



UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA



FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

*“ESTUDIO DE LA CONTAMINACIÓN DE LA MIEL
POR RESIDUOS PROCEDENTES DE
TRATAMIENTOS SANITARIOS EN APICULTURA”*

MEMORIA PRESENTADA POR FRANCISCO MOLINO GAHETE EN LA UNIVERSIDAD DE
ZARAGOZA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN VETERINARIA

ZARAGOZA, JUNIO 2008



Area de Nutrición y Bromatología
Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos
Facultad de Veterinaria
Universidad de Zaragoza

La **Dra. Regina Lázaro Gistau** y la **Dra. Consuelo Pérez Arquillué**, profesoras titulares del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza,

Certifican que la presente memoria de tesis doctoral titulada: “Estudio de la contaminación de la miel por residuos procedentes de tratamientos sanitarios en apicultura”, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, que su contenido se corresponde con el proyecto de tesis aprobado en su día, y que reúne las condiciones requeridas para que **D. Francisco Molino Gahete**, pueda optar al Grado de Doctor en Veterinaria por la Universidad de Zaragoza.

Y para que conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firman el presente certificado en Zaragoza, a treinta de junio de dos mil ocho.

Fdo. Regina Lázaro Gistau

Fdo. Consuelo Pérez Arquillué

Tempore contractos artus sacer ignis edebat

ROTINVS aerii mellis redolentia dona
Hybleasq. apes alueorum cerea tecta
Quiq. albi flores examina queq. legēda
Indicat humentes fauces celestia dona.



ROTINVS aerii mellis ce
lestia dona
Exequar. hanc etiam merce
nal aspice partem
Admiranda tibi leuium spec
tacula rerum
Magnanimosq. duces totius
que ex ordine gentis

Mores & studia & populos & prelia dicam

Intenui labor at tenuis non gloria si quem

Lumina leua sinunt auditq. uocatus apollo

Ilustración página anterior procedente de un códice en pergamino del siglo XV; se encuentra en la Biblioteca Real del Monasterio de El Escorial. Ilustra el libro cuarto de *El Georgicon* de Virgilio. Foto de Angel Díaz. Traducción libre: *“Ahora voy a tratar de la miel aérea regalo celestial: mira también, Mecenas, esta parte. Voy a hablarte del maravilloso espectáculo de las cosas minúsculas: jefes esforzados, costumbres detalladas de la raza entera, sus afanes, pueblos y batallas. De asunto menudo es la tarea, mas no es menuda su gloria si le dejan a uno las divinidades hostiles y es escuchado por Apolo al invocarlo”.*

*A los sin nombre,
el verdadero espíritu de la colmena*

AGRADECIMIENTOS

A mis madres, por abrirme las puertas de la ciencia y por consentirme utilizar esta tesis de excusa para poder disfrutar de la vida.

A toda el área de nutrición y bromatología, por estos maravillosos años, por hacer de mi lo que soy hoy y por regalarme sin pedir nada a cambio, un pedacito de su corazón.

A los que han pasado a mejor vida y a los que siguen siendo becarios, por todos y cada uno de los buenos momentos que me han hecho pasar, por estar a mi lado en los buenos y sobretodo, en los malos momentos.

A mi hermana mayor y a mi hermana pequeña, por su comprensión, por hacer más liviana esta carga y por ser mucho más que unas magnificas compañeras de despacho.

A mis amigos, por despertar en mí, desde su curiosidad, el gusanillo de la docencia.

A mi cayado y compañera en este viaje, por hacer camino al andar.

A mis padres, sencillos y laboriosos como obreras, trabajadores infatigables en la colmena familiar, mi modelo a seguir.

*A todos y cada uno de ellos, por todo esto
y por mucho más, gracias.*

ÍNDICE

1. <u>Introducción</u>	1
2. <u>Objetivos</u>	7
3. <u>Revisión bibliográfica</u>	9
3.1. La miel como alimento	
3.1.1. <i>Definición y Composición</i>	11
3.1.2. <i>Estructura del sector apícola</i>	12
3.1.2.1. <i>Comercio mundial de miel</i>	12
3.1.2.2. <i>Estructura del sector apícola nacional</i>	16
3.2. Actividades apícolas	
3.2.1. <i>Manejo del apiario</i>	19
3.2.2. <i>Obtención de la miel</i>	21
3.3. Enfermedades más importantes de <i>Apis mellifera</i>	25
3.3.1. <i>Varroosis</i>	26
3.3.2. <i>Loques</i>	27
3.4. Tratamientos sanitarios en apicultura	28
3.4.1. <i>Tetraciclinas</i>	
3.4.1.1. <i>Características físico-químicas y modo de acción</i>	29
3.4.1.2. <i>Uso de tetraciclinas en apicultura</i>	31
3.4.2. <i>Flumetrina</i>	
3.4.2.1. <i>Características físico-químicas y modo de acción</i>	32
3.4.2.2. <i>Uso de flumetrina en apicultura</i>	33
3.4.3. <i>Aspectos legales del uso de medicamentos veterinarios en apicultura</i>	34
3.5. La miel y la seguridad alimentaria: problemática de la presencia de residuos en miel	38
3.5.1. <i>Residuos de tetraciclinas en miel</i>	40
3.5.1.1. <i>Aspectos toxicológicos</i>	42
3.5.1.2. <i>Aspectos legales de su presencia en la miel</i>	43
3.5.2. <i>Residuos de flumetrina en miel</i>	43
3.5.2.1. <i>Aspectos toxicológicos</i>	45
3.5.2.2. <i>Aspectos legales de su presencia en la miel</i>	45
3.6. Métodos analíticos de determinación de residuos de tratamientos veterinarios en la miel	47

3.6.1. <i>Acondicionamiento de la muestra</i>	48
3.6.2. <i>Extracción de los analitos</i>	48
3.6.2.1. <i>Técnicas de extracción con solventes orgánicos</i>	48
3.6.2.2. <i>Técnica de extracción en fase sólida</i>	49
3.6.2.3. <i>Técnica de microextracción en fase sólida</i>	55
3.6.2.4. <i>Dispersión en fase sólida de la matriz</i>	56
3.6.2.5. <i>Extracción con fluidos supercríticos</i>	56
3.6.2.6. <i>Extracción con barras magnéticas</i>	57
3.6.3. <i>Purificación del extracto (clean-up)</i>	58
3.6.4. <i>Determinación</i>	59
3.6.4.1. <i>Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)</i>	59
3.6.4.2. <i>Cromatografía de gases</i>	62
3.6.5. <i>Confirmación</i>	64
3.6.6. <i>Métodos analíticos para determinación de residuos de tetraciclinas (oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina y doxiciclina) en miel.</i>	65
3.6.7. <i>Métodos analíticos para determinación de residuos acaricidas de síntesis (flumetrina, fluvalinato, cumafós, bromopropilato y 4,4'-dibromobenzofenona) en miel</i>	68
4. <u>Material y métodos</u>	73
4.1. <i>Material, reactivos y equipos</i>	75
4.1.1. <i>Material</i>	75
4.1.2. <i>Reactivos</i>	75
4.1.3. <i>Preparación de reactivos</i>	77
4.1.4. <i>Equipos</i>	78
4.1.5. <i>Control de calidad y validación de los reactivos y equipos</i>	79
4.2. <i>Puesta a punto y validación de un método analítico multiresidual para la determinación de tetraciclinas en miel</i>	80
4.2.1. <i>Ensayo del método original (Oka et al., 1987)</i>	80
4.2.2. <i>Optimización de la extracción en fase sólida de los analitos</i>	81
4.2.3. <i>Optimización de la determinación cromatográfica mediante HPLC</i>	82
4.2.4. <i>Validación del método analítico</i>	83
4.2.5. <i>Fortificación de una muestra de miel exenta de residuos</i>	85
4.3. <i>Puesta a punto y validación de un método de análisis multiresiduo de</i>	

acaricidas de síntesis (flumetrina, fluvalinato, cumafós, bromopropilato y 4,4'-dibromobenzofenona) en miel	86
4.3.1. <i>Fortificación de una muestra de miel exenta de residuos</i>	88
4.3.2. <i>Validación del método</i>	88
4.4. Estudio de la estabilidad de las tetraciclinas en diferentes muestras de miel (efecto de la pasteurización y del tiempo de almacenamiento)	98
4.5. Estudio de la estabilidad de la flumetrina en la colmena	100
4.6. Análisis de residuos de acaricidas de síntesis en muestras de miel	101
5. <u>Resultados y Discusión</u>	103
5.1. Puesta a punto y validación de un método de análisis multiresiduo de tetraciclinas (oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina, y doxiciclina) en miel	
5.1.1. <i>Puesta a punto</i>	105
5.1.2. <i>Validación del método de análisis</i>	114
5.2. Puesta a punto y validación de un método de análisis multiresiduo de acaricidas de síntesis (flumetrina, fluvalinato, cumafós, bromopropilato y 4,4'-dibromobenzofenona) en miel	
5.2.1. <i>Puesta a punto</i>	119
5.2.2. <i>Validación del método</i>	124
5.3. Estudio de la estabilidad de las tetraciclinas en diferentes tipos de miel	
5.3.1. <i>Estudio del efecto del proceso de pasteurización en la degradación de las tetraciclinas</i>	137
5.3.2. <i>Estudio del efecto del tiempo de almacenamiento en la degradación de las tetraciclinas</i>	139
5.4. Estudio de la estabilidad de la flumetrina en la colmena	143
5.5. Análisis de residuos de acaricidas de síntesis en muestras de miel	146
6. <u>Conclusiones</u>	149
7. <u>Resumen</u>	155
8. <u>Bibliografía</u>	159

1. INTRODUCCIÓN

“La miel es como el sol de la madrugada: tiene el encanto del amor del estío y la frescura de las frutas maduras del otoño”. Federico García Lorca.

La presencia de residuos de antibióticos en productos alimenticios representa un peligro potencial para la salud de los consumidores, debido a la aparición de reacciones alérgicas, desarrollo de resistencias bacterianas y modificaciones en la flora intestinal.

En el ámbito de la sanidad apícola, las tetraciclinas (antibióticos de amplio espectro que inhiben la síntesis proteica de las bacterias impidiendo su crecimiento) son utilizadas como tratamientos terapéuticos frente a la loque americana (*Paenibacillus larvae*) y la loque europea (*Melissococcus pluton*). La incorrecta utilización de estos medicamentos puede dejar residuos en la miel, lo que constituye un riesgo para la salud pública.

En la Unión Europea no hay fijados límites máximos para estos residuos (LMRs) en miel (Reglamento CEE nº 2377/90), ya que su uso en apicultura está prohibido. Sin embargo, en países como Cuba, Chile o Argentina, éste último uno de los principales exportadores de miel a la Unión Europea, este límite está establecido en 0,1 µg/g miel.

El límite máximo de estos residuos (LMRs) en otros alimentos como leche y carne está establecido en 0,1 µg/g, si bien es previsible que este valor vaya disminuyendo conforme se desarrollen nuevos métodos de análisis y de detección más sensibles.

En la actualidad, hay numerosos métodos para el análisis de estos residuos en diversas matrices, pero existen pocos métodos para determinar residuos de tetraciclinas en miel, y ninguno de ellos oficial, debido principalmente a la complejidad de este alimento dada la facilidad de las tetraciclinas para formar complejos con metales y unirse a proteínas, condicionando con ello los procesos de extracción al obtenerse recuperaciones muy bajas. Otro problema importante a tener en cuenta son las interferencias de la propia matriz en el análisis cromatográfico, lo que dificulta su identificación.

En apicultura, siempre que se habla de enfermedades apícolas, hay que tener como referencia la varroosis. Está producida por el ácaro *Varroa destructor*, perteneciente a la familia *Ixodidae*. Este ácaro coloniza la abeja asiática (*Apis ceranea*), pero debido a la expansión de la abeja europea productora de miel (*Apis mellifera*) a zonas asiáticas, el parásito se ha adaptado a esta última, aumentando su nicho ecológico a cualquier zona donde esté presente la *Apis mellifera* (Anderson y

Trueman, 2000). Es la enfermedad de mayor trascendencia económica en apicultura a nivel mundial.

El éxito en el control de la varroosis depende de la efectividad del medicamento, el cual debe permanecer en la colmena durante varias semanas para que todos los ácaros mueran, incluyendo los que van saliendo de las celdas junto con las abejas. Las condiciones climáticas en España exigen la utilización de productos de acción prolongada que puedan cubrir todo el ciclo de la abeja. Este factor, unido en muchos casos a una preparación y aplicación efectuada de forma artesanal (riesgo de toxicidad para la persona que lo manipula y aplica, falta de control en la dosificación, la duración y el tiempo de espera del tratamiento), provoca la posibilidad de presencia de este tipo de residuos en los distintos productos de la colmena (miel, polen, cera, jalea real), con el consiguiente riesgo para la salud de los consumidores.

Actualmente, los acaricidas estudiados en esta tesis presentan valores variables en lo referente a LMRs a nivel de la Unión Europea: flumetrina, fluvalinato, bromopropilato y 4,4'-dibromobenzofenona, carecen de límites; cumafós 100 µg/kg.

Uno de los últimos productos autorizados en España ha sido Bayvarol® (flumetrina), cuyo principio activo es un acaricida de síntesis de tercera generación considerado de baja toxicidad, siendo muy escasos los estudios de su presencia en mieles, así como poco estudiado el comportamiento, en cuanto a la estabilidad de su principio activo en la colmena.

La miel, al igual que otros alimentos, es sometida a tratamientos tecnológicos y a un proceso de almacenamiento cuyas condiciones inciden directamente sobre su calidad y en particular sobre los residuos que pueda contener.

Por el riesgo para la salud humana y por los posibles efectos tóxicos que supone la presencia de residuos en la miel, se hace indispensable la implantación de herramientas que posibiliten el control de dichos residuos.

Teniendo en cuenta la problemática anteriormente mencionada, en la presente tesis doctoral, se han puesto a punto y validado sendos métodos de análisis multiresiduo para la detección y cuantificación de residuos de tetraciclinas y acaricidas de síntesis en miel; se ha estudiado la estabilidad de las tetraciclinas en diferentes tipos de miel; se ha realizado un estudio sobre la estabilidad de flumetrina en base a un estudio de campo y, finalmente, se ha procedido al análisis y evaluación del riesgo de estos residuos en mieles procedentes de la Comunidad Autónoma de Aragón.

2. OBJETIVOS

“Es de condición muy excelente para gozar de buena salud y alcanzar la edad más secular, alimentarse de miel y untarse de aceite”. Demócrito de Abdera.

Con la presente tesis se persiguen los siguientes objetivos:

1. Objetivos metodológicos:

- Poner a punto y validar un método de análisis multirresidual de tetraciclinas en miel.
- Poner a punto y validar un método de análisis de residuos de flumetrina y otros acaricidas de síntesis en miel.

2. Objetivos analíticos:

- Estudiar la estabilidad de las tetraciclinas en diferentes muestras de miel:
 - Efecto de la pasteurización.
 - Efecto del tiempo de almacenamiento en oscuridad.
- Estudiar la estabilidad de la flumetrina en la colmena.
- Analizar residuos de acaricidas de síntesis en muestras de miel.

3. Objetivos de seguridad alimentaria:

- Evaluar el riesgo sanitario derivado de la presencia de residuos de acaricidas de síntesis en miel.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

“Si buscas un modelo de conducta en un mundo de complejidad, nada mejor que imitar el de las abejas”. Peter Miller

3.1. La miel como alimento

3.1.1. Definición y composición

La miel se define como la “sustancia natural dulce producida por la abeja, *Apis mellifera*, a partir del néctar de plantas o de secreciones de partes vivas de plantas o de excreciones de insectos chupadores presentes en las partes vivas de plantas, que las abejas recolectan, transforman combinándolas con sustancias específicas propias, depositan, deshidratan, almacenan y dejan en colmenas para que madure” (Real Decreto 1049/2003).

La miel de flores es elaborada por la abeja a partir del néctar de las flores. A través de su lengua, el néctar es ingerido y llega al buche donde se mezcla con enzimas de la saliva que, junto con los que recoge del néctar floral, hidrolizan la sacarosa del néctar en fructosa y glucosa, principales azúcares contenidos en la miel. Cuando la abeja regresa a la colmena, regurgita la carga del néctar en las celdillas próximas a la entrada (Sainz *et al.*, 2000), donde la deposita y pierde agua por evaporación. Transcurridos unos días, el néctar que ha sido depositado en los alvéolos de los panales, se deshidrata hasta una concentración de agua de entre 14 y 25%, al mismo tiempo que la concentración de azúcares se eleva hasta el 70-80% y su espectro de azúcares se modifica por la acción enzimática. Finalmente, la abeja recubre la celdilla con miel ya madurada mediante un opérculo de cera (Jean-Prost, 2001).

Además de estos azúcares y enzimas, los principales componentes de la miel son agua, sacarosa, maltosa, ácidos orgánicos, minerales, aminoácidos, pigmentos, proteínas y compuestos fenólicos.

Tabla 1. Principales componentes de la miel, según Sainz *et al.* (2000).

Componentes	Valores medios
Agua	17,2%
D-levulosa (fructosa)	38,2%
D-dextrosa (glucosa)	31,3%
Sacarosa	1,3%
Maltosa	7,3%
Polisacáridos	1,5%
Ácidos libres (ácido glucónico)	0,4 meq/kg
Lactona (glucolactona)	0,1%
Nitrógeno	0,1%
Cenizas	0,2%

En cuanto a las características organolépticas, la miel tiene un color que puede variar desde incoloro a pardo oscuro, prácticamente negro. Puede tener una consistencia fluida, espesa o cristalizada (en parte o en su totalidad). El sabor y el aroma pueden variar, dependiendo del origen vegetal.

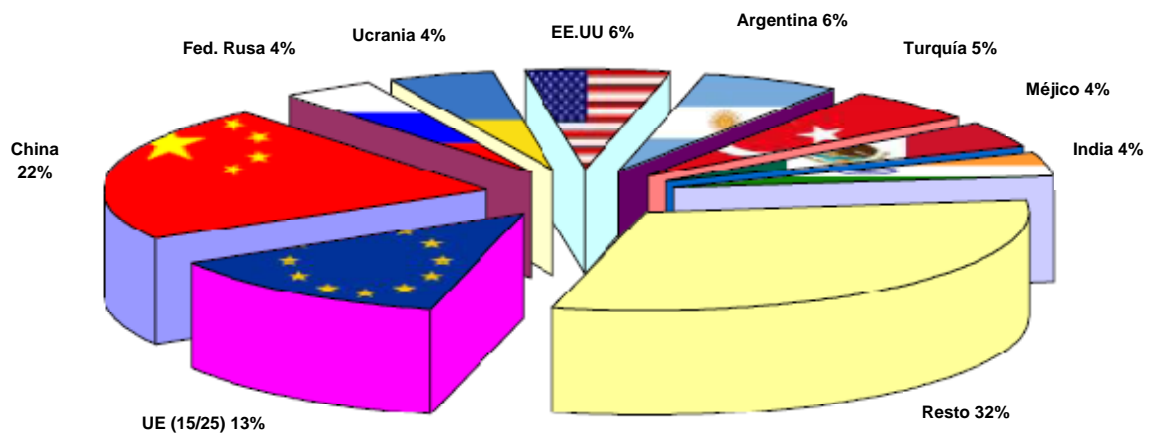
3.1.2. Estructura del sector apícola

Hasta muy recientemente, no se ha contado con suficientes datos oficiales relativos a este sector. El año 1997 puede considerarse como el punto de partida para un mejor conocimiento del mismo. Es en ese año cuando a la actividad apícola se le da cobertura legal comunitaria, a través de un Reglamento que pretende fomentar la producción y comercialización de miel en la Unión Europea y que se instrumenta a través de Programas Nacionales de Medidas de Ayuda a la Apicultura.

3.1.2.1. Comercio mundial de miel

La producción mundial de miel alcanzó 1.381.000 Tm en 2005 y desde 1996 ha aumentado un 25%. Asia constituye el área más importante de producción de miel a escala mundial, seguida de Europa y América del Norte.

Figura 1. Distribución de la producción mundial de miel.



Desde 2004, con la ampliación a diez nuevos Estados miembros, la UE se ha convertido en el segundo productor mundial. En 2005, la UE produjo 174.000 Tm de miel, equivalente al 13% de la producción mundial, mientras que China consolidó su posición de primer productor mundial con una producción de 305.000 Tm.

En 2005, las exportaciones mundiales de miel alcanzaron 325.000 toneladas. Argentina exportó 108.000 Tm y se convirtió en el primer exportador (más del 30% del comercio mundial). China, que había sido tradicionalmente el primer país exportador, ha registrado una disminución bastante importante desde 2001).

Entre los demás países exportadores, algunos como la India han desarrollado recientemente su comercio exterior. En cambio, Brasil ha reducido considerablemente sus exportaciones, sobre todo por razones sanitarias. Desde 2006, Brasil no estaba autorizado para exportar a la UE, recientemente (mediados del 2008) esta prohibición ha sido levantada. También Turquía ha reducido muchísimo sus exportaciones.

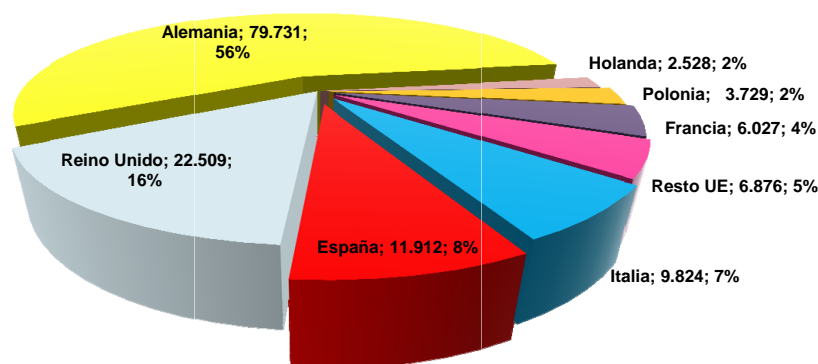
Desde finales de los años setenta, las importaciones mundiales no han cesado de aumentar, debido al incremento del consumo de productos naturales y dietéticos, al dinamismo de algunos operadores a la hora de introducir mieles especiales o a precios reducidos, habitualmente en forma de mezclas, y al aumento de la utilización industrial de la miel.

El principal mercado de importación sigue siendo la UE, que en 2005 absorbió cerca del 45% de la miel importada en el mundo. Norteamérica es la otra gran región

importadora. Alemania y el Reino Unido representan casi el 70% del total importado por la UE en 2005.

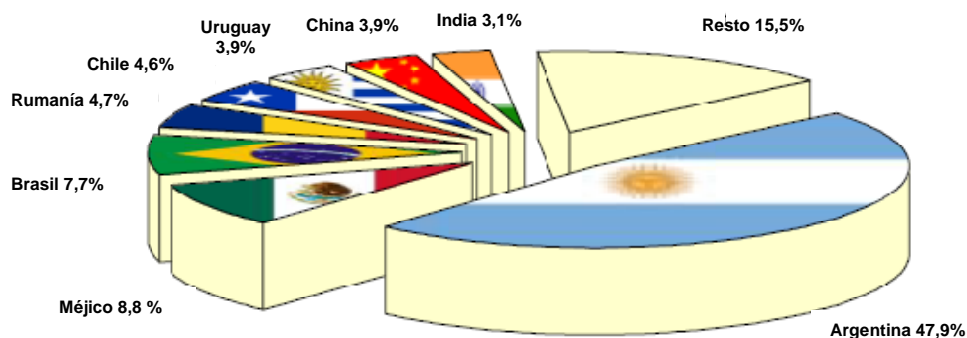
La Unión Europea es deficitaria en miel y habitualmente necesita importar aproximadamente la mitad de la miel que consume; el nivel de autoabastecimiento, que en el período de 2004 a 2005 fue del 54,2%, ha mejorado, desde la ampliación de la UE a veinticinco países.

Figura 2. Principales países comunitarios importadores de miel en el año 2005 (Tm).



La UE importa alrededor de 150.000 Tm de miel al año. Argentina sigue siendo el primer proveedor de la Unión Europea, con cerca del 50% de las importaciones comunitarias en 2005.

Figura 3. Origen de las importaciones de miel a la Unión Europea año 2005.



Las exportaciones comunitarias a terceros países representan poco más del 3,5% de la producción de 2005. Los principales países comunitarios exportadores de miel

son Alemania y España con cerca de la mitad de las exportaciones comunitarias en 2005 siendo el principal destino de esas exportaciones Suiza.

Figura 4. Principales países comunitarios exportadores de miel en el año 2005 (Tm).

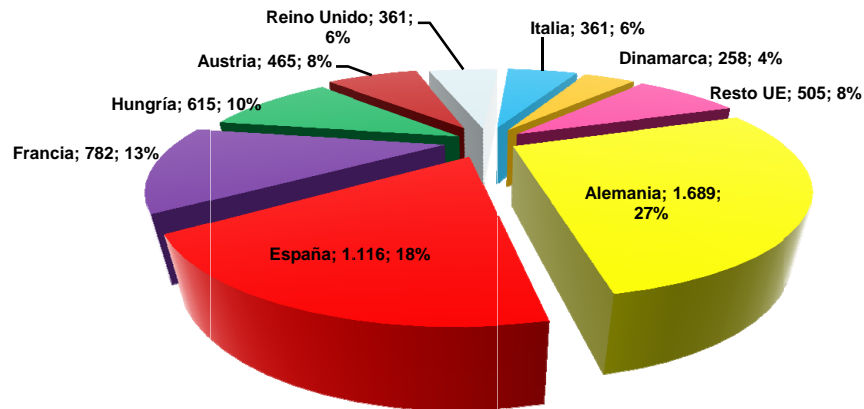
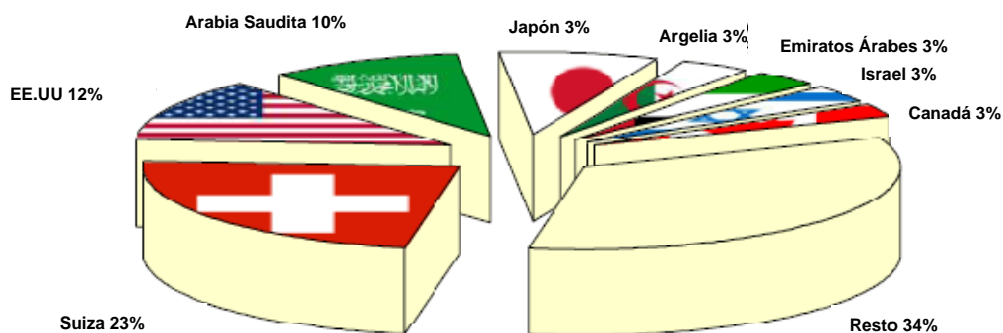


Figura 5. Destinatarios de las exportaciones de miel de la Unión Europea. Año 2005.



En la UE, el precio medio de importación ha sufrido un considerable descenso desde 2003, habiendo pasado de 2,31 euros/kg a 1,29 euros/kg. Este precio es bajo, ajustándose al de principios de 2000 (antes de que se prohibiera la importación de miel china, debido a presencia de antibióticos en estas mieles).

Los tres primeros productores de miel de la UE son España, Alemania y Hungría, que en 2004-2005 produjeron, respectivamente, 32.000, 26.000 y 19.500 Tm. La producción de los diez Estados miembros que se adhirieron en 2004 es de aproximadamente 43.000 Tm, lo que equivale al 25% de la producción total de la UE. Entre esos Estados miembros, Hungría y Polonia son los mayores productores.

Nota: Los datos de este apartado se han obtenido apartir de Ayet, 2007 (Domuento Comisión Europea)

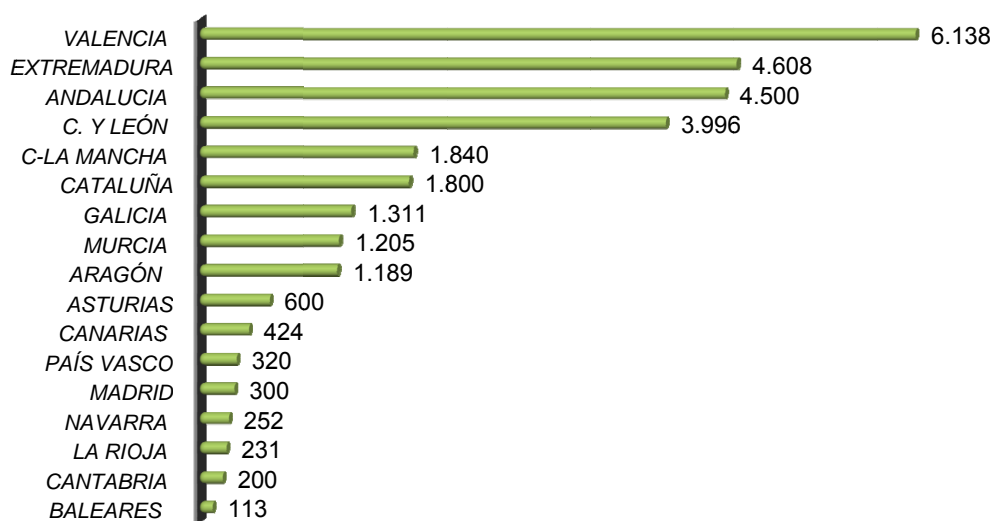
3.1.2.2. Estructura del sector apícola nacional

Según datos del Registro de explotaciones apícolas en España, el censo de colmenas en marzo de 2007 asciende a 2.320.949, lo que supone un descenso de un 6% respecto al existente en 2004.

No obstante, el nivel de profesionalización del sector sigue aumentando en nuestro país (el 25% de los 23.265 apicultores totales), entendiendo por apicultor profesional aquél que tiene más de 150 colmenas. La media de colmenas por apicultor profesional asciende a 325, mientras que en los apicultores no profesionales cuentan con una media de 26 colmenas.

Según datos del antiguo Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA) (actual Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino, MARM), la producción total de miel en España en el año 2006 se situó en 28.998 Tm siendo las Comunidades Autónomas de Valencia, Extremadura, Andalucía y Castilla y León las que poseen unas producciones de miel más altas (Figura 6). El tipo de miel que predomina en España es la llamada “milflores”, el 61% de la producción total en el año 2006.

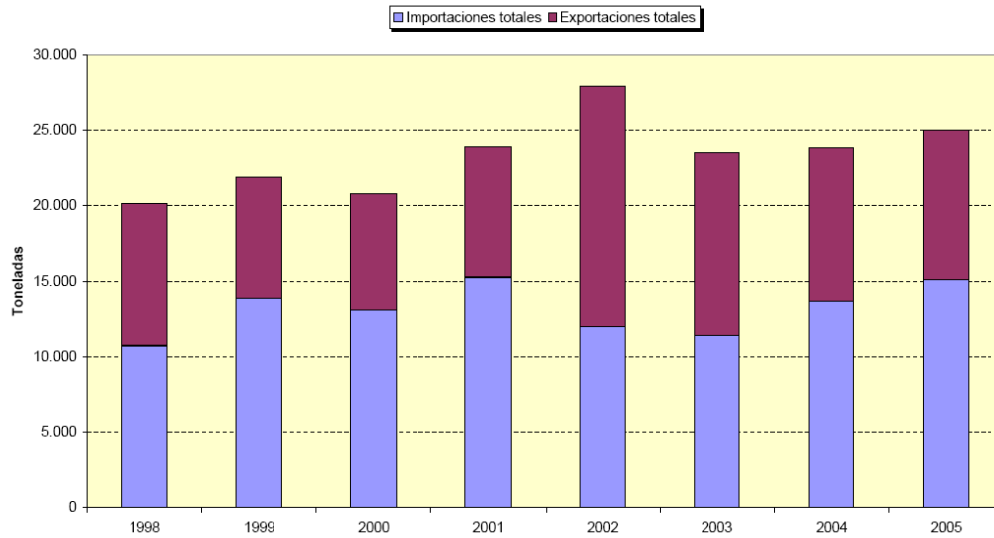
Figura 6. Producción de miel en España (Tm) en 2006. Distribución por Comunidades Autónomas.



Fuente: Programa Nacional de medidas de ayuda a la apicultura en España. 2008-2010. MAPA, 2007.

En cuanto al balance comercial, el grado de autoabastecimiento en España se sitúa en torno al 82%, tras la ligera bajada producida en los últimos años por la reducción de la producción. Como puede verse en la figura 7, las importaciones y exportaciones en nuestro país se mantienen estables en los últimos años.

Figura 7. Evolución de la balanza comercial del sector de la miel en España.



Fuentes: Comisión de la UE y Departamento de aduanas e importaciones Especiales (Agencia Tributaria).

La mayor parte de las importaciones españolas (79,2%) tienen origen extracomunitario (Argentina, China, Uruguay y Cuba, principalmente), alcanzando las 13.917 Tm frente a las 3.649 Tm procedentes de la Unión Europea (Alemania, Francia y Portugal).

En lo que se refiere a las exportaciones, el principal mercado para las mieles españolas continúa siendo el intracomunitario (9.614 Tm), destacando Francia, seguida de Alemania, Portugal y Grecia. El mercado con terceros países (1.543 Tm) incluye, principalmente, Marruecos, Argelia, Túnez e Israel.

En las dos siguientes figuras (8 y 9) se pueden apreciar las transacciones comerciales españolas de miel más significativas.

Figura 8. Importaciones españolas en 2006(Tm).

