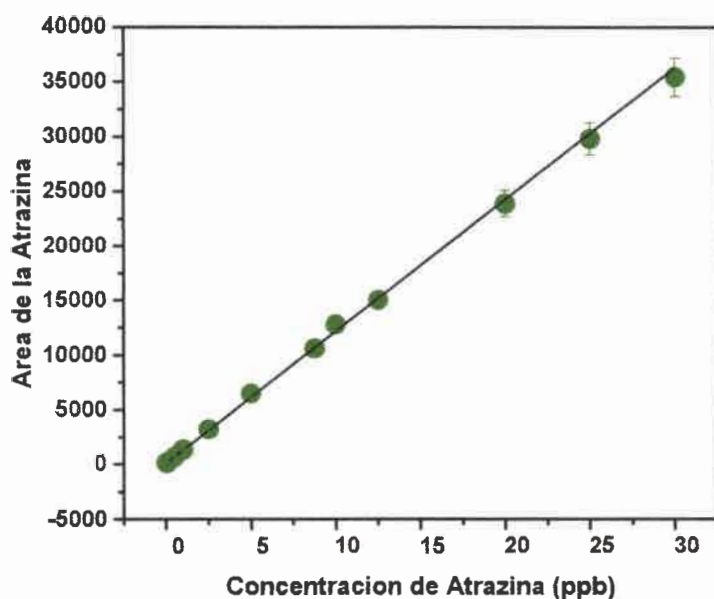


Figura 55. Curva de calibración de Atrazina

En las Figuras 56 se muestran los respectivos calibrados para el cumafós, que comprende el mismo rango de concentración para el cumafós, un coeficiente de correlación de $R^2=0,999$, la ordenada del origen = $11,00 \pm 0,02$ y la pendiente de 157 ± 2 .

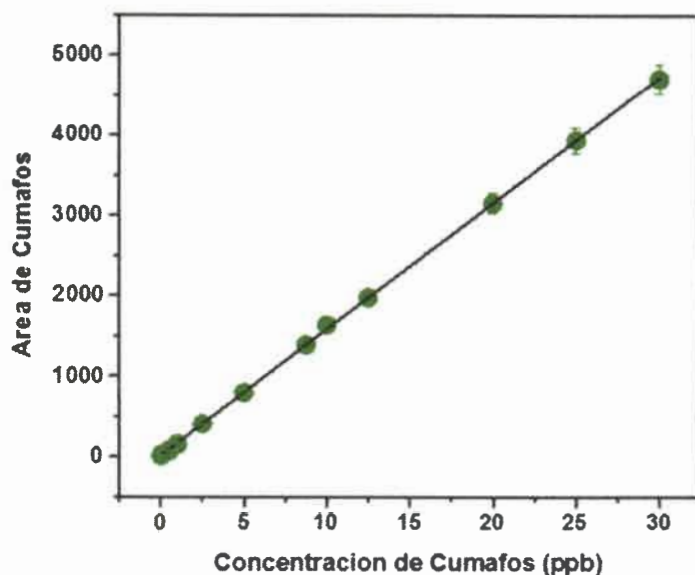


Figura 56. Curva de calibración de Cumafós.

En la Figura 57 se observa la curva de calibración para el amitraz y se obtuvo un coeficiente de correlación de $R^2 = 0,998$, la ordenada del origen = $764 \pm 1 \text{ ppm}^{-1}$ y una pendiente = $2311 \pm 1 \text{ ppm}^{-1}$. En todos los casos se observa una tendencia lineal en las concentraciones estudiadas. A su vez, se estudió la estabilidad de los patrones, inyectándolos en un período de 30 días registrándose variaciones en el valor de las áreas. Por este motivo, se decidió preparar los patrones en el momento, y de esta manera se logró trabajar con un método un método reproducible y robusto.

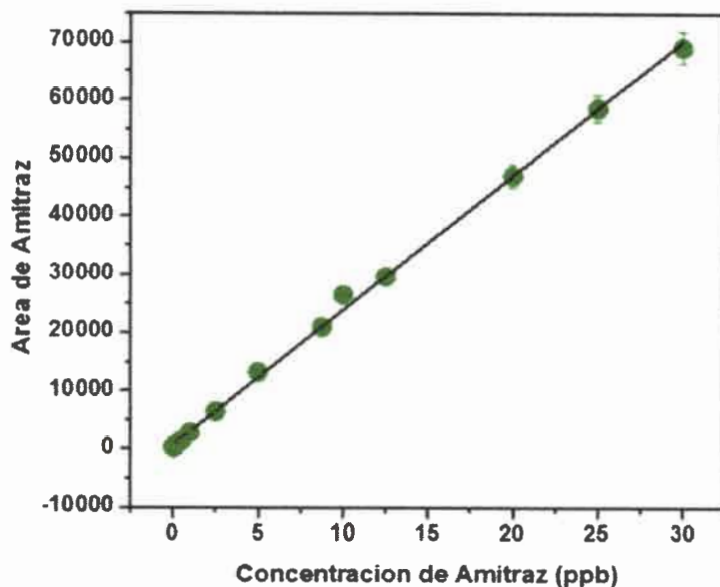


Figura 57. Curva de calibración de Amitraz.

6.3. OBTENCIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN EN MUESTRAS DE MIEL APLICANDO QUECHERS

Como se mencionó anteriormente, la miel es una matriz muy compleja y produce un efecto que se verá reflejado en la señal del analito, aumentándola o disminuyéndola a partir de la muestra estudiada en comparación con los resultados obtenidos con patrones. En la Figura 58, se muestra la curva de calibración para la atrazina extraída de la miel aplicando el procedimiento quechers. Se observa un comportamiento lineal, en las concentraciones trabajadas con un coeficiente de correlación ($R^2= 0,999$) los valores de la regresión lineal obtenidos se muestran en la tabla 9.

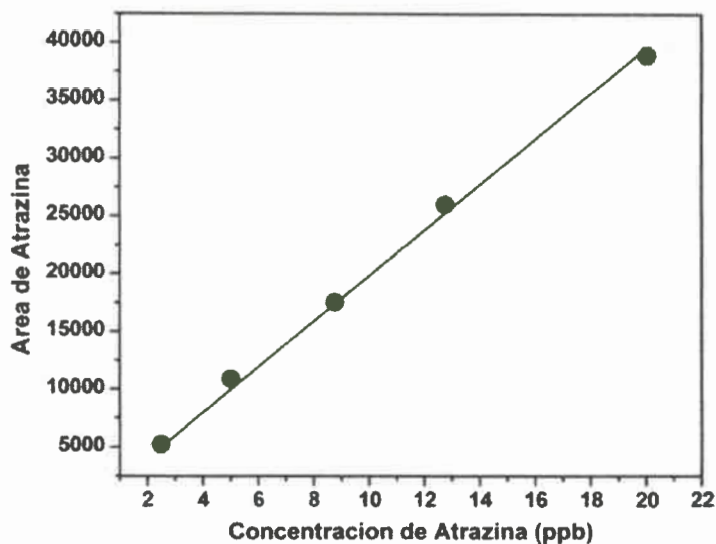


Figura 58. Curva de calibración de atrazina extraída de miel.

En la Figura 59 se puede observar la curva de calibración para el cumafós extraído de la miel, se muestra el mismo comportamiento lineal obtenido para la atrazina y un coeficiente de correlación ($R^2 = 0,998$), los valores de la regresión lineal obtenidos se muestran en la tabla 9.