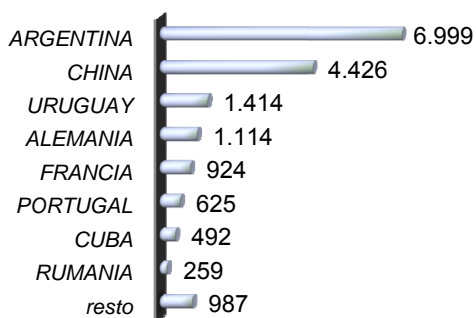
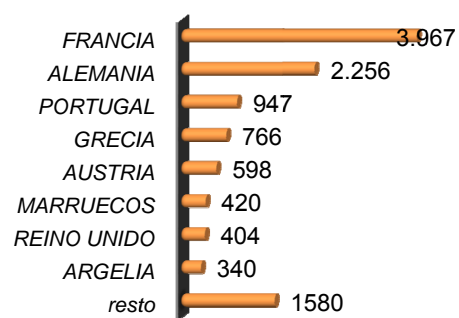


Figura 9. Exportaciones españolas en 2006(Tm).



Dada la escasa importancia económica de la apicultura en el conjunto de la producción ganadera en nuestro país, son escasos los datos oficiales sobre la valoración económica de este sector. Sin embargo, sobre la base de precios, número de colmenas y producciones, se puede estimar el valor de facturación del sector apícola en, aproximadamente, el 0,44% sobre la Producción Final Ganadera y en el 0,17% de la Producción Final Agraria.

Más importante que el valor económico de las producciones de la colmena, es el papel que juegan las abejas en el contexto medio ambiental derivado de su función polinizadora, habida cuenta de su repercusión en el desarrollo rural, el equilibrio ecológico, en tanto en cuanto constituye la base para la conservación y la diversidad de las plantas que dependen de la polinización, lo que contribuye a elevar la productividad de gran parte de los cultivos, aprovechando recursos no utilizados por ninguna otra actividad productiva. Por ello, la producción apícola se configura como uno de los mejores modelos de producción sostenible, en la que confluyen intereses económicos y sociales, contribuyendo a fijar la población en el medio rural y a mejorar las condiciones medioambientales.

3.2. Actividades apícolas

3.2.1. Manejo del apiario

Con objeto de obtener una producción apícola rentable y de máxima calidad, el apicultor realiza una serie de actividades que se van programando a lo largo del año, en función de la biología del insecto y de las condiciones medioambientales. A continuación, se describen las actividades más significativas de cada época del año en la Comunidad Autónoma de Aragón.

Primavera:

Se hace una revisión completa de la colmena, eligiendo un día soleado para ello. Se limpian los fondos de la colmena, que tienen restos de cera y de abejas muertas. Si la primavera ha sido lluviosa es posible que exista una acumulación de humedad dentro de la colmena y como consecuencia pueden aparecer partes enmohecidas que se eliminarán. Además, podría favorecer la aparición de algunas enfermedades como son *nosemosis* y *amebosis*. Para eliminar el exceso de humedad se realiza un orificio por encima de la zona de cría, creando una corriente de aire.

Al llegar la primavera, comienza la época de reproducción y con ello un aumento de la población y la producción. Por ello, cuando todos los panales se encuentran ocupados con miel, polen, néctar y cría, debe aumentarse el tamaño de la colmena, mediante la adición de una o varias alzas, para evitar que la reina se lleve parte de la colonia a otra ubicación por falta de espacio (fenómeno de enjambrazón).

Es muy importante que los cuadros con celdillas dedicadas a la cría se renueven, ya que con el nacimiento de las crías, estas celdillas se van haciendo cada vez más pequeñas y, si la cera con la que las abejas han elaborado estas celdillas es muy vieja, ésta es menos maleable, produciendo abejas más pequeñas y débiles. Estos panales también disminuyen la calidad de la miel ya que la acidifican dando sabores desagradables. Se aconseja una renovación total cada 5 años.

En esta época se cata la miel de primavera y, posteriormente, se aplica el primer tratamiento frente a *Varroa*.

Verano:

Se han de realizar inspecciones periódicas para comprobar el estado sanitario de la colmena, así como el comportamiento de la colonia. Si hay mucha producción de miel se colocan más alzas. Se mira el nivel de *Varroa* y se realiza un primer corte, castrado o recogida de la miel. Se eliminan los cuadros con cera vieja.

En este periodo estival se realizan las tareas de sustitución de las reinas de más de dos años de edad para evitar la enjambrazón. Las reinas de peor calidad también se sustituyen.

Otoño:

En esta época se cata la miel de otoño. Una vez que la miel es retirada de los apiarios, comienza el segundo periodo de tratamientos sanitarios y la preparación de las colmenas para el invierno.

Para poder adecuar el espacio de la colmena al tamaño de la colonia, se disminuye el número de cuadros ya que cuanto más espacio exista, mayor será el gasto energético de la colonia para poder mantener la temperatura a 35° C.

Se debe vigilar la cantidad de miel y polen presente en la colmena y, si no fuera suficiente para pasar el invierno, se proporcionaría alimentación suplementaria a las abejas.

Se reduce el tamaño de las piqueras en función del tamaño de la colonia, si las piqueras son muy grandes entrará frío a la colmena, con la consiguiente pérdida de energía de la colonia.

Si existieran colmenas débiles que no sobreviviesen al invierno, se realizaría la unión de varias de estas colmenas para obtener una colmena más fuerte, evitando así la pérdida de la población. Se elimina la reina de la colonia débil, se coloca la colonia fuerte sobre la débil y, entre ellas, un soporte con solución de plantas aromáticas o un excluidor de reinas para que se mezclen poco a poco. Después se elimina la colmena débil y los panales de cría y alimento se pasan a la colmena fuerte.

Invierno:

Se realizan inspecciones y estimaciones de las reservas de miel de la colmena. Si se estima que la colmena tiene poca miel de reserva, se puede administrar a la colmena alimentación suplementaria para las abejas. No es muy aconsejable en esta época abrir mucho la colmena, evitando así un descenso brusco de temperatura. Cuando se revisa una colmena, se ha de tener en cuenta que no se debe abrir si llueve o hace mucho frío, ya que se enfría el interior que está a unos 35° C. Es mejor esperar a que la temperatura exterior esté por encima de 12° C.

3.2.2. Obtención de la miel

El cumplimiento de Buenas Prácticas de Fabricación en todas y cada una de las etapas del proceso permite la obtención de un producto natural sano y de calidad. La cosecha de miel o cata se realiza tras la mielada, cuando los aportes de néctar han cesado y al menos tres cuartas partes de las celdillas del panal están operculadas. Tras la expulsión de las abejas mediante un ahumador, se extraen los cuadros de la colmena y, posteriormente, se procede al desoperculado de los mismos, y a la extracción de la miel de las celdillas mediante una centrifuga, manual o eléctrica. La miel recogida es sometida a un posterior filtrado y, a continuación, pasa a un madurador donde las impurezas que han quedado ascienden a la superficie y son eliminadas. En la etapa de maduración la miel sufre un proceso de deshidratación y cambios químicos. La pasterización es un tratamiento por el que la miel alcanza una temperatura de 78° C durante 1 minuto, o bien 82° C durante 3 segundos, para después enfriarla rápidamente. Finalmente, la miel se envasa para su distribución.

Descripción más detallada de las diferentes etapas:

Selección de cuadros: en el proceso de recolección de la miel es importante catarla con un adecuado grado de madurez. Se deberán elegir aquellos panales con un porcentaje de humedad suficientemente bajo como para garantizar su conservación sin riesgo de fermentación, es decir, con un valor de humedad inferior al 18,5% (Gómez, 2004). Para ello, se seleccionan aquellos panales que se hallan operculados al menos 2/3 partes de su superficie.

Desoperculado: consiste en eliminar la capa de cera con la que las abejas han cubierto las celdas del panal una vez que la miel está madura. Puede hacerse manualmente o mediante el empleo de máquinas específicas.

Desoperculado manual: las herramientas que se utilizan para esta operación son diferentes tipos de cuchillos y cardas o peines. El equipo se completa con un banco desoperculador de fondo inclinado, que sirve de apoyo al cuadro y recoge la cera junto con la miel que resultan del corte. Una vez posicionado el panal, se procede a cortar cuidadosamente la superficie del panal con un cuchillo caliente, por ambas caras, tratando de obtener hojuelas de cera lo más finas posible. A continuación los cuadros desoperculados pueden pasar directamente al extractor (Salvachúa *et al.*, 2005).

Desoperculado mecánico: en el mercado existen muchos modelos de maquinaria para realizar este trabajo. Se pueden clasificar en tres grupos: de corte, de percusión y mixtos. En las máquinas de corte los cuadros pasan frente a una cuchilla caliente que vibra; es muy difícil de adaptar a la superficie y a la heterogeneidad de los panales. Pueden cortar por una sola cara o por ambas a la vez, y operar tanto de manera horizontal como vertical.

Extracción: es la operación mediante la cual se saca la miel de los panales. En la actualidad esta tarea se realiza con la ayuda de equipos que se sirven de la fuerza centrífuga para la extracción. El extractor consiste en cuerpo cilíndrico en cuyo interior se aloja un bastidor adaptado al tipo de cuadros con que trabaja. Cuenta con uno o más grifos en la parte inferior para la salida de la miel. Al girar, la fuerza centrífuga expulsa la miel de las celdillas proporcionalmente a la velocidad de giro y al radio del aparato. Según la posición en la que se acomodan los cuadros existen extractores radiales o tangenciales.

Depuración: La depuración es el proceso mediante el cual se libera la miel de todas las partículas extrañas que la acompañan. Se puede llevar a cabo por decantación y por filtración. Según el método de desoperculado que se utilice, del extractor sale un producto que contiene en suspensión una cantidad muy variable de cera e impurezas como: fragmentos de abejas, polen, burbujas de aire, madera y otros cuerpos extraños (Salvachúa *et al.*, 2005; Piana *et al.*, 1989).

Decantación: Es el proceso físico mediante el que sustancias no miscibles, se separan por diferencia de densidades. Las partículas de cera y las burbujas de aire

tienden a llegar rápidamente a la superficie. La rapidez del proceso de ascensión depende de las características físicas de estas cargas: peso, tamaño y forma, principalmente, así como viscosidad de la miel, temperatura de la sala de extracción y de la forma y altura de los recipientes en los que se almacena.

En los clásicos bidones en los que se almacena la miel puede producirse este proceso de forma espontánea, pero si son contenedores muy estrechos o altos, la decantación puede interrumpirse por una pérdida de fluidez o por la cristalización que pueda iniciarse. En salas de extracción mecanizadas se utilizan bancos de decantación que tienen paredes atemperadas mediante resistencias eléctricas o sistemas análogos, que permiten que el proceso se haga en continuo solventando los problemas reseñados anteriormente (Salvachúa *et al.*, 2005).

Filtración: Es la operación que separa partículas sólidas contenidas en un fluido al paso de éste por una lámina perforada, malla o material poroso sobre la que quedan retenidos los sólidos con los que se ha mezclado. El filtrado puede hacerse a presión y/o por gravedad.

Para que el proceso de filtración sea eficiente es necesario que la miel esté fluida. Si la viscosidad es muy alta, deberá reducirse un poco por acción del calor, teniendo presente que cuanto mayor sea la superficie del filtro más rápido será el proceso.

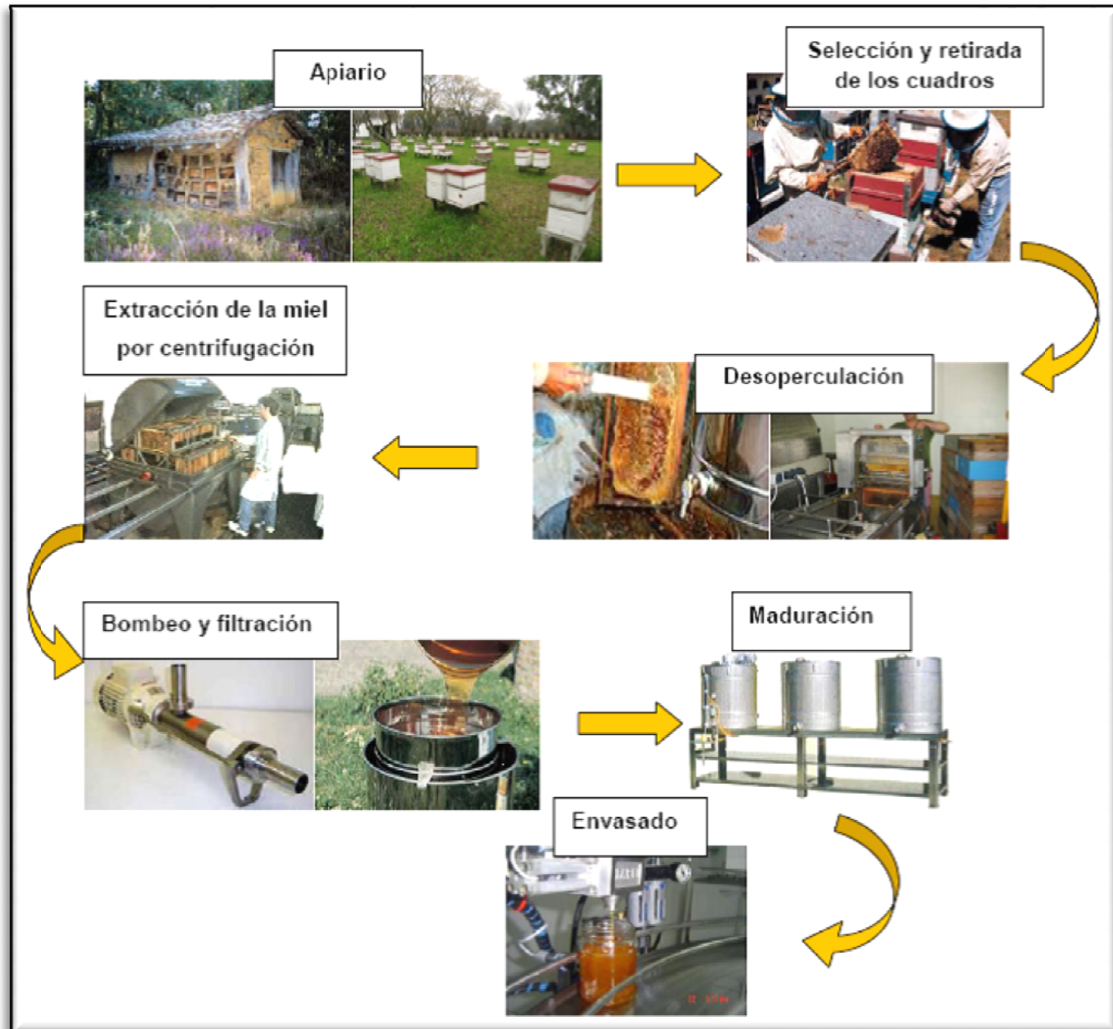
En los filtros con forma de embudo, la miel filtrada resbala por el plano inclinado de los bordes en vez de caer perpendicularmente, evitando de este modo la incorporación de burbujas al producto.

Cuando el volumen de miel es importante se utiliza el filtrado a presión, haciendo pasar la miel por un circuito, impulsada mediante una bomba hasta llegar a un cartucho filtrante donde quedan retenidas las impurezas. Para trabajar en continuo se instalan dos o más tubos en paralelo, de manera que siempre haya uno activo mientras que se limpia el que se va obstruyendo.

Envasado y almacenamiento: la miel limpia y decantada se suele guardar en bidones de diferente capacidad, normalmente entre 35 y 300 kg, hasta el momento del envasado o venta a un envasador. Es importante tener especial cuidado con los materiales de envasado, ya que deben tener calidad alimentaria. Se suelen utilizar depósitos industriales o bidones de acero inoxidable u otros materiales revestidos con pinturas alimentarias de resinas epoxi. Asimismo, es importante tener unas

condiciones ambientales adecuadas: lugar fresco, seco y con buenas condiciones higiénicas del local y de las instalaciones (Gómez, 2004).

Figura 10. Esquema de obtención y procesado de la miel



3.3. Enfermedades más importantes de *Apis mellifera*

La productividad de una colonia de abejas y su capacidad de sobreponerse a condiciones adversas, depende de varios factores externos e internos estrechamente relacionados.

Desde el punto de vista sanitario, se han descrito más de 20 enfermedades que afectan a la abeja melífera (*Apis mellifera*) (Tabla 2), si bien menos de 10 son de verdadera importancia. Ninguna de las enfermedades apícolas se transmite al hombre (SAGARPA, 2007).

Tabla 2. Enfermedades de la abeja melífera (*Apis mellifera*) (Moreno).

Denominación	Tipo de agente	Agente causal
Loque americana	Bacteria	<i>Paenibacillus larvae</i>
Loque europea	Bacteria	<i>Melissococcus pluton</i>
Varroosis	Ácaro ectoparásito	<i>Varroa destructor</i>
Brauliosis	Díptero ectoparásito	<i>Braula coeca</i>
Tropilaelapsosis	Ácaro ectoparásito	<i>Tropilaelaps clareae</i>
Acaro pruriginoso del heno	Ácaro ectoparásito	<i>Pyemotes ventricosus</i>
Nosemosis	Microsporidio endoparásito	<i>Nosema apis</i>
Acarapisosis	Ácaro endoparásito	<i>Acarapis woodi</i>
Amebosis	Ameba endoparásito	<i>Malpighamoeba mellifica</i>
Apimiosis	Díptero endoparásito	<i>Senotainia tricuspis</i>
Ascospferosis	Hongo heterotático	<i>Ascospaera apis</i>
Aethinosis	Coleóptero	<i>Aethina tumida</i>
Esfinge calavera (mariposa)	Lepidóptero	<i>Acherontia atropos</i>
Polilla de la cera (galleriosis)	Pirálido	<i>Galleria mellonella</i> , <i>Achorioa grisella</i>
Cría ensacada o pollo sacciforme	Virus	<i>Morator aetatulae</i>
Parálisis de la abeja negra (aguda y crónica)	Virus	Virus tipo RNA

3.3.1. Varroosis

Esta enfermedad de origen biótico es, sin duda, una de las más importantes y de mayor incidencia sanitaria y económica, siendo considerada como la enfermedad parasitaria principal de las abejas. Como dato que lo corrobora, valga el hecho de que entre el 35 y el 46% de los fondos económicos de la Unión Europea destinados a la apicultura, entre los años 2001 y 2006 (ambos incluidos), se dedicaron a la lucha frente a la varroosis (Ayet, 2007).

Esta patología empezó a aparecer en los apiarios europeos a final de la década de los setenta proveniente de Asia (Thompson *et al.*, 2002). La varroosis está causada por el ácaro *Varroa destructor*, perteneciente a la familia *Ixodidae*.

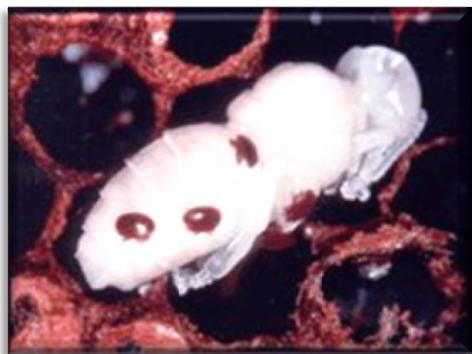


Foto 1: Varroas sobre pupa de obrera



Foto 2: Varroas sobre una obrera

Este ácaro coloniza la abeja asiática (*Apis ceranea*), pero debido a la expansión de la abeja europea productora de miel (*Apis mellifera*) a zonas asiáticas, el parásito se ha adaptado a esta última, aumentando su nicho ecológico a cualquier zona donde esté presente *Apis mellifera* (Anderson y Trueman, 2000).

El agente es un artrópodo ectoparásito que succiona la hemolinfa del hospedador, tanto de la cría operculada como de la abeja adulta. Hay dos tipos de daños que causa este parásito. Uno directo sobre la cría, de cuya hemolinfa se alimentarán tanto la *Varroa* progenitora como su descendencia, causando diferentes malformaciones durante el desarrollo y generando abejas de menor tamaño, cuerpo deforme y alas atróficas. Estas malformaciones invalidan a las abejas para el normal desarrollo de sus funciones en la colonia, por lo que acaban siendo eliminadas. El otro tipo de daño es indirecto: al succionar la hemolinfa de sus hospedadores, se puede favorecer la transmisión de enfermedades, especialmente de cuadros víricos. Probablemente, estos virus pueden ser responsables últimos de gran parte de las

pérdidas atribuidas al parásito (Puerta *et al.*, 2001; Ritter, 2001) e, incluso, del síndrome de despoblamiento de las colmenas, de gran actualidad sanitaria.

3.3.2. Loques

La loque americana ya fue descrita por Aristóteles (384-322 a. de C.) como la “enfermedad del moho” por su olor repugnante (Crespo *et al.*, 2006). El agente causal de la loque americana es *Paenibacillus larvae*, bacteria esporulada, cuyas formas de resistencia pueden sobrevivir hasta 35 años en el medio ambiente y, en particular, en productos de la colmena como miel, propóleos, polen, cera y en la propia colmena (SAG, 2006). Para De Jong (2004), la problemática de esta enfermedad reside en su difícil control y erradicación debido a la gran resistencia de los esporos de *P. larvae*, los cuales pueden sobrevivir a temperaturas de 100° C y a la mayoría de los desinfectantes químicos.

Los esporos de *P. larvae*, sólo pueden germinar y multiplicarse en el aparato digestivo de la larva, a continuación traspasan el intestino y llegan a la hemolinfa, donde siguen su multiplicación y finalmente provocan la muerte de la cría (SAG, 2006).

La principal vía de transmisión de este agente es la contaminación cruzada de la miel mediante el pillaje a colmenas enfermas o muertas, el intercambio de material contaminado entre colmenas, el uso de herramientas contaminadas, y/o la alimentación de las abejas con miel contaminada.

La enfermedad cursa con opérculos hundidos de color oscuro y larvas semidescompuestas formando una masa líquida de olor desagradable.



Foto 3: Prueba del “palillo” para el diagnóstico de loque americana

3.4. Tratamientos sanitarios en apicultura

En cada apiario se realizan dos controles sanitarios al año, en otoño y primavera, en épocas de postcosecha. Los tratamientos sanitarios frente a determinadas enfermedades como micosis, polilla y otras requieren un procedimiento de limpieza y desinfección de las colmenas afectadas. En otras enfermedades, como varroosis, loques y nosemosis, se hace necesaria la aplicación de medicamentos, respetando las buenas prácticas veterinarias, con el fin de lograr la máxima eficacia de su principio activo y de que en la miel no queden residuos por encima de los límites máximos permitidos que pudieran afectar a la salud del consumidor.

En la tabla 3 se recogen los tratamientos sanitarios frente a las enfermedades más comunes de las abejas.

Tabla 3. Tratamientos de las enfermedades más comunes en apicultura.

Enfermedades	Tratamiento sanitario
Varroosis	Principio activo: Clorobenzilato, Bromopropilato, Amitraz, Fluvalinato, Flumetrina, Cumafós, Ácidos orgánicos y Aceites esenciales
Bacteriosis de las abejas	Eliminación cera contaminada, aislamiento colmenas enfermas y desinfección del material Principio activo: Antibióticos (Tetraciclinas y Sulfamidas)
Nosemosis	Principio activo: Antibióticos (Fumagilina)
Amebosis	Eliminación cuadros afectados y desinfección del material
Virosis de las abejas	Profilaxis
Micosis de las abejas	Eliminación cuadros afectados Principio activo: Tiabendazol y Ecomazol
Piojillo de las abejas	Principio activo: Bromopropilato Otros (Nicotina, Mezcla de alcohol y aguarrás)
Polilla de la cera	<i>Bacillus thuringiensis</i> (B-401) y desinfección del material

Fuente: http://www.infoagro.com/agricultura_ecologica/apicultura.htm

Los principios activos pueden aplicarse de diferentes maneras en función de su presentación comercial. Así, el cumafós se comercializa como Perizin® (goteo), ChekMite® (tiras) y Asuntol® (solución); el cimiazol forma parte del Apitol® (gránulos

solubles); el amitraz, mediante el producto comercial Apivar® (tiras), se utiliza como acaricida contra la varroosis.

El producto comercial del bromopropilato es el Folbex VA Neu. Su aplicación se realiza mediante combustión de tiras fumígenas en el interior de la colmena. Durante la combustión del bromopropilato se forma el metabolito 4,4'-dibromobenzofenona (Zimmerman *et al.*, 1993; Klein *et al.*, 1986). La problemática surgida por los residuos asociados a este acaricida hace que en muchos países este producto ya no se aplique en apicultura (Adamczyk *et al.*, 2007; Mutinelli, 2003).

Los productos comerciales de fluvalinato son Klartan® y Mavrik® (soluciones de goteo) y Apistan® (tiras). La flumetrina es un insecticida ectoparasitario de liberación lenta, similar al fluvalinato; su producto comercial es el Bayvarol® (tiras).

De todos ellos, se va a describir en detalle el uso en apicultura de antibióticos (tetraciclinas), acaricidas de síntesis de tercera generación (flumetrina) y de uso convencional (fluvalinato, cumafós, bromopropilato, 4,4'-dibromovenzofenona) por ser el objeto de estudio de esta tesis doctoral.

3.4.1. Tetraciclinas

3.4.1.1. Características físico-químicas y modo de acción

Las tetraciclinas son derivados de la naftacenocarboxamida policíclica. Son antibióticos de amplio espectro, que impiden el crecimiento de bacterias mediante la inhibición de la síntesis proteica. Actúan sobre bacilos y cocos Gram (+), bacilos Gram (-) [*H. influenzae*, *Brucella*, *Legionella pneumophyla*, *Helicobacter pilory*, *Borrelia recurrentis*], así como sobre *Rickettsia*, *Mycoplasma*, *Chlamydia* y *Spirochaetes*.

Estructuralmente, poseen un esqueleto común de octahidronaftaceno formado por cuatro anillos condensados. Las tetraciclinas son compuestos anfóteros y muchas de ellas forman sales solubles en agua, tanto con ácidos como con bases fuertes. Las sales ácidas que se forman por la protonación del grupo dimetilamino unido al átomo de carbono 4 son estables. Las sales básicas que se forman con hidróxido sódico y potásico son inestables.

El sistema cromóforo común les confiere color amarillo. En cada tetraciclina existen tres grupos ionizables, con los siguientes valores de pKa: 3,5; 7,7 y 9,5.

Debido a la presencia de grupos que pueden formar varios puentes de hidrógeno intermoleculares, las tetraciclinas tienen propiedades quelantes y forman complejos insolubles con sales de hierro, calcio, magnesio o aluminio. Por tanto, para una mejor absorción digestiva no deben administrarse con leche o con otros productos lácteos, aminoácidos u otros productos que contengan estas sales.

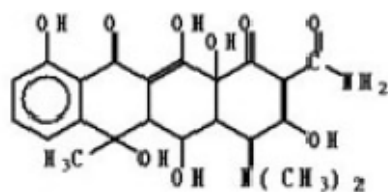
En disoluciones de pH intermedio (de 2 a 6) las tetraciclinas experimentan epimerización en el átomo de carbono 4, alcanzándose el equilibrio cuando aproximadamente se han formado cantidades iguales de ambos isómeros. Los ácidos y bases fuertes inactivan las tetraciclinas que poseen un grupo hidroxilo en la posición 6, formando anhidrotetraciclinas e isotetraciclinas. Los esfuerzos efectuados para superar esta inactivación han conducido al desarrollo de la 6-desoxitetraciclina que es más estable y posee una acción más prolongada.

Según su origen, se distinguen tetraciclinas naturales (clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, demeclociclina) y tetraciclinas semisintéticas, con el grupo carboxamido inalterado (doxiciclina, metaciclina, minociclina, sanciclina).

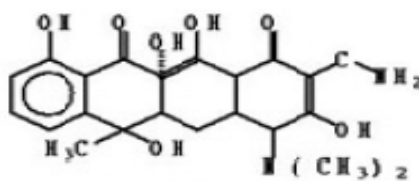
Las estructuras químicas de las principales tetraciclinas utilizadas como tratamientos veterinarios se muestran en la Figura 11.

Figura 11. Estructura química de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina y doxiciclina.

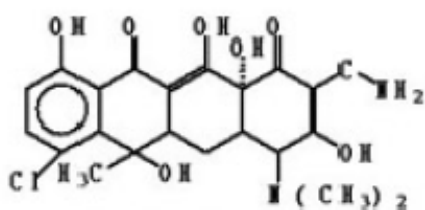
Oxitetraciclina



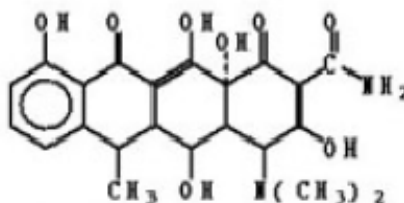
Tetraciclina



Clortetraciclina



Doxiciclina



3.4.1.2. Uso de tetraciclinas en apicultura

Los antibióticos se emplean con fines terapéuticos en sanidad humana y animal, además de ser incorporados en la alimentación de los animales de abasto como promotores del crecimiento.

El resultado inmediato del tratamiento con tetraciclinas es una disminución rápida de los síntomas clínicos. Sin embargo, se debe considerar que estos fármacos actúan solamente sobre la fase vegetativa de la bacteria, sin tener ninguna acción sobre los esporos, con lo cual la colmena continúa con la enfermedad sin presentar signos clínicos (SAG, 2006).

En España, el uso de tetraciclinas en apicultura está prohibido, tanto en tratamientos paliativos contra la loque como en tratamientos preventivos. Pero en otros países esto no sucede así, comprobándose que la eficacia del tratamiento con tetraciclinas es muy variable. Los resultados dependen del grado de contaminación del colmenar, del manejo del apicultor y de la variabilidad de factores ambientales que influyen en el curso de la enfermedad.

A pesar de su prohibición, no es infrecuente la utilización de los productos con tetraciclinas en España como medida profiláctica. Una de las formas de aplicación es con jarabe de azúcar (5 g de producto en 250 ml de jarabe de azúcar), administrado mediante un alimentador individual de colmena, 1 vez cada 5 días, durante 20 días. Otra forma de aplicación es mojando las abejas con el jarabe para que éstas se limpien.

Asimismo, es posible proporcionar a la colmena oxitetraciclina en polvo (pureza del 5,5-6%, soluble en agua y solventes orgánicos). Para su administración, se mezclan 100 g de producto comercial con 400 g de azúcar glasé, aplicándose 20 g de esta mezcla a cada colonia, durante 20 días repartida en 4 tomas. Es importante evitar el contacto directo con la larva para no matarla y con la miel para no contaminarla.

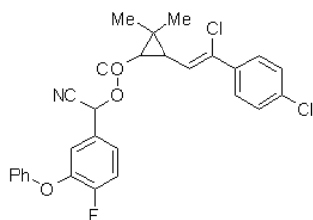
Otra manera de administrar el antibiótico es mediante el empleo de tortas preparadas mezclando 150 g de manteca vegetal, 300 g de azúcar glasé y 20 g del producto comercial. Esta masa se deposita en la zona alta de los cuadros de la cámara de cría. Esta torta permite la administración de antibiótico a la colonia durante 4-6 semanas.

3.4.2. Flumetrina

3.4.2.1. Características físico-químicas y modo de acción

La flumetrina (α -ciano-4-fluoro-3-fenoxibenzil 3-(β ,4-diclorostiril)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato), es un piretroide sintético apolar, no volátil, soluble en grasa y termoestable (Figura 12). Pertenece al grupo de piretroides sintéticos llamados de tercera generación, fotoestables y con sustancia activa más purificada y concentrada, lo que les diferencia de los de primera y segunda generación, respectivamente.

Figura 12. Estructura química de la flumetrina.



La actividad de los piretroides está muy relacionada con su estereoquímica. La flumetrina es un éster en forma *cis*, que es metabolizada mejor por el ácaro que la forma *trans* y, por consiguiente es más activa (Zerba, 1988).

La flumetrina, como piretroide, actúa sobre los canales de Na^+ en el sistema nervioso central y periférico. Su mecanismo de acción a nivel molecular está relacionado con la interacción con los canales de entrada de iones en la membrana nerviosa, incrementando la permeabilidad del Na^+ y bloqueando el impulso nervioso.

La actividad puede variar en función de la temperatura y del nervio donde actúa. Las neuronas sensitivas, las células neurosecretoras y las terminaciones nerviosas son particularmente sensibles a su acción. El efecto letal está producido por su acción sobre las neuronas centrales y periféricas (Zerba, 1988).

3.4.2.2. Uso de flumetrina en apicultura

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

La flumetrina se utiliza como ectoacaricida en animales de abasto, así como en perros y caballos. En apicultura, se utiliza como varroacida, a modo de tiras impregnadas con 3,6 mg del principio activo, colocadas en la zona central del nido de cría, a razón de 4 tiras por colmena. Al ubicarse entre los cuadros, las abejas contactan con la sustancia activa por ambas caras de la tira.

El tratamiento se realiza al final de la cosecha de miel, pudiendo permanecer las tiras en la colmena como máximo seis semanas, periodo tras el cual han de ser retiradas de la misma.

3.4.3. Aspectos legales del uso de medicamentos veterinarios en apicultura

A pesar de la gran variedad de principios activos y formas comerciales descritas, los medicamentos de uso en apicultura autorizados actualmente en España por la Subdirección General de Medicamentos de Uso Veterinario de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, son los indicados en la tabla 4. Como se puede apreciar, sólo se autorizan productos para el tratamiento de varroosis y nosemosis. Es decir, no hay productos autorizados para el tratamiento del resto de enfermedades, como loques u otras.

Cabe señalar que el uso en apicultura de medicamentos autorizados en otras especies, está prohibido, a pesar de contener los mismos principios activos que los medicamentos apícolas. Tal es el caso de Quadrex (contiene amitraz), medicamento autorizado para su uso frente a plagas sobre frutales, de Supona (clorfenvinfós) autorizada para su uso en animales, y de Mavrik-10 y Klartan (fluvalinato), autorizados como insecticidas en frutales y productos hortícolas. Asimismo, está prohibida la utilización de cualquier preparación artesanal, incluso las que contengan principios activos de los medicamentos apícolas autorizados.

Tabla 4. Medicamentos de uso en apicultura autorizados en España (Llorente, 2007; Cardenal *et al.*, 2005).

Medicamento (Principio activo)	Enfermedades
Apistan® (Fluvalinato) Apivar® (Amitraz) Bayvarol® (Flumetrina) Check Mite® (Cumafós)* Apiguard® (Timol) Ecoxal® (Ácido oxálico)	Varroosis
Fumidil B® (Fumagilina)*	Nosemosis

*Autorización excepcional de la Agencia Española del Medicamento ante una situación sanitaria determinada

Los productos autorizados en otros países son diferentes. A modo de ejemplo, en la tabla 5 se presentan los productos autorizados contra la varroosis en algunos países europeos.

Tabla 5. Productos autorizados contra *Varroa* en algunos países de Europa (Mutinelli, 2003).

País	Medicamento veterinario (principio activo)
Alemania	Bayvarol® (Flumetrina), Apitol® (Cimiazol), Perizin® (Cumafós), AF
Austria	Apistan® (Fluvalinato), Apitol® (Cimiazol), Perizin® (Cumafós)
Bélgica	Apistan® (Fluvalinato), Apivar® (Amitraz)
Dinamarca	Ninguno
Eslovenia	Apistan® (Fluvalinato), Apilife Var® (Timol, Mentol, Eucaliptol)
Finlandia	Apistan® (Fluvalinato), Apilife Var® (Timol, Mentol, Eucaliptol), AF, AO
Francia	Apistan® (Fluvalinato), Apivar® (Amitraz), Apiguard® (Timol)
Grecia	Apistan® (Fluvalinato), Perizin® (Cumafós), Apitol® (Cimiazol), Folbex® (Bromopropilato)
Holanda	Apistan® (Fluvalinato), Apitol® (Cimiazol), AF
Hungría	Apistan® (Fluvalinato), Apilife Var® (Timol, Mentol, Eucaliptol), Perizin® (Cumafós), Apitol® (Cimiazol)
Irlanda	Bayvarol® (Flumetrina)
Italia	Apistan® (Fluvalinato), Apilife Var® (Timol, Mentol, Eucaliptol), Perizin® (Cumafós), Apitol® (Cimiazol), Bayvarol® (Flumetrina), Apivar® (Amitraz)
Noruega	Ninguno
Portugal	Apistan® (Fluvalinato), Apivar® (Amitraz)
Reino Unido	Apistan® (Fluvalinato), Bayvarol® (Flumetrina)
Suecia	Apistan® (Fluvalinato)
Suiza¹	Apistan® (Fluvalinato), Bayvarol® (Flumetrina), Perizin® (Cumafós), Apitol® (Cimiazol), AF

¹ Richtlinien zur Bekämpfung der Bienenkrankheiten, Ausgabe Maerz 2003, Zentrum fuer Bienenforschung, Eidgenoessische Forschungsanstalt fuer Milchwirtschaft, Liebefeld, Ch-Bern.

AO= Ácido oxálico AF= Ácido fórmico.

Si se intenta extrapolar al resto del mundo, la situación se complica aún más. En Argentina, principal exportador de miel a la UE, los medicamentos autorizados para uso apícola difieren de la normativa española. En la tabla 6, se indican los medicamentos aprobados según datos de la Dirección Nacional Argentina de Alimentos-Subsecretaría de Política Agropecuaria y Alimentos (SAG, 2006). Es interesante destacar que el uso de medicamentos a base de tetraciclinas para luchar contra la loque americana está permitido.

Otros países latinoamericanos relevantes en el comercio de la miel, como Chile y Uruguay, siguen las mismas directrices que su país vecino, utilizando los mismos productos que se aplican en Argentina y que están autorizados por SENASA, organismo perteneciente al Ministerio de Agricultura responsable de garantizar y certificar la sanidad y calidad de la producción agropecuaria, pesquera y forestal de Argentina.

En Méjico, también existen diferentes productos autorizados para la apicultura, como se refleja en la tabla 6 (SAGARPA, 2007). En ella se puede apreciar cómo el uso de antibióticos y otros varroacidas (cuyo uso no está autorizado en apicultura en España) está permitido.

En Estados Unidos también está permitido el uso de ciertos antibióticos en apicultura, pero no el uso de la fumagilina contra la nosemosis. A diferencia de Argentina, en EE.UU. la flumetrina no está permitida contra la varroosis, al igual que no está permitido el uso de otros varroacidas como el ácido oxálico y el ácido láctico.

En Canadá, los productos autorizados son muy similares a los de EE.UU., con la salvedad de que en Canadá el uso de la fumagilina (Fumidil B y Fumagilin-B Soluble Powder) contra la nosemosis está permitido (<http://www.drugs.com/vet/bees.html>.)

En la tabla 6 se describen los medicamentos aprobados para su utilización en la apicultura de los principales países americanos exportadores de miel a la Unión Europea.

Tabla 6. Medicamentos apícolas aprobados en los principales países americanos.

Medicamento (Principio activo)			Enfermedades
Argentina ⁽¹⁾	Méjico ⁽²⁾	EE.UU ⁽³⁾	
Naturalvar®, Cumavar® y Apiguard® (Timol) Wang's Manpou® (Fluvalinato) Amivan® (Amitraz) Beevar proapi® (Ác. fórmico) Bayvarol® (Flumetina) Cumavar® (Cumafós) Oxavan® (Ác. oxálico)	Apiguard® (Timol) Apistan® (Fluvalinato) Colmesan® (Amitraz) Api plus® (Ac. fórmico) Bayvarol® (Flumetina) Apitol® (Cimiazol)	ApilifeVar® (Timol, Mentol, Eucaliptol) Apistan® (Fluvalinato) Apirar ® (Amitraz) Apicare®, Mite Away II® (Ac. fórmico) Mite-A-Thon® (Mentol) CheckMite® (Cumafós)	Varroosis
Oxibiotic oral del Rosario® (OTC) Oxicin® (OTC) Oxitetraciclina polvo soluble® (OTC) Terramicina polvo soluble® (OTC)	Sulfathiasol® (Sulfamidas) Estrepen®, Vetranal® (Estreptomicina) Terramicina® (OTC)	Tylan ® (Tilosina (bajo evaluación)) Lincormix® (Lincomicina (bajo evaluación)) Terramycin®, Oxitet®, Oxisol®, Foulbrood mix ®, Pennox®, AmTech Oxytetracycline HCl Soluble Powder-343® (OTC)	Loque americana
Nosemix-B® y Fugjorm® (Fumagilina)	Nosema X® y Fumicil B® (fumagilina)	Ninguno	Nosemosis

(1) SAGPyA, 2008, Argentina. <http://www.sagpya.mecon.gov.ar>

(2) SAGARPA, 2007. <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia>

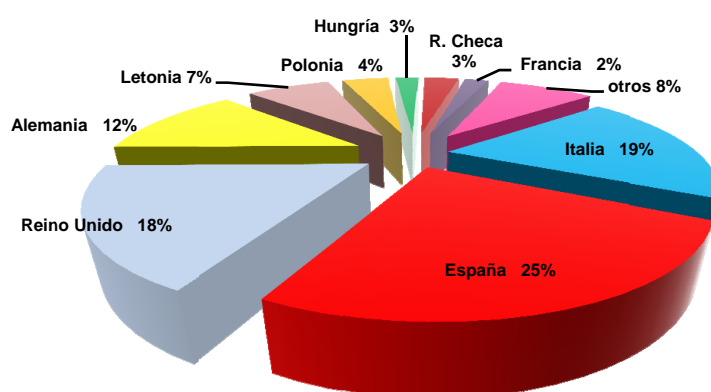
(3) Gelcich F. 2007 y <http://www.drugs.com/vet/bees.html>
(OTC): Oxitetraciclina

3.5. La miel y la seguridad alimentaria: problemática de la presencia de residuos en miel

Desde el año 2005 hasta junio de 2008, en la Unión Europea se han notificado 97 alertas/informaciones relacionadas con la miel, de las cuales en el 25% la miel estaba destinada al mercado español (Figura 13). China fue el país de origen en el 29% de las ocasiones (Figura 14).

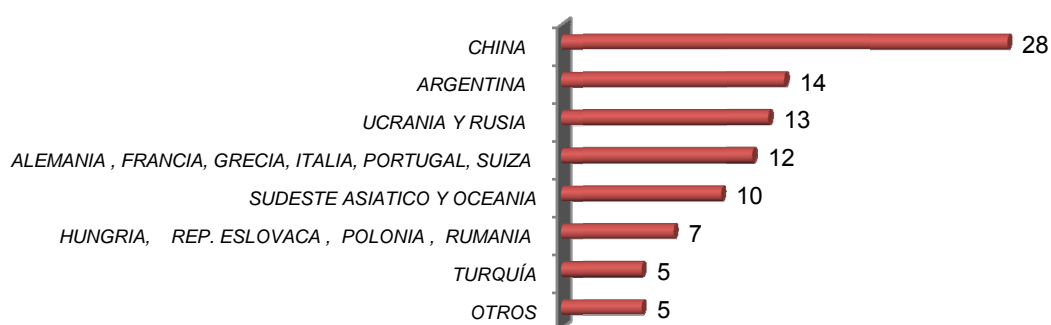
De las 24 notificaciones sanitarias que tenían como destino España, el 87,5% de las mismas era causada por miel proveniente de China y Argentina (54,2 y 33,3%, respectivamente). Las notificaciones restantes se debieron a miel proveniente del Sudeste Asiático y Australia.

Figura 13. Países destinatarios de mieles causantes de notificaciones sanitarias (%).



Fuente: <http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert>

Figura 14. Número de notificaciones sanitarias según país de origen de la miel.



Fuente: <http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert>

La utilización de un fármaco como tratamiento sanitario en apicultura debe respetar las pautas de aplicación y realizarse de acuerdo con unas buenas prácticas veterinarias, para evitar la presencia de residuos en los productos de la colmena. Por ello, es muy importante valorar la tendencia del principio activo, o de sus metabolitos, a acumularse en ciertos tejidos, o a ser eliminados con ciertas secreciones como la leche o la miel (Ivie y Rowe, 1986).

Las fuentes de contaminación para los productos de la colmena son varias. Debe tenerse en consideración la contaminación de la vegetación, por tratamientos fitosanitarios o a partir del medio ambiente, que pueda ser incorporada por la abeja junto con el néctar. Si el pesticida es muy tóxico para las abejas, el riesgo de contaminación en los productos apícolas es bajo ya que éstas mueren antes de llevar el néctar a la colmena, o sufren alteraciones conductuales que les impiden llegar a la colmena (Flamini, 1986).

Otra fuente de contaminación importante la constituyen los tratamientos aplicados para combatir alguna de las enfermedades de las abejas. En este caso, el producto es introducido directamente en la colmena, por lo que puede entrar en contacto con la miel muy fácilmente. Se recomienda evitar la aplicación de los tratamientos en la época de afluencia de néctar a la colmena por ser la más peligrosa.

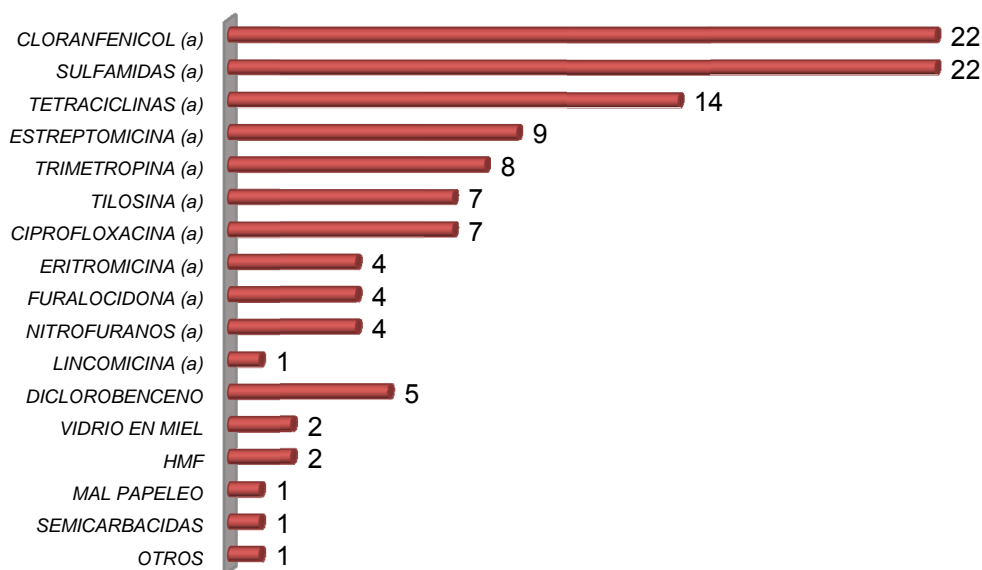
En actuaciones profilácticas, los apicultores administran determinadas mezclas de antibióticos a través de la alimentación artificial, que también pueden generar residuos.

En España, un problema adicional es el uso de la colmena modelo Layens, ya que en ella se encuentran en el mismo compartimento tanto los cuadros con miel como los que contienen cría ("pollo"), por lo que el problema de los residuos se agrava.

Por último, no hay que olvidar la posibilidad de contaminación de los productos apícolas a lo largo de su procesado (por ejemplo, residuos de semicarbidas procedentes de los envases).

En la figura 15 se muestran las causas de las notificaciones sanitarias relacionadas con la comercialización de la miel. Como se puede ver, en un 85% de las ocasiones, el motivo de la alerta fue la presencia de antibióticos en miel, principalmente tetraciclinas, sulfamidas y cloranfenicol.

Figura 15. Causa de notificaciones sanitarias en la UE (periodo 09/2005-06/2008).



(a): Antibiótico

La presencia de estos residuos en los productos apícolas puede influir también en su comercialización, especialmente en el comercio exterior, como consecuencia de los mecanismos de control establecidos por los diferentes países (Gnädinger, 1989).

3.5.1. Residuos de tetraciclinas en miel

Según datos del Centro Nacional de Alimentación y del Instituto de Salud Carlos III, los beta-lactámicos y, especialmente las tetraciclinas, son los residuos mayoritariamente aislados de todas las especies animales de abasto en España (Calderón *et al.*, 1996). En este informe, considerando conjuntamente todas las especies y tejidos, se afirma que el 83% de las muestras presuntamente positivas contenían tetraciclinas (Díez y Calderón, 1997; Calderón *et al.*, 1996).

Los problemas sanitarios más importantes asociados a estos residuos están relacionados con la aparición de antibiorresistencias y las reacciones alérgicas que pueden producirse en individuos sensibilizados, cuadros de toxicidad aguda o crónica, o el posible poder mutagénico y/o carcinogénico (Demoly y Romano, 2005).

Las tetraciclinas, pueden producir problemas analíticos relacionados con la inhibición del desarrollo de la flora contaminante de un alimento, de manera que pase inadvertida al realizar un análisis microbiológico del producto. De este modo, podría

permitirse la comercialización de un alimento potencialmente peligroso, cuyos patógenos podrían desarrollarse una vez que el efecto inhibitor de los antibióticos hubiera desaparecido (Díez y Calderón, 1997).

La problemática por la aparición de resistencias merece mención aparte. A lo largo de los años 50 y 60 del siglo XX, las tetraciclinas se emplearon como promotores del crecimiento en numerosos países, en dosis subterapéuticas y sin ningún control. El uso masivo e irresponsable ha contribuido en gran medida a acelerar el mecanismo de aparición natural de resistencias. Las bacterias pueden volverse insensibles a los antibióticos por mutación genética. En ese caso, la tetraciclina destruirá la bacteria sensible, pero no a la bacteria mutante resistente, que al final será la única que sobreviva y que transmita la resistencia. A la larga pueden aparecer cepas bacterianas multirresistentes, insensibles a varios antibióticos (OCU, 2003).

Se ha demostrado la asociación entre el empleo de tetraciclinas en la alimentación animal (la oxitetraciclina era el más usado hasta aquel momento) y la aparición de resistencias a estos antibióticos en enterobacterias (Levy *et al.*, 1976). A raíz de la detección de antibiorresistencias en *Enterobacteriaceae* se considera la producción animal como un potencial reservorio de resistencias (Witte, 2000).

Informes de la OMS (1994, 1997), concluyeron que el uso de tetraciclinas en cualquier ambiente puede ser la causa de selección de bacterias antibiorresistentes. Además, se resaltaba que los tratamientos prolongados a bajas dosis, como es el caso de los administrados con fines profilácticos o zootécnicos, ejercen una mayor presión en la selección de antibiorresistencias (Witte, 2000).

Un hecho incuestionable es que el principal factor de riesgo para el aumento de las resistencias a antibióticos es el creciente empleo de estos fármacos. De este modo, se considera que el uso de antibióticos, ya sea en humanos o en animales, condiciona la selección de bacterias antibiorresistentes en la microflora de los organismos tratados (Phillips, 2004; OMS, 2001).

En el ámbito apícola, la aparición de resistencias trae consigo, tanto la ineficacia de tratamientos veterinarios contra enfermedades como la loque, como la ineficacia de tratamientos en medicina humana con tetraciclinas, producida por el consumo de miel con residuos de este antibiótico.

En la tabla 7 se pueden ver los niveles de residuos de tetraciclinas encontrados en mieles comerciales en distintos países.

Tabla 7. Residuos de tetraciclinas en mieles en diversos países.

Tetraciclina	Número de muestras analizadas	Muestras positivas	Concentración de residuos detectados (µg/kg)	País y año	Autor
OTC y TC	57	0	< 50	España y Portugal, 2001-2003	Pena <i>et al.</i> 2005
OTC, TC, CTC y DC	-	0	< 30	España, 2004	Viñas <i>et al.</i> 2004
TC	170	31	-	Bélgica, 2000-2002	Reybroeck, 2003
OTC y TC	112	4	10-1000	Italia, 2003	Sabatini <i>et al.</i> 2003
TC	20	1	-	España, 2002	OCU SALUD 2003
OTC y CTC	297	20	-	Japón, 1992	Jimbo <i>et al.</i> 1992
CTC	50	1	700	- 1984	Takeba, 1984
TC	54	3	1.500-5.100	Rumanía, España y Méjico 1981	Jürgens, 1981

OTC: oxitetraciclina, TC: tetraciclina, CTC: clortetraciclina, DC: doxiciclina.

-: No hay datos.

3.5.1.1. Aspectos toxicológicos

Los estudios llevados a cabo por el Comité de Medicamentos Veterinarios de la Agencia Europea del Medicamento (EMEA, 1995), establecen que oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina y doxiciclina tienen efectos tóxicos muy similares.

La toxicidad aguda de estos compuestos es baja y los valores de su DL₅₀ para ratones están entre 3600 mg/kg y 7200 mg/kg. Estudios de toxicidad a corto plazo de oxitetraciclina, tetraciclina y clortetraciclina, realizados en perros, mostraron degeneración del epitelio germinal (NOEL 125 mg/kg). También se pudo observar efecto hepatotóxico en un ensayo con doxiciclina en perros (NOEL 25 mg/kg). En ratas, se encontró evidencia de hepatotoxicidad, pero no de alteraciones reproductivas (EMEA, 1995).

No se encontró evidencia de que la oxitetraciclina tuviera actividad teratogénica ni carcinogénica ni mutagénica en ratas, ratones, ni conejos. Sin embargo, un ensayo en ratones a concentraciones citotóxicas produjo resultados positivos para linfoma (EMEA, 1995).

El 36° Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) ha establecido la Ingesta Diaria Admisible (IDA) de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina y doxiciclina, solas o en combinación, en 0-0,003 mg/kg peso vivo (FAO/OMS, 1995).

3.5.1.2. Aspectos legales

En la Unión Europea no existen Límites Máximos de Residuos (LMRs) de tetraciclinas en miel ya que su uso en apicultura está prohibido. Sin embargo, sí se han establecido LMRs de tetraciclinas en otros alimentos como hígado (0,6 µg/g), riñón (0,3 µg/g), huevos (0,2 µg/g), leche (0,1 µg/g), carne (0,1 µg/g), pescado (0,1 µg/g) y grasa (0,01 µg/g) (Reglamento CE 2377/1990).

Conviene recordar que en otros países como Cuba, Chile, México, Uruguay o Argentina, éstos últimos, algunos de los principales exportadores de miel a España, autorizan el uso de oxitetraciclina en apicultura, para la que establecen un LMR de 0,1 µg/g miel.

3.5.2. Residuos de flumetrina en miel

La presencia de residuos de flumetrina en miel indica un mal manejo apícola por una recolección prematura de la miel.

De igual modo, esta presencia también puede indicar una sobredosificación del principio activo en la colmena, trayendo consigo el riesgo de resistencias, no sólo a la flumetrina sino también al fluvalinato, como consecuencia de las resistencias cruzadas (Thompson, 2002).

Slabezki *et al.* (1991) mostraron que cuando las colmenas están expuestas a piretroides como la flumetrina o el fluvalinato durante un tiempo prolongado, estas colonias producen menor cantidad de miel a causa de un efecto subletal de estos acaricidas en el comportamiento de las abejas que influye negativamente en su

pecoreo. En la tabla 8 se muestran los acaricidas de síntesis encontrados en mieles de diversos países.

Tabla 8. Residuos de acaricidas de síntesis en mieles en diversos países.

Acaricida	Número de muestras analizadas	Muestras positivas (%)	Concentración de residuos detectados ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	País y año	Autor
Fluvalinato	50	-	40	Méjico 2003	Wasilizewski <i>et al.</i> 2003
Fluvalinato	60	75	<9	Italia 2002	Russo <i>et al.</i> 2002
Cumafós	19	21	20	Eslovaquia 2001	Maver <i>et al.</i> 2003
Cumafós	12	42	10	Eslovaquia 2000	Maver <i>et al.</i> 2003
Bromopropilato	105	13	2-33	Austria 2000	Menkissoglu <i>et al.</i> 2001
Cumafós	84	12	2-12	Austria 2000	Menkissoglu <i>et al.</i> 2001
Fluvalinato	94	3	2-7	Austria 2000	Menkissoglu <i>et al.</i> 2001
Fluvalinato	125	98	1-39	Grecia 2000	Menkissoglu <i>et al.</i> 2001
Fluvalinato	320	1	10-26	Francia 1999-2001	Martel <i>et al.</i> 2002
Cumafós	320	0,7	110-260	Francia 1999-2001	Martel <i>et al.</i> 2002
Bromopropilato	1000	11	2-10	Alemania 1997	Wallner 1999
Cumafós	1000	28	2-15	Alemania 1997	Wallner 1999
Fluvalinato	1000	1	2-7	Alemania 1997	Wallner 1999
Fluvalinato	26	15	<130	Jordania 1997	Al-rifai <i>et al.</i> 1997
Fluvalinato	22	90	29-750	España 1993	Atienza <i>et al.</i> 1993
Fluvalinato	15	100	250	España 1991	Sancho <i>et al.</i> 1991
Fluvalinato	101	11	10-100	España 1990	Fernández <i>et al.</i> 1997
Bromopropilato	101	16	5-60	España 1990	Fernández <i>et al.</i> 1993
Cumafós	177	14	1-5	España 1988-1990	Fernandez <i>et al.</i> 1994
Bromopropilato	3	-	70	Suiza 1989	Bogdanov <i>et al.</i> 1990
Fluvalinato	2	-	3	Suiza 1989	Bogdanov <i>et al.</i> 1990
Cumafós	11	46	140	Eslovaquia 1987	Gajduskavá <i>et al.</i> 1990
Bromopropilato	21	5	3000	Alemania 1985	Klein <i>et al.</i> 1986

-: No hay datos.

Tan sólo se ha encontrado un estudio en el que se haya analizado la presencia de flumetrina en muestra de miel. En dicho estudio se analizaron 33 muestras de miel austriaca y no se encontraron residuos de flumetrina (Menkissoglu-Spiroudi *et al* 2001).

3.5.2.1. Aspectos toxicológicos

La flumetrina es un insecticida de baja toxicidad y se considera inocuo para las abejas, por lo que la aplicación de este medicamento, en las condiciones de uso del fabricante, no requiere tiempo de espera ni especiales medidas de protección para el apicultor.

La Agencia Europea para la Evaluación de los Medicamentos (EMA), desde el año 2000, considera a la flumetrina como compuesto no genotóxico, ni potencialmente cancerígeno para los humanos, pero peligroso para la fauna acuícola y fetotóxico en ratas. Además, la Organización Mundial de la Salud (OMS) no incluye la flumetrina en la categoría de sustancias con toxicidad aguda.

La FAO ha establecido una ingesta diaria admisible (IDA) para el hombre de 1,8 µg flumetrina/kg peso vivo (EMA, 2000).

3.5.2.2. Aspectos legales

El Reglamento Europeo 2377/1990 no establece límite máximo de residuos de flumetrina en miel (Anexo II: sustancias no sujetas a LMR). No sucede lo mismo en otros alimentos de origen animal (Anexo I): 10 µg/kg en músculo y riñón, 20 µg/kg en hígado, 30 µg/kg en leche y 150 µg/kg en grasa de las especies bovina y ovina.

Sin embargo, algunos países europeos, sí han establecido límites máximos de residuos de flumetrina en miel (Tabla 9).

Tabla 9. Límites máximos de residuos (LMRs) de flumetrina y otros acaricidas de síntesis ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en miel.

Acaricida \ País	U.E. ¹	Alemania ²	Italia ²	Suiza ²	EE.UU. ²
Flumetrina	-	10	10	5	-
Fluvalinato	-	10	10	50	-
Amitraz	200	10	10	10	1000
Bromopropilato	-	100	10	100	-
Cumafós	100	10	10	50	-
Cimiazol	1000	10	10	500	-

-: No se establece LMR; 1: Reglamento CEE/2377/90; 2: Wallner (1999)

3.6. Métodos analíticos de determinación de residuos de tratamientos veterinarios en la miel

El creciente aumento de la población mundial exige un sector de producción animal cada día más eficiente. Este hecho, inevitablemente, se asocia a un mayor empleo de productos químicos, por lo que aumenta día a día la demanda de métodos fiables, sencillos, sensibles, rápidos y de bajo coste para la detección de sus residuos en los alimentos (Anadón y Martínez-Larrañaga, 1999).

Los métodos para la determinación de residuos de antibióticos en alimentos se desarrollaron a finales de la década de los 40 del siglo pasado, poco después de la introducción del empleo de estos compuestos en la producción animal. Estos primeros métodos se basaban en la inhibición del crecimiento microbiano por la presencia de residuos de medicamentos en las muestras analizadas en niveles superiores al umbral de sensibilidad del test. En el momento actual se siguen utilizando, bien en placa según el método clásico aplicado a diferentes alimentos, o bien mediante kits comerciales (no disponibles para residuos en miel). Además, se han desarrollado diferentes kits de tipo enzimático o inmunológico, si bien no son muy numerosos los trabajos que hacen referencia a su aplicación al análisis de residuos de antibióticos en miel (Heering *et al.*, 1998; Mascher *et al.*, 1996; Assil y Sporns, 1991 y Sheth y Sporns, 1990).

También hay que señalar que las técnicas inmunoquímicas para la detección de residuos en alimentos son sólo semicuantitativas. Por ello, se han desarrollado en las últimas décadas técnicas más específicas como la cromatografía de gases, la cromatografía líquida y la espectrometría de masas, que permiten la identificación y cuantificación de los residuos presentes en las muestras.

En el caso de la miel, al ser una matriz sumamente compleja, el análisis no se puede realizar en una sola etapa, y es necesario efectuar varios pasos antes de llegar a la identificación y cuantificación del analito. El procedimiento de análisis de residuos en una muestra determinada, se puede dividir en varias etapas: acondicionamiento de la muestra: limpieza, pesada y preparación; extracción de los analitos; purificación del extracto; determinación: identificación y cuantificación de los analitos; y confirmación.

3.6.1. Acondicionamiento de la muestra

Se hace necesario retirar los elementos de la miel que no forman parte de la matriz: restos de cera, insectos y otras impurezas, para lo cual se realiza previamente una limpieza mediante filtración. A continuación, se pesa la cantidad de muestra necesaria y se somete a un procedimiento de disolución con un disolvente de carácter polar con el fin de favorecer las posteriores fases del análisis.

En cuanto a las técnicas utilizadas se pueden observar diferencias entre los autores. Así, Szerletics-Túri (1999) separa la miel de la cera mediante presión, mientras que Thrasyvoulou *et al.* (1988) y Bogdanov *et al.* (1998a) separan la miel de la cera con un colador o un filtro, respectivamente.

3.6.2. Extracción de los analitos

En esta fase se separan los analitos de interés de la matriz. Se trata de combinar la máxima eficacia en la extracción de los analitos con la mínima coextracción de cualquier otro compuesto que pudiera interferir en la posterior determinación cromatográfica. Para ello existen diferentes técnicas, que se describen a continuación.

3.6.2.1. Técnicas de extracción con solventes orgánicos (SE)

La más utilizada tradicionalmente para el análisis de la miel ha sido la *extracción líquido-líquido* (Bernal *et al.*, 1996), que se define como la transferencia de una sustancia cualquiera desde una "fase líquida A" a otra "fase líquida B", inmiscibles entre sí, y con la ayuda de un embudo de decantación. La extracción líquido-líquido también puede llevarse a cabo mediante utilización de columnas que sustituyen a los embudos de decantación.

Otra forma de realizar la extracción con solventes orgánicos es por *disolución de la muestra en solvente* seguida de una centrifugación para separar los analitos ahora disueltos en el solvente de la fase sólida de la muestra (Adamczyk *et al.* 2007).

La *destilación* es otra técnica de extracción con solventes. La extracción de los analitos se realiza por evaporación parcial de la muestra en un solvente orgánico o

agua, es decir, la fracción con los residuos de interés se evapora, se condensa y se recupera como un extracto líquido (Adamczyk *et al.*, 2005).

La extracción de los analitos se realiza con diferentes mezclas de agua y solventes atendiendo a la polaridad de los analitos a extraer. Estos solventes de extracción pueden ser diclorometano, acetato de etilo, benceno-isopropanol, acetona-hexano, ácido glacial-hexano o hexano-propanol. En algunos casos la acidificación de los solventes de extracción puede incrementar la extracción de analito.

Thompson (2005) y Sporns (1986) utilizaron acetato de etilo como solvente para la extracción de oxitetraciclina y tetraciclina en miel. Otros autores utilizaron acetona (Alfredsson *et al.*, 2004; Diéguez *et al.*, 2000; Alippi *et al.* 1999).

Rial-Otero *et al.* (2007), en un exhaustiva revisión de los métodos analíticos de residuos de pesticidas en miel, indican que los principales inconvenientes que tiene la técnica de extracción con solventes, residen en la gran cantidad de solvente que se usa, el extenso tiempo de extracción, la excesiva manipulación de la muestra y la gran cantidad de residuos que se generan. Además, es necesario purificar el extracto obtenido.

Aún así, ha sido la técnica más utilizada hasta la amplia difusión de la extracción en fase sólida (Tremolada *et al.*, 2004; Wasilizewski *et al.*, 2003; Maver *et al.*, 2003; Korta *et al.*, 2001; Floris *et al.*, 2001; Szerletics-Túri, 1999a, b; Lodesani *et al.*, 1992; Van Buren *et al.*, 1992; Sancho *et al.*, 1991; Slabezki *et al.*, 1991; Thrasyvoulou *et al.*, 1988; Klein *et al.*, 1986). En algunos casos, esta técnica se combina con una purificación en fase sólida (Tremolada *et al.*, 2004; Szerletics-Túri, 1999b; Van Buren *et al.*, 1992), o bien con cromatografía de permeación sobre gel (Klein *et al.*, 1986). Algunos autores como De Greef (1994) utilizan para la extracción líquido-líquido una columna de Extrelut, y Tsigouri *et al.* (2001) disuelven la muestra en agua/etanol seguido de una centrifugación y posterior purificación en fase sólida.

3.6.2.2. Técnica de extracción en fase sólida (SPE)

La Extracción en Fase Sólida (SPE) separa los analitos haciendo pasar la muestra a través de una columna cromatográfica que contiene una fase estacionaria adsorbente, para posteriormente eluirlos con un solvente apropiado. El principio en el que se basa la SPE es la diferente afinidad de los analitos por la fase sólida, que es el adsorbente, y por los diferentes solventes orgánicos (muestra, solvente de

lavado, solvente de elución). Así, compuestos de alta a media polaridad se extraen de soluciones no polares mediante fases adsorbentes polares; de manera similar, compuestos de baja a media polaridad se extraen de soluciones polares con adsorbentes no polares (Tekel *et al.*, 1996). Los analitos se eluyen posteriormente con diferentes solventes orgánicos, dependiendo de las características del compuesto de interés y el mecanismo de retención en la fase adsorbente. La elección del solvente apropiado para conseguir la adecuada elución es de gran importancia y depende tanto de la matriz como de los compuestos coextraídos y retenidos en la fase adsorbente junto con el analito (Fong, 1999).

Una columna SPE es un lecho de partículas adsorbentes mantenido entre dos discos porosos dentro de un tubo desechable. Estas partículas son de sílice porosa, modificada químicamente por la acción de reactivos silano con grupos silanol de la superficie de sílice, revestidas químicamente por moléculas orgánicas, formando una especie de configuración en “cepillo” que se proyecta hacia el espacio, permitiendo así la retención de los compuestos de interés.