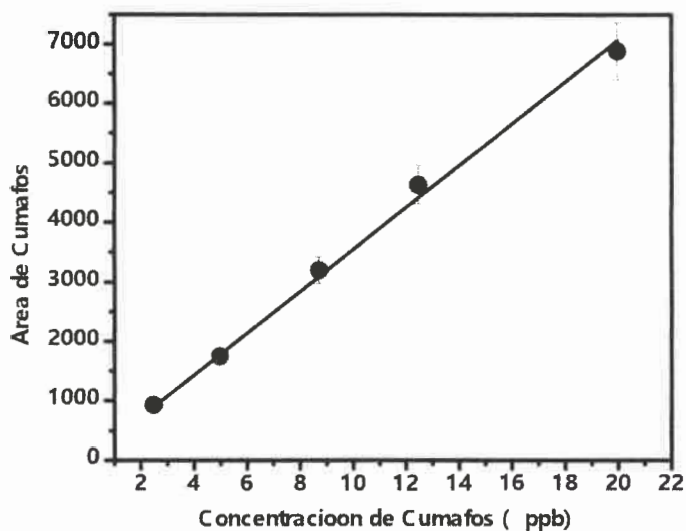


Figura 59. Curva de calibración de cumafós extraído de miel.

En la Figura 60, se puede observar la curva de calibración para el amitraz extraído de la miel fortificada, se puede observar que posee un comportamiento lineal, en las concentraciones trabajadas y se obtiene coeficiente de correlación ($R^2 = 0,999$), los valores de la regresión lineal obtenidos se muestran en la tabla 9.

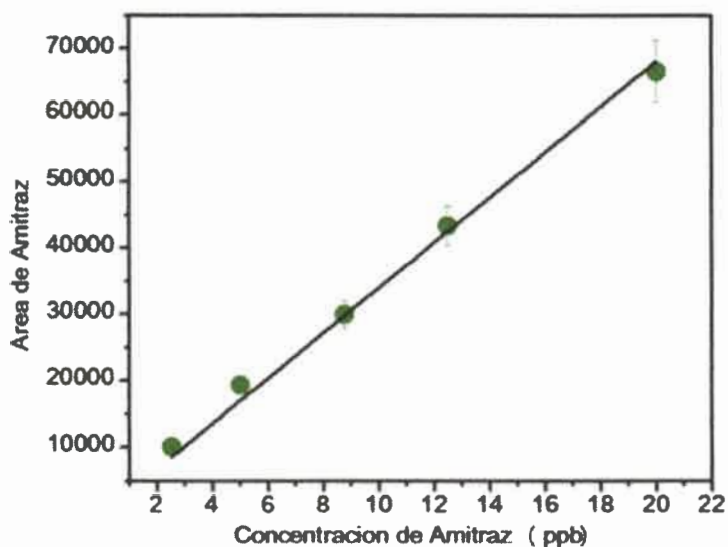


Figura 60. Curva de calibración de amitraz extraída de miel.

Como se puede observar en las curvas de calibración de las figuras anteriores, existe una buena linealidad entre la concentración de cada analito y la respuesta en este caso del área medida. Idealmente, la señal analítica debería representar solo la contribución del analito. Cuando los componentes de la matriz afectan por exceso o defecto la respuesta instrumental, estamos en presencia de un efecto matriz [79]. Por lo general, el estudio del efecto matricial se realiza por dos métodos diferentes. Una opción es comparar las pendientes de los estándares en disolvente con las pendientes de los estándares matriciales [80].

El otro método es la comparación de las áreas de las soluciones estándar preparadas en matriz y las preparadas en disolvente, multiplicadas por 100. Cuando el resultado es igual al 100%, no hay efecto de matriz, mientras que valores superiores o inferiores al 100% indican enriquecimiento o supresión de la ionización por los componentes de la matriz como en nuestro caso [81]. En la tabla 9 se muestran los valores correspondientes a la regresión lineal, ordenada del origen y pendientes de los respectivos calibrados.

Tabla 11. Parámetros de regresión, ordenada del origen y pendiente de las curvas de calibración en muestras contaminadas *exprofeso* de atrazina, cumafós y amitraz.

Analito	Ecuación $Y=a+b*X$	Coefficiente de Correlación R^2	Ordenada del origen u.a./ppm ⁻¹	Pendiente u.a.
Atrazina	$Y=a+b*X$	0,999	$5,40 \pm 0.01$	1828 ± 70
Cumafós	$Y=a+b*X$	0,999	$-6,70 \pm 0,5$	$343,0 \pm 0,5$
Amitraz	$Y=a+b*X$	0,998	$-685,0 \pm 0.5$	3202 ± 64

Por último, cuando se tienen las curvas de calibración con patrones y con muestra se procede a realizar las extracciones en las muestras de miel recolectadas. En la tabla 12 se muestran los resultados de residuos de plaguicidas determinados por UPLC-MS/MS, estos están expresados en mg/kg (ppb). Los resultados que están por debajo del límite de detección (LDM) del método se informan con no detectados ND. Se calculó la concentración para cada uno de los analitos en las muestras, por interpolación en las curvas de calibración, obteniendo límites de detección que van de 0,2 a 1,0 ppb.

Tabla 12. Resultados obtenidos para las muestras de miel aplicando *Quechers* por UPLC-MS/MS (ppb)

Pool*	Atrazina	Amitraz	Cumafós
25	ND	ND	1,31
26	ND	ND	23,15
27	ND	ND	1,24
28	ND	ND	25,84
29	ND	ND	2,28
30	ND	ND	3,74
31	ND	ND	0,54
32	ND	ND	7,03
33	ND	ND	2,05
34	ND	ND	21,55
35	ND	ND	4,76
36	3,77	ND	5,96
37	ND	ND	2,88
38	1,67	ND	3,61
39	ND	ND	4,45

40	ND	ND	1,67
41	0,25	ND	6,92
42	ND	ND	0,82
43	ND	ND	2,02
44	ND	ND	14,29
45	ND	ND	1,03
46	ND	ND	8,43
47	ND	ND	7,95
48	ND	ND	9,82
49	ND	ND	1,04
50	ND	ND	0,63
51	ND	ND	20,38
52	ND	ND	2,92
53	ND	ND	3,71
54	ND	ND	2,89
55	ND	ND	2,07
56	ND	ND	3,02
57	ND	ND	0,88
58	ND	ND	2,72

* Las muestras que involucran el número de pool, ubicación y fecha están descriptas en la tabla 6

6.4. OBTENCIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN EN MUESTRAS DE MIEL POR GC-MS/MS

Por otra parte se realizaron medidas en un sistema GC-MS/MS en los laboratorios privados del Centro de Alta Tecnología Analítica (CATA) en la ciudad de Buenos Aires. Para este análisis se preparó una mezcla con 9 plaguicidas: diclorvos, timol, atrazina, clorpirifos, fipronil, endosulfan, amitraz, cumafós y cipermetrina en acetonitrilo. Para poder conocer los tiempos de retención de cada uno de los analitos se inyectó una mezcla con una concentración de 10 ppm. La Tabla 13 muestra las condiciones cromatográficas utilizadas.