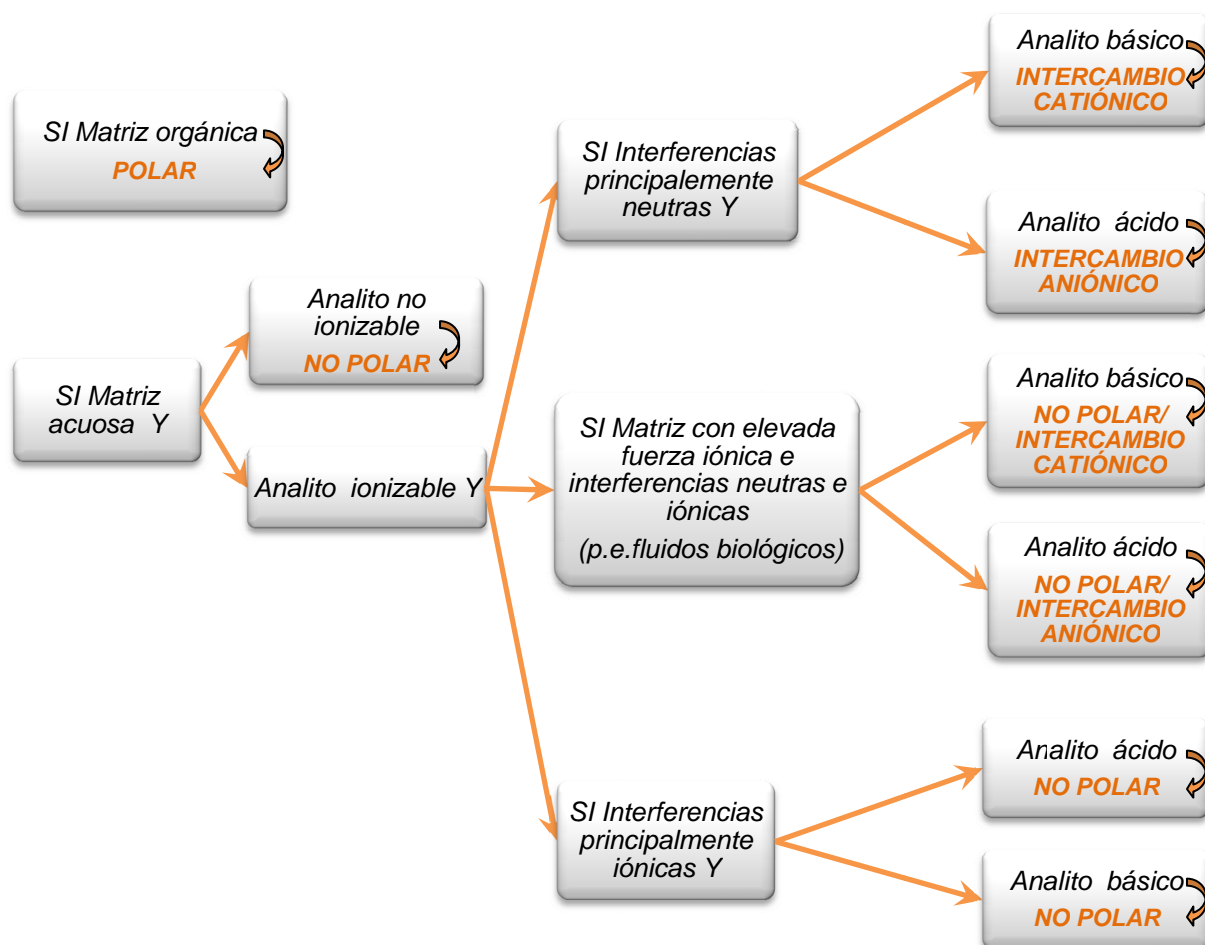
La retención selectiva de los analitos se consigue por interacción entre la superficie de las partículas y el analito disuelto. Tales interacciones se pueden modificar según diferentes factores: superficie de la partícula de sílice, pH, fuerza iónica y volumen de disolvente (Fong, 1999).

En la actualidad, existen multitud de fases adsorbentes y su elección dependerá de las características del analito que se quiera determinar (polar, no polar, ionizable), así como de la matriz (acuosa u orgánica) (Figura 16). Los diferentes tipos de fases sólidas utilizadas se comercializan como cartuchos o discos de extracción, diferenciándose básicamente en tres tipos: adsorbentes de fase normal (extracción de analitos polares en fase sólida polar con solvente de elución apolar), de fase reversa (extracción de analitos apolares en fase sólida apolar con solvente de elución polar) y de intercambio iónico (extracción de analitos ionizables en base a interacciones iónicas) (Tabla 10).

Tabla 10. Tipos de fases adsorbentes utilizadas en Extracción en Fase Sólida, en función del tipo de separación.

Adsorbente					
Fase normal (polar)		Fase reversa (apolar)		Intercambio Iónico (aniónico ^a o catiónico ^b)	
Nombre	Estructura	Nombre	Estructura	Nombre	Estructura
Sílice (SI)	-Si-OH	Octadecil (C ₁₈)	-Si-C ₁₈ H ₃₇	Aminopropil ^a (NH ₂)	Si-(CH ₂) ₃ NH ₂
Aminopropil (NH ₂)	-Si-(CH ₂) ₃ NH ₂	Octil (C ₈)	-Si-C ₈ H ₁₇	Amina secundaria primaria ^a (PSA)	Si-(CH ₂) ₃ NH(CH ₂) ₂ NH ₂
Florisil (FL)	MgO·3.6SiO ₂ ·0.1OH	Hexil (C ₆)	-Si-C ₆ H ₁₃	Amina cuaternaria ^a (SAX)	Si-(CH ₂) ₃ N ⁺ (CH ₃) ₃ Cl ⁻
2,3-dihydroxy propoxypropyl (DIOL)	-Si-(CH ₂) ₃ - OCH ₂ CH(OH)CH ₂ (OH)	Butil (C ₄)	-Si-C ₄ H ₉	Ac. bencensulfónico ^b (SCX)	Si-C ₆ H ₅ -SO ₃ ⁻ H ⁺
Cianopropil (CN)	-Si-(CH ₂) ₃ CN	Etil (C ₂)	-Si-C ₂ H ₅	Ac. propilsulfónico ^b (SCX-2, PRS)	Si-(CH ₂) ₃ SO ₃ ⁻ H ⁺
Alúmina ácida, básica o neutra (AL)		Cianopropil (CN)	-Si-(CH ₂) ₃ CN	Ac. etilbencensulfónico ^b (SCX-3)	Si-(CH ₂) ₃ -C ₆ H ₅ -SO ₃ ⁻ H ⁺
		Fenil (PH)	-Si-C ₆ H ₅		

Figura 16. Árbol de decisiones para la elección de la fase adsorbente utilizada en la Extracción en Fase Sólida.



La sílice enlazada al grupo octadecilo (C₁₈) es la fase adsorbente más ampliamente utilizada para la extracción de contaminantes orgánicos. Una matriz acuosa como es la miel disuelta en agua, junto con la necesidad de utilizar pequeñas cantidades de solventes orgánicos, unido a una ejecución rápida, hacen de la C₁₈, la fase de SPE idónea para interacciones apolares entre los enlaces C-H de la fase adsorbente y el analito (Tolosa *et al.*, 1996).

En cuanto al protocolo de análisis, la técnica de extracción en fase sólida SPE constaría de cinco pasos (Figura 17):

1. *Activación.* El primer paso es una preparación de la columna en la que se utiliza un solvente orgánico para "humidificar" la fase, con el objetivo de solvatarla, aumentando con ello la superficie en cepillo y facilitando la interacción con el analito.

Con fases sólidas hidrofóbicas como la C₁₈ se usa un solvente polar y miscible con la matriz, como es el metanol.

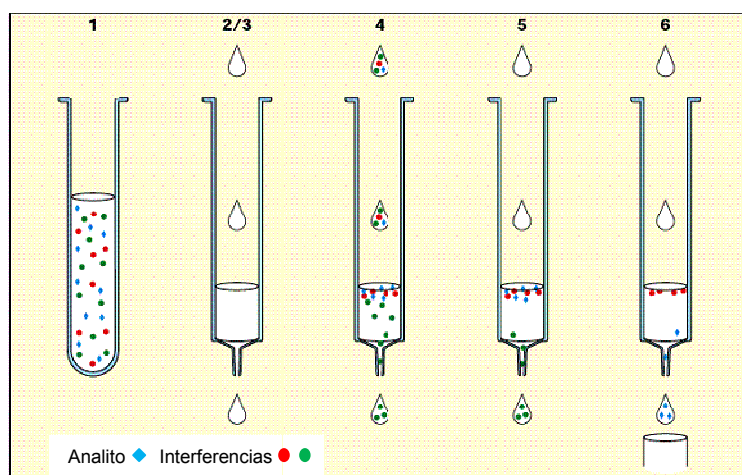
2. *Acondicionamiento*. El acondicionamiento permite "alinearse" la fase estacionaria lejos de la superficie de la sílice, permitiendo la interacción entre el analito y la fase estacionaria. La fase estacionaria SPE se acondiciona con el mismo solvente en el que está disuelta la matriz; por ejemplo, con matrices acuosas el solvente es agua o disolución tampón (Barcarolo *et al.* 1988). Cualquier solvente orgánico residual se elimina en esta etapa, asegurando que los analitos de interés sean retenidos en la parte superior de la columna.

3. *Retención*. Las interacciones entre las moléculas de la muestra y la fase sólida determinan la retención de los analitos. El volumen y flujo del solvente que pasa por la columna pueden controlarse mediante una válvula en la estación de vacío. Los componentes de interés han de retenerse en el adsorbente, mientras que la matriz y los contaminantes deben eluir y desecharse. Durante el proceso la fase sólida ha de mantenerse húmeda siempre, puesto que el secado de la misma puede traer consigo una pérdida de muestra.

4. *Eliminación de interferencias o Lavado*. Usando un disolvente único o varios utilizados en serie con fuerza eluyente creciente, los contaminantes pueden eliminarse del adsorbente de SPE hasta que sólo los analitos de interés queden retenidos. Tras el lavado, la fase sólida se seca, generalmente con nitrógeno. El secado es esencial si el eluyente de lavado no es miscible con el solvente de elución final. Hay que controlar el tiempo e intensidad del mismo, ya que son determinantes en la recuperación de los analitos.

5. *Elución*. Los solventes de elución que se suelen utilizar con fases sólidas apolares son: hexano, éter de petróleo, diclorometano, acetonitrilo y acetato de etilo, entre otros. El adsorbente de la columna de SPE y la interacción analito-fase sólida determinan las características del eluato o extracto final, que se recoge en el recipiente colector.

Figura 17: Esquema de la técnica de extracción en fase sólida (SPE)



1. Muestra
- 2/3. Activación y acondicionamiento de la columna SPE
4. Introducción de la muestra en la columna SPE
5. Lavado de la columna SPE
6. Elución de los analitos

Se trata de una técnica de extracción sencilla, que requiere poco volumen de solvente, rápida, selectiva y precisa. Tiene la ventaja adicional de que, en la mayoría de los casos, el extracto obtenido no requiere una purificación posterior y puede analizarse directamente. Por este motivo, desde que Bogdanov *et al.* (1990) emplearan por primera vez la técnica SPE para la extracción de acaricidas en miel, su utilización es creciente y son muchos los autores que la aplican en el análisis de miel y otros productos apícolas (Herrera *et al.*, 2005; Blasco *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2002, 1997 y 1993; Tsigouri *et al.*, 2001; Korta *et al.*, 2001; Jansson, 2000; Bernal *et al.*, 2000; Jiménez *et al.*, 1998; Tsipi *et al.*, 1999; Bogdanov *et al.*, 1998; Gomis *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1996).

El efecto quelante de las tetraciclinas hacía que la fase de extracción y purificación en fase sólida (SPE) tuvieran unos porcentajes de recuperación bajos. Este problema fue resuelto por Oka *et al.* (1987) con una disolución de miel en un tampón de Na₂EDTA y el acondicionamiento de la columna SPE con Na₂EDTA.

Las columnas SPE de extracción y purificación más comúnmente usadas para la determinación de tetraciclinas son las columnas de C₁₈ (Geertsen *et al.*, 2004; Kochansky *et al.*, 2000 y Oka *et al.*, 1994), aunque otros autores han utilizado columnas HLB (Pagliuca *et al.*, 2002) o columnas fenil (Viñas *et al.*, 2004).

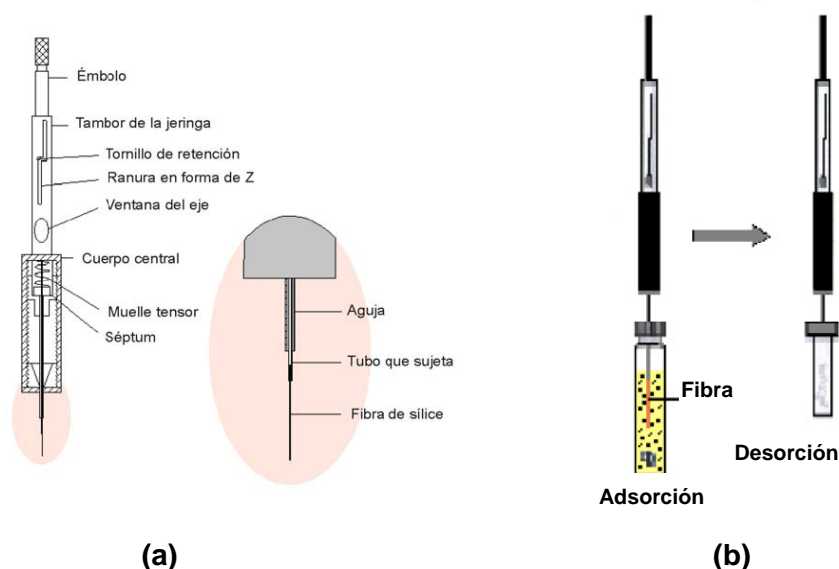
Esta técnica utiliza con frecuencia cartuchos de C_{18} para el análisis de residuos de acaricidas de síntesis en miel (Bogdanov *et al.*, 1998; Gomis *et al.*, 1996; Lodesani *et al.*, 1992; Bogdanov *et al.*, 1990) y eluyentes como hexano para eluir cumafós, fluvalinato y bromopropilato (Gomis *et al.*, 1996) o sólo bromopropilato (Lodesani *et al.*, 1992). Lodesani *et al.* (1992) utilizan también cloruro de metilo para eluir fluvalinato. Además, Bogdanov *et al.* (1998) aplican una mezcla de eluyentes (hexano/acetato de etilo) para la extracción de bromopropilato, cumafós, fluvalinato y flumetrina.

3.6.2.3. Técnica de microextracción en fase sólida (SPME)

La SPME se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta por un adsorbente, en la mayoría de los casos polimérico, seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura o un disolvente orgánico. El pequeño tamaño de la fibra y su geometría cilíndrica permiten incorporarla en una jeringa, facilitando así su manipulación y protegiéndola cuando no se utiliza, ya que ésta permanece dentro de la aguja de la jeringa. Un esquema del dispositivo comercial de SPME se muestra en la Figura 18.

Esta técnica presenta la ventaja de que puede utilizarse con todos los tipos de muestras (líquidas o sólidas) y se puede aplicar a la determinación de compuestos de diferente volatilidad. Como inconveniente cabe destacar la limitada capacidad de las fibras ya que la cantidad de recubrimiento es muy pequeña y, en ocasiones, no se obtienen límites de detección bajos, sobre todo si la SPME se utiliza combinada con cromatografía líquida (Yu *et al.*, 2004; Blasco *et al.*, 2004; Jiménez *et al.*, 1998).

Figura 18: Esquema del dispositivo comercial (a) y de la técnica (b) de SPME.



3.6.2.4. Dispersión en fase sólida de la matriz (MSPD)

En esta técnica, desarrollada por Barker *et al.* (1989), la muestra se mezcla con una fase adsorbente, normalmente Florisil o C₁₈, para ser transferida a una columna donde se eluye el analito mediante solventes. El extracto obtenido puede ser analizado directamente, sin necesidad de purificación posterior ya que las interferencias, como los pigmentos u otros componentes polares, son retenidos en el adsorbente (Rial-Otero *et al.*, 2007).

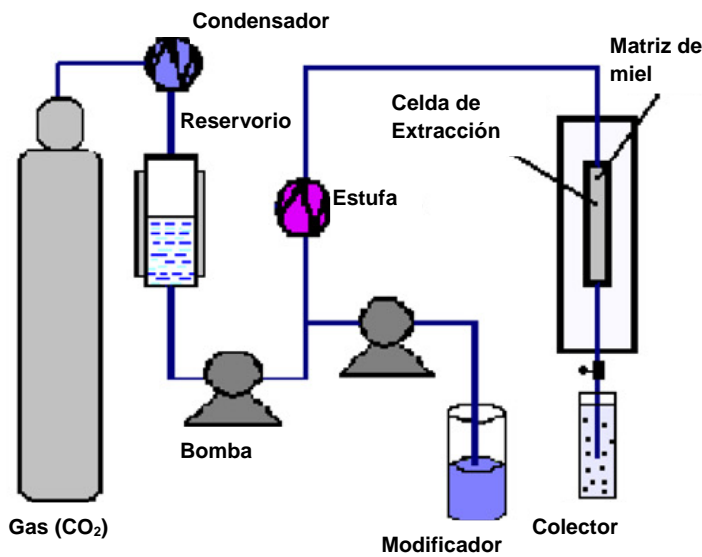
La MSPD minimiza los inconvenientes de la extracción en fase sólida y de la extracción con solventes orgánicos (Silveira-Dórea *et al.*, 2004), ya que requiere menos tiempo que la extracción con solventes y no necesita la dilución de la muestra como ocurre en la extracción en fase sólida.

Esta técnica ha sido utilizada por Alberio *et al.* (2001) y Sánchez *et al.* (2002), para la extracción de residuos de pesticidas organoclorados, organofosforados y piretroides en la miel. Estos autores utilizaron Florisil como fase adsorbente y acetato de etilo como solvente de elución. Las recuperaciones obtenidas estaban entre el 60% y 113%, con unos límites de detección por debajo de los 0,015 µg/g.

3.6.2.5. Extracción con fluidos supercríticos (SFE)

Los fluidos supercríticos son líquidos o gases en condiciones ambientales, llevados a unas condiciones operativas de presión elevada y temperatura moderada, por encima de su punto crítico (estado supercrítico). La propiedad más importante que presentan es su elevado poder disolvente en dicho estado supercrítico, lo que permite la separación de sustancias disueltas o incluidas dentro de una matriz (Rissato *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 1996). La extracción se realiza sin cambios de fase, simplemente variando las condiciones de presión y/o temperatura de los fluidos supercríticos (Figura 19).

Figura 19. Esquema de la técnica de extracción con fluidos supercríticos.



El principal inconveniente que presenta la extracción con fluidos supercríticos, está en la baja solubilidad del CO_2 , el gas más comúnmente usado, en agua. Otro inconveniente a reseñar es el elevado coste de esta tecnología (Rial-Otero, 2007).

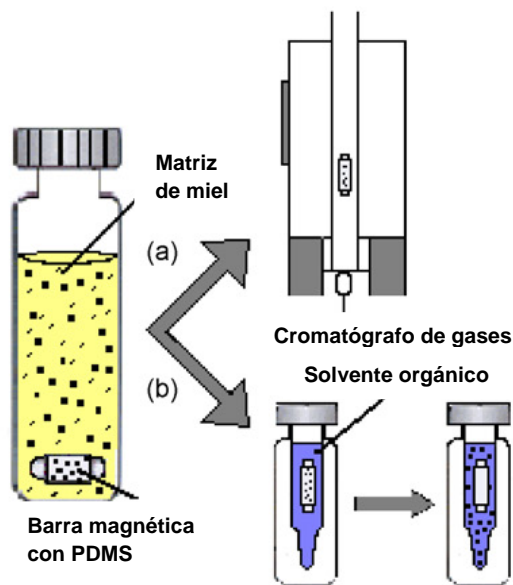
3.6.2.6. Extracción con barras magnéticas (SBSE)

Esta nueva técnica es similar a la microextracción en fase sólida, pero tiene la ventaja de que las recuperaciones de los analitos son más altas, al igual que la sensibilidad; además, el efecto matriz de la miel es más bajo (Blasco *et al.* 2004).

En la SBSE, la disolución de la muestra se agita junto con un barrita magnética, recubierta con un adsorbente, el PDMS (polidimetilsiloxano), hasta conseguir un equilibrio entre el polímero, la fase acuosa y el analito. El analito unido a la barrita magnética, tiene que someterse a un proceso de desorción mediante altas temperaturas para ser posteriormente analizado por cromatografía de gases, o bien someterse a un proceso de desorción con solventes y ser analizado por cromatografía líquida (Mitra, 2003) (Figura 20).

El principal inconveniente de esta técnica de extracción radica en que solamente existe un tipo de polímeros para barras magnéticas, por lo que, de momento y hasta que se fabriquen otros tipos de adsorbentes, sólo se puede aplicar a la extracción de analitos afines al PDMS.

Figura 20. Esquema de la técnica de extracción con barras magnéticas de PDMS



a) Desorción térmica

b) Desorción en un solvente

Blasco *et al.* (2004) aplicaron esta técnica como técnica de extracción de seis residuos organofosforados en la miel. Estos autores realizaron una comparativa entre la utilización de esta técnica y la técnica de microextracción en fase sólida, siendo ambas técnicas similares en cuanto a precisión y linealidad, pero observando que la SBSE es más exacta, más sensible y presenta un menor efecto matriz.

3.6.3. Purificación del extracto (*clean-up*)

En esta fase los analitos se recuperan completamente del extracto de la muestra eliminándose, al mismo tiempo, el material interferente coextraído. En algunos casos, si la técnica de extracción es suficientemente selectiva (como ocurre con la SPE o la MSPD) esta fase no es necesaria ya que va implícita en la técnica de extracción.

Los procedimientos para eliminar del extracto de miel las sustancias interferentes son múltiples: separación líquido-líquido (Martel *et al.*, 2002), cromatografía de permeación sobre gel (Menkissoglu *et al.*, 2000; Al-Rifai *et al.*, 1997) e, incluso, la propia SPE es, en la mayoría de los casos, la técnica elegida para realizar la

purificación (Tremolada *et al.*, 2004; Szerletics-Túri, 1999b; Bernal *et al.*, 1996; Jiménez *et al.*, 1996; Van Buren *et al.*, 1992).

3.6.4. Determinación

En esta fase se realiza la identificación y cuantificación de los residuos de interés, principalmente, mediante técnicas cromatográficas (Rouessac, 2003).

La cromatografía se fundamenta en los equilibrios de distribución de los compuestos presentes entre dos fases no miscibles de las que una, llamada estacionaria, está inmovilizada en una columna o fijada sobre un soporte y la otra, llamada móvil, se desplaza arrastrando la muestra para hacerla pasar por la fase estacionaria. La separación de los analitos depende de la intensidad de su interacción con la fase estacionaria y de su solubilidad en la fase móvil.

Aunque diversos autores han utilizado la cromatografía de capa fina como técnica de extracción de residuos procedentes de tratamientos sanitarios en apicultura, principalmente tetraciclinas (Oka *et al.*, 1987 y Xie *et al.*, 1997), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de gases (GC), como se puede observar en las tablas 11 y 12, son las técnicas más utilizadas para la determinación de estos residuos en miel.

3.6.4.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La HPLC es una técnica cromatográfica en la que la muestra se fracciona entre una fase móvil que es líquida y una fase estacionaria (Bermejo, 1991). Utiliza una presión muy elevada para forzar el paso del disolvente por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución (Harris, 2001).

En la cromatografía de líquidos se distinguen varios tipos, como son fase normal, la fase reversa, intercambio iónico y exclusión molecular.

La técnica más habitual para la determinación de residuos en miel es la *fase reversa*. Funciona, tal y como su nombre indica, a la inversa de la cromatografía en fase normal, es decir, la fase móvil es un líquido polar, como el agua o sus mezclas con solvente polares (metanol, acetonitrilo), y la fase estacionaria es un sólido de

características apolares (hidrofóbicas). La retención tiene lugar como consecuencia de la partición y adsorción de los analitos en la fase estacionaria. Cuanto más baja es la diferencia de polaridad entre la fase estacionaria y los analitos, mayor es el tiempo de retención y, por consiguiente, los compuestos más apolares son los más retenidos. Gomis *et al.* (1996) proponen el uso de columnas con diámetros internos muy pequeños (*micro-bore* 0,32 mm y *narrow-bore* 2,1 mm) para aumentar la sensibilidad hasta límites de detección equiparables a los obtenidos con cromatografía de gases.

Los métodos más recientes para la detección de tetraciclinas en miel, tienen en la mayoría de los casos un punto de partida en común. Se trata del método publicado por Oka *et al.* en 1987, aunque desde unos años antes ya se utilizaba la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación de tetraciclinas en una disolución ácida de miel (Sporns, 1986 y Takeba, 1984).

En cromatografía líquida para la determinación de tetraciclinas, los solventes utilizados como fases móviles son mezclas de disolventes en diversa proporción de metanol, acetonitrilo y una disolución ácida (Geertsen *et al.*, 2004; Viñas *et al.*, 2004; Pagliuca *et al.*, 2002; Oka *et al.*, 1994; Argauer *et al.*, 1991). El flujo de estas fases móviles suele ser de 1 ml/min e isocrático (Pagliuca *et al.*, 2002; Oka *et al.*, 1987 y 1994; Sporns *et al.*, 1986). El flujo en gradiente se utiliza en determinaciones, donde se pretende detectar diferentes tetraciclinas con la misma inyección (Viñas *et al.*, 2004; Kochansky *et al.*, 2000).

En cuanto a las fases estacionarias utilizadas para la separación de las tetraciclinas la más comúnmente utilizada es la C₁₈ (Geertsen *et al.*, 2004; Diéguez *et al.*, 2000; Kochansky *et al.* 2000). Otras fases utilizadas son fenil-hexil (Pagliuca *et al.*, 2002), C₈ (Oka *et al.*, 1987 y Takeba *et al.*, 1984) y C₁₆ (Viñas *et al.*, 2004). En cuanto a las dimensiones de la columna cromatográfica la mayor parte de los autores utilizan columnas de 250 mm de longitud, 4,6 mm de grosor y 5 µm de diámetro de las partículas de relleno (Geertsen *et al.*, 2004; Alippi *et al.*, 1999; Oka *et al.*, 1987).

Finalmente, entre los detectores más usados para determinar residuos de tetraciclinas en miel, el detector de ultravioleta (UV) (Thompson *et al.*, 2005; Viñas *et al.*, 2004; Pagliuca *et al.*, 2002; Geertsen *et al.*, 1999; Diéguez *et al.*, 1999; Oka *et al.*, 1987) y de fluorescencia (FLD) (Pena *et al.*, 2005; Nakaya *et al.*, 1991), son los más comúnmente empleados. También se ha descrito el uso de la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrofotómetro de masas (Nakazawa *et*

al., 1999; Oka *et al.*, 1994), aunque el número de referencias encontradas en la bibliografía es escasa.

De manera general, la sensibilidad de los diferentes métodos descritos para la determinación de tetraciclinas en miel está comprendida entre 1 y 100 ng/g de miel como límites de detección. En cuanto a los porcentajes de recuperación de estas técnicas los valores están entre el 55 y el 122%.

En cuanto a la determinación de residuos de acaricidas de síntesis en miel, los solventes empleados como fase móvil son mezclas de agua-acetonitrilo (Atienza *et al.*, 1993) y agua-metanol (Blasco *et al.*, 2003). Algunos autores destacan la importancia de un pH ácido de la fase móvil para la estabilidad y la resolución de los analitos (Martel *et al.*, 2002; Korta *et al.*, 2001; Atienza *et al.*, 1993). El flujo de la mezcla empleado en cromatografía puede ser isocrático (Blasco *et al.*, 2003; Martel *et al.*, 2002; Atienza *et al.*, 1993) o en gradiente (Korta *et al.*, 2001; Gomis *et al.*, 1993).

En lo que respecta a la fase estacionaria utilizada para la determinación de estos residuos, la columna de C₁₈ de 250 mm de longitud, 4,6 mm de grosor y 5 µm de diámetro de las partículas de relleno es la más utilizada (Rial-Otero *et al.*, 2007). También se ha empleado otro tipo de columnas, como la ODS (150 mm de longitud, 0,32 mm de grosor y 5 µm de diámetro de las partículas de relleno) (Blasco *et al.*, 2003), así como columnas con diámetros internos muy pequeños (*small-bore columns*) (Gomis *et al.*, 1996).

Finalmente, entre los detectores más usados para determinar residuos de acaricidas en miel, el uso del detector de barrido de espectros (DAD) (Martel *et al.*, 2002; Korta *et al.*, 2001; Gomis *et al.*, 1996) y del detector ultravioleta (Jiménez *et al.*, 2000; Blasco *et al.*, 1994; Atienza *et al.*, 1993). También se ha utilizado la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrofotómetro de masas (Blasco *et al.*, 2003 y 2004; Fernández *et al.*, 2002), pero su alto coste y mantenimiento hacen que su uso no sea muy común. Otros detectores como el de fluorescencia (FLD) (Bernal *et al.*, 1997; Van Buren *et al.*, 1992) o el amperiométrico (EC) (Blanco *et al.*, 1994), tampoco son muy usuales para la determinación de estos residuos.

De manera general, la sensibilidad de los diferentes métodos descritos para la determinación de acaricidas de síntesis en miel está comprendida entre 1 y 200 µg/kg de miel. En cuanto a los porcentajes de recuperación de estas técnicas los valores están entre el 83 y el 103%.

3.6.4.2. Cromatografía de gases

En la cromatografía de gases, la muestra es inyectada y vaporizada gracias al flujo de un gas apropiado. Este flujo con la muestra vaporizada pasa por una columna que contiene la fase estacionaria, donde ocurre la separación de la mezcla. La fase estacionaria puede ser un sólido adsorbente (cromatografía gas-sólido) o, más comúnmente, una película de un líquido poco volátil retenido sobre un sólido inerte (cromatografía gas-líquido) o sobre la propia pared del tubo de la columna (cromatografía gaseosa de alta resolución).

Esta técnica de separación y análisis de mezclas de sustancias volátiles, no es muy apropiada para determinar tetraciclinas en miel. Sin embargo, junto con la cromatografía líquida de alta resolución, es la técnica más ampliamente utilizada para identificar y cuantificar residuos de acaricidas de síntesis en miel.

Para la determinación de acaricidas de síntesis en miel, diversos autores han utilizado columnas capilares de polisiloxano, 5% fenil 95% metil (Bogdanov *et al.*, 1998 y 1990; Lodesani *et al.*, 1992) y de polisiloxano, 100% metil (Tsigouri *et al.*, 2001 y Slabezki *et al.*, 1991) como fase estacionaria.

Como técnica de determinación, la cromatografía de gases se ha empleado junto con diferentes detectores en función de la naturaleza química de los analitos (algunos de los cuales, sí que han sido utilizados para la detección de tetraciclinas, pero acoplados a un cromatógrafo de líquidos y no a uno de gases):

Detector de captura de electrones (ECD): utilizado por Fernández *et al.* (1997), con límite de cuantificación de residuos de amitraz, cumafós, bromopropilato y fluvalinato de 20 µg/kg; Bogdanov *et al.* (1998), con límite de detección de 3 µg/kg para los acaricidas cumafós, bromopropilato y fluvalinato; Tsigouri *et al.* (2001), cuyo límite de detección para el fluvalitano es de 1 µg/kg; Albero *et al.* (2001), con un límite de detección para 16 pesticidas de 15 µg/kg.

Detector de nitrógeno-fósforo (NPD): utilizado por Klein *et al.* (1986), para la determinación de bromopropilato, amitraz, clordimeform, con límite de detección de 1 µg/kg miel; Jiménez *et al.*, 1996 para la detección de amitraz, bromopropilato y clordimefor en miel, con límite de detección de 70 mg/L; Floris *et al.* (2001) para la determinación de amitraz, con límites de detección de 10 µg/kg y Herrera *et al.* (2005) para 21 pesticidas en miel con límite de 25 µg/kg.

Detector de ionización de llama (FID): utilizado por utilizado por Fernández *et al.* (1997), con límites de cuantificación de residuos de amitraz, cumafós, bromopropilato, cimiazol y fluvalinato de 20 µg/kg.

Detector de espectrometría de masas (MS): utilizado por Rissato *et al.* (2004), para la determinación de 32 pesticidas con límites de detección de 10 µg/kg; Russo *et al.* (2002), para la determinación de fluvalinato, con límites de detección entre 8 y 18 µg/kg; Blasco *et al.* (2003), para la determinación de 42 tipos diferentes de pesticidas organoclorados, organofosforados y carbamatos con límites de cuantificación de 100 µg/kg; Fernández *et al.* (1993), para la determinación de amitraz, cumafós, bromopropilato, cimiazol y fluvalinato con límites de cuantificación de 20 µg/kg; Albero *et al.* (2001), con límites de detección para la determinación de 51 pesticidas con límites de detección de 6 µg/kg, Volante *et al.* (2001), para la determinación de amitraz, bromopropilato, 2,4-dimetilanilina, cumafós, cimiazol y fluvalinato con un límite de detección de 10 µg/Kg, y Tremolada *et al.* (2004) para la determinación de cumafós con un límite de detección de 5 µg/kg.

Por último y de manera puntual, el detector de emisión atómica (AED) fue utilizado por Jiménez *et al.* (1996) para la detección de amitraz, bromopropilato y clordimefor en miel, con límites de detección de 70 µg/l.

La sensibilidad de los diferentes métodos descritos para la determinación de acaricidas de síntesis en miel mediante cromatografía de gases está comprendida entre 0,001 y 40 µg/kg de miel.

3.6.5. Confirmación

Los métodos de confirmación proporcionan la información necesaria para identificar y cuantificar de manera inequívoca los analitos. Según la Decisión 657/2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo, en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados, existen diversas técnicas de confirmación adecuadas para determinar la presencia de residuos de medicamentos. Estas técnicas son la cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas, infrarroja o captación electrónica, y cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas, infrarroja, DAD, fluorescencia, ultravioleta o inmunograma.

Para la confirmación de tetraciclinas en miel, Nakazawa *et al.* (1999) y Oka *et al.* (1994) confirman los resultados de sus métodos por espectrometría de masas.

Para la confirmación de acaricidas de síntesis en miel, Maver *et al.* (2003), Korta *et al.* (2001) y Van Buren *et al.* (1992) confirman los resultados de sus métodos por GC-MS.

3.6.6. Métodos analíticos para la determinación de residuos de tetraciclinas (oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina y doxiciclina) en miel

En la tabla 11 se reflejan los distintos métodos de determinación de residuos de tetraciclinas recogidos en la literatura científica.

Tabla 11: Métodos de determinación de residuos de tetraciclinas:

Análito	Proceso de extracción	Técnica determinación/ parámetros	Referencia
OTC, TC, CTC	Miel es diluida en tampón. filtrada por membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm	ELISA: Recuperación TCs entre 79 y 108 %. LD 400 µg/kg	Pastor 2007
OTC	<u>ELISA:</u> Miel se disuelve en tampón, adición anticuerpo antitetraciclina, eliminación anticuerpo libre, adición anticuerpo secundario, sustrato y cromógeno. <u>Chem II:</u> Miel se disuelve en tampón, adición tetraciclina marcada con ³ H, centrifugación y eliminación tetraciclina libre. <u>HPLC:</u> Miel se disuelve en tampón. SPE: columna de sílice y sobre, elución tampón, purificación columna C18, elución con metanol, evaporación, reconstitución extracto.	ELISA: LD 10 µg/kg Chem II: LD 10 µg/kg HPLC: LD 25 µg/kg	Minstedt 2005
OTC, TC y MTC:	Miel en tampón pH 4,5, columna empaquetada XAD-2 con resina, elución metanol-agua, concentrado a sequedad, reconstitución con agua.	HPLC-CL: Recuperación TCs entre 92 y 122 %. LD entre 1 y 5 µg/kg.	Wan 2005
OTC:	Miel se diluyen en tampón pH 5, y acetato de etilo, centrifugación, extracción sobrenadante y adición al mismo de acetato de etilo, adición de sulfato sódico anhidro, filtración, sequedad, reconstitución con metanol.	HPLC UV: Recuperación OTCs 66 %. LQ 60 µg/kg	Thompson 2005
OTC y TC	Miel en tampón pH 4, filtración. SPE: Columna HLB acondicionada, elución con metanol, columna LRC-PRS activada, elución ac. oxálico-acetonitrilo filtración por membrana de 0,45 µm.	HPLC con detector de fluorescencia: Recuperación TCs entre 66 y 95 %. CCα. 20 µg/kg. CCβ 50 µg/kg.	Pena 2005
OTC, TC, CTC:	Miel se diluyen en tampón, adición de una alícuota al kit Tetrasensor® (Unisensor, Belgium).	Screening: LD TCs: 5 y 25 µg/kg.	Afredsson 2005
OTC, TC, CTC, DC, MINO y MTC:	Miel en tampón pH 4. SPE: columna DSC-phenil acondicionada. elución metanol-acetato de etilo. evaporación sequedad. reconstitución con disolución ac. oxálico.	HPLC-UV: Recuperación TCs entre 97 y 72 %. LD entre 15 y 30 µg/kg.	Villas 2004
OTC, TC y CTC:	Miel en tampón pH 4, centrifugación, filtración. SPE: Columna C18 acondicionada. elución ac. oxálico-metanol. Concentrar y reconstituir con metanol.	HPLC-UV.	USDA 2003

Continuación Tabla 11:

OTC:	Miel en tampón pH 4, filtración, SPE: Columna HLB acondicionada, elución con acetato de etilo.	HPLC-UV: Recuperación OTC 82 %. LQ 50 µg/kg. LD 25 µg/kg.	Popiluco 2002
OTC, TC, CTC, DC y DMCTC.	Miel en tampón, pH 4, centrifugación, sobrenadante a SPE: Columna Bond Elut CNV acondicionada, elución metanol, evaporación sequedad, reconstitución con metanol-agua.	APCI LC-MS-MS (Inyección química a presión atmosférica cromatografía líquida en tándem con masas-masas); Recuperación TCs entre 64 y 77 %. LQ 50 µg/kg, LD entre 1 y 4 µg/kg.	Nakazawa 1989
OTC, TC y CTC	Miel en tampón pH 4.5, centrifugación, sobrenadante a SPE: Columna C18 acondicionada, elución metanol-acetato de etilo, columna PRS, elución metanol, acetonitrilo, ac. oxálico, filtración por 0.45 µm.	HPLC-UV: Recuperación TCs entre 75 y 94 %. LQ entre 2.4 y 72 µg/kg. LD entre 12 y 36 µg/kg.	Geertsen 1989
OTC	Miel se sometió a una doble extracción con acetona, evaporación a sequedad, reconstitución con agua.	HPLC-UV: Recuperación TCs 90 %. LQ 50 µg/kg.	Dieguez 1000
OTC, TC, CTC y DC	Miel en tampón, pH 4, filtración, SPE: Columna Bond Elut C18 acondicionada, elución con metanol, evaporación sequedad, reconstitución con agua.	Frit FAP-LC-MS: Recuperación TCs entre 90 y 85 %. LD 100 µg/kg.	Oka 1994
OTC, TC, CTC DC y DMCTC	Miel en agua con NaOH y Amonio.	Quimioluminiscencia con NBS en medio alcalino: Recuperación TCs entre 89 y 106 %. LQ 30-50 µg/kg.	Halvatzis 1983
OTC, TC, CTC y DC	Miel en tampón, pH 4, CTC: Columna Bond Elut C18 acondicionada, elución metanol-acetato de etilo, columna Baker COOH, elución Cloruro potásico-etanol, evaporación sequedad, reconstitución con metanol.	TLC/FAB-MS: Recuperación TCs entre 81 y 94 %. LQ 100 µg/kg.	Oka 1993
OTC y CTC.	Miel en tampón, pH 4, Centrifugación y sobrenadante se mezcla con cloroformo. Desecación y reconstitución del extracto con tampón pH 8. La parte acuosa se pesa por columna C18 y eluye con metanol.	Bioensayos microbiológicos con <i>B. subtilis</i> y <i>B. cereus</i> : LD OTC 50 µg/kg, CTC 10 ppb.	Jimbo 1982
OTC	Miel en ac. clorhídrico 0,1 N.	HPLC: Recuperación OTC 100 %. LQ 500 µg/kg.	Argauer 1982

Continuación Tabla 11:

OTC y CTC	Miel es diluida, extracción C18 y purificación con ion pair.	HPLC-FL: LD entre 5 µg/kg y 20 µg/kg	Nakaya 1001
OTC y TC	Miel es diluida con MeCN y agua	HPLC: LD entre 1200 µg/kg y 3000 µg/kg	Galano 1991
OTC, IC, CTC, DC, MINO, MIC y MINO	Miel en tampón, pH 4, filtración, SPE: Columna Pakar 10 C18 acondicionada, elución metanol-acetato de etilo, columna Baker 10 COOH, elución con metanol:acetonitrilo:ac.oxálico.	HPLC-UV: Recuperación TCs entre 81 y 07 %. LD entre 20 y 50 µg/kg.	Oka 1887 ^b
OTC, TC, CTC y DC	Miel en tampón, pH 4, filtración, SPE: Columna Pakar 10 C18 acondicionada, sequedad, elución acetato de etilo, columna COOH, elución con metanol, acetonitrilo, ac.oxálico.	HPLC-UV: Recuperación TCs entre 85 y 99 %. LD entre 20 y 60 µg/kg.	Oka 1087a
OTC	Miel diluida en agua sometida a un proceso de extracción con solventes (cloruro sódico, tampón glicina, tricloroacetato de sodio y acetato de etilo). La parte orgánica se concentra y reconstituye con agua calidad HPLC.	HPLC: Recuperación CTC 90 %. LQ 500 µg/kg.	Sporns 1996
OTC, TC y CTC	Miel en 10 mL N/10 HCl, SEP-PACK C18, elución con metanol.	HPLC-UV: Recuperación TCs entre 88 y 94 %. LD entre 100 y 500 µg/kg.	Takeba 1994
TC	Miel en H ₃ PO ₄ calentar a 40° C., enfriar, adición acetonitrilo, y H ₃ PO ₄ , filtración por membrana de 0.45 µm.	HPLC: Recuperación TC 100 %. LQ 1000 µg/kg. LD 100 µg/kg.	Jürgens 1991

DMCTC: Demeclociclina

MTC: Metaciclina

MINO: Minotetraciclina

HPLC-CL: Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de quimioluminiscencia

FAB: Bombardeo con átomos acelerados

3.6.7. Análisis de residuos de acaricidas de síntesis (flumetrina, fluvalinato, cumafós, bromopropilato y 4,4'-dibromobenzofenona) en miel

En la tabla 12 se reflejan los distintos métodos de determinación de residuos de acaricidas sintéticos recogidos en la literatura científica.

Tabla 12. Métodos de determinación de residuos de acaricidas sintéticos:

Análito	Proceso de extracción	Técnica/parámetros de calidad	Referencia
26 pesticidas (OCPs y OPPs)	SFE. Miel diluida en metanol-agua pasada por columna ENV+, lavado con metanol-agua y eluida con acetato de etilo.	22 OCPs y OPPs. GC-ECD y GC-NPD. Recuperación: 80-88%. R.S.D. < 28%. LQ <25 µg/kg. 26 pesticidas. GC-ECD, GC-TSD o GC-PPFD. Recuperación: 85-127%. R.S.D. < 27%	Hérrera 2005 Jansson 2000
32 pesticidas	SFE. Miel agua y celulosa. Congelación y liofilización Extracción con acetonitrilo. Columna de florisil, elución acetona-hexano.	GC-ECD, confirmación por GC-MSD. Recuperación: 88-98%. R.S.D. < 6%. LD: 10 µg/kg	Rizzato 2004
Cumafós	SE. Agua-hexano. SPE con florisil y Na ₂ SO ₄ , elución hexano acetato de etilo	GC-MS. LD 6 µg/kg	Tremolada 2004
6 OPPs	SFME. Miel diluida en agua, extracción con fibra de PDMS Desorción en metanol.	LC-APol-MSD Recuperación: 3.8-7.6%. R.S.D. < 10%. LD< 500 µg/kg	Blasco 2004
6 OPPs	SBSE. Miel diluida en agua, doble extracción con fibra de PDMS. Desorción en metanol.	LC-APol-MSD. Recuperación: 40-84%. R.S.D. < 9%. LQ <100 µg/kg	Blasco 2004
51 pesticidas (insecticidas, fungicidas, acaricidas y herbicidas)	SFE. Miel diluida en metanol-agua, columna de C18 lavado con metanol-agua y elución con hexano-acetato de etilo.	GC-MSD. Recuperación: 88-101% R.S.D. < 10%. LD< 6 µg/kg	Alberio 2004
11 OPPs	SFME. Miel diluida en agua saturada de NaCl. Extracción con sol-gel. Desorción.	GC-PPD. Recuperación: 74-105%. R.S.D. < 15%. LD< 1 µg/kg	Yu 2004

Continuación Tabla 12:

Cumafós amitraz	SE, agua, hexano éter dietílico	GC-ECD, Confirmación GC-MS. LD 5 µg/kg	Maver 2003
Fluvalinato	SE hexano acético.	GC-ECD. LD 3 µg/kg	Waliszewski 2003
42 carbamatos, OCPs y OPPs	SPE. Miel diluida con agua, columna C18. Elución con acetato de etilo, metanol y diclorometano.	HPLC-APci-MSD. GC-MSD. Recuperación 73-98%. R.S.D. < 18%. LQ <100 µg/kg	Biasco 2003
22 OPPs	SPE. Miel diluida con agua, columna C18. Elución con acetato de etilo, metanol y diclorometano.	LC-APci-MSD Recuperación: 14-102%. R.S.D. < 17%. LD < 240 µg/kg	Fernández 2002
Cumafós, bromopropilato, amitraz y fluvalinato	SE, doble extracción con hexano-propanol y agua-hexano	HPLC-DAD. Recuperación: 86-103%. R.S.D. < 7%. LD: 5 µg/kg	Manel 2002
Fluvalinato	SE. Dilución con metanol-agua. Extracción con acetato de etilo y elución con hexano.	GC-ECD GC-MSD Recuperación: 83-100%. R.S.D. < 8%. LD: 8-18 µg/kg	Russo 2002
16 pesticidas	MSPD. Dilución con metanol. Columna de florisil y Na ₂ SO ₄ . Adición hexano y acetato de etilo.	16 pesticidas. GC-ECD. Recuperación: 80-113%. R.S.D. < 10%. LD < 0,015 mg/kg. Pirimicarb, amitraz y 12 OPPs. GC-NPD. Confirmación por GC-MSD. Recuperación: 60-112%. R.S.D. < 10%. LD < 12 µg/kg	Sánchez 2002 Albero 2001
Fluvalinato	SPE. Dilución con etanol-agua, homogenización y centrifugación. Sobrenadante pasa por c18. Lavado con etanol-agua y hexano. Elución con diclorometano.	GC-ECD Recovery: 88-93%. R.S.D. < 8%. LD: 1 µg/kg	Tsigouri 2001

Continuación Tabla 12:

Bromopropilato, clorfenwintos, cumafós, diazinon, esion, pirimifós metil, terbufos	SPME. Miel diluida y extracción con fibra de PDMS.	GC-MSD. R.S.D. < 26%. LD< 3 µg/kg	Volante 2001
Amitraz, bromopropilato, dimeflanilina, cumafós, cimidazol y fluvalinato.	SPME dilución en agua y amonio. Extracción con fibra de PDMS.	GC-MSD. R.S.D. < 51%. LD<10 µg/kg	Volante 2001
5 acaricidas	SPE. Miel diluida en tampón, sonicación, extracción en C18, lavado con tampón elución con THF.	HPLC-DAD. Recuperación: 83-100%. R.S.D. < 8%. LD: 4-10 µg/kg	Korta 2001
Amitraz	SE agua hexano	GC-NPD. LD 10 µg/kg	Floris 2001
Fluvalinato, malation and cumafós	SE. Dilución con agua, extracción con diclorometano purificación con gel de sílice activado con charcos I	Malation and cumafós GC-NPD Recuperación: 79-96%. R.S.D. < 20%. LQ <20 µg/kg. Fluvalinato. GC-ECD. Recuperación: 89-92%. R.S.D. < 7%. LD: 5 µg/kg	Menissoglu 2000
39 pesticidas	SPE. Dilución con metanol, extracción con columna de florisil, elución con hexano-diclorometano	Acrinatria, 3-fenoxibenzaldehido. GC-FID Recuperación: 100%. R.S.D. < 3.6%. LD< 0.01 mg/kg. 37 pesticidas GC-ECD, y GC-NPD. Recuperación: 97-102%. R.S.D. < 7%. LOD< 75 µg/kg	Bernal 2000 Jiménez 1988
Flumetrina	Extracción con tolueno, metanol y diclorometano. Purificación silicagel, elución hexano diclorometano.	GC-ECD. LD 5 µg/kg	Szerletics-Turi 1989
18 OCPs	SPE. Dilución con metanol y agua, paso por columna de C18, elución con hexano.	GC-ECD. Confirmación por GC-ECD Recuperación: 45-126%. R.S.D. < 13%. LD: 200 µg/kg	Tsipi 1989

Continuación Tabla 12:

Fluvalinato	SE. Dilución con agua y extracción con hexano y ácido glacial.	GC-ECD Recuperación: 98–102%. R.S.D. < 10%. LD: 3000 µg/kg	Waliszewski 1988
Bromopropilato, cumafós, fluvalinato	SPE. Dilución con etanol y agua, paso por C18, elución con acetato de etilo y hexano.	GC-ECD. LD < 3 µg/kg	Bogdanov 1988
21 pesticidas	SPME. Dilución en agua y extracción con fibra de PDMS.	GC-ECD. Recovery: 81–115%. R.S.D. < 20%. LOD: 30 µg/kg	Jiménez 1988
13 OCPs, 30 OPPs, 5 ONPs	SE. Dilución con etanol y agua, primera extracción con diclorometano saturado de NaCl, segunda extracción con diclorometano, purificación con silicagel.	OCPs GC-ECD. Recuperación: 87–105%. LD: <10 µg/L. 30 OPPs y 5 ONPs. GC-NPD. Recuperación: 80–90%. LOD: <100 µg/L. Fenpropatrin, fluvalinato y bromopropilato. GC-ECD	Al-Rifai 1987
Amitraz, bromopropilato, cumafós, cimiazol y fluvalinato	SPE. Dilución con agua, paso por dos columnas de C18, lavado con agua y elución con hexano y diclorometano.	GC-MSD Recuperación: 74–96. R.S.D. < 8%. LQ <40 µg/kg. Amitraz, bromopropilato, cumafós y fluvalinato. GC-ECD y GC-FID Recuperación: 75–93%. R.S.D. < 10%. LQ <20 µg/kg	Fernández 1987 y 1983
Clordimeform, bromopropilato y amitraz	SE. Dilución con agua, extracción con hexano y acetona, purificación con C18.	GC-AE, GC-ECD-NPD. Recovery: 91–97%. R.S.D. < 6%. LD: <70 µg/L	Jiménez 1986
Bromopropilato, cumafós, fluvalinato, dicrombenzofenona	SPE. Purificación C ₁₈ , elución con hexano	HPLC-UV. Columna microbore. LD 0.01–0.025 µg/kg	Gomis 1986
4 acaricidas	SPE. Dilución con metanol, paso por C18, lavado con agua y metanol, elución con hexano.	HPLC-DAD. Recuperación: 81–95%. R.S.D. < 11%. LD: 740 µg/kg	Blanco 1986
Fluvalinato	SE, extracción con hexano	GC-ECD. LD 1 µg/kg	De Greef 1984

Continuación Tabla 12:

Fluvalinato	SFE. Dilución en agua y celulosa, congelación y liofilización. Extracción usando benzeno-isopropanol. Análito retenido en un relleno de bolas de acero inoxidable y elución con metanol.	HPLC-UV. Recuperación: 53-94%. R.S.D. < 3%. LD: 20 µg/kg	Atienza 1983
Cumafós	SE. Extracción con agua, acetónitrilo, cloroformo, hexano. Purificación con SPE con florisil. Elución con hexano y éter dietílico	HPLC-Fluorescencia y confirmación con GC-MS. LD 0,5 µg/kg	Van Buren 1982
Bromopropilato, amitraz, fluvalinato	SE con acetona, agua, purificación con C ₁₈ elución con hexano, cloruro de metileno	GC-ECD. LD 1 µg/kg	Locesani 1982
Fluvalinato	SE, extracción con agua hexano	GC-ECD. LD 40 µg/kg	Slabezki 1981
Fluvalinato	SE, extracción con cloruro de sodio y éter dietílico	GC-ECD. LD 9 µg/kg	Sancho 1981
Bromopropilato	SPE	GC-ECD. LD 2 µg/kg	Bogdanov 1980
Malatión, cumafós	SE, extracción hexano acetónitrilo	GC-ECD. LD 0,5 µg/kg	Thrasylvoulou 1988
Bromopropilato, BBP, amitraz, clordimeform y malatión	SE. Extracción con NaOH, acetona, NaCl, diclorometano. Purificación GPC	GC-ECD y GC-NPD. LD 1 µg/kg	Klein 1986

4. MATERIAL Y MÉTODOS

“Mira a la abeja y aprende; observa su diligencia y con qué seriedad realiza su trabajo. El fruto de sus esfuerzos es provechoso para la salud tanto de reyes como de gente sencilla”. (Versión de los LXX del Libro de los Proverbios 6, 8^{ac}).

4.1. Material, reactivos y equipos

4.1.1. Material

- Tijeras, pinzas y espátulas de acero inoxidable.
- Imanes de agitación.
- Vasos de precipitados de vidrio de 50, 100, 250 y 600 ml.
- Matraces aforados de vidrio de 10, 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 ml.
- Matraces Erlenmeyer de vidrio con tapón de cierre esmerilado, de 250 y 500 ml de capacidad.
- Probetas de vidrio graduadas con tapón de cierre esmerilado, de 50 y 100 ml.
- Tubos de ensayo de vidrio con tapón de rosca de 10, 15 y 50 ml de capacidad.
- Tubos de vidrio graduados cónicos, de 10 y 15 ml de capacidad.
- Varillas de vidrio.
- Pipetas Pasteur de vidrio.
- Pipetas de vidrio graduadas, de 1, 5, 10 y 25 ml.
- Micropipetas (60-100 μ l y 100-200 μ l) con capilares de vidrio Socorex (Suiza).
- Viales de vidrio de 2 ml con tapón de rosca.
- Viales de vidrio ámbar de 2 ml con tapón de rosca.
- Insertos de vidrio (100 μ l) para viales.
- Coladores de plástico de 8,5 cm y de 10 cm de diámetro.
- Filtros Tracer de nylon, de 25 mm de diámetro, con tamaño de poro de 0,2 μ m y 0,45 μ m.
- Cubetas de cuarzo de 1 cm.

4.1.2. Reactivos

- Disolventes orgánicos
 - Acetona grado HPLC Lab Scan (Irlanda).
 - Metanol grado HPLab Scan LC (Irlanda).
 - Acetonitrilo grado HPLC Lab Scan (Irlanda).
 - Acetato de etilo grado HPLLab Scan C (Irlanda).
 - n-Hexano 95% grado Pestiscan Lab Scan (Irlanda).

- Etanol 96 % v/v grado HPLC Panreac Química S.A. (España).
- Agua ultrapura MilliQ.
- EDTA ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$) grado PA Panreac Química S.A. (España).
- Ácido cítrico ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) grado PA Panreac Química S.A. (España).
- Sodio fosfato dibásico (Na_2HPO_4) grado PA Panreac Química S.A. (España).
- Ácido oxálico 2-hidrato ($(COOH)_2 \cdot 2H_2O$) grado PA Panreac Química S.A. (España).
- Hidróxido potásico (KOH), pureza del 97,3%, grado PA Baker Chemicals B.V. (Holanda).
- Ácido clorhídrico (HCl) 0,1N grado PA Panreac (España).
- Hidróxido de sodio (NaOH) 1N grado PA Panreac (España).
- Nitrógeno ultrapuro C55 Carbueros Metálicos (España).
- Cartuchos de extracción en fase sólida:
 - 500 mg de C_{18} (EC), 6 ml, Isolute, International Sorbent Technology (Reino Unido).
 - 1 g de C_{18} (EC), 6 ml, Isolute, International Sorbent Technology (Reino Unido).
 - 0,5 g de fenil, 6 ml, Isolute, International Sorbent Technology (Reino Unido).
- Cartuchos de desecación de 2,5 g de sulfato de sodio anhidro Isolute, International Sorbent Technology (Reino Unido).
- Patrones de tetraciclinas, Vetrinal® (Alemania):
 - Tetraciclina ($C_{22}H_{25}ClN_2O_8$), pureza del 97,3%.
 - Clortetraciclina ($C_{22}H_{24}Cl_2N_2O_8$), pureza del 83,0%.
 - Oxitetraciclina ($C_{22}H_{25}ClN_2O_9$), pureza del 96,2%.
 - Doxiciclina ($C_{22}H_{24}N_2O_8HCl \cdot 0,5H_2O \cdot 0,5CH_3CH_2OH$), pureza del 98,0%.
- Patrones de acaricidas, Laboratorio Dr. Ehrenstorfer Gmb (Alemania):
 - Flumetrina ($C_{28}H_{22}Cl_2FNO_3$), pureza del 96,8%.
 - Tau-fluvalinato ($C_{26}H_{22}ClF_3N_2O_3$), pureza del 94,5%.
 - Cumafós ($C_{14}H_{16}ClO_3PS$), pureza del 95,0%.
 - Bromopropilato ($C_{17}H_{16}Br_2O$), pureza del 99,5%.
 - 4,4'-Dibromobenzofenona ($C_{13}H_8Br_2O$), pureza del 99,5%.
- Bayvarol®, 20 tiras, 3,6 mg de flumetrina por tira, Bayer (Alemania).
- Miel de romero "Luna de miel", Tierra y Oro S.A. (España).

4.1.3. Preparación de reactivos

- Disolución de hidróxido potásico 1N: 1,6 g de KOH y completar con agua MiliQ en matraz aforado de 25 ml.
- Disolución de hidróxido de sodio 0,05N: 5 ml de 1 N de NaOH y completar con agua MiliQ en matraz aforado de 100 ml.
- Disolución de ácido clorhídrico 0,05N: 50 ml de 0,1N de HCl y completar con agua MiliQ en matraz aforado de 100 ml.
- Disolución saturada de EDTA 0,25M: 9,3 g de EDTA y completar con agua MiliQ en matraz aforado de 100 ml.
- Disolución de ácido cítrico: 2,1 g de ácido y completar con agua MiliQ en matraz aforado de 100 ml.
- Disolución de sodio fosfato dibásico: 2,8 g de sodio fosfato dibásico y completar con agua MiliQ en matraz aforado de 100 ml.
- Tampón EDTA-McIlvaine, pH 4: Mezclar 100 ml de la disolución de ácido cítrico y 62,5 ml de la disolución de sodio fosfato dibásico. Ajustar la disolución resultante a pH 4 con las disoluciones de ácido cítrico o de sodio fosfato dibásico. Añadir a la disolución de pH 4, 6 g de EDTA.
- Disolución de ácido oxálico, pH 3: 1,26 g de ácido oxálico y completar con agua MiliQ en matraz aforado de 1000 ml. Ajustar la disolución resultante a pH 3 con la disolución de hidróxido potásico.
- Disoluciones de tetraciclinas: los patrones comerciales de tetraciclinas se disolvieron a diferentes concentraciones en acetonitrilo:ácido oxálico pH 3 (15:85) (v/v).
- Disoluciones de acaricidas: los patrones comerciales de acaricidas se disolvieron a diferentes concentraciones en metanol.

4.1.4. Equipos

- Congelador Liebherr GS 5211 (-24°C) (Alemania).
- Frigorífico Catalán S. A. (España).
- Estufa de desecación Selecta (20-200°C) (España).
- Horno microondas FM 1535 (1200 W) Moulinex (Francia).
- Baño María Tectron P Selecta (España).
- Bloque calentador de tubos Tembloc P Selecta (España).
- Rota-Tubos MS2 Minishaker IKA (EE.UU.).
- pHmetro Crison GLP 21 (España).
- Termómetro graduado de mercurio (0-100° C).
- Balanza analítica monoplato CP 224 S Sartorius (Alemania), con precisión de 0,00001 g.
- Agitador oscilante TK3S Techno Kartell (Italia).
- Baño de ultrasonidos, Selecta (España).
- Buretas digitales de 25 ml Brand (Alemania).
- Centrifuga Rotofix 32 Hettich Zentrifugen (Alemania).
- Bomba de vacío XX5522050 Millipore (EE.UU.) (de 0 a 100 kPa).
- Estufa de incubación Heraeus (Alemania).
- Espectrofotómetro Avantes, AvaSpec 1024, 200-1100 nm (Holanda).
- Equipo de extracción en fase sólida *Vacuum Manifold Visiprep™* Supelco (EE.UU.).
- Cromatógrafo líquido de alta resolución HP Series 1100 con sistema de bombeo binario, inyector manual con *loop* de 20 µl, detector de barrido de espectros (DAD), controlado por la estación de trabajo HP-Chemstation, Agilent (Alemania).
 - Microjeringa 705 SNR de 50 µl, Hamilton (Suiza).
 - Columna cromatográfica de fase reversa octadecil C₁₈, de 250 mm de longitud, 4,6 mm de diámetro interno, y 5 µm de tamaño de partícula, ODS2 Waters Spherisorb (Irlanda).
 - Columna cromatográfica de fase reversa octadecil C₁₈, de 250 mm de longitud, 4,1 mm de diámetro interno, y 5 µm de tamaño de partícula, ACE (Reino Unido).
 - Horno para columna cromatográfica 90-2215 SSI Lab-Alliance (EE.UU.).

4.1.5. Control de calidad de reactivos, material y equipos

Todos los reactivos utilizados en este estudio debían estar exentos de sustancias susceptibles de causar interferencias en el análisis cromatográfico y, por ello, se han utilizado sólo reactivos de la mayor calidad. En particular, todos los disolventes orgánicos cuentan con certificados de calidad según la norma ISO 9002.

El agua destilada ultrapura MilliQ se ha recogido directamente en botella de vidrio ámbar. Con objeto de eliminar las impurezas que puedan dar respuesta en el detector e interferir con los analitos, se ha lavado con n-hexano (150 ml de n-hexano/litro de agua) en un embudo de decantación.

Para comprobar el grado de pureza de los reactivos, hemos realizado en nuestro laboratorio un blanco de reactivos, es decir, se ha aplicado todo el protocolo de análisis en ausencia de muestra (extracción, purificación y determinación). En ningún caso se observó la presencia de impurezas cuyos tiempos de retención coincidieran con los compuestos objeto de estudio.

Asimismo, la limpieza de material es fundamental para evitar cualquier interferencia en la determinación cromatográfica de los analitos. Por este motivo, no se ha utilizado en ningún momento material de plástico. Además, todo el material de vidrio y acero inoxidable se ha lavado con agua y detergente, aclarado con agua destilada y secado en estufa a 102° C. Finalmente, se ha lavado tres veces con n-hexano. Para comprobar la eficacia de la limpieza del material, se pone en contacto n-hexano con el material lavado y se inyecta en el cromatógrafo. La ausencia de picos interferentes con los analitos demuestra una buena limpieza.

Por otro lado, se estudió la estabilidad de las disoluciones-patrón a lo largo de 9 meses, mediante el análisis mensual de dichas soluciones. Se comprobó así que las disoluciones patrón son estables en las condiciones de almacenamiento fijadas por los fabricantes.

Finalmente, todos los equipos están sometidos a controles de calidad, realizados periódicamente por sus respectivos servicios de mantenimiento y calibración.

4.2. Puesta a punto y validación de un método analítico multiresidual para la determinación de tetraciclinas en miel

Se ha puesto a punto y validado en nuestro laboratorio un método para el análisis simultáneo de residuos de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina y doxiciclina en miel.

Se ha tomado como referencia el trabajo realizado por Oka *et al.* (1987) y se han ensayado las modificaciones necesarias hasta obtener resultados satisfactorios, de acuerdo con criterios internacionalmente reconocidos.

El método analítico de Oka *et al.* (1987) se describe a continuación. Se pesan 5 g de miel y se disuelven con 20 ml de tampón Na₂EDTA-McIlvaine pH 4. La muestra homogeneizada y filtrada se carga en una columna de 0,1 g de C₁₈, previamente acondicionada y activada con metanol, agua y disolución saturada de Na₂EDTA. La columna se lava con 20 ml de agua y se hace pasar una corriente de nitrógeno. Los analitos se eluyen con 50 ml de acetato de etilo. El eluato obtenido se hace pasar por una columna Baker 10 COOH, que se lava con 10 ml de metanol y se eluye con 10 ml metanol-acetonitrilo-acido oxálico. Finalmente, se inyectan 100 µl de eluato en un equipo de HPLC con una columna de C₈ de 250 mm x 4,6 mm y 5 µm, a un flujo de 1 ml/min. La elución isocrática se lleva a cabo con una mezcla metanol-acetonitrilo-acido oxálico (1:1,5:3) como fase móvil. La detección de las tetraciclinas se realiza a 350 nm.

A continuación, se describe de manera detallada los estudios efectuados en nuestro laboratorio.

4.2.1. Ensayo del método original (Oka *et al.*, 1987)

En primer lugar, se ensayó el método sobre una muestra de miel fortificada a una concentración conocida, encontrando una serie de dificultades y problemas prácticos que hicieron que los resultados obtenidos no fueran satisfactorios (recuperaciones inferiores al 60%). Los principales problemas fueron la separación de dos fases en el eluato tras la extracción en fase sólida así como la presencia de impurezas interferentes con los analitos.

Las modificaciones ensayadas para optimizar el método de análisis incluyen el estudio de diferentes fases sólidas así como del solvente de lavado y del solvente de elución (tipo y volumen) en la fase de extracción. En cuanto a los cambios introducidos en los parámetros cromatográficos, se ha modificado la fase móvil (tipo y pH) en la determinación cromatográfica.

4.2.2. Optimización de la extracción en fase sólida de los analitos

- Fase sólida

Para mejorar la recuperación de las tetraciclinas, se ensayaron las fases sólidas de 1 g de C₁₈, 0,5 g de C₁₈ y 1 g de Fenil. Para realizar este estudio se fortificaron muestras de miel con una mezcla de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina y doxiciclina a una concentración final de 350 ng de cada tetraciclina por gramo de miel.

- Solvente de lavado

Con el objetivo de eliminar o reducir lo máximo posible tanto las pérdidas de analito como las impurezas presentes en el extracto, se ensayaron diversos solventes de lavado (agua, metanol, tolueno, hexano e isooctano) así como la eliminación de la propia fase de lavado.

- Tipo y volumen de solvente de elución

Una vez elegida la fase sólida que dio los mejores resultados, se estudió el efecto de diversos solventes de elución: acetonitrilo, acetonitrilo:ácido oxálico (20:80), acetonitrilo:ácido oxálico (15:85), acetato de etilo, acetato de etilo:metanol (95:5), acetato de etilo:metanol (90:10) y acetato de etilo:metanol (80:20).

Finalmente, una vez seleccionado el solvente de elución óptimo, la siguiente etapa fue la elección del volumen de elución. Para ello se ensayaron los siguientes volúmenes: 6, 10 y 13 ml.

4.2.3. Optimización de la determinación cromatográfica mediante HPLC

- Fase móvil

Se ensayaron diversas opciones, tanto la elución isocrática como en gradiente, con distintos tipos y concentraciones de solventes como fase móvil. Los diferentes ensayos realizados se recogen en la tabla 13.

Tabla 13. Fases móviles ensayadas para la elaboración del método.