Tabla 13. Condiciones y parámetros analíticos GC-MS/MS

Gas Carrier	He
Inyector	PTV
Modo	Splitless
Tiempo de Splittess	3 min a 30 mL/min
Columna	Columna Agilent HP-5 5 % Phenyl Methyl silox, 30m*250 μ m*0,25 μ m
Flujo en columna	1,2 mL/min Flujo constante
Programación del horno	60°C 1,50 min 40°C/min a 170°C 10°C/min a 310 1,20 min
Inyección	1 μ L

Para todos los plaguicidas se tuvieron en cuenta las dos fragmentaciones más abundantes. La primera transición fue usada para la cuantificación y la segunda transición para la confirmación teniendo en cuenta la intensidad del ion precursor de cada uno de los compuestos. Para la determinación cualitativa y cuantitativa se utilizó una mezcla patrón 10 ppm que contenía los nueve analitos descritos anteriormete. A partir de ésta se hicieron diluciones y se realizaron las curvas de calibración, trabajando en concentraciones comprendidas entre 10 ppb hasta 100 ppb. Los tiempos de retención para las sustancias registradas son estimados con exactitud y en simultáneo desde los componentes más volátiles hasta los menos volátiles (Figura 61).

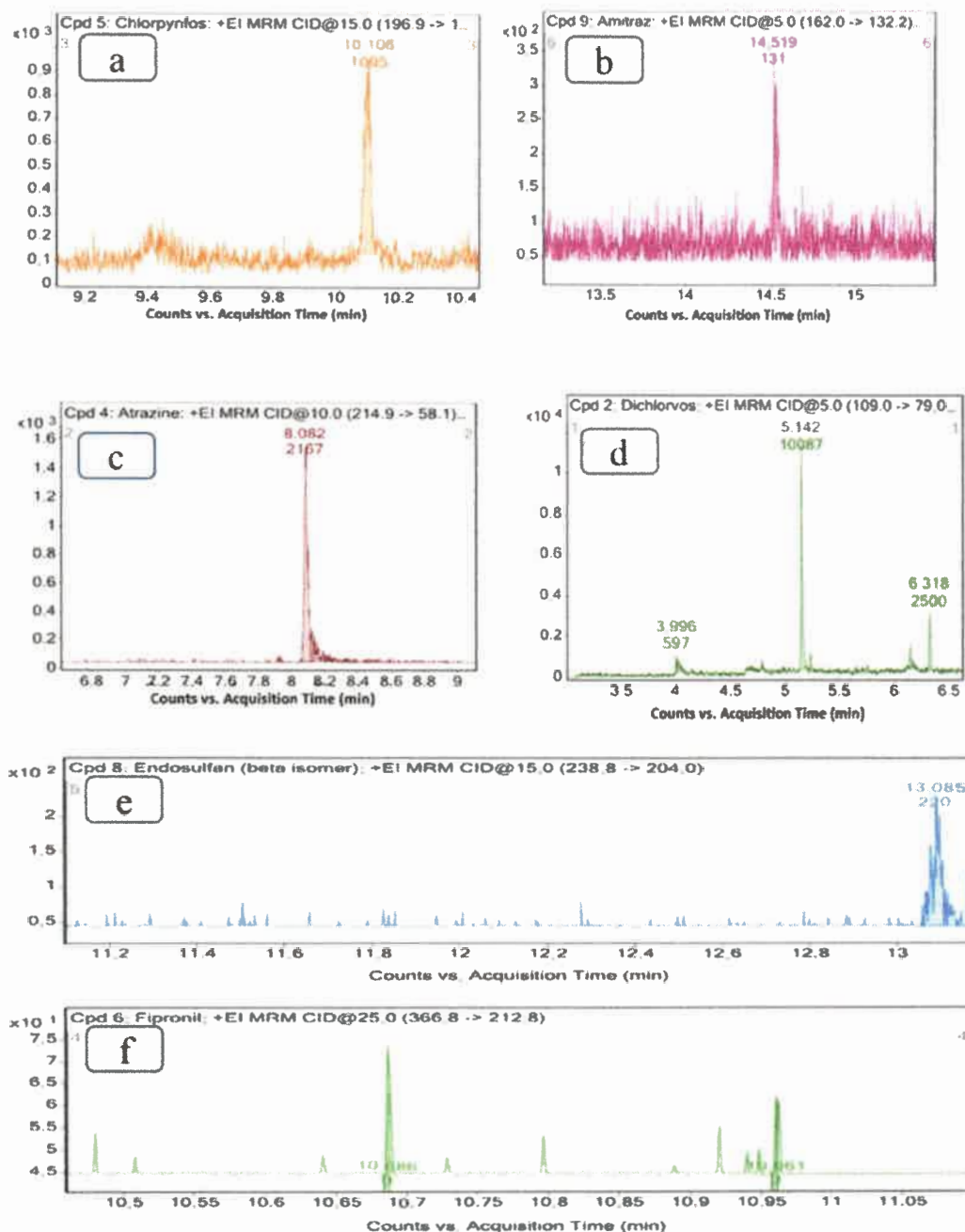


Figura 61. MRM de algunos de los analitos estudiados. a) Clorpirifos, b) Amitraz, c) Atrazina, d) Dieldrin, e) Endosulfan, f) Fipronil

Teniendo en cuenta que este equipo crea métodos de análisis MRM automáticamente, a partir de una base de datos y obteniendo así las transiciones más abundantes, para cada uno de los analitos estudiados, En la Figura 62 se observa un cromatograma (MRM) para el dieldrin y las transiciones más abundantes de este que son (184,9 → 93,0;

109 → 79,0). Se aplicó el mismo procedimiento para los 8 analitos restantes, y así conocer sus principales iones. Todos los plaguicidas se detectaron con gran selectividad y sin interferencia.

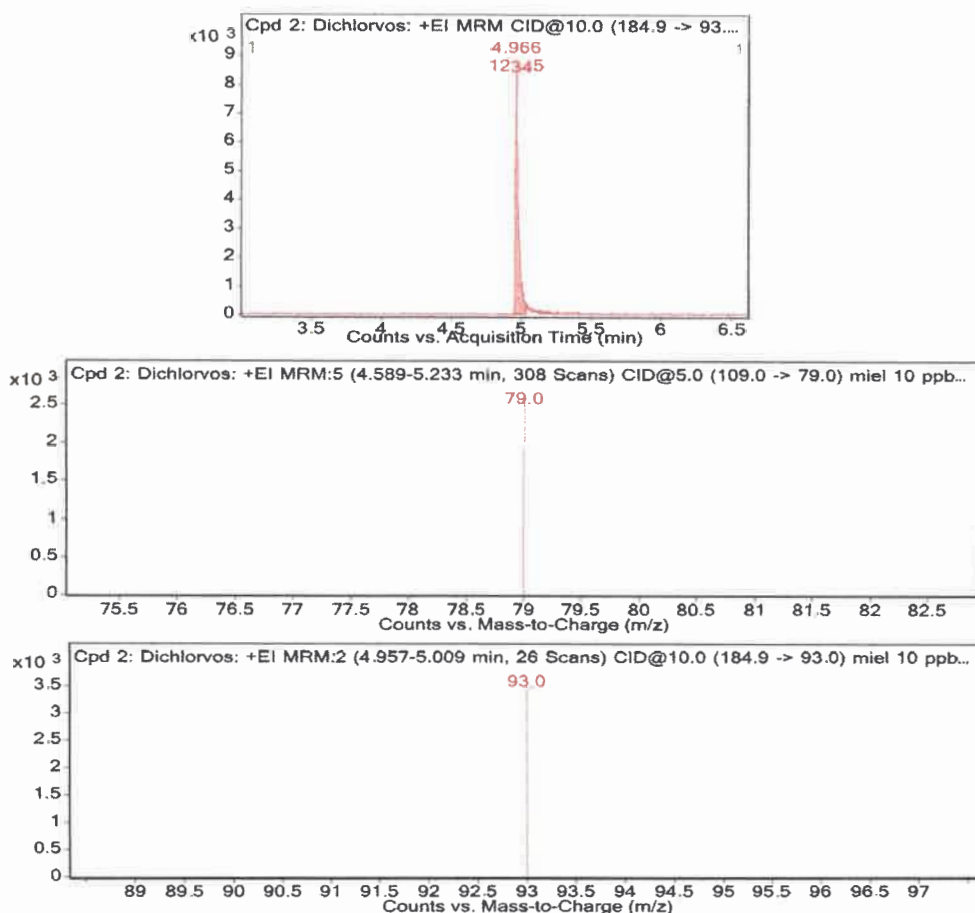


Figura 62. MRM y las transiciones más abundantes para el Diclorvos

Una vez aplicadas las extracciones por el procedimiento Quechers a las mieles, se procede a analizar los resultados. En la tabla 14 se muestran los resultados obtenidos de residuos de plaguicidas determinados por GC-MS/MS y, en las diferentes muestras de miel. Se calculó la concentración para cada uno de los analitos, e interpolando los valores del área en las curvas de calibración. Los valores de concentración de cada uno de los analitos fueron provistos por el CATA. Los límites de detección de esta técnica varían de 2 a 5 ppb.

Tabla 14. Resultados obtenidos para las muestras de miel aplicando Quechers por GC-MS/MS (ppb)

Pool*	Diclorvos	Timol	Atrazina	Clorpirifos	Fipronil	Endosulfan	Amitraz	Cumafós	Cipermetrina
1	ND	ND	10,69	ND	ND	ND	9,41	ND	ND
2	ND	1501	10,45	ND	ND	ND	12,66	ND	ND
3	4,75	12017	11,20	ND	ND	ND	10,06	ND	ND
4	ND	ND	10,71	ND	ND	ND	11,30	ND	ND
5	ND	ND	26,57	ND	ND	ND	320	ND	ND
6	ND	41,83	10,40	ND	ND	ND	319	ND	ND
7	ND	ND	10,38	ND	ND	ND	45,99	ND	ND
8	ND	1398	10,39	ND	ND	ND	37,81	ND	ND
9	ND	21,25	10,38	ND	ND	ND	48,80	ND	ND
10	ND	ND	10,38	ND	ND	ND	10,20	ND	ND
11	2,22	62,15	10,46	ND	ND	ND	68,47	ND	ND
12	ND	ND	10,38	ND	ND	ND	11,41	ND	ND
13	ND	1985	10,36	ND	ND	ND	7,93	ND	ND
14	47,10	ND	10,42	ND	ND	ND	10,05	ND	ND
15	ND	655	10,40	ND	ND	ND	7,10	ND	ND
16	56,56	456	10,39	ND	ND	ND	14,8	ND	ND
17	ND	ND	10,37	ND	ND	ND	8,01	ND	ND
18	ND	ND	10,38	ND	ND	ND	7,80	ND	ND
19	ND	4075	10,42	ND	ND	ND	8,05	ND	ND
20	9,35	ND	10,36	ND	ND	ND	7,02	ND	ND
21	-	ND	10,36	ND	ND	ND	7,22	ND	ND
22	-	ND	10,41	ND	ND	ND	7,92	ND	ND
23	-	1692	10,36	ND	ND	ND	7,33	ND	ND
24	-	4061	10,37	ND	ND	ND	7,04	ND	ND

* Las muestras que involucran el número de pool, ubicación y fecha están descriptas en la tabla 6.

Con respecto a los residuos de plaguicidas encontrados, se puede decir que se registró presencia de timol, principalmente en las mieles a las cuales se les aplicó tratamiento orgánico (muestras 2, 3, 6 y 8). Es importante destacar el uso periódico de las tabletas de timol para el control de la Varoosis y parasitosis (aproximadamente cada 15 días). Se ha demostrado en otros estudios la importancia del contacto de las tabletas de timol con la abeja para tener una mayor dispersión y eficacia del producto [82,83]. Para el timol, como para otros aceites esenciales están dentro del estado legal de la FAO como Generally

Recognized As Safe (GRAS) en concentraciones superiores a 50 mg/kg, es decir que estas sustancias en la miel son de interés no toxicológico [22]. De este acuerdo con la regulación estadounidense N° 2377/90, estas sustancias están en el grupo II de las drogas veterinarias no tóxicas, las cuales no necesitan LMRs [84]. Los aceites esenciales son, sin embargo, sustancias olorosas intensivas y pequeñas cantidades en la miel pueden alterar su sabor [85]. También se encontró residuo de timol en la muestra 9, a la cual se le aplicó tratamiento sintético, esto puede atribuirse a la contaminación cruzada entre colmenas, la cual tiene lugar cuando las abejas salen durante su pecoreo.

El diclorvos es un insecticida muy polar y soluble en agua cuya eficacia ha sido demostrada en diferentes trabajos [86,87]. Se encontró residuo de este insecticida en la muestra de miel 3 que está ubicada en la zona de alta actividad agrícola. El valor encontrado no sobrepasa los LMRs permitidos para granos que es 500 ppb [88]. Es importante resaltar que la contaminación en la miel por este plaguicida se debe a la aplicación del mismo en los cultivos de maíz y otros productos de la zona, indicando de esta manera la importancia de la abeja y sus productos como posibles indicadores ambientales.

La atrazina, que es un herbicida utilizado para los cultivos de maíz y sorgo, es aplicado al suelo, aunque también puede ser eficaz en aplicaciones sobre el follaje, posee una residualidad de 2 a 6 meses [89]. Se encontró residuo en varias muestras analizadas tanto por GC-MS/MS como por UPLC, aunque estos valores no sobrepasan los LMRs permitidos en la miel que son 0,2 ppm [90]. Es por ello que es muy importante conocer un poco más sobre la capacidad de retención y la persistencia de la atrazina. Para ello diferentes autores han investigado los procesos de adsorción y degradación del herbicida en suelos agrícolas. [91, 92]. A su vez otros autores han reportado una vida media de atrazina de 120 días, 0,8 y 1,1,12 años [93,94]. Confirmando de esta manera la persistencia de este analito en el ambiente en diferentes matrices como el suelo y la miel. Los resultados muestran ausencia de clorpirifos, fipronil, endosulfan y cipermetrina.

El amitraz es uno de los acaricidas más comúnmente utilizado por los apicultores para combatir los ácaros y parásitos como la *Varroa jacobsoni* y *Apis ascophera* [95,96]. Los

análisis de residuos muestran la presencia de amitraz en todas las mieles estudiadas por la técnica cromatográfica GC-MS/MS, lo cual era de esperarse ya que durante el desarrollo de este estudio se aplicó permanentemente en las colmenas elegidas como “tratamiento sintético”. Sin embargo, los valores encontrados, no sobrepasan los LMRs (Amitraz 200 ppb), excepto las muestras 5 y 6 (320,3 y 318,8 ppb). Una posible explicación a estos resultados es que el amitraz haya sido aplicado como insecticida en plantaciones de maíz y trigo cercanas a la zona de estudio. En el caso de cultivos de trigo presenta una gran importancia, por las enfermedades causadas por hongos, entre las que se encuentra la fusariosis o ‘golpe blanco’ de la espiga [97]. Es importante comparar los resultados de este estudio con otros autores que resaltan la alta actividad de este principio activo, ellos hablan de una baja capacidad de dejar residuos en miel como en cera. Los bajos niveles de residuos generalmente determinados en miel aun cuando el amitraz es directamente administrado en la colmena se deberfan a su rápida degradación [98]. De acuerdo a otros autores el amitraz es el único acaricida de síntesis estudiado que se descompone en la miel, siendo completamente degradado dentro de los 10 días por ruptura de los enlaces amino de su molécula [99]. Resulta muy interesante hacer la comparación en este caso de las técnicas implementadas ya que por HPLC-MS/MS no se encontró en ninguna de las muestras analizadas, pero cuando se realizó la determinación por GC-MS/MS se encontró residuos de este en las 24 muestras estudiadas. Si bien no fueron las mismas muestras analizadas por una técnica y otra sería muy interesante poder hacer el estudio sobre las mismas muestras por las diferentes técnicas analíticas, teniendo en cuenta de que tienen diferente sensibilidad y trazabilidad.