Fases móviles ensayadas	
Isocrático	% Ácido oxálico
Acetonitrilo: Ac Oxálico	95
Acetonitrilo: Ac Oxálico	90
Acetonitrilo: Ac Oxálico	85
Acetonitrilo: Ac Oxálico	80
Acetonitrilo: Ac Oxálico	75
Acetonitrilo: Ac. Oxálico	70
Metanol:Acetonitrilo:Ac. Oxálico (1:1,5:3)	55
Gradiente	
Metanol: Ac. Oxálico	min 9: 82 ; min 26: 88 ; min 41: 92
Acetonitrilo: Ac. Oxálico ¹	min 3: 88 ; min 15: 80 ; min 18: 15 ; min 21: 80 min 26: 75 ; min 40: 85
Acetonitrilo: Ac. Oxálico ²	min 3: 88 ; min 15: 80 ; min 18: 15 ; min 25: 85 min 36: 75 ; min 40: 85
Acetonitrilo: Ac. Oxálico ³	min 3: 75 ; min 15: 80 ; min 18: 15 ; min 26: 80 min 40: 85
Acetonitrilo: Ac. Oxálico ⁴	min 3: 90 ; min 15: 85 ; min 30: 80 ; min 55: 75
Acetonitrilo: Ac. Oxálico ⁵	min 3: 88 ; min 13: 80 ; min 23: 75 ; min 25: 85

- pH de la fase móvil

Se ensayaron diferentes pH de la fase móvil seleccionada mediante el estudio anterior. Así se ensayaron los pH de 2,5, 3 y 3,5

4.2.4. Validación del método analítico

Una vez optimizado el método de análisis, éste se ha sometido a un proceso de validación de acuerdo con el Comité del *Codex Alimentarius* sobre residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos (FAO, 2003), el Manual de Analítico de Pesticidas de la Administración Norteamericana de Medicamentos y Alimentos, (FDA, 1994), y el Grupo de Discusión para el Análisis de Residuos (ORA, 1995), que exigen la determinación de parámetros como la sensibilidad, exactitud y precisión de dicho método.

En consecuencia, para la validación del método se han realizado estudios de sensibilidad (linealidad, límite de detección y límite de cuantificación), exactitud (recuperación) y precisión (repetibilidad y reproducibilidad). El estudio de validación se ha llevado a cabo sobre muestras de miel, fortificadas a diferentes concentraciones y analizadas con el método puesto a punto.

Estudio de la linealidad: determinación de los intervalos de respuesta dinámico y lineal

El intervalo de respuesta dinámico del detector se define como aquel intervalo de concentraciones donde una variación en la cantidad de analito produce un cambio mensurable de la respuesta del detector. Dentro del intervalo dinámico puede haber uno o varios intervalos de respuesta lineal (rangos lineales), que son aquéllos en los que la variación de la respuesta del detector es proporcional al cambio de la cantidad de analito (FDA, 1994).

Para determinar el intervalo de respuesta dinámico del detector, se han inyectado en el cromatógrafo diferentes concentraciones de analito (5-700 ng/g miel) y representado gráficamente el factor respuesta (FR) (concentración de analito inyectada/área del pico correspondiente a dicha concentración de analito inyectada) *versus* concentración de la disolución de analito. Todas las concentraciones se han inyectado por duplicado. Por su parte, el intervalo lineal se determina como aquél en el que el factor respuesta es constante dentro de un margen de $\pm 10\%$ (FDA, 1994).

Estudio de la sensibilidad: determinación de los límites de detección y cuantificación

La sensibilidad de un método analítico es su capacidad de registrar ligeras variaciones en la concentración de un analito. Este parámetro se relaciona con la cantidad de analito requerida para dar un resultado significativo, cualitativo o cuantitativo. La sensibilidad de un método se evalúa mediante la determinación de los límites de detección y de cuantificación.

En la 14ª Sesión del Comité de la FAO sobre Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos, celebrada en Washington (EE.UU.), en marzo de 2003, se define el límite de detección absoluto, el límite de detección y el límite de cuantificación como:

Límite de detección absoluto (LDA): la cantidad de analito, expresada en unidades de masa (pg, ng, µg), que da una señal tres veces mayor que el ruido de fondo del instrumento de medida.

Límite de detección (LD): la menor cantidad de analito a partir de la cual se puede establecer la presencia del mismo en la muestra con una certeza estadística razonable. Se puede establecer numéricamente a un nivel al que se le añade tres veces la desviación estándar, en las unidades utilizadas, de un número representativo de análisis blanco. Se puede expresar en unidades de cantidad absoluta (pg, ng, µg) o de cantidad relativa (pg/g, ng/g, g/g o mg/l).

Límite de cuantificación (LC): la menor cantidad de analito en la muestra que puede ser medida cuantitativamente con una certeza estadística razonable. Se puede establecer numéricamente a un nivel al que se le añade diez veces la desviación estándar, en las unidades utilizadas, de un número representativo de análisis blanco. Se puede expresar en unidades de cantidad absoluta (pg, ng, µg) o de cantidad relativa (pg/g, ng/g, µg/g o mg/l).

Para establecer los límites de detección y cuantificación es necesario tener en cuenta, además, la presencia en los cromatogramas de los análisis blancos de interferencias coincidentes con los analitos.

Estudio de exactitud (recuperación)

El estudio de recuperación evalúa la eficacia de la extracción de un método analítico. La Food and Drug Administration (FDA) (1994) recomienda realizar los estudios de recuperación de residuos de medicamentos sobre muestras fortificadas a diferentes concentraciones. En nuestro estudio, hemos elegido las concentraciones de 350 ng/g miel y 50 ng/g miel, que se corresponden respectivamente con concentraciones que se pueden encontrar en análisis rutinarios de determinación de tetraciclinas en miel y con concentraciones similares a los límites de detección del método para cada tetraciclina. Los ensayos se han realizado por triplicado.

Estudios de precisión (repetibilidad y reproducibilidad)

De acuerdo con estas recomendaciones descritas por la FDA (1994), para el estudio de repetibilidad, los análisis han sido llevados a cabo en el mismo laboratorio, por el mismo analista, en el mismo día y con el mismo equipamiento en cada caso. Se ha realizado un total de 9 ensayos sobre mieles fortificadas con las cuatro tetraciclinas a 350 ng/g miel.

Para el estudio de reproducibilidad, los análisis se han llevado a cabo en el mismo laboratorio, por el mismo analista, con el mismo equipamiento, pero en 3 días distintos, en dos semanas diferentes. Para ello, se han realizado 9 análisis sobre mieles fortificadas con las cuatro tetraciclinas a 350 ng/g miel.

4.2.5. Fortificación de una muestra de miel exenta de residuos

Para evaluar la eficacia de todas las modificaciones ensayadas a lo largo de todas las etapas del análisis, es necesario fortificar una muestra de miel exenta de analitos a concentraciones detectables (blanco matriz) (FDA, 1994).

Para ello, se ha elegido una miel comercial que, tras la extracción mediante la técnica descrita en esta tesis, no presentaba picos coincidentes con los de los analitos.

Para la fortificación, se ha preparado una disolución madre de 2.000 µg/ml de cada tetraciclina en acetonitrilo:ácido oxálico a pH 3 (15:85) (v/v), a partir de la cual se han preparado las diferentes disoluciones de trabajo. Para obtener la concentración final deseada se han adicionado a 3 g de miel las cantidades necesarias de la solución patrón.

4.3. Puesta a punto y validación de un método analítico multiresidual para la determinación y cuantificación de flumetrina, fluvalinato, cumafós, bromopropilato y 4,4´-dibromobenzofenona en miel

El objetivo de este estudio es incluir la determinación de residuos de flumetrina en el método de análisis multiresidual establecido en nuestro laboratorio (Adamczyk *et al.*, 2007) para la determinación simultánea de cumafós, bromopropilato, 4,4´dibromobenzofenona y fluvalinato en cera, basado en el descrito por Gomis *et al.* (1996), y que consiste en una extracción en fase sólida, y una posterior determinación cromatográfica mediante HPLC-DAD.

Para ello, se han ensayado distintas condiciones, tanto de extracción como cromatográficas que permitieran optimizar la determinación de flumetrina sin disminuir la eficacia para el resto de analitos. Posteriormente, el método optimizado se ha validado determinando los parámetros de sensibilidad, exactitud y precisión de acuerdo con la Decisión de la Comisión Europea del 12 de Agosto del 2002 (2002/657/CE), por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y a la interpretación de los resultados.

El método de partida (Adamczyk *et al.*, 2007) consiste en una preparación previa de la muestra de miel (5 g) diluyéndola con metanol:agua (15 ml) y un acondicionado de la columna de C₁₈ (0,5 g) con metanol y agua (1:1) (v/v). Posteriormente, se carga la solución de la muestra en la columna, se lava con solvente metanol:agua (3x3 ml), y se seca con una bomba de vacío conectada a un *Vacuum Manifold* (10 min y 15 mm Hg). Tras este proceso se cambian las guías del *Vacuum Manifold* y se colocan unos cartuchos de 2,5 g de sulfato sódico anhidro. Para la elución de los analitos se utiliza hexano (10 ml) y se lleva a sequedad bajo una corriente de nitrógeno. El extracto se reconstituye con metanol (1 ml) y se almacena en congelación (-20°C) en viales de rosca. La determinación cromatográfica, se lleva a cabo a 25° C, mediante una columna en fase reversa de C₁₈ de 250 mm de longitud, 4,6 mm de diámetro interno, y 5 µm de tamaño de partícula. Una elución en gradiente, a 1 ml/min, con acetonitrilo y agua MiliQ ultrapura. La determinación de los diferentes acaricidas se realiza a diferente longitud de onda (Tabla 15). El tiempo de análisis cromatográfico es de 18 minutos.

Los cambios introducidos por Adamczyk *et al.* (2007) respecto al método original de Gomis *et al.* (1996) se pueden contemplar en la tabla 14.

Tabla 14: Variaciones introducidas por nuestro laboratorio en el método original de extracción de acaricidas en miel.

Método de Gomis <i>et al.</i> (1996)	Método de Adamczyk <i>et al.</i> (2007)														
Acondicionado: 2 ml metanol y 2 ml agua.	Acondicionado: 2 ml metanol, 2 ml agua y 5 ml metanol:agua (1:1)														
Lavado: 5 ml metanol:agua (1:1)	Lavado: 3 x 3 ml metanol: agua (1:1)														
	Utilización cartuchos de (Na ₂ SO ₄)														
Elución: 5 ml Hexano	Elución: 10 ml Hexano														
Columna: C ₁₈ 125 mm x 4 mm x 5µm	Columna: C ₁₈ 250 mm x 4,6 mm x 5µm														
Fase móvil: agua y metanol	Fase móvil: agua y acetonitrilo														
<ul style="list-style-type: none"> Gradiente de elución: <table border="1"> <thead> <tr> <th>Tiempo (minutos)</th> <th>% solvente Metanol</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>15</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>23</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>70</td> </tr> </tbody> </table>	Tiempo (minutos)	% solvente Metanol	15	70	23	100	25	70	<ul style="list-style-type: none"> Gradiente de elución: <table border="1"> <thead> <tr> <th>Tiempo (minutos)</th> <th>% solvente Acetonitrilo</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>12</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>80</td> </tr> </tbody> </table>	Tiempo (minutos)	% solvente Acetonitrilo	12	100	15	80
Tiempo (minutos)	% solvente Metanol														
15	70														
23	100														
25	70														
Tiempo (minutos)	% solvente Acetonitrilo														
12	100														
15	80														

Tabla 15: Longitud de onda óptima para la determinación de los diferentes acaricidas estudiados en esta tesis.

Pesticida	Longitud de onda óptima (nm)
Flumetrina	254
Fluvalinato	254
Cumafós	315
Bromopropilato	233
4,4'Dibromobenzofenona	270

4.3.1. Fortificación de una muestra de miel exenta de residuos

Para evaluar la eficacia de todas las condiciones ensayadas a lo largo de todas las etapas del análisis, es necesario fortificar una muestra de miel exenta de analitos a concentraciones detectables (blanco matriz) (Decisión de la Comisión 2002/657/CE).

Se ha elegido una miel comercial que no presenta picos coincidentes con los de los analitos. Esta miel comercial es la que habitualmente utilizamos en nuestro laboratorio como blanco para análisis de distintos residuos y se ha analizado mediante la técnica de extracción descrita en esta tesis, comprobando que no presentaba picos coincidentes con los de los analitos.

Para la fortificación, se ha preparado una solución patrón de cada uno de los analitos en metanol a una concentración de 1.000 µg/ml, a partir de la cual se han preparado las diferentes diluciones de trabajo. Estas soluciones patrón se han almacenado en oscuridad, a -20°C. Para obtener la concentración final deseada se han adicionado a 5 g de miel las cantidades necesarias de la solución patrón.

Para elaborar las distintas disoluciones de trabajo, se han tenido en el hecho de que en la Unión Europea no existen límites máximos de residuos de flumetrina, fluvalinato, bromopropilato y 4,4'-dibromobenzofenona en miel. Por ello, ésta ha sido fortificada a tres concentraciones distintas, 1, 1,5 y 2 veces el límite de funcionamiento exigido (contenido mínimo de un analito en una muestra que debe ser detectado y confirmado). Este criterio sirve para armonizar el funcionamiento analítico de los métodos aplicables a las sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido (Decisión de la Comisión 2002/657/CE). En el caso de cumafós, las tres concentraciones de fortificación han sido 0,5, 1 y 1,5 el límite máximo permitido.

4.3.2. Validación del método

Al método analítico desarrollado en esta tesis se le aplicaron sus respectivos estudios de linealidad, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud (recuperación) y sensibilidad ($CC\alpha$ y $CC\beta$), basándose en la Decisión de la Comisión (2002/657/CE) para la validación de un método analítico.

Especificidad

Este parámetro permite comprobar la capacidad de un método para distinguir entre el analito y otras sustancias presente en condiciones experimentales. Para comprobarlo se han analizado un número apropiado de muestras blanco y otras adicionadas con flumetrina, fluvalinato, cumafós, bromopropilato y 4,4'-dibromobenzofenona (en total 18 muestras). Se han verificado posibles interferencias en las regiones de interés en las que cabe esperar los analitos. La identificación cromatográfica de los analitos se ha llevado a cabo comparándolos con los tiempos de retención de los patrones. También se ha comprobado la concordancia entre los parámetros que definen los picos de los patrones y los de las muestras adicionadas.

Finalmente, se debe comprobar que los picos estén formados por un único componente y para ello se obtiene información de la pureza de los picos a partir de la información espectral obtenida.

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

La distancia entre ambos picos (interferente y analito) ha de ser superior a la anchura del pico del analito medida al 10% de la anchura máxima del mismo. Por último, el coeficiente de variación de los tiempos de retención de los blancos matriz fortificados no ha de ser superior al 2,5%.

En el caso de la flumetrina y del fluvalinato existe gran similitud química entre ambos, traduciéndose ésta, en unos espectros muy similares (su longitud de onda óptima es la misma, 254 nm) (Figura 38), lo que nos ha inducido a profundizar más en este apartado.

Identificación

La identificación cromatográfica se realiza comparando los tiempos de retención de los analitos de los patrones de calibración con los de las muestras.

Los picos que se han detectado cromatográficamente se confirman espectralmente. La confirmación se basa en la comparación de los espectros de la muestra problema con los de una muestra adicionada.

Los criterios de identificación utilizados están basados en la Decisión de la Comisión 657/2002/CE. Así, los máximos de absorción del analito en matriz deben presentar las mismas longitudes de onda que los del patrón de calibración, dentro de un margen determinado de resolución de $\pm 2\text{nm}$. El espectro del analito por encima de 220 nm no debe diferir visualmente del espectro del patrón de calibración, para aquellas partes de ambos espectros con una absorbancia relativa $\geq 10\%$.

Este criterio se satisface, en primer lugar, cuando se presentan máximos iguales y, en segundo lugar, cuando en ninguno de los puntos observados la diferencia entre ambos espectros es superior al 10% de la absorbancia del patrón.

La similitud del pico de la matriz con el de otros analitos se puede comprobar comparando el espectro del pico problema con el espectro de la flumetrina de la biblioteca de espectros del equipo informático.

Estudio de la linealidad

Es la capacidad del método analítico para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración o cantidad del analito en un rango definido, entendido éste como el intervalo de concentración en el cual el método es aplicable (Angelini, 2000).

El estudio de la linealidad se realiza preparando disoluciones patrón a cuatro niveles de concentración calculado de forma que la disolución de las muestras a analizar se encuentre en las zonas centrales del rango.

Para este estudio las disoluciones patrón se preparan y analizan seis veces y, posteriormente, se evalúan usando las condiciones cromatográficas determinadas durante el estudio de especificidad.

En un primer paso la linealidad se evalúa por inspección visual de la gráfica obtenida al representar los pares de puntos señal/concentración y, si es lineal, la línea de regresión se calcula por el método de los mínimos cuadrados.

El rango lineal se define como aquel intervalo de concentraciones para los que la variación de la respuesta del detector es proporcional al cambio en la cantidad de analito (FDA, 1994). En nuestro estudio de linealidad se fortificaron matrices con 100 µl de disoluciones patrón con concentraciones comprendidas entre 5.000 y 8 ng/g. En la determinación del rango de respuesta lineal se han seguido los criterios que recomienda la Food and Drug Administration de EE.UU. (1994), que considera lineal el rango de concentraciones de un compuesto para las que el factor respuesta es constante dentro de un margen del $\pm 10\%$.

Estudios de precisión (repetibilidad y reproducibilidad)

La precisión del método se define como el grado de coincidencia existente entre los resultados independientes de un ensayo obtenidos en condiciones estipuladas (UNE 82009-1:1998).

La repetibilidad, es el grado de precisión obtenida cuando en las mismas condiciones se realizan ensayos independientes en un intervalo corto de tiempo. De acuerdo con estas recomendaciones, para el estudio de repetibilidad, los análisis han sido llevados a cabo en el mismo laboratorio, por el mismo analista, en el mismo día y con el mismo equipamiento en cada caso. Se ha realizado un total de 18 análisis sobre mieles fortificadas con los analitos a varios niveles del límite de funcionamiento del método, es decir $n=6$ para 1, 1,5 y 2 veces el límite de funcionamiento. El coeficiente de variación en todos los niveles y entre ellos ha de estar por debajo del 20%.

En los estudios de precisión, de acuerdo con la Decisión de la Comisión Europea del 12 de Agosto de 2002 (2002/657/CE), sólo se aceptan coeficientes de variación inferiores al 20%.

La reproducibilidad intralaboratorio es un término definido por la ICH (International Conference Harmonization, 1995) como la variabilidad de un proceso largo que se determina comparando los resultados obtenidos en el mismo laboratorio en diferentes momentos. Las variaciones típicas para ser estudiadas incluyen días, analistas, equipos, etc... No se considera necesario estudiar estos efectos individualmente.

Para el estudio de reproducibilidad, los análisis se han realizado en el mismo laboratorio, por el mismo analista, con el mismo equipamiento, pero en 3 días distintos y en 2 semanas diferentes. Para ello, se han realizado 27 análisis sobre mieles fortificadas con los analitos a varios niveles del límite de funcionamiento del método, es decir $n=9$, para 1, 1,5 y 2 veces el límite de funcionamiento. De acuerdo con la Decisión de la Comisión 657/2002/CE, sólo se aceptan coeficientes de variación inferiores al 20%.

Veracidad

La veracidad de un método de medición valora los errores sistemáticos del método de ensayo, es decir, errores inherentes y constantes. Para comprobarlos se calibran los equipos, se emplean muestras certificadas de referencia, patrones químicos o intercomparativos con otros laboratorios. El término veracidad se define en la Decisión 2002/657/CE como el grado de concordancia existente entre el valor medio obtenido de una gran serie de resultados y un valor de referencia aceptado. La veracidad se expresa, generalmente, como sesgo (δ) (diferencia entre el valor medio obtenido y el valor de referencia).

No se han encontrado muestras de material de referencia certificado por lo que no es necesario calcularla si se ha realizado un estudio de recuperación del método (Decisión 2002/657/CE).

Estudio de exactitud (recuperación)

Este estudio tiene como objetivo determinar qué porcentaje del analito se pierde en las etapas previas a la medición (Ramis-Ramos, 2001). En la Decisión 2002/657/CE se establece que la recuperación es el porcentaje de la concentración real de una sustancia recuperado durante el procedimiento analítico.

Durante el proceso de validación se ha calculado el factor de recuperación analizando material de muestra enriquecido a tres niveles distintos. Este factor posteriormente se aplica a la corrección del valor de concentración obtenido.

La recuperación (%) a cada nivel de enriquecimiento se obtiene con la fórmula:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{ppb}(\text{obtenido})}{\text{ppb}(\text{adicionado})} \times 100$$

En este estudio se han analizado 18 muestras de miel exenta de residuos, seleccionada como blanco matriz y fortificada con los diferentes patrones químicos.

El ensayo de recuperación se realizó por sextuplicado, a tres niveles de fortificación, 1.000 ng/g miel, 100 ng/g miel y 50 ng/g miel (debido a que cumafós tiene LMR, estos niveles fueron 1.000, 200 y 100 ng/g miel).

Conforme a la Decisión de la Comisión 657/2002/CE, se aceptan recuperaciones comprendidas entre el 70 y el 110%, para valores de fortificación comprendidos entre 1 µg/kg y 10 µg/kg. Para valores ≥ 10 µg/kg los resultados de las recuperaciones deben estar entre el 80 y el 110%.

Estudio de la sensibilidad: Límite de decisión ($CC\alpha$) y Capacidad de detección ($CC\beta$)

Según Decisión de la Comisión 657/2002/CE se considera que una muestra es “no conforme” si se supera el límite de decisión del método de confirmación para el analito.

En el caso de los acaricidas flumetrina, fluvalinato, cumafós, bromopropilato y 4,4'-dibromobenzofenona este límite de decisión ($CC\alpha$) es la concentración más baja a partir de la cual un método puede detectar la presencia del analito en cuestión, con una certeza estadística de $1-\alpha$.

El error α (tipo I) es la probabilidad de que la muestra analizada sea realmente “conforme”, aunque se haya obtenido una medición de “no conforme”, es decir, que se concluya que una sustancia está presente cuando realmente no lo está (falso positivo).

Sin embargo, el Límite de Decisión ($CC\alpha$) no tiene en cuenta el error β (o de tipo II) que es la probabilidad de que la muestra analizada sea realmente no conforme, o que se concluya que una sustancia no está presente cuando realmente lo está (falso negativo).

La capacidad de detección ($CC\beta$) sí tiene en cuenta este tipo de error y se define como la concentración mínima en la que un método puede detectar muestras realmente contaminadas con una certeza estadística de $1-\beta$.

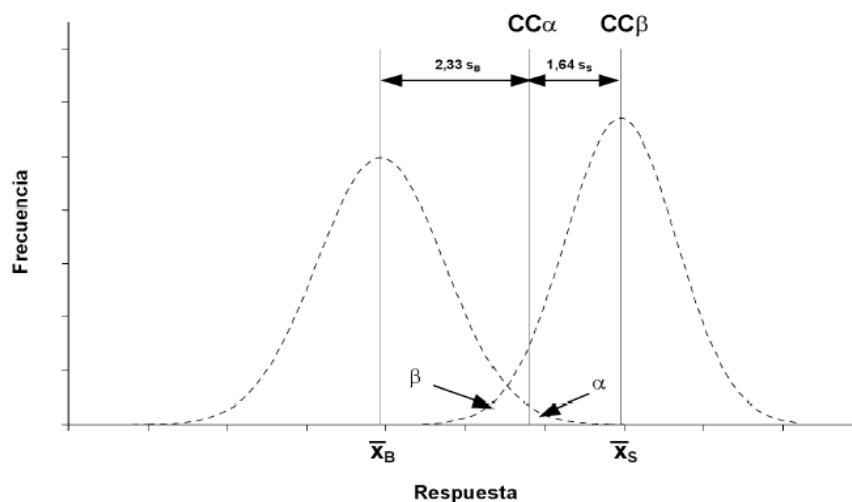
Cuando se realiza una serie de medidas repetidas la distribución de resultados que se obtienen siguen una distribución normal o de Gauss, es decir, una distribución

simétrica en la que el suceso más probable es el central, y la probabilidad de ocurrencia disminuye de forma exponencial conforme nos alejamos del centro. En estas poblaciones la desviación estándar determina la amplitud de la distribución.

En la figura 21 se representa cómo sería la distribución de los resultados obtenidos al realizar un ensayo sobre muestras blanco y sobre muestras contaminadas y dónde se situarían gráficamente, $CC\alpha$ y $CC\beta$.

Para las sustancias en las que no hay límite máximo de residuos (LMR) fijado en la Unión Europea (todas las incluidas en este estudio salvo el cumafós), tienen establecido un error $\alpha=1\%$ y un error $\beta=5\%$. El límite de decisión se puede calcular delimitando la señal frente a la concentración añadida mediante una curva de calibración siendo la ordenada el equivalente al valor medio de la muestra sin adicionar.

Figura 21. $CC\alpha$ y el $CC\beta$ en sustancias para las que no se ha establecido LMR



X_B = Valor medio de la respuesta en la muestra sin adicionar

X_S = Valor medio de la muestra contaminada

s_B = Desviación estándar de la muestra sin adicionar

s_S = Desviación estándar de la muestra contaminada

α = Tasa de resultados de falsos no conforme (falsos positivos)

β = Tasa de resultados de falsos conforme (falsos negativos)

$CC\alpha$ = Respuesta con un error α dado y un 50% de error β

$CC\beta$ = Respuesta con un error α muy pequeño y un error β dado

Para realizar este estudio, se han utilizado las muestras blanco fortificadas con los 5 acaricidas utilizadas previamente para los estudios de reproducibilidad. Tras la identificación se delimita la señal frente a la concentración añadida. El límite de decisión es igual a la concentración correspondiente a la ordenada en el origen más 2,33 veces la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio (s_{Rinlab}).

$$CC \alpha = ordenada + (2,33 \times s_{Rinlab} .)$$

En el caso particular del cumafós (LMR de 100 ng/g en la UE), el límite de decisión equivale a la concentración correspondiente al límite permitido más 1,64 veces la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio (s_{Rinlab}).

$$CC \alpha = LMR + (1,64 \times s_{Rinlab} .)$$

Por otro lado, la capacidad de detección se obtiene como la concentración correspondiente al límite de decisión más 1,64 veces la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio de las muestras fortificadas con concentraciones de cada acaricida similares al límite de decisión (s).

$$CC\beta = CC\alpha + (1,64 \times s)$$

Estudio de la robustez

La robustez es la susceptibilidad de un método analítico a los cambios de las condiciones experimentales. Con este estudio se pretende introducir deliberadamente en el método ligeras variaciones razonables y observar sus consecuencias.

Para ello, se han determinado previamente siete factores del análisis de la muestra que podían influir en los resultados de la medición y se han modificado en un orden de magnitud razonable. Para poder realizar los cálculos, a los valores nominales de estos siete factores elegidos se les ha asignado una letra mayúscula de la A a la G y a sus modificaciones se les ha asignado una letra minúscula de la a la g. Los factores modificados y la magnitud de la modificación se muestran en la tabla 16.

Se ha diseñado el experimento según el método de Youden (Decisión de la Comisión 657/2002/CE), ya que este reduce al mínimo el tiempo y el esfuerzo requeridos. Este método es un diseño factorial fraccional que permite estudiar

diversas variaciones simultáneamente, aunque no permite detectar interacciones entre los diversos factores. Se ha tomado un subconjunto equilibrado y representativo de 8 de las 128 combinaciones posibles (Tabla 17). Las características del análisis para cada combinación se describen en la tabla 18.

Tabla 16. Factores modificados en el método de determinación de residuos de acaricidas de síntesis en miel y magnitud de la modificación.

Tipo de cambio	Magnitud del cambio	
	Referencia	Modificación
Lavado del material de vidrio con agua mili-Q y hexano	Si (A)	No (a)
Características de los solventes	Marca Lab-Scan® (B)	Marca Panreac® (b)
Tiempo de secado de columna de extracción	10 min (C)	15 min (c)
Volumen de elución	10 ml (D)	9,5 ml (d)
Tiempo transcurrido desde la obtención del extracto con los analitos hasta su inyección cromatográfica	Inmediato (E)	Una semana (e)
Temperatura de la columna cromatográfica	25° C (F)	Ambiente (f)
Cambio de analista	F (G)	S (g)

Tabla 17. Combinaciones elaboradas para la configuración del estudio de robustez.

Valor del factor	Combinación							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Lavado material de vidrio con agua mili-Q y hexano	A	A	A	A	a	a	a	a
Características de los solventes	B	B	b	b	B	B	b	b
Tiempo de secado de columna de extracción	C	c	C	c	C	c	C	c
Volumen de elución	D	D	d	d	d	d	D	D
Tiempo hasta inyección cromatográfica del extracto	E	e	E	e	e	E	e	E
Temperatura columna cromatográfica	F	f	f	F	F	f	f	F
Cambio del analista	G	g	g	G	g	G	G	g

Tabla 18. Descripción de las características del análisis para cada combinación.

Combinación	Características del análisis
1	Lavado del material de vidrio con agua mili-Q y hexano, solventes Lab-Scan [®] , 10 min de secado de columna de extracción, 10 ml de volumen de elución, inyección inmediata, 25°C temperatura de columna, realizado por F.
2	Lavado del material de vidrio con agua mili-Q y hexano, solventes Lab-Scan [®] , 15 min de secado de columna de extracción, 10 ml de volumen de elución, inyección tras una semana, columna a temperatura ambiente, realizado por S.
3	Lavado del material de vidrio con agua mili-Q y hexano, solventes Panreac [®] , 10 min de secado de columna de extracción, 9,5 ml de volumen de elución, inyección inmediata, columna a temperatura ambiente, realizado por S.
4	Lavado del material de vidrio con agua mili-Q y hexano, solventes Panreac [®] , 15 min de secado de columna de extracción, 9,5 ml de volumen de elución, inyección tras una semana, 25°C temperatura de columna, realizado por F.
5	No lavado del material de vidrio con agua mili-Q y hexano, solventes Lab-Scan [®] , 10 min de secado de columna de extracción, 9,5 ml de volumen de elución, inyección tras una semana, 25°C temperatura de columna, realizado por S.
6	No lavado del material de vidrio con agua mili-Q y hexano, solventes Lab-Scan [®] , 15 min de secado de columna de extracción, 9,5 ml de volumen de elución, inyección inmediata, columna a temperatura ambiente, realizado por F.
7	No lavado del material de vidrio con agua mili-Q y hexano, solventes Panreac [®] , 10 min de secado de columna de extracción, 10 ml de volumen de elución, inyección tras una semana, columna a temperatura ambiente, realizado por F.
8	No lavado del material de vidrio con agua mili-Q y hexano, solventes Panreac [®] , 15 min de secado de columna de extracción, 10 ml de volumen de elución, inyección inmediata, 25°C temperatura de columna, realizado por S.

Para llevar a cabo este estudio, todas las muestras fueron fortificadas a una concentración de 100 ng/g miel para cada acaricida. El estudio de cada combinación de factores se ha realizado por triplicado.

4.4. Estudio de estabilidad de las tetraciclinas en diferentes muestras de miel (efecto de la pasteurización y efecto del tiempo de almacenamiento)

Se ha realizado un estudio con el objetivo de determinar la degradación que sufren las tetraciclinas en la miel por efecto de la pasteurización y del tiempo. Para ello, se utilizaron 11 mieles de distintas marcas comerciales y orígenes botánicos (romero, limonero, multifloral, naranjo, espliego, eucalipto, tomillo, montaña, bosque, brezo y encina), comprobándose sobre las mismas la ausencia de residuos de tetraciclinas mediante la metodología analítica puesta a punto en esta tesis (apartado 5.1.1.).

De cada una de las diferentes mieles comerciales se tomó una submuestra de 250 g y se depositó en un bote de vidrio con tapa metálica. A estos 250 g de miel se añadió 1 ml de una mezcla de las cuatro tetraciclinas estudiadas (Oxitetraciclina, Tetraciclina, Clortetraciclina y Doxiciclina) disueltas en acetonitrilo-ácido oxálico (15:85), a una concentración de 125 µg/ml. La concentración final teórica fue de 500 ng/g de miel en el tiempo 0 de este estudio, comprobándose mediante su análisis la concentración real.

Para estudiar el efecto de la pasteurización, inmediatamente después de su fortificación, las muestras de miel (50 g) se sometieron a una pasterización, similar a la que se aplica en el proceso industrial (78° C durante 1 minuto) y posteriormente fueron analizadas.

Para estudiar el efecto del factor tiempo, la miel restante (150 g), se almacenó en oscuridad a temperatura ambiente (25° C ± 5° C), analizándose submuestras de 50 g de miel a los 30, 90 y 180 días.

En la figura 22 se puede observar gráficamente el diseño de este estudio.

Para evaluar las diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos en el estudio de degradación se sometieron los datos a análisis estadístico aplicando el test paramétrico de *t-student*. Los cálculos se llevaron a cabo con el programa StatView SE-Graphics para Macintosh (1988, Abacus Concept, Inc., Berkeley, California).