En cuanto al cumafós se observan trazas en todas las muestras analizadas por UPLC-MS/MS. Aunque durante el desarrollo del proyecto no se aplicó cumafós, este producto se aplicó durante muchos años consecutivos utilizando pastillas de cumafós ABVarC, sin rotación de drogas. Además

La presencia de cumafós puede explicarse por su gran afinidad por los lípidos ya que la cera de abejas presenta en su composición un importante contenido de ácidos grasos de alto peso molecular, lo que la hace un medio adecuado para la acumulación de sustancias lipofílicas como el cumafós [100]. Estudios anteriores han demostrado que el cumafós se



acumula a lo largo del tiempo en la cera de la colmena y contamina en baja proporción a la miel [101]. De esta manera podemos comparar nuestros resultados con otros autores que han analizado residuos de este acaricida en cera y en la miel en cuatro cuadros representativos de cuatro apiarios diferentes escogidos al azar. Ellos encontraron una alta concentración de residuos de coumafós en cera en comparación con la cantidad encontrada en la miel. (Límite de detección en cera: 15 ppb, límite de detección en miel: 5 ppb) [102]. De esta manera podemos concluir que nuestros límites de detección son mucho más bajos que los informados en este estudio, aunque hubiera sido muy interesante poder realizar en análisis sobre la cera.



CAPÍTULO VII: CONCLUSIÓN FINAL

El desarrollo de algunos sectores de la agricultura se encuentra estrechamente relacionado con la actividad apícola, teniendo en cuenta que esta especie desempeña un rol muy importante en la polinización de cultivos, principalmente en frutas y hortalizas. Aproximadamente un 90 % de la producción de alimentos dependen de la polinización de la *Apis mellífera* que es uno de los agentes polinizadores más importantes a nivel mundial.

Tal como se mencionó anteriormente, se realizaron muestreos durante tres años consecutivos. Se recolectaron un total de 445 muestras con las cuales se formaron 81 pooles, de los cuales 58 fueron sometidos al análisis de residuos de plaguicidas de uso agrícola y medicamentos de uso apícola, aplicados por los apicultores para mantener la sanidad de las colmenas.

De la misma manera fueron sometidos 71 pooles a diferentes análisis fisicoquímicos de: humedad, color, acidez y contenido de HMF. A partir de estos resultados se pudo concluir que las mieles estudiadas satisfacen las especificaciones de calidad establecidas por el C.A.A.

Se realizó un análisis estadístico que mostró que existe diferencia significativa entre las localidades de Gigena y Merlo para Color, acidez y HMF. Para el parámetro de humedad no se encontró diferencia significativa.

En cuanto a los plaguicidas de uso agrícola, a partir de estos estudios se pudo determinar que el 50% de las muestras contienen residuos de atrazina y el 7% de diclorvos. La importancia de esta observación reside en el hecho que dichos plaguicidas no son empleados por los apicultores, sino que serían incorporados a la colmena por las abejas, quienes durante su pecoreo se ponen contacto con zonas contaminadas con los mismos. Lo que demostraría que los productos de la colmena, como la miel, bien pueden jugar el rol de indicadores de la contaminación ambiental. Respecto a los plaguicidas de uso apícola, el 100% de las muestras analizadas presentan residuos de amitraz, lo cual es lo esperado dado que fue empleado por los apicultores para control de la *Varroa*. Si bien, del total, solo 2 muestras superan el LMR (300 ppb) es un resultado muy importante para los apicultores en cuanto a la aplicación sin control que pueda hacerse del mismo ya que demuestra que



efectivamente este acaricida llega a la miel y la contamina pudiendo acumularse.

Por otra parte, el 50% de las muestras contienen residuos de cumafós, aunque no superan el LMR (100 ppb). Este resultado es de suma importancia dado que este último acaricida no fue empleado por los apicultores, lo cual confirma que el mismo, por sus características de liposolubilidad, puede quedar almacenado en la cera y luego transferirse a la miel.

Finalmente es importante destacar que, dado que en la zona agrícola de la provincia de Córdoba principalmente se cultiva soja sería sumamente importante el análisis de residuos de glifosato en muestras de miel. Si bien en este trabajo de Tesis no se llegó al análisis de las muestras obtenidas se logró poner a punto la técnica de determinación del mismo y su metabolito AMPA y se probó una metodología de extracción sumamente sencilla con resultados aceptables.





CAPÍTULO VIII:

BIBLIOGRAFÍA





8. BIBLIOGRAFIA CITADA POR ORDEN NUMERICO

- [1] MANTEIGA, L. (2000). Los indicadores ambientales como instrumento para el desarrollo de la política ambiental y su integración en otras políticas. *Estadística y medio ambiente*, 75-87.
- [2] BECKER, A. (1999). Las abejas, Centinelas del entorno ambiental. (*Revista L'a Abeille de Francs. Francia*).
- [3] ROJAS, D. S. (2014). Artefacto analógico de la abeja y su importancia para la vida. *Revista Grafías*, (25), 87-89.
- [4] WALLNER, K., & FRIES, I. (2003). Control of the mite *Varroa destructor* in honey bee colonies. *Pesticide Outlook*, 14(2), 80-84.
- [5] JEAN-PROST, P. (2007). *Apicultura: conocimiento de la abeja. Manejo de la colmena*. Mundi-Prensa Libros.
- [6] GOMEZ, C., & AUDIZZIO, N. (1997). La colmena y sus partes. *Agroeconomico NEA (Argentina)*.(, 4(22), 14-15.
- [7] BASILIO, A. (2000). Cosecha polínica por *Apis mellifera* (Hymenoptera) en el bajo Delta del Paraná: comportamiento de las abejas y diversidad del polen. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales nueva serie*, 2(2), 111-121.
- [8] GALLO MENDOZA, G. (1995). *Sector Agropecuario: Nación y provincia de Buenos Aires. Una contribución a la elaboración de políticas para una agricultura social y ambientalmente sustentable 1914-1993* (No. E10/45). Instituto de Economía Energética/Fundación Bariloche, Buenos Aires (Argentina).