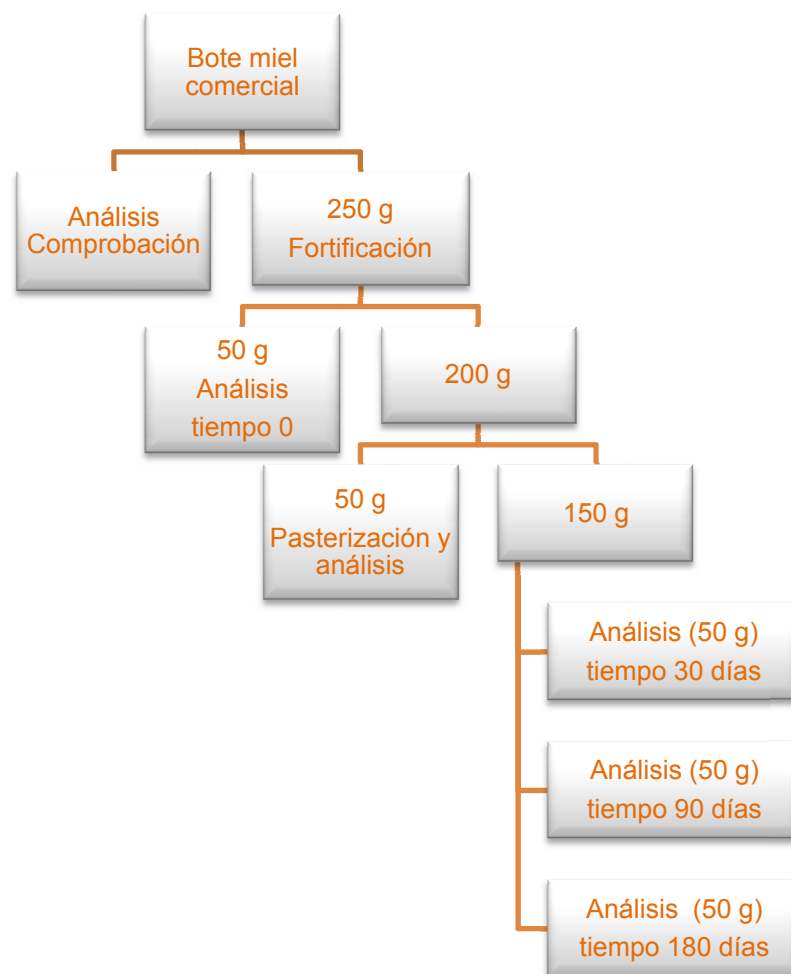
Por otro lado, con objeto de explicar la diferente degradación de las tetraciclinas en diversas mieles, se ha realizado un estudio más exhaustivo sobre la influencia de las características físico-químicas de la miel en la degradación de las cuatro tetraciclinas. Para ello se han determinado los siguientes parámetros físico-químicos: humedad, conductividad eléctrica, pH, acidez libre, acidez láctónica,

acidez total y color (parámetros L, a, b, c, H), y se ha realizado posteriormente un análisis estadístico basado en matrices de correlación.

Para efectuar las mediciones de los parámetros de humedad, conductividad eléctrica, pH, acidez libre, acidez láctica y acidez total se ha seguido la metodología oficial descrita en el método oficial de análisis para la miel (BOE, 1986).

Para medir los parámetros de color las muestras de miel, es necesario depositarlas en cubeta de cuarzo de 1 cm y sellarlas con *parafilm*. Dado su estado sólido, la muestra es llevada a una estufa de incubación a una temperatura de 40° C, el tiempo suficiente para alcanzar su licuación. Posteriormente, y a temperatura ambiente, se realiza la medida de los espectros en un espectrofotómetro, entre 380 y 780 nm, cada 1 nm. Se utiliza el iluminante D65 y el observador patrón CIE64, de 10° en la determinación del color según el método de la CIE (CIE, 1986).

Figura 22. Organigrama con el diseño cronológico del estudio de degradación.



4.5. Estudio estabilidad de flumetrina en la colmena

Se ha realizado un estudio para conocer la estabilidad de flumetrina en miel procedente del tratamiento con Bayvarol® en la propia colmena.

Para ello, se trataron con Bayvarol®, cinco colmenas de un mismo colmenar ubicado en la localidad zaragozana de Litago. El producto Bayvarol® se aplica mediante tiras que contienen 3,6 mg de flumetrina/tira. Las tiras se colocaron en el interior de la colmena, tanto sobre panales con cámara de cría, como sobre panales alejados de estas zonas, durante un periodo de 6 semanas. El resto de colmenas (5) quedaron como colmenas control.

El colmenar elegido no había sido tratado con flumetrina ni con fluvalinato anteriormente y, de esta manera, se eliminó la posibilidad de la aparición de resistencias a la flumetrina, o resistencias cruzadas debidas al fluvalinato, sustancia activa de la misma familia que la flumetrina, ambos piretroides indicados para la lucha contra la varroosis, tal como se ha señalado anteriormente.

Previamente al tratamiento veterinario con flumetrina, se sustrajeron trozos de panal de unos 8 cm de largo por 5 cm de ancho, de los cuales se extrajo la miel, que sirvió como referencia y blanco matriz en el posterior proceso analítico. Esta miel fue almacenada en congelación (-20° C) hasta su posterior análisis.

Tras esperar las seis semanas indicadas en el prospecto, se retiraron las diversas tiras y se sustrajeron trozos de panal (8 x 5 cm), tanto de las zonas próximas a la ubicación de las tiras como de los panales más alejados a éstas.

La miel fue separada del panal por procesos puramente físicos. Para ello, la muestra se coloca sobre un colador y se presiona cuidadosamente con una varilla de vidrio para hacer pasar la miel a través de la malla sin arrastrar impurezas, obteniendo de esta manera una miel fluida, limpia y evitando cualquier posible alteración de la sustancia activa debida a la temperatura. Esta miel fue almacenada inmediatamente en congelación (-20° C).

Ocho semanas después de la aplicación del tratamiento, se repitió la misma operación, retirándose los trozos de las zonas más próximas a las tiras y de los panales más alejados a éstas para posteriormente extraer la miel. A continuación, se procedió al análisis de las mismas. Para ello, se utilizó el método de extracción de residuos de flumetrina, fluvalinato, cumafós, bromopropilato y 4,4'-dibromobenzofenona optimizado y validado en esta tesis.

4.6. Análisis de residuos de acaricidas de síntesis en muestras de miel

Se han analizado 20 muestras de miel cruda, de diferentes orígenes botánicos y geográficos, procedentes de colmenas de la Comunidad Autónoma de Aragón, recogidas entre los años 2005 y 2007, con la finalidad de determinar el contenido de residuos de acaricidas de síntesis, en base a un control rutinario efectuado por técnicos de ADSs apícolas de nuestra comunidad.

Al hallarse las muestras en un buen estado de limpieza, no fue necesario realizar ningún acondicionamiento previo de la miel, procediéndose directamente a la extracción de los analitos.

El análisis de las mieles se ha llevado a cabo en la primera semana tras su recepción y siguiendo la metodología descrita en esta tesis para la determinación de residuos de flumetrina, fluvalinato, cumafós, bromopropilato y 4,4'-dibromobenzofenona y que de un modo resumido se describe a continuación.

Se pesan 5 g de miel en un vaso de precipitados, se añaden 15 ml de una solución de metanol-agua (1:1, v/v) y se homogeniza. Acondicionado de la columna de C₁₈ (0,5 g) con 2 ml de metanol, 2 ml de agua MiliQ y 5 ml de solución de metanol-agua (1:1, v/v) metanol y agua (1:1, v/v). Posteriormente, se carga la solución de la muestra en la columna, se lava con solvente metanol:agua (3 x 3 ml), y se seca. Tras este proceso se cambian las guías del *Vacuum Manifold* y se colocan unos cartuchos de sulfato sódico anhidro de 2,5 g. Para la elución de los analitos se utiliza hexano (10 ml) y se lleva a sequedad bajo corriente de nitrógeno. El extracto se reconstituye con metanol (1 ml) y se almacena en congelación (-20°C). La determinación cromatográfica, se lleva a cabo a 25° C, mediante una columna en fase reversa de C₁₈ de 250 mm x 4,6 mm de diámetro y 5 µm de tamaño de partícula y elución en gradiente, a 1 ml/min, con acetonitrilo y agua MiliQ (Tabla 14). La determinación de los diferentes acaricidas se realiza a diferente longitud de onda (Tabla 15). El tiempo de análisis cromatográfico es de 18 minutos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

“Sin abejas, al hombre sólo le quedarían cuatro años de vida. Sin ellas, no hay polinización, ni hierba, ni animales, ni humanidad”. Albert Einstein.

5.1. Puesta a punto y validación del método multiresiduo de análisis tetraciclinas en miel.

5.1.1. Puesta a punto

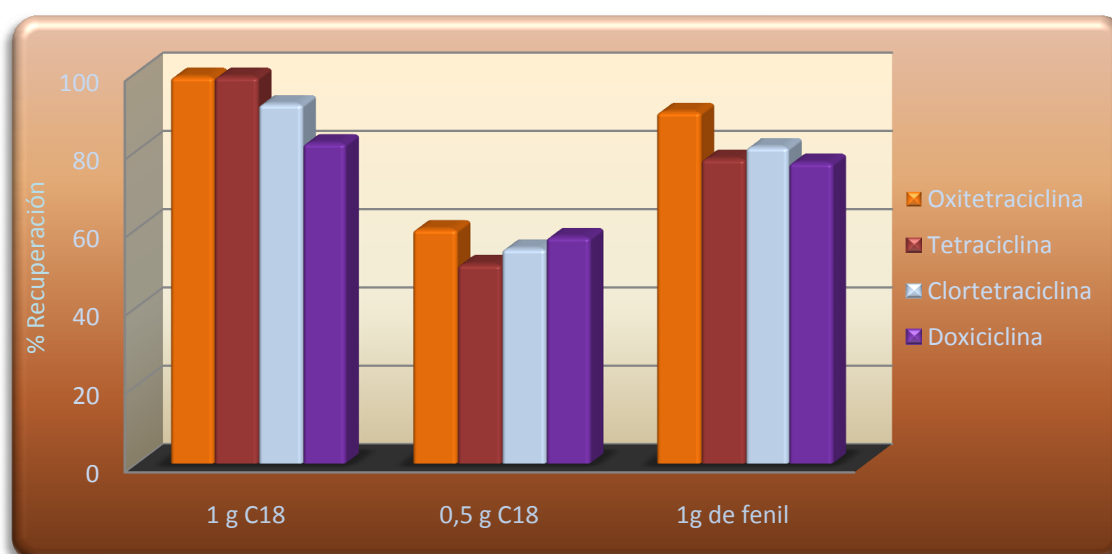
Optimización de la extracción en fase sólida

Se han ensayado diversas modificaciones en los estudios de puesta a punto para la etapa de extracción. En síntesis, los mejores resultados se consiguieron no sometiendo a filtración la muestra disuelta; cargándola en una columna de 1g de C₁₈; no realizando lavado de columna; eluyendo los analitos con 13 ml de acetato de etilo:metanol (9:1); y realizando una filtración positiva del extracto con un filtro de membrana de 0,22 µm.

- Elección de la fase sólida:

Dada la polaridad de los analitos y de la matriz, las fases sólidas ensayadas fueron de naturaleza apolar: 1g de C₁₈, 0,5 g de C₁₈ y 1g de fenil. Los mejores porcentajes de recuperación, como se puede apreciar en la figura 23, se obtuvieron con la columna de 1 g de C₁₈ (82-99%).

Figura 23. Porcentaje de recuperación de las tetraciclinas usando diferentes tipos de fases sólidas.



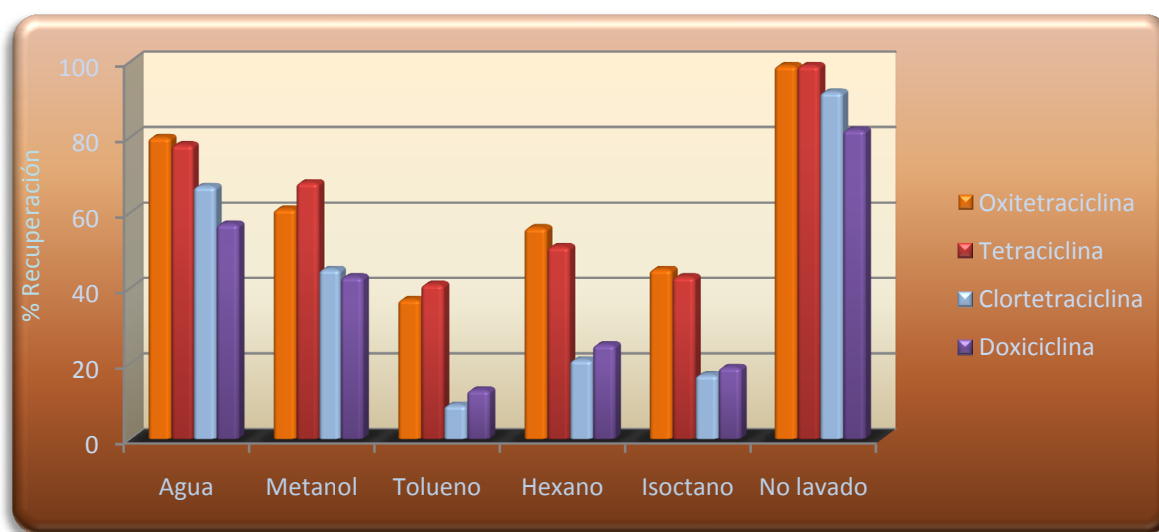
Estos resultados coinciden con la mayoría de investigadores, que utilizan principalmente fases apolares, en particular C₁₈ (Münstedt *et al.*, 2005; Wan *et al.*, 2005; Viñas *et al.*, 2004; USDA, 2003; Pagliuca *et al.*, 2002; Oka *et al.*, 1994, 1993; Nakaya *et al.*, 1991 y Takeba *et al.*, 1984). Sin embargo, algunos autores como Nakazawa *et al.* (1999) emplean columnas polares como la ENV⁺ (indicada principalmente para matrices orgánicas y no para acuosas como una disolución de miel). Otros autores emplean un tándem de columnas, primero una columna apolar tipo C₁₈ ó HLB y posteriormente una de intercambio iónico tipo PRS (especialmente indicada para la extracción de analitos en medio básico y no para medio ácido como es nuestro caso) (Pena *et al.*, 2005; Geertsen *et al.*, 1999) o incluso otra apolar (Oka *et al.*, 1994, 1987).

En cuanto a la cantidad de fase sólida que tiene cada columna, principalmente se han utilizado rellenos de 500 mg. Autores que han utilizado columnas HLB como Pena *et al.* (2005) y Pagliuca *et al.* (2002), han empleado rellenos de 60 y 200 mg; otros como Oka *et al.* (1987) emplearon rellenos de 100 y 200 mg. En ningún caso, la bibliografía recoge el empleo de columnas de 1 g de fase sólida, utilizadas en nuestra metodología.

- Elección del solvente de lavado:

La elección de no utilizar lavado, en base a la obtención de unos porcentajes de recuperación más elevados, fue la opción seleccionada (Figura 24), eliminándose además el problema de presentación de dos fases en la elución. Esta elección presenta el inconveniente de que el extracto no está adecuadamente purificado. Para evitar este problema se añade un paso al método consistente en la filtración positiva del eluato mediante un filtro de membrana de 0,22 μm .

Figura 24. Porcentaje de recuperación de las tetraciclinas utilizando diferentes solventes de lavado.



La literatura no describe el problema de separación de fases con el que nos hemos encontrado en este estudio, pero sí menciona que la fase de lavado es clave para obtener extractos lo más purificados posible. Por ello, el hecho de eliminar la fase de lavado supone un cambio en cuanto a la metodología tradicional de la SPE.

En cuanto a la filtración del extracto, algunos autores la realizan antes de cargar la muestra en la columna (Pagliuca *et al.*, 2002; Nakazawa *et al.*, 1999; Oka *et al.*, 1994) incluso la combinan con una centrifugación (USDA, 2003). Otros autores no realizan esta filtración inicial, sustituyéndola por una centrifugación seguida de filtración tras la elución (Geertsen *et al.*, 1999). Incluso algunos autores filtran tanto antes de cargar la columna como después de la elución (Pena *et al.*, 2005) y, por último, otros autores no la realizan en ninguna fase (Viñas *et al.*, 2004). No hay referencias bibliográficas de investigadores que realicen la filtración antes de la elución, tal como se expone en nuestra metodología.

- Elección del tipo y volumen de solvente de elución:

Tras la elección de la columna de extracción en fase sólida se ensayaron diversos solventes de elución (acetonitrilo, metanol, ácido oxálico y acetato de etilo) así como diferentes volúmenes (6, 10 y 13 ml). El solvente de elución más adecuado fue la mezcla acetato de etilo:metanol (9:1, v/v) (Figura 25). Con esta mezcla el volumen de elución óptimo es el de 13 ml (figura 26).

Figura 25. Porcentaje de recuperación de las tetraciclinas con distintos solventes utilizados para la elución de las tetraciclinas de las columnas SPE.

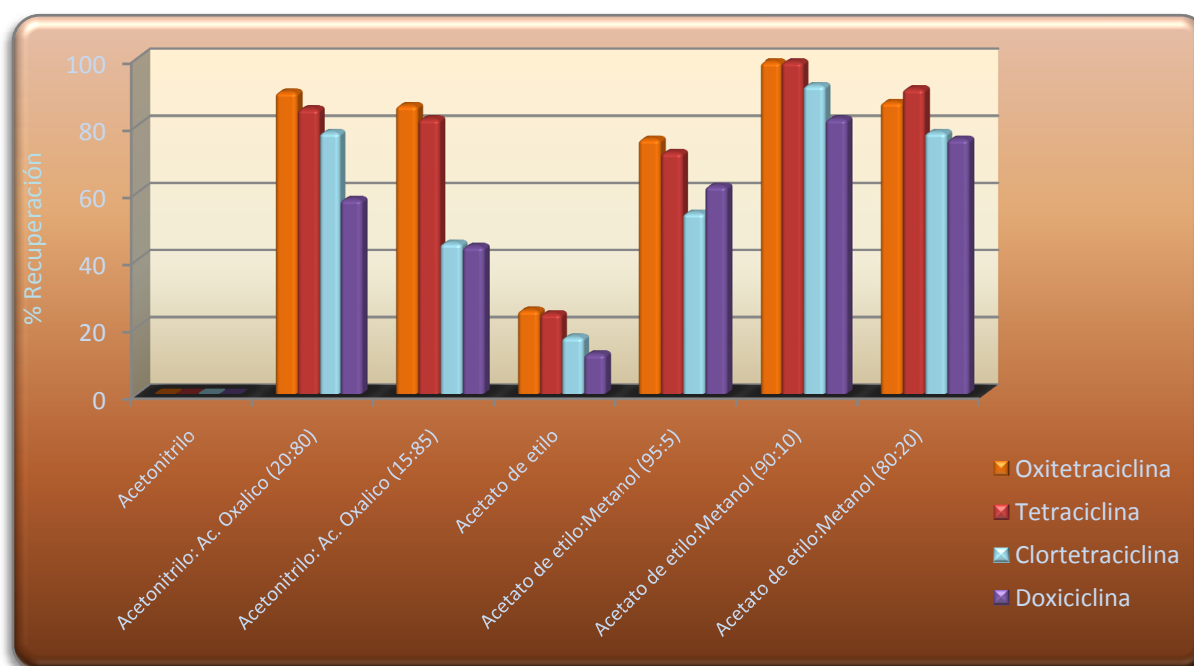
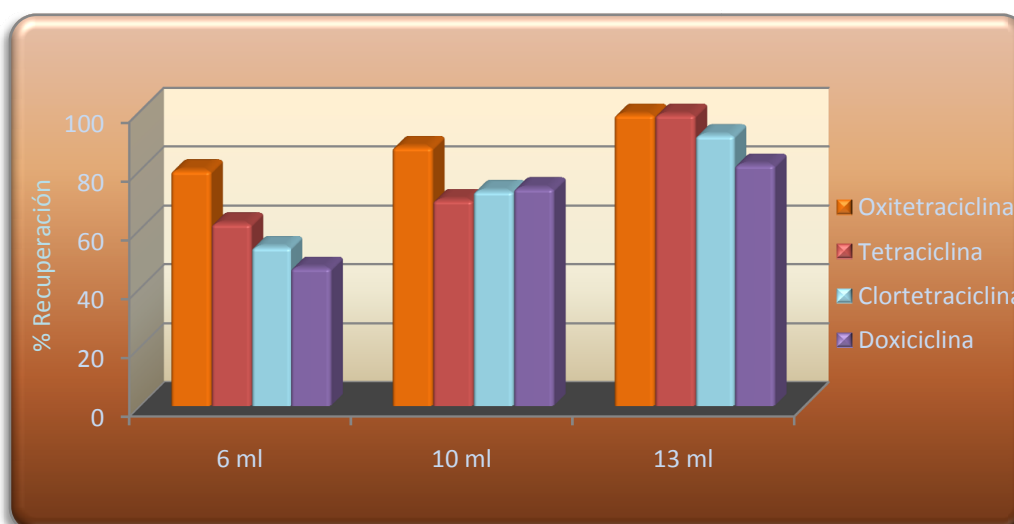


Figura 26. Porcentaje de recuperación de las tetraciclinas con diferentes volúmenes de elución de acetato de etilo:metanol (9:1, v/v).



El tipo de tetraciclina, así como la utilización de una fase sólida u otra, condiciona la elección del solvente de elución. En la literatura consultada, los solventes de elución utilizados son acetonitrilo, metanol, ácido oxálico, agua y acetato de etilo, bien individualmente o en mezcla.

Viñas *et al.* (2004); Nakazawa *et al.* (1999) y Oka *et al.* (1994), determinaron las mismas tetraciclinas que en esta tesis, si bien sólo el grupo de Oka utilizó C₁₈. El empleo de una mezcla de metanol y acetato de etilo, debido a su adecuada polaridad la convierten en el solvente de elución elegido por nuestro laboratorio para la determinación de las 4 tetraciclinas utilizando C₁₈. Esta mezcla también es la utilizada por Oka *et al.*, (1987) y Geertsen *et al.* (1999) si bien estos autores utilizaron dos columnas en tándem (C₁₈-COOH y C₁₈-PRS, respectivamente). Por su parte, Viñas *et al.*, (2004) también utilizan esta misma mezcla de solvente, aunque utilizan fenil como fase sólida.

Algunas de las tetraciclinas estudiadas en esta tesis han sido analizadas mediante diversas columnas solas o en tándem y solventes de elución como el metanol (Münstedt *et al.*, 2005; Nakazawa *et al.*, 1999; Oka *et al.*, 1994, y Takeba *et al.*, 1984), metanol-agua (Wan *et al.*, 2005), metanol-ácido oxálico (USDA, 2003), acetonitrilo-ácido oxálico (Pena *et al.*, 2005) o el acetato de etilo (Pagliuca *et al.*, 2002).

Optimización de la determinación cromatográfica

- Elección de la fase móvil:

Se ensayaron diferentes fases móviles, condiciones de flujo (isocrático/gradiente), así como tipos y concentraciones de solventes (metanol, agua, ácido oxálico, acetonitrilo).

Sólo la fase móvil constituida por acetonitrilo y ácido oxálico 0,01 M consiguió una buena resolución de todos los analitos, pero no con todos los gradientes ensayados. El gradiente de elución óptimo fue el siguiente: 12% de acetonitrilo hasta los 3 min., 20% hasta los 20 min, 25% hasta los 23 min y 15% hasta los 25 min. También dio buen resultado el gradiente: 10% de acetonitrilo hasta los 3 min., 15% hasta los 15 min, 20% hasta los 30 min y 25% hasta los 55 min, aunque el tiempo de análisis es superior a 1 hora.

- Elección del pH de la fase móvil:

Una vez elegida la fase móvil, se ensayaron diferentes pH: 2,5, 3 y 3,5. A medida que se acidifica la fase móvil las tetraciclinas eluyen más tarde y sus picos se resuelven peor. Además, hay que tener en cuenta que pH muy ácidos acortan la vida útil de la columna.

Como se puede observar en la tabla 19, la fase móvil a pH = 3 proporciona la mejor resolución de las cuatro tetraciclinas. Aunque el resto de pH no da malos resultados.

Tabla 19. Tiempo de retención relativo (TRR) a la oxitetraciclina (OTC) según el pH de la fase móvil.

pH \ TRR	OTC	TC	CTC	DC
2,5	1	1,2	2,2	2,4
3	1	1,2	1,8	2,1
3,5	1	1,2	1,7	1,9

En términos generales, el análisis cromatográfico de tetraciclinas se suele utilizar un 80% de disolución ácida y el 20% restante, metanol, acetonitrilo o ambos. Además, al igual que en nuestro caso, el pH de estas fases móviles siempre está comprendido entre 2 y 4 (Wan *et al.*, 2005; Geertsen *et al.*, 2004; Viñas *et al.*, 2004; Pagliuca *et al.*, 2002; Oka *et al.*, 1994; Argauer *et al.*, 1991; Jürgens *et al.*, 1981).

El flujo de estas fases móviles suele ser de 1 ml/min e isocrático (Pena *et al.*, 2005; Pagliuca *et al.*, 2002; Oka *et al.*, 1987, 1994; Sporns *et al.*, 1986). El hecho de que estos autores hayan elegido este tipo de flujo radica en que solamente determinan una tetraciclina siendo su tiempo de análisis inferior a los 15 minutos. Oka *et al.* (1994), utilizaron un flujo de 1 ml/min e isocrático para determinar las mismas tetraciclinas que se han estudiado en esta tesis (oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina y doxiciclina) y la duración del análisis fue de una hora. Con el flujo en gradiente se ha conseguido detectar diferentes tetraciclinas en la misma inyección y además acortar el tiempo de análisis a menos de 30 minutos. Este tipo de flujo, así como tiempos de análisis similares a los nuestros, han sido descritos por Viñas *et al.* (2004).

A modo recopilatorio en la siguiente tabla se presentan las modificaciones realizadas en esta tesis sobre el método original de Oka *et al.* (1987).

Tabla 20. Variaciones introducidas por nuestro laboratorio en el método original.

Método Oka <i>et al.</i> (1987)	Método optimizado en este estudio										
5 g de miel en 20 ml de 0,1 N Na ₂ EDTA-tampón Mcllvine pH 4	3 g de miel en 6 ml de 0,1 N Na ₂ EDTA-tampón Mcllvine pH 4										
Activación y acondicionamiento: metanol y agua y 10 ml de disolución de Na ₂ EDTA saturada.	Activación y acondicionamiento: 5 ml acetonitrilo y 5 ml disolución ácido oxálico y 5 ml de disolución de Na ₂ EDTA saturada.										
Filtración de la muestra disuelta											
Columna SPE: Baker 10 C ₁₈ de 100 mg	Columna SPE: Isolute C ₁₈ de 1 g										
Lavado 20 ml agua	No lavado										
Corriente de aire seco en <i>Vacumm Manifold</i> 5min	Aplicación de vacío en <i>Vacumm Manifold</i> 5 min										
Elución 50 ml acetato de etilo	Elución 13 ml acetato de etilo- metanol (9:1)										
Columna SPE: Baker 10 COOH	Corriente de N ₂ para llevar a sequedad el eluato										
Lavado 10 ml metanol	Reconstitución extracto con 1 ml acetonitrilo-acido oxálico (15:85)										
Elución 10 ml metanol-acetonitrilo-acido oxálico	Filtración del extracto										
Columna: C ₈ de 250 mm x 4,6 mm x 5µm	Columna: C ₁₈ 250 mm x 4,1 mm x 5µm										
FM: metanol-acetonitrilo-acido oxálico (1:1,5:3)	Fase móvil: acetonitrilo-acido oxálico (15:85)										
Volumen de inyección 100 µl	Volumen de inyección 20 µl										
<ul style="list-style-type: none"> Gradiente de elución: Isocrático 	<ul style="list-style-type: none"> Gradiente de elución: <table border="1"> <thead> <tr> <th>Tiempo (minutos)</th> <th>% solvente Acetonitrilo</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>3</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td>13</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>23</td> <td>25</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>15</td> </tr> </tbody> </table>	Tiempo (minutos)	% solvente Acetonitrilo	3	12	13	20	23	25	25	15
Tiempo (minutos)	% solvente Acetonitrilo										
3	12										
13	20										
23	25										
25	15										
Longitud de onda de lectura 350 nm	Longitud de onda de lectura 357 nm										

El método analítico para la determinación y cuantificación de tetraciclinas propuesto en esta tesis, tras haber realizado los ensayos descritos con diferentes fases sólidas de extracción, solventes y volúmenes de elución, y fases móviles para la determinación cromatográfica, es el que se describe a continuación.

Tras homogeneizar la muestra de miel a analizar, se pesan 3 g de la misma y se disuelven con 6 ml de tampón Na_2EDTA -McIlvaine 0,1N, pH 4. La solución resultante se homogeneiza en un agitador a 800 rpm durante 10 minutos.

La solución homogeneizada de la muestra se carga en una columna de 1g de C_{18} , previamente acondicionada y activada con 5 ml de acetonitrilo, 5 ml de ácido oxálico a pH 3 y 5 ml de disolución saturada de Na_2EDTA , sometiendo a una extracción en fase sólida. La elución se lleva a cabo con 13 ml de metanol en acetato de etilo al 10% (v/v). No se realiza lavado.

Tras la elución, el eluato se concentra a sequedad en un *Vacuum Manifold*, bajo corriente de nitrógeno y, finalmente, se reconstituye con 1 ml de acetonitrilo:ácido oxálico a pH 3 (15:85) (v/v), solventes que más tarde se usarán como fase móvil en la determinación cromatográfica por HPLC-DAD. Para lograr una buena reconstitución del eluato, se homogeneiza en rotatubos durante 3 minutos, evitando así que los analitos queden adheridos a las paredes de los tubos cónicos en que se recoge el eluato. El extracto se filtra a través de una membrana de 0,22 μm y se transvasa a un vial ámbar para su posterior análisis. La separación cromatográfica se lleva a cabo a 25°C, mediante una columna en fase reversa de C_{18} de 250 mm de longitud, 4,1 mm de diámetro interno, y 5 μm de tamaño de partícula. Se realiza una elución en gradiente, a 1 ml/min, con acetonitrilo y ácido oxálico 0,01M, pH 3 (Tabla 20). La figura 27 muestra los espectros de absorción en tres dimensiones de las cuatro tetraciclinas estudiadas. La determinación de las diferentes tetraciclinas se realiza a una longitud de onda (λ) de 357 nm. El tiempo de análisis cromatográfico es de 25 minutos.

En las figuras 28a y 28b se muestran sendos cromatogramas de una miel exenta de analitos a concentraciones detectables (blanco matriz), así como de esa misma miel fortificada con los analitos oxitetraciclina (OTC), tetraciclina (TC), clortetraciclina (CTC) y doxiciclina (DC), a la concentración de 0,35 $\mu\text{g/g}$ de miel. Como se puede apreciar, no existen interferencias de los componentes de la matriz con los picos de los analitos.

Figura 27. Espectros de absorción en tres dimensiones de las cuatro tetraciclinas estudiadas.

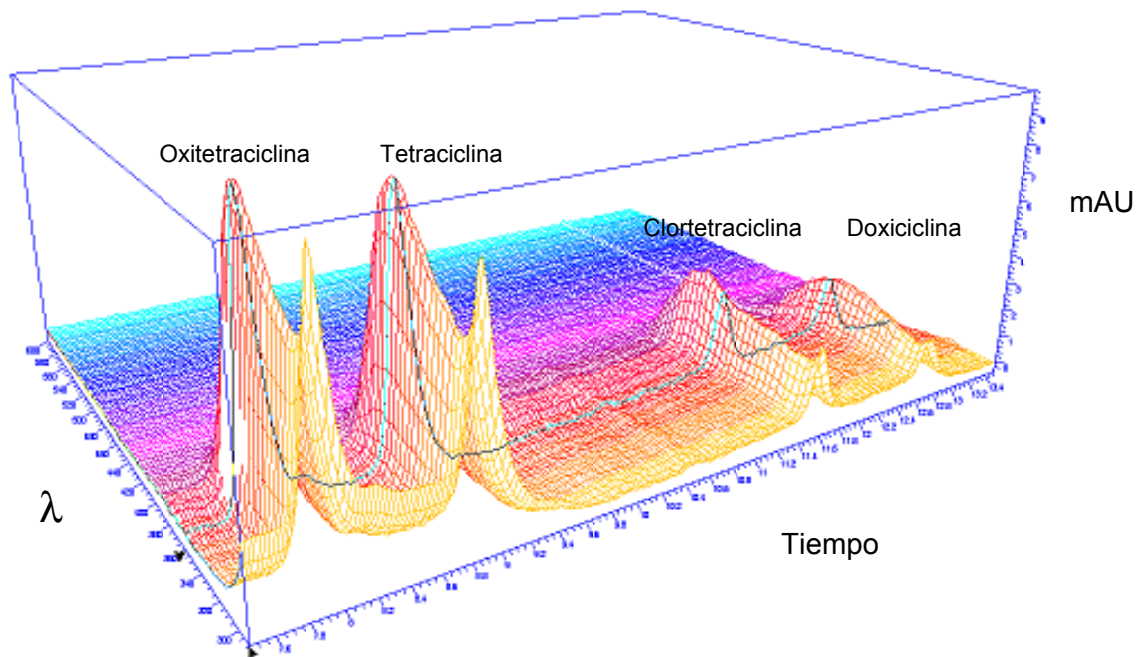


Figura 28a: Cromatograma matriz de miel (λ 350 nm).

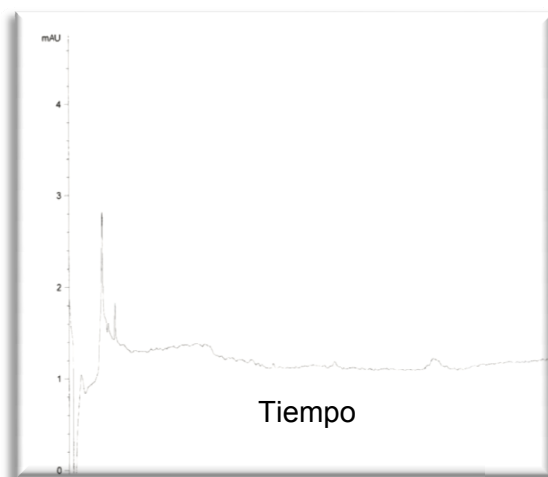
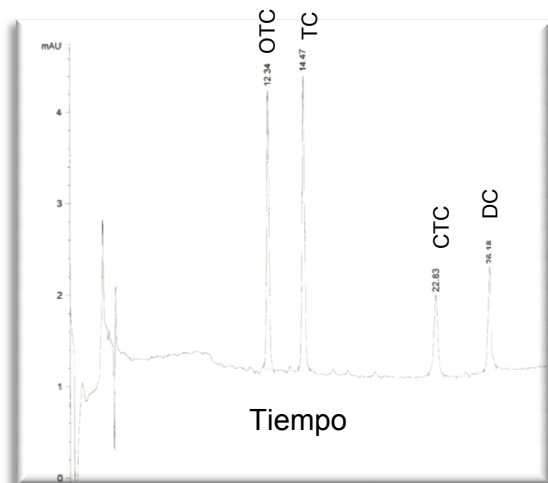


Figura 28b: Cromatograma matriz de miel fortificada a 0,35 $\mu\text{g/g}$ de miel con las 4 tetraciclinas (λ 350 nm).