-
- [9] DELLE VILLE, H., & INTA, E. R. A. E. (1992). Perspectiva apícola nacional Gaceta del Colmenar, Argentina, (588), 9-12.
- [10] ALIMENTARIUS, C. (2011). Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. 34 Período de sesiones. *FAO, WHO, United Nations, Geneva, Switzerland*.
- [11] ZHANG, Z. Q. (2000). Notes on *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) parasitic on honeybees in New Zealand. *Systematic and Applied Acarology Special Publications*, 5(1), 9-14.
- [12] GRANDJEAN, M., & CAMPO, S. O. (2002). *Manual de buenas prácticas para la apicultura* (No. IICA-L01 22). IICA, Santiago (Chile). PROMER. FIDA, Santiago (Chile).
- [13] SAETA, J. M., BULACIO, L., GIULIANI, S., & PANELO, M. S. (2008). "Incidencia del manejo sanitario de la colmena en la contaminación de la miel". *Revista Agromensajes* (24), 1-4.
- [14] PASSUCCI, J. A., WEST, M., TORRES, J. O., BALLESTEROS, B., RODRÍGUEZ, G., & TABERA, A. (2014). Diagnóstico clínico de Loque americana en colmenas y prevalencia de esporos viables de *Paenibacillus larvae* subs. *larvae* en miel de apiarios de Tandil. *Revista Argentina de Producción Animal*, 26(1), 57-62.
- [15] ALIPPI, A. M., RINGUELET, J. A., HENNING, C. P., & BANDONI, A. (2001). Loque americana. Actividad antimicrobiana in vitro de algunos aceites esenciales y mezclas de esencias sobre *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. *Vida Apícola*, 106, 41-44.
- [16] EGUARAS, M. J. (2006). Estrategias para el control de *Varroa*, Universidad Nacional de mar de la plata, Editorial Martin, pag (10-11)
- [17] ULLOA, J. A., MONDRAGÓN CORTEZ, P. M., RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, R., RESÉNDIZ VÁZQUEZ, J. A., & ROSAS ULLOA, P. (2010). La miel de abeja y su importancia. *Revista Fuente*, 2(4), 1-4.

[18] C.A.A. CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO, LEY 18.284, 1993. CAPÍTULO X, ALIMENTOS AZUCARADOS, ART. 782, 783 (2007). Resolución Mercosur sobre miel No 15794. Anexo, Res. No 321/85 y Res. No 330/88.

[19] BULACIO CAGNOLO, N., BASUALDO, M., & EGUARAS, M. (2010). Actividad Varroocida del timol en colonias de *Apis mellifera* L. de la provincia de Santa Fe. *InVet*, 12(1), 85-90.

[20] BIANCHI, E. M. (1990). Control de la calidad de la miel y la cera. Boletín de servicios agrícolas de la FAO, SF 539. (B52).

[21] ALIMENTARIUS, C. (1998). CÓDIGO INTERNACIONAL RECOMENDADO REVISADO DE PRÁCTICAS-PRINCIPIOS GENERALES DE HIGIENE DE LOS ALIMENTOS (CAC/RCP 1-1969, Rev 3 (1997) y anexo: sistema de análisis de peligros y de puntos críticos de control. HACCP. Directrices para su aplicación. Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. Suplemento al Volumen IB. Requisitos Generales (Higiene de los Alimentos). *Italia (Roma) Codex alimentarius*.

[22] BOGDANOV, S., KILCHENMANN, V., & IMDORF, A. (1999). "Acaricide residues in honey, beeswax and propolis". *Swiss Bee Research Centre, Dairy Research Station, Liebefeld, Bern, Switzerland*, 11

[23] MAHMOOD, R., WAGCHOURE, E. S., UL MOHSIN, A., RAJA, S., & SARWAR, G. (2012). Control of ectoparasitic mites in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies by using thymol and oxalic acid. *Pakistan J. Zool*, 44(4), 985-989.

[24] NOZAL, M. J., BERNAL, J. L., JIMENEZ, J. J., GONZÁLEZ, M. J., & HIGES, M. (2002). Extraction of thymol, eucalyptol, menthol, and camphor residues from honey and

beeswax: Determination by gas chromatography with flame ionization detection. *Journal of Chromatography A*, 954(1), 207-215.

[25] BOGDANOV, S., KILCHENMANN, V., FLURI, P., BÜHLER, U., & LAVANCHY, P. (1999). Influence of organic acids and components of essential oils on honey taste. *American Bee Journal*, 139(1), 61-63.

[26] IMDORF, A., BOGDANOV, S., IBA EZ OCHOA, R., & CALDERONE, N. W. (1999). Use of essential oils for the control of *Varroa jacobsoni* Oud. in honey bee colonies. *Apidologie*, 30, 209-228.

[27] ALBERO ROMANO, M. B. (2009). "Determinación de residuos de contaminantes orgánicos en miel y zumos" (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones).

[28] DE AMARANTE JUNIOR, O. P., DOS SANTOS, T. C. R., BRITO, N. M., & RIBEIRO, M. L. (2002). Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Quim. Nova*, 25(4), 589-593.

[29] RIOS LOSADA, C. (2004). "Desenvolupament de mètodes de preconcentració emprant membranes líquides suportades i extracció en fase sòlida per a la determinació de l'herbicida glifosat i el seu metabòlit AMPA en aigües naturals". Universitat de Girona.

[30] DE FERNICOLA, N. A. G. G. (1985). Toxicología de los insecticidas organoclorados. *Bol of Sanit Panam*, 98(1), 10-19.

[31] SINGLETON, S. T., LEIN, P. J., FARAHAT, F. M., FARAHAT, T., BONNER, M. R., KNAAK, J. B., & OLSON, J. R. (2014). "Characterization of α -cypermethrin exposure in Egyptian agricultural workers". *International journal of hygiene and environmental health*, 217(4), 538-545.

- [32] BARRANCO, M., VERGARA, C., & MORA, A. (2015). Conocimiento actual del efecto de los insecticidas derivados de la nicotina (neonicotinoides) en las poblaciones de abejas polinizadoras. *revista científica y tecnológica upse*, 2(3), 1-5.
- [33] KLEIN NC, CUNHA BA. (1995) Tetracyclines, *Med clin North Am*, vol. 79 (789-801).
- [34] PÉREZ-TRALLERO, E., & IGLESIAS, L. (2003). “Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol”. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 21(9), 520-529.]
- [35] SORACI, A., BEDASCARRASBURE, E., & LIBONATTI, C. (2002). “Metodología analítica para la detección de residuos de oxitetraciclina en miel”. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- [36] DIEGUEZ, S., SORACI, A., BEDASCARRASBURE, E., & LIBONATTI, C. (2002). Serie: RIA Revista de Investigaciones Agropecuarias, 31(1), 159-165.
- [37] ADAMS, S. J., HEINRICH, K., HETMANSKI, M., FUSSELL, R. J., WILKINS, S., THOMPSON, H. M., & SHARMAN, M. (2007). “Study of the depletion of tylosin residues in honey extracted from treated honeybee (*Apis mellifera*) colonies and the effect of the shook swarm procedure”. *Apidologie*, 38(4), 315-322.
- [38] CISNEROS, J. M., PALOMINO-NICÁS, J., & PACHÓN-DÍAZ, J. (2014). La interconsulta de enfermedades infecciosas es una actividad clave para los servicios y unidades de enfermedades infecciosas y para el hospital. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(10), 671-675.
- [39] PAYÁ, P., ANASTASSIADES, M., MACK, D., SIGALOVA, I., TASDELEN, B., OLIVA, J., & BARBA, A. (2007). Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 389(6), 1697-1714.



- [40] AOAC OFFICIAL METHOD (2007:01). "Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate".
- [41] SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J., & DOLAN, J. W. (2011). "Introduction to modern liquid chromatography". John Wiley&Sons.
- [42] PAYÁ, A. (2006). Fundamento y Funciones de la Espectrometría de Masas. Universidad de Valencia, España. Química Analítica Moderna, Madrid: Mc Graw Hill / Interamericana S.A., España.
- [43] TAKATS, Z., WISEMAN, J. M., GOLOGAN, B., & COOKS, R. G. (2004). Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science*, 306(5695), 471-473.
- [44] KNEPIL, J. (1999). Practical Introduction to GC/MS Analysis with Quadrupoles, by Michael Oehme. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 37(9), 929-929.
- [45] R. P. W. SCOTT, TANDEM TECHNIQUES. JOHN WILEY AND SONS, NEW YORK, (1997). P1053.
- [46] SKOOG, D. A., WEST, D. M., & HOLLER, F. J. (1997). Fundamentos de química analítica (Vol. 2).
- [47] GROSS, JÜRGEN H. (2004) Instrumentation in Mass Spectrometry. Springer Berlin Heidelberg, 2004. p. 111-192.
- [48] MORENO, M. L., & DALLOS, J. A. G. (2002). Validación de una metodología multiresiduo para la determinación de residuos de plaguicidas en repollo (*Brassica oleracea* var *capitata*.) por cromatografía de gases. *Revista Colombiana de Química*, 31(1), 19-32.

[49] LEDOUX, M. (2011). "Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin". A review of the past two decades. *Journal of chromatography A*, 1218(8), 1021-1036.

[50] TETTE, P. A. S., DA SILVA OLIVEIRA, F. A., PEREIRA, E. N. C., SILVA, G., DE ABREU GLÓRIA, M. B., & FERNANDES, C. (2016). Multiclass method for pesticides quantification in honey by means of modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS. *Food chemistry*, 211, 130-139.

[51] CALDAS, S. S., ROMBALDI, C., DE OLIVEIRA ARIAS, J. L., MARUBE, L. C., & PRIMEL, E. G. (2016). Multi-residue method for determination of 58 pesticides, pharmaceuticals and personal care products in water using solvent demulsification dispersive liquid-liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 146, 676-688.

[52] PIRARD, C., WIDART, J., NGUYEN, B. K., DELEUZE, C., HEUDT, L., HAUBRUGE, E., & FOCANT, J. F. (2007). "Development and validation of a multi-residue method for pesticide determination in honey using on-column liquid-liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*, 1152(1), 116-123. C.

[53] BERNAL, J. L., JIMÉNEZ, J. J., DEL NOZAL, M., HIGES, M., & LLORENTE, J. (2000). "Gas chromatographic determination of acrinathrine and 3-phenoxybenzaldehyde residues in honey". *Journal of Chromatography A*, 882(1), 239-243.

[54] SILLARD, S., & ANNETTE, S. (2002). "Residuos de fluvalinato en cera de abejas de colmenares de la Décima Región". (Doctoral dissertation, Tesis. Escuela Ing. en Alimentos, Facultad de Ciencias Agraria, Universidad Austral de Chile, Valdivia).

[55] KILJANEK, T., NIEWIADOWSKA, A., SEMENIUK, S., GAWEL, M., BORZECKA, M., & POSYNIAK, A. (2016). Multi-residue method for the determination

of pesticides and pesticide metabolites in honeybees by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry—Honeybee poisoning incidents. *Journal of Chromatography A*, 1435, 100-114.

[56] NORMA, I. R. A. M. 15945: 1997. Miel-Determinación de la Conductividad eléctrica. Buenos Aires: Editado por Instituto Argentino de Normalización. *Mieles de la provincia de Santa Fe (Argentina)*.

[57] VIT, P., ENRIQUEZ, E., BARTH, O. M., MATSUDA, A. H., & ALMEIDA-MURADIAN, L. B. (2006). Necesidad del control de calidad de la miel de abejas sin aguijón. *medula*, 15(2), 36-42.

[58] DELMORO, J., MUÑOZ, D., NADAL, V., CLEMENTZ, A., & PRANZETTI, V. (2010). El color en los alimentos: determinación de color en mieles. *Revista de investigación académica*, (25), 145-152.

[59] CERVERA, S. S., & CERVERA, M. M. S. (1994). Valores de acidez (libre lactónica y total) y pH de las mieles de La Rioja. *Zubia*, (12), 193-204

[60] SUBOVSKY, M. J., LÓPEZ, Á. S., CASTILLO, A., & CANO, N. (2016). Evaluación del contenido de Hidroximetilfurfural en mieles del Nordeste Argentino. *Agrotecnia*, (12), 32-33.

[61] JUÁREZ-SALOMO, A., & VALLE-VEGA, P. (1995). Termogeneración de hidroximetilfurfural (HMF) en miel de abeja como parámetro de calidad. *Tecnología de Alimentos*, 30(6), 13.

[62] MOLAN, P. C. (1992). The antibacterial activity of honey: 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee world*, 73(1), 5-28.

[63] ORDÓÑA, Y. B. M., GONZÁLEZ, C. E., & ESCOBEDO, R. M. (2012). Calidad fisicoquímica de la miel de abeja *Apis mellifera* producida en el estado de Yucatán durante diferentes etapas del proceso de producción y tipos de floración. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 43(3), 323-334.

[64] MATEO CASTRO, R., JIMENEZ ESCAMILLA, M., & BOSCH REIG, F. (1992). Evaluation of the color of some Spanish unifloral honey types as a characterization parameter. *Journal of AOAC international*, 75(3), 537-542.

[65] CHIFA, C., MONTENEGRO, S. B., AVALLONE, C. M., & PIRE, S. M. (2000). Calidad polínica de las mieles producidas en el Depto. Güemes de la Prov. del Chaco (Argentina). *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas Universidad Nacional del Nordeste*, 4.

[66] MONTENEGRO, S. B., AVALLONE, C. M., AZTARBE, M., & OSUNA, M. (2006). Actividad enzimática en miel de *Apis mellifera*. *Comunicaciones científicas y tecnológicas*, T095.

[67] ROMERA, D. F., & ARA, R. C. D. (1998). Determinación de algunos parámetros de calidad de la miel en la Provincia de Huesca. *Lucas Mallada: revista de ciencias*, (10), 107-122.

[68] PÉREZ-ARQUILLUÉ, C., CONCHELLO, P., ARIÑO, A., JUAN, T., & HERRERA, A. (1995). Physicochemical attributes and pollen spectrum of some unifloral Spanish honeys. *Food Chemistry*, 54(2), 167-172.

[69] CIAPPINI, M. C., GATTUSO, S., GATTI, M. B., DI VITO, M. V., & GÓMEZ, G. (2009). Miele de la provincia de Santa Fe (Argentina): Determinación palinológica, sensorial y fisicoquímica, según provincias fitogeográficas. *Invenio: Revista de investigación académica*, (22), 109-120.

[70] BASUALDO M, PEREDA A, BEDASCARRASBURRE E (2006) Caracterización botánica de mieles de la cuenca del Salado, Buenos Aires, Argentina *RIA* (35): 5-14.



[71] BARONI MV, FAYÉ P, WUNDERLIN DA. (2004). Caracterización de mieles de la provincia de Córdoba por análisis de parámetros físico químicos, Libro de Actas del Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba, Argentina.

[72] WHITE. J.W. (1980). Hidroxymethylfurfural content of honey an indicator of its adulteration whit invert sugars *Bee World* 61(1):29-37.

[73] NOZAL, M. J., BERNAL, J. L., JIMENEZ, J. J., GONZÁLEZ, M. J., & HIGES, M. (2002). Extraction of thymol, eucalyptol, menthol, and camphor residues from honey and beeswax: Determination by gas chromatography with flame ionization detection. *Journal of Chromatography A*, 954(1), 207-215.

[74] PERUZZO, P., MARINO, D., CREMONTE, C., DA SILVA, M., PORTA, A., RONCO, A., & INTERNATIONAL WATER ASSOCIATION. (2003). Impacto de pesticidas en aguas superficiales y sedimentos asociado a cultivos por siembra directa. en *Agua: Usos Múltiples del Agua, para la Vida y el Desarrollo Sostenible* (1-8). IWA.

[75] CALDERÓN, M. J., QUINTANA, M. A., LOPEZ-PIÑEIRO, A., HERMOSÍN, M. C., & CORNEJO, J. (2005) Estudio preliminar sobre el comportamiento del herbicida glifosato en dos suelos de extremadura. *Estudios de la zona No Saturada del suelo* (7), 29-32.

[76] SANCHO, J. V., HIDALGO, C., HERNÁNDEZ, F., LÓPEZ, F. J., DIJKMAN, E., & HOGENDOORN, E. A. (1996). Rapid determination of glyphosate residues and its main metabolite AMPA in soil samples by liquid chromatography. *International journal of environmental analytical chemistry*, 62(1), 53-63.

[77] PERUZZO, P. J., PORTA, A. A., & RONCO, A. E. (2008). Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution*, 156(1), 61-66.

[78] HAMSCHER, G., SCZESNY, S., HÖPER, H., & NAU, H. (2002). Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 74(7), 1509-1518.

[79] PALACIOS, ANDRÉS, VÍCTOR ARIAS, AND BENITO ARIAS (2014) "Las actitudes hacia las matemáticas: construcción y validación de un instrumento para su medida." *Revista de Psicodidáctica* 19.1, 67-91.

[80] TOMASINI, D., SAMPAIO, M. R., CALDAS, S. S., BUFFON, J. G., DUARTE, F. A., & PRIMEL, E. G. (2012). Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified QuEChERS method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*, 99, 380-386.

[81] SAMPAIO, M. R., TOMASINI, D., CARDOSO, L. V., CALDAS, S. S., & PRIMEL, E. G. (2012). Determination of pesticide residues in sugarcane honey by QuEChERS, and liquid chromatography. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(2), 197-205.

[82] RUFFINENGO, S., EGUARAS, M., FLORIS, I., FAVERIN, C., BAILAC, P., & PONZI, M. (2005). LD50 and repellent effects of essential oils from Argentinian wild plant species on *Varroa destructor*. *Journal of Economic Entomology*, 98(3), 651-655.

[83] CHIESA, F. (1991). Effective control of varroaosis using powdered thymol. *Apidologie*; 22:135-145

[84] REGLAMENTO N° 2377/90 del consejo de la CEE del 26 de junio (1990). Por el que se establece un procedimiento de fijación de límites de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal.

[85] FIGUEROA, V., & PATRICIO, A. (2003). Analisis de residuos de aceite esencial mentol en miel de abejas (*Apis mellifera* L.).



-
- [86] XUE, Q. Q., YAO, D., HUANG, Z. Y., KE, Q., WEN, X., & GENG, B. R. (2005). Acute toxicity of pesticide dichlorvos and herbicide butachlor to *Microhyla ornata* tadpoles. *Sichuan Journal of Zoology*, 24(2), 209-212.
- [87] XU, Z., FANG, G., & WANG, S. (2010). Molecularly imprinted solid phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography for determination of trace dichlorvos residues in vegetables. *Food Chemistry*, 119(2), 845-850.
- [88] STRADA, J. (2012). Evaluación de residuos de plaguicidas en granos de maíz (*Zea mays* L.) y trigo (*Triticum aestivum* L.) posterior a la aplicación en el almacenamiento y en el campo. *Interciencia*, 37(6), 412-417.
- [89] USTARROZ, D., & RAINERO, H. P. (2011) Persistencia y fitotoxicidad de atrazina en el cultivo de soja. Investigadores del INTA, área de Agronomía. 76-78
- [90] ORANTES-BERMEJO, F. J., PAJUELO, A. G., MEGÍAS, M. M., & FERNÁNDEZ-PÍÑAR, C. T. (2010). Pesticide residues in beeswax and beebread samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in Spain. Possible implications for bee losses. *Journal of Apicultural Research*, 49(3), 243-250.
- [91] Li, J., Langford, C.H., Gamble, D.S., 1996, Atrazine sorption by a mineral soil: Effects of soil size fractions and temperature: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3680–3684.
- [92] Krutz, L.J., Senseman, S.A., McInnes, K.J. Zuberer, D.A., Tierney, D.P., 2003, Adsorption and desorption of atrazine, desethylatrazine, deisopropylatrazine, and hydroxyatrazine in vegetated filter strip and cultivated soil: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7379–7384.
- [93] GUILLÉN-GARCÉS, R.A., HANSEN, A.M., AFFERDEN VAN, M., (2007), Mineralization of atrazine in agricultural soil: Inhibition by nitrogen: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, 844–850.

- [94] MÁRQUEZ-PACHECO, H., (2009), Atenuación natural de atrazina en perfiles de suelo de Guasave, Sin.: México, Universidad Nacional Autónoma de México, tesis de maestría, 103 pp.
- [95] FERNANDEZ MUINO, M. A., SANCHO, M. T., SIMAL-GANDARA, J., CREUS-VIDAL, J. M., HUIDOBRO, J. F., & SIMAL-LOZANO, J. (1997). Acaricide residues in honeys from Galicia (NW Spain). *Journal of food protection*, 60(1), 78-80.
- [96] FERNÁNDEZ, M., PICÓ, Y., & MANES, J. (2002). Analytical methods for pesticide residue determination in bee products. *Journal of Food Protection*, 65(9), 1502-1511.
- [97] STRADA, J. (2012). Evaluación de residuos de plaguicidas en granos de maíz (*Zea mays* L.) y trigo (*Triticum aestivum* L.) posterior a la aplicación en el almacenamiento y en el campo. *Interciencia*, 37(6), 412-417.
- [98] JIMÉNEZ, J.; BERNAL, M.; NOZAL, L.; TORIBIDO. (1997). Characterization and monitoring of Amitraz degradation products in honey. *J. High Resol. Chromatograph*, 20:81-84.
- [99] KORTA, E.; BAKKALI, A.; BARRUETA, L.; GALLO, B.; VICENTE, F.; KILCHENMANN & S. BOGDANOV. 2001. Study of acaricide stability in honey. Characterization of amitraz degradation products in honey and beeswax. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 5835-5842.
- [100] Eguaras, M. J. (2006). Estrategias para el control de Varroa. Editorial Martin, 43-49.
- [101] Lanzelotti, P., Maldonado, M., Ocampo, V., & Arroyo, J. (2006). Exploración en el estudio de distribución de concentraciones del acaricida coumpahos en cera y en miel de mismo cuadro melario en condiciones de campo. *Laboratorio de Control de Calidad, MELACROM, Buenos Aires, Argentina.*



- [102] LANZELOTTI, P. (2007). Dinámicas de contaminación de miel y cera en la colmena. Estudio de casos con residuos de nitrofuranos y coumaphos. *Agro sur*, 35(1), 28-29.

2/10/20

76147

MORENO, GABRIELA ANALIA

Verbo abstr.: como abstr. f. como sustantivo de sustantivación por abstracción en sustantivos f.

2017 76147