OTC: Oxitetraciclina (Tiempo retención: 12,34 min).

TC: Tetraciclina (Tiempo retención: 14,47 min).

CTC: Clortetraciclina (Tiempo retención: 22,83 min).

DC: Doxiciclina (Tiempo retención: 26,83 min).

5.1.2. Validación método para el análisis de residuos de tetraciclinas en miel

Estudio de los rangos de respuesta lineal

En la determinación del rango de respuesta lineal se han seguido los criterios que recomienda *The Food and Drug Administration* de EE.UU. (1994), que considera lineal el rango de concentraciones de un compuesto para las que el factor respuesta (FR) es constante dentro de un margen del $\pm 10\%$.

Los resultados de nuestro estudio de los rangos de respuesta lineal se muestran en la tabla 22. De igual manera, en las figuras 29-32 se puede apreciar gráficamente los rangos dinámico y lineal del método para la oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina y doxiciclina. En dichos gráficos se observa cómo la linealidad para las cuatro tetraciclinas se mantiene en todo el rango de concentraciones estudiado y por consiguiente dentro del margen de variación permitido.

Figura 29. Estudio del rango dinámico y lineal de oxitetraciclina.

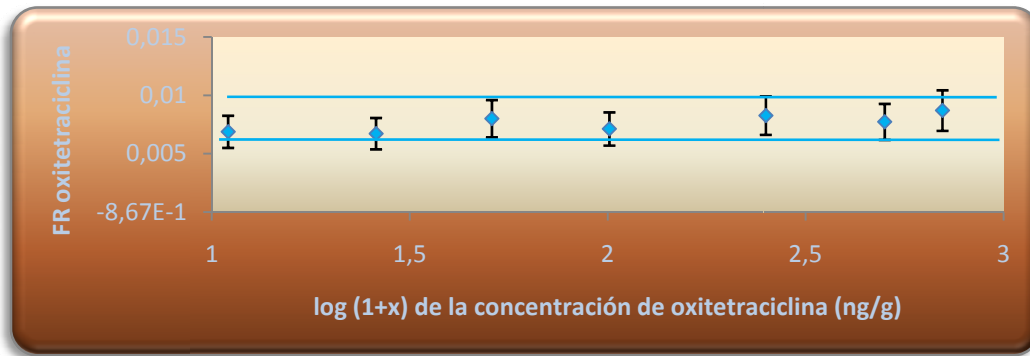


Figura 30. Estudio del rango dinámico y lineal de tetraciclina.

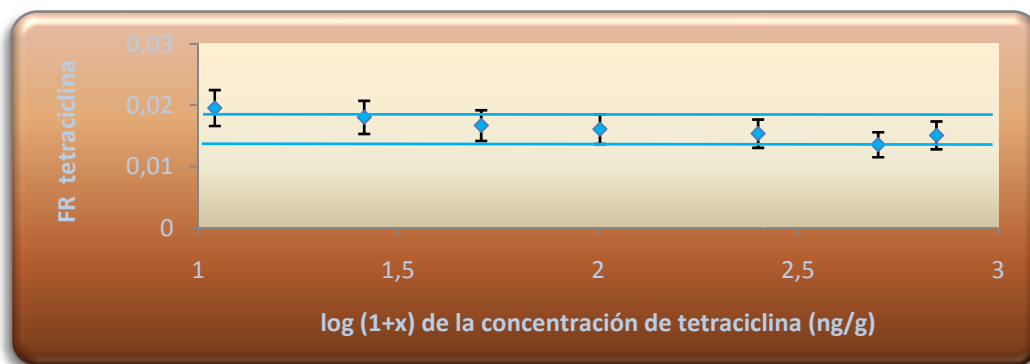


Figura 31. Estudio del rango dinámico y lineal de clortetraciclina.

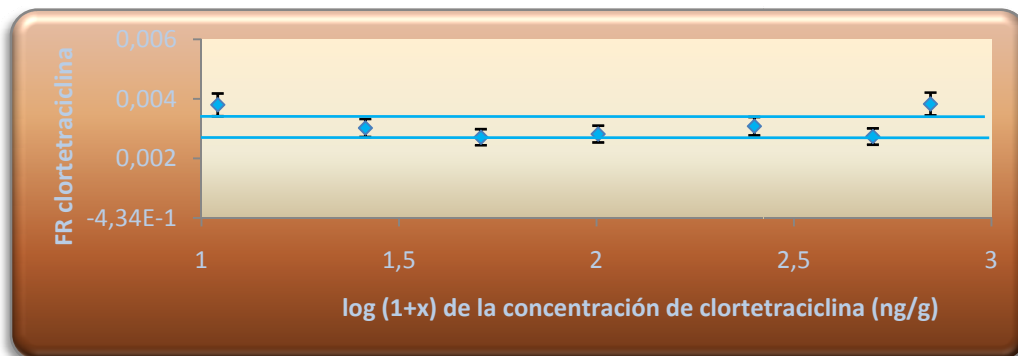
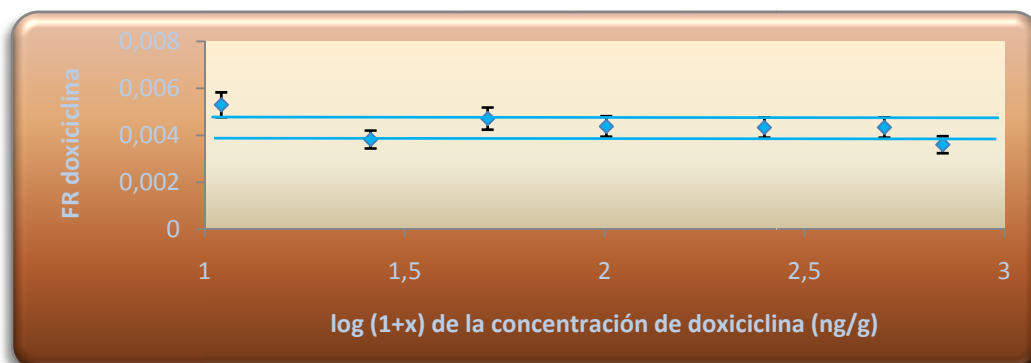


Figura 32. Estudio del rango dinámico y lineal de doxiciclina.



Estudio de la precisión y exactitud del método

Se ha seguido la metodología descrita en el apartado 4.2.4. Validación del método analítico. Conforme a *The Food and Drug Administration* de EE.UU. (1994), se aceptan coeficientes de variación inferiores al 20% en los estudios de precisión y recuperaciones comprendidas entre el 80 y el 110% (para fracciones de masa superiores a 10 µg/kg). Como se puede apreciar en la tabla 22, tanto los resultados de recuperación como los de repetibilidad y reproducibilidad, se hallan comprendidos dentro de estos márgenes.

Estudio de la sensibilidad: determinación de los límites de detección y cuantificación

Para establecer los límites de detección y cuantificación se ha partido de los resultados obtenidos en el estudio de los rangos de respuesta dinámico y lineal. Además, se ha tenido en cuenta la presencia de interferencias coincidentes con los analitos en los cromatogramas de los análisis blancos. En la tabla 21 se muestran estos límites expresados en ng/g miel, para los cuatros analitos de este estudio.

El límite que da una señal tres veces mayor que el ruido de fondo del detector del HPLC para estos antibióticos en la miel, representa el límite de detección absoluto de nuestro equipo (LDA), expresado en nanogramos (Tabla 21).

Tabla 21. Rango lineal, límite de detección absoluto (LDA), límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).

	Rango lineal (ng/g miel)	LDA (ng)	LD (ng/g miel)	LC (ng/g miel)
OTC	700-5	0,01	1	5
TC	700-5	0,01	1	5
CTC	700-5	0,01	1	5
DC	700-5	0,01	1	5

OTC: oxitetraciclina; TC: tetraciclina; CTC: clortetraciclina; DC: doxiciclina

Tabla 22. Resultados de precisión y exactitud del estudio de validación

	Repetibilidad (%C.V.)	Reproducibilidad (%C.V.)	Recuperación (%)	
			(50 ng/g miel)	(350 ng/g miel)
OTC	4,4	8,9	99	99,6
TC	8,4	6,9	99	102,4
CTC	8,4	7,7	96	102,2
DC	7,3	8,6	82	100,4

OTC: oxitetraciclina; TC: tetraciclina; CTC: clortetraciclina; DC: doxiciclina

CV: coeficiente de variación

La validación de métodos analíticos para la determinación de residuos de tetraciclinas en miel de acuerdo con criterios internacionales, aún por extraño que parezca, es bastante inusual fuera de los laboratorios oficiales de control. Como excepción cabe citar los trabajos de Pena *et al.* (2005); Diéguez *et al.* (1999) y Geertsen *et al.* (1999) quienes han realizado estudios de validación (linealidad, sensibilidad y exactitud) para la determinación de residuos de oxitetraciclina y tetraciclina en miel.

Los resultados de linealidad obtenidos en nuestro laboratorio, para la oxitetraciclina y la tetraciclina son similares a los encontrados en la bibliografía mencionada anteriormente (Pena *et al.*, 2005; Diéguez *et al.*, 1999), si bien el límite inferior en nuestro caso es menor al mencionado por dichos autores (5 ng/g de miel frente a 25 y 50 ng/g, indistintamente). En el caso de clortetraciclina y doxiciclina, sólo Viñas *et al.* (2004), aportan datos referentes a la linealidad (100-850 ng/ml).

Parámetros relacionados con la sensibilidad de los métodos analíticos (LD, LC, $CC\alpha$ y $CC\beta$), sí que están ampliamente difundidos en la literatura científica. La sensibilidad de los diferentes métodos empleados en la determinación de tetraciclinas en miel está comprendida entre 1 y 100 ng/g de miel (Tabla 11). Límites de detección similares a los mencionados en esta tesis son los descritos por Wan *et al.* (2005), para OTC, TC y MTC (1-5 ng/g miel) y por Nakazawa *et al.* (1999), para OTC, TC, CTC y DC (1-4 ng/g miel).

Además de Wan *et al.* (2005), otros autores que emplean técnicas de extracción y determinación comparables a las nuestras obtienen límites de detección superiores,

como por ejemplo, Münstedt *et al.* (2005), para OTC (25 ng/g); ó Viñas *et al.* (2004), para OTC, TC, CTC y DC (15-30 ng/g); ó Pagliuca *et al.* (2002), para OTC (25 ng/g); ó Geertsen *et al.* (1999), para OTC, TC, CTC (12-36 ng/g) y finalmente Oka *et al.* (1987) para OTC, TC, CTC y DC (20-50 ng/g).

En relación a los límites de cuantificación, los límites obtenidos por otros investigadores son ligeramente superiores a los conseguidos en nuestro laboratorio (5 ng/g): Pagliuca *et al.* (2002) obtiene 50 ng/g para OTC; Geertsen *et al.* (1999), 24-72 ng/g para OTC, TC, CTC y Nakazawa *et al.* (1999), 50 ng/g miel para OTC, TC, CTC y DC, si bien este último conviene recordar nuevamente que utiliza una determinación mediante APCI LC-MS-MS. Pena *et al.* (2005), utilizando un detector de fluorescencia, determinan los parámetros de sensibilidad $CC\alpha$ y $CC\beta$ para OTC y TC siendo éstos de 20 y 50 ng/g miel, respectivamente.

Los porcentajes de recuperación para otros investigadores, empleando la misma técnica de extracción de tetraciclinas en miel que se describe en esta tesis (SPE), se hallan comprendidos entre 64 y 122% (Tabla 11). En nuestro estudio se han conseguido valores entre el 82 y 99% (al nivel más bajo de fortificación, 50 ng/g miel).

Tan sólo tres equipos de investigación (Viñas *et al.*, 2004; Nakazawa *et al.*, 1999 y Oka *et al.*, 1994, 1993, 1987) realizan estudios de recuperación de forma conjunta para oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina y doxiciclina en miel. Los porcentajes de recuperación obtenidos por Nakazawa *et al.* (1999) no estarían de acuerdo con la normativa europea, ya que obtienen valores inferiores al 80%. El método descrito por Oka *et al.* (1994, 1993, 1987) consigue porcentajes de recuperación entre 81 y 97%, si bien emplean para la extracción de las tetraciclinas un tándem de dos columnas de SPE, con lo que el método es más complejo, de mayor duración y coste.

Otros datos de recuperación de tetraciclinas, según diversos autores, son: 92-122% para OTC y TC (Wan *et al.*, 2005); 86-95% para OTC y TC (Pena *et al.*, 2005); 82% para OTC (Pagliuca *et al.*, 2002), y 75-94% para OTC, TC y CTC (Geertsen *et al.*, 1999). Al igual que en nuestro caso, el límite inferior de los porcentajes de recuperación de todos aquellos autores que han determinado clortetraciclina y doxiciclina se corresponden con valores de recuperación superiores al 80% (Viñas *et al.*, 2004; Geertsen *et al.*, 1999; Nakazawa *et al.*, 1999; Oka *et al.*, 1994, 1993, 1987).

5.2. Puesta a punto y validación del método multirresiduo de análisis de acaricidas de síntesis en miel.

5.2.1. Puesta a punto

Aplicando directamente en nuestro laboratorio las condiciones de extracción establecidas en el método de Gomis *et al.* (1996), los resultados que se obtuvieron para el conjunto de los acaricidas no fueron del todo positivos. Sólo en el caso de la 4,4'-dibromobenzofenona el porcentaje de recuperación se hallaba por encima del 80%, valor mínimo fijado por la Decisión 657/2002/CE para cantidades superiores o iguales a 10 µg/kg. Por este motivo se procedió a la optimización de este método en base a algunas modificaciones del mismo.

Optimización de la extracción en fase sólida

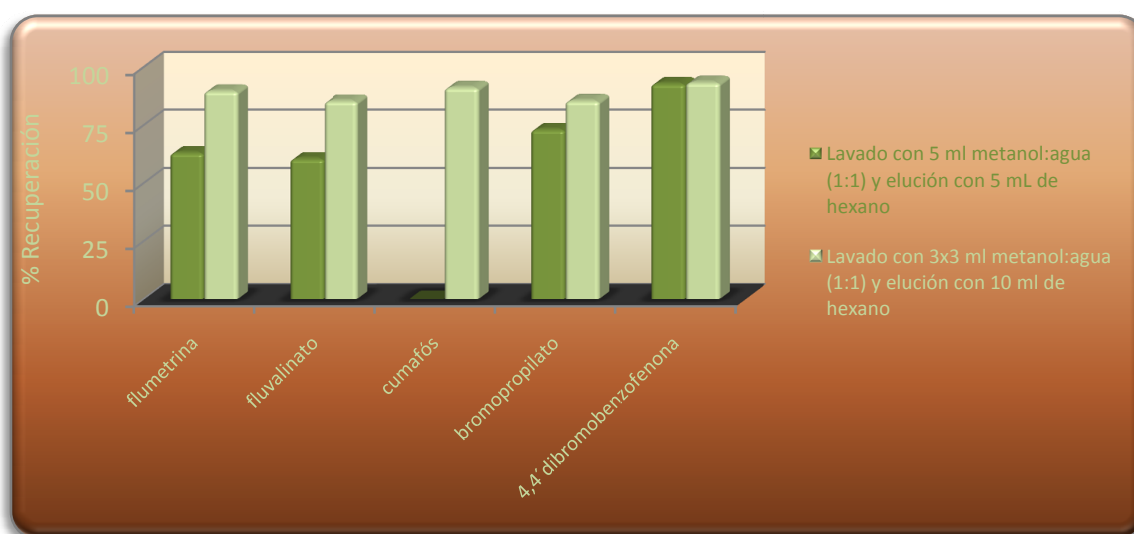
Los principales problemas que se plantearon en la fase de extracción fueron la aparición de una fina capa adherente a las paredes del tubo cónico de vidrio, eliminación de impurezas interferentes con los analitos en el eluato, así como del agua presente en el eluato final (separación de fases). A modo de síntesis, los mejores resultados se consiguieron lavando la columna de 0,5 g de C₁₈ con 3 x 3 ml de metanol:agua (1:1), utilizando cartuchos de Na₂SO₄ y eluyendo los analitos de la columna con 10 ml de hexano.

La naturaleza de la fase sólida elegida en la mayoría de los casos es apolar (C₁₈), aunque algunos autores como Jansson *et al.* (2000) emplean columnas polares como la ENV⁺ (fase adsorbente indicada principalmente para matrices orgánicas y no para acuosas como una disolución de miel) (ver árbol decisiones del apartado 3.6.2.2. sobre técnica de SPE). Otros autores emplean columnas de Florisil (fase adsorbente indicada principalmente para matrices no polares con analitos polares) (Bernal *et al.*, 2000; Jiménez *et al.*, 1998).

- Elección del volumen de lavado y del volumen de solvente de elución:

Con la finalidad de mejorar el porcentaje de recuperación del método descrito por Gomis *et al.* (1996) y que el extracto estuviera lo más purificado posible, se ensayaron diversos volúmenes de lavado y de elución. La elección de utilizar un volumen de 9 ml fraccionado en 3 veces (3 x 3 ml) y eluir con un volumen de 10 ml, obtuvo los mejores porcentajes de recuperación (figura 33).

Figura 33. Porcentaje de recuperación de diferentes acaricidas según el volumen de lavado y el volumen de elución.



El tipo del tipo de acaricida a detectar, así como la utilización de una fase estacionaria u otra, condiciona la elección tanto del disolvente de lavado, como del disolvente de elución. Según la literatura consultada los solventes de lavado son al agua y el metanol y los solventes de elución, ya sean en mezcla o solos, son hexano, acetato de etilo, cloruro de metilo, acetonitrilo, metanol y diclorometano (Herrera *et al.*, 2005; Blasco *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2002, 1997 y 1993; Tsigouri *et al.*, 2001; Korta *et al.*, 2001; Jansson, 2000; Bernal *et al.*, 2000; Jiménez *et al.*, 1998; Tsipi *et al.*, 1999; Bogdanov *et al.*, 1998; Blanco-Gomis *et al.*, 1996).

El solvente de lavado elegido en nuestro trabajo ha sido agua-metanol, coincidiendo con la mayoría de las citas consultadas por nosotros.

Para eluir cumafós, fluvalinato y bromopropilato se utilizan eluyentes como hexano (Blanco-Gomis *et al.*, 1996, Lodesani *et al.*, 1992) o hexano/diclorometano (Fernández *et al.*, 1997 y 1993). Lodesani *et al.* (1992) utilizan cloruro de metilo para eluir fluvalinato, en cambio Tsiguri *et al.* (2001) emplean el diclorometano para eluir este acaricida. Además, Bogdanov *et al.* (1998) aplican una mezcla de eluyentes (hexano/acetato de etilo) para la extracción de bromopropilato, cumafós, fluvalinato y flumetrina.

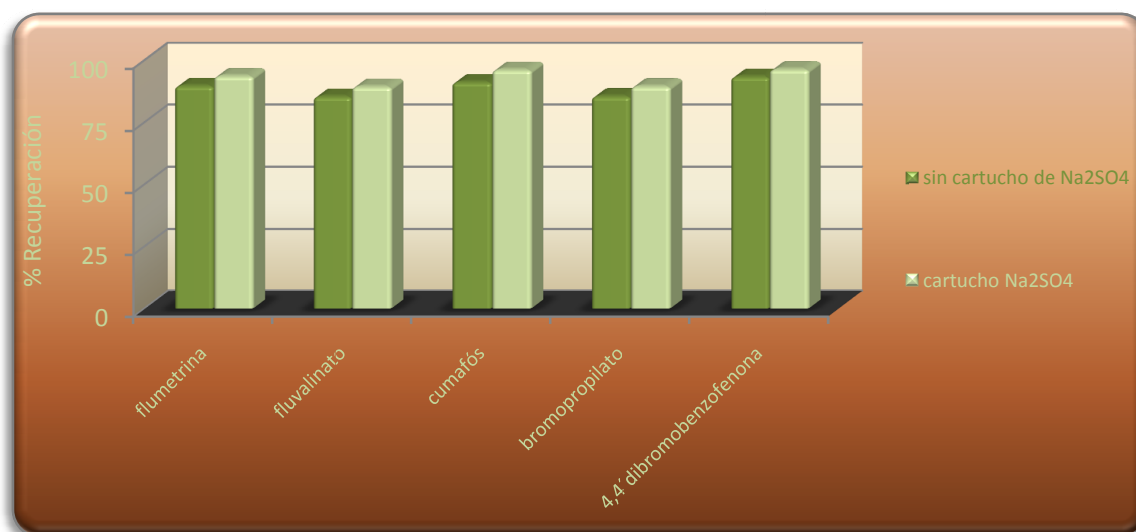
Hexano es el solvente de elución elegido por nuestro laboratorio para determinar flumetrina, fluvalinato, cumafós, bromopropilato y 4,4'-dibromobenzofenona en miel, dada su adecuada polaridad, siendo además utilizado por Gomis *et al.* (1996) y Lodesani *et al.* (1992) para dicho fin.

En cuanto a los volúmenes, tanto de lavado como de elución, se han considerado volúmenes superiores a los indicados por Gomis *et al.* (1996) y por otros autores, con el objetivo de purificar aún más el extracto y mejorar los porcentajes de recuperación.

- Utilización de un cartucho de 2,5 g de Na_2SO_4 :

Tras establecer los volúmenes de lavado y elución en 3 x 3 ml de metanol: agua (1:1) y 10 ml de hexano respectivamente, se planteó como objetivo eliminar la presencia de dos fases en el extracto final, una de ellas acuosa y otra hexánica. Para ello, se procedió a realizar un estudio de optimización del método en el que se colocaba un cartucho de 2,5 g de Na_2SO_4 antes de la fase de elución de los analitos. Se consiguió eliminar el agua, quedando ésta retenida en el cartucho Na_2SO_4 . Además, se consiguió aumentar el porcentaje de recuperación del método (Figura 34), ya que se evitaba la pérdida de analitos a través del solvente de lavado.

Figura 34. Porcentaje de recuperación según la utilización o no de cartuchos de 2,5 g de Na₂SO₄.



La utilización de este tipo de cartuchos, tan sólo ha sido descrita en la literatura científica por Tremolada *et al.* (2004) para la determinación de cumafós en miel.

Optimización de la determinación cromatográfica

En los estudios de puesta a punto para la etapa cromatográfica se han ensayado diversas modificaciones con el objetivo de disminuir el tiempo de análisis y conseguir mejores resultados. Para ello se ha realizado un estudio comparativo entre la fase móvil y el gradiente del método descrito por Gomis *et al.* (1996). Los mejores resultados se han conseguido utilizando como fase móvil el agua y el acetonitrilo y un gradiente inicial del 80% de acetonitrilo que alcanza hasta el 100% a los 12 minutos y disminuye nuevamente al 80% hasta el minuto 15. El tiempo de análisis se reduce de 25 minutos a 15 y la resolución de los picos sigue siendo óptima.

Nuestra técnica de determinación, la cromatografía líquida de alta resolución, no es la más habitual para la determinación de acaricidas en miel, si bien hay autores que la han utilizado (Blasco *et al.*, 2003; Korta *et al.*, 2001; Gomis *et al.*, 1996; Atienza *et al.*, 1993; Van Buren *et al.*, 1992). En cuanto a los solventes empleados como fase móvil, nuestro laboratorio ha empleado mezclas de agua-acetonitrilo, solventes también seleccionados por Atienza *et al.* (1993). Otros autores emplean agua-metanol, como por ejemplo, Blasco *et al.* (2003). Algunos autores destacan la importancia de un pH ácido de la fase móvil para la estabilidad y la resolución de los analitos (Martel *et al.*,

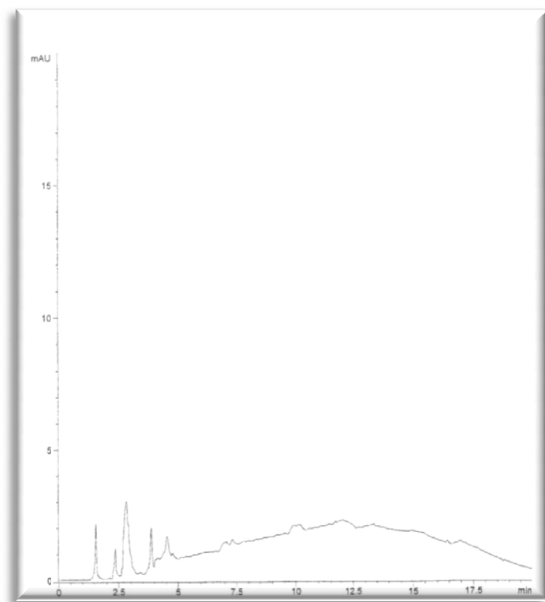
2002; Korta *et al.*, 2001; Atienza *et al.*, 1993), nosotros no lo hemos considerado. El flujo de la mezcla empleado en cromatografía puede ser isocrático (Blasco *et al.*, 2003; Martel *et al.*, 2002; Atienza *et al.*, 1993) o en gradiente, utilizado por Korta *et al.* (2001); Gomis *et al.* (1994) y nosotros mismos.

En lo que respecta a la fase estacionaria, la columna de C₁₈ de 250 mm de longitud, 4,6 mm de grosor y 5 µm de diámetro de partícula de relleno es la utilizada en nuestra metodología y en la mayoría de las descritas en la literatura (Rial-Otero *et al.*, 2007). También se ha empleado otro tipo de columnas, como la C₁₈ de ODS (150 mm de longitud, 0,32 mm de grosor y 5 µm de diámetro de las partículas de relleno) (Blasco *et al.*, 2003), así como columnas con diámetros internos muy pequeños (*small-bore columns*) (Blanco-Gomis *et al.*, 1996) que permiten límites de detección muy bajos (0,01-0,025 ng/g miel).

Finalmente, entre los detectores más usados para determinar residuos de acaricidas en miel, están el detector de barrido de espectros (DAD), empleado en nuestro laboratorio así como por Martel *et al.* (2002), Korta *et al.* (2001) y Gomis *et al.* (1996), y el detector ultravioleta (Jiménez *et al.*, 2000; Blasco *et al.*, 1994; Atienza *et al.*, 1993). También se ha utilizado la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrofotómetro de masas (Blasco *et al.*, 2003 y 2004; Fernández *et al.*, 2002), pero requiere un alto coste y mantenimiento. Otros detectores como el de fluorescencia (FLD) (Bernal *et al.*, 1997; Van Buren *et al.*, 1992;) o el amperiométrico (EC) (Gomis *et al.*, 1994), no son muy usuales para la determinación de estos residuos.

Finalmente, en las figuras 35 y 36 se muestran sendos cromatogramas de una miel exenta de analitos a concentraciones detectables (blanco matriz) así como de esa misma miel fortificada con los analitos flumetrina (FLM), fluvalinato (FLV), cumafós (CMF) bromopropilato (BMP) y 4,4'-dibromobenzofenona (DBB) a la concentración de 0,25 µg/g de miel. Como se puede apreciar, no existen interferencias de los componentes de la matriz con los picos de los analitos.

Figura 35: Cromatograma de una matriz de miel ($\lambda = 233 \text{ nm}$).

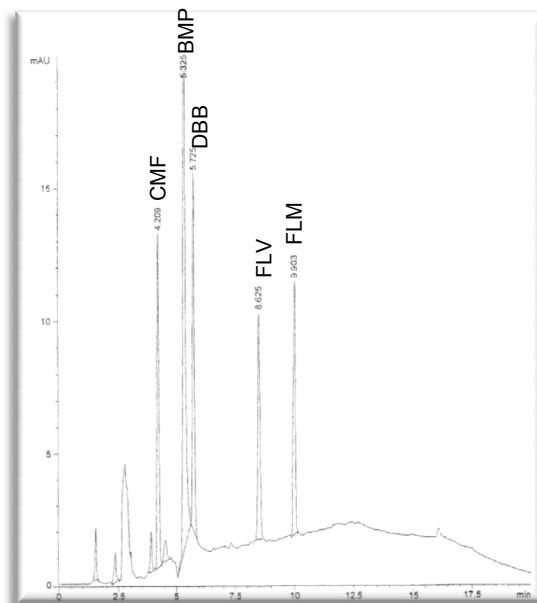


FLM: Flumetrina (Tiempo de retención 9,90 min).

FLV: Fluvalinato (Tiempo de retención 8,62 min).

CMF: Cumafós (Tiempo de retención 4,21 min).

Figura 36: Cromatograma de una matriz de miel fortificada con 0,25 $\mu\text{g/g}$ de FLM, FLV, CMF, BMP y DBB.



BMP: Bromopropilato (Tiempo de retención 5,32 min).

DBB: Dibromobenzofenona (Tiempo de retención 5,72 min).

5.2.2. Validación del método de análisis según la Decisión 2002/657/CE

Especificidad

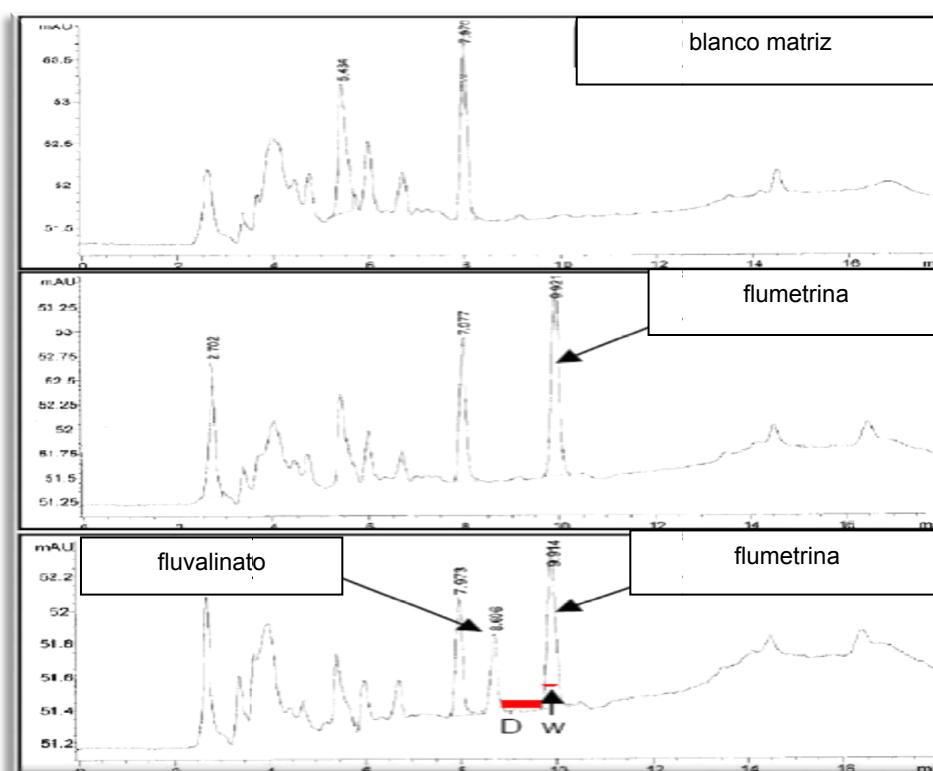
El método optimizado en este estudio distingue entre el analito y otras sustancias presentes en las condiciones experimentales, es decir es específico para la determinación de los acaricidas estudiados. Para ello se ha verificado la presencia de interferencias en las regiones del cromatograma en las que cabe esperar los analitos. La identificación cromatográfica de los analitos se ha llevado a cabo comparando los sus tiempos de retención y sus espectros de absorción con los de los patrones comerciales. También se ha comprobado la concordancia entre los parámetros que definen los picos de los patrones y los de las muestras fortificadas. Además, no existe en la matriz ningún pico que pueda inducir a confusión con los analitos y la identificación de éstos no se ve dificultada por la presencia de interferencias o metabolitos (Figuras 35 y 36).

En el caso particular de la flumetrina y del fluvalinato (ambos se identifican a 254 nm como su longitud de onda óptima), se ha comprobado que la distancia entre ambos picos (D) es superior a la anchura del pico del analito medida al 10% de la anchura máxima del mismo (w). Por último, el coeficiente de variación de los tiempos de retención de los blancos matriz fortificados con los acaricidas no es superior al 2,5% (Figura 37). En la tabla 23 se presentan las medias (n=9) de los tiempos de retención de la flumetrina, fluvalinato, cumafós, bromopropilato y 4,4'-dibromobenzofenona.

Tabla 23. Tiempo medio de retención de los acaricidas: flumetrina, fluvalinato, cumafós, bromopropilato y 4,4'-dibromobenzofenona (n=9).

Acaricida	Tiempo medio de Retención (min)	Coefficiente de Variación (% C.V.)
Cumafós	4,2	2,1
Bromopropilato	5,3	0,9
4,4'-dibromobenzofenona	5,7	1,2
Fluvalinato	8,6	1,8
Flumetrina	9,9	1,3

Figura 37. Cromatogramas de miel sin acaricidas (blanco matriz), miel fortificada con flumetrina, y miel fortificada con flumetrina y fluvalinato. ($\lambda = 254$ nm).

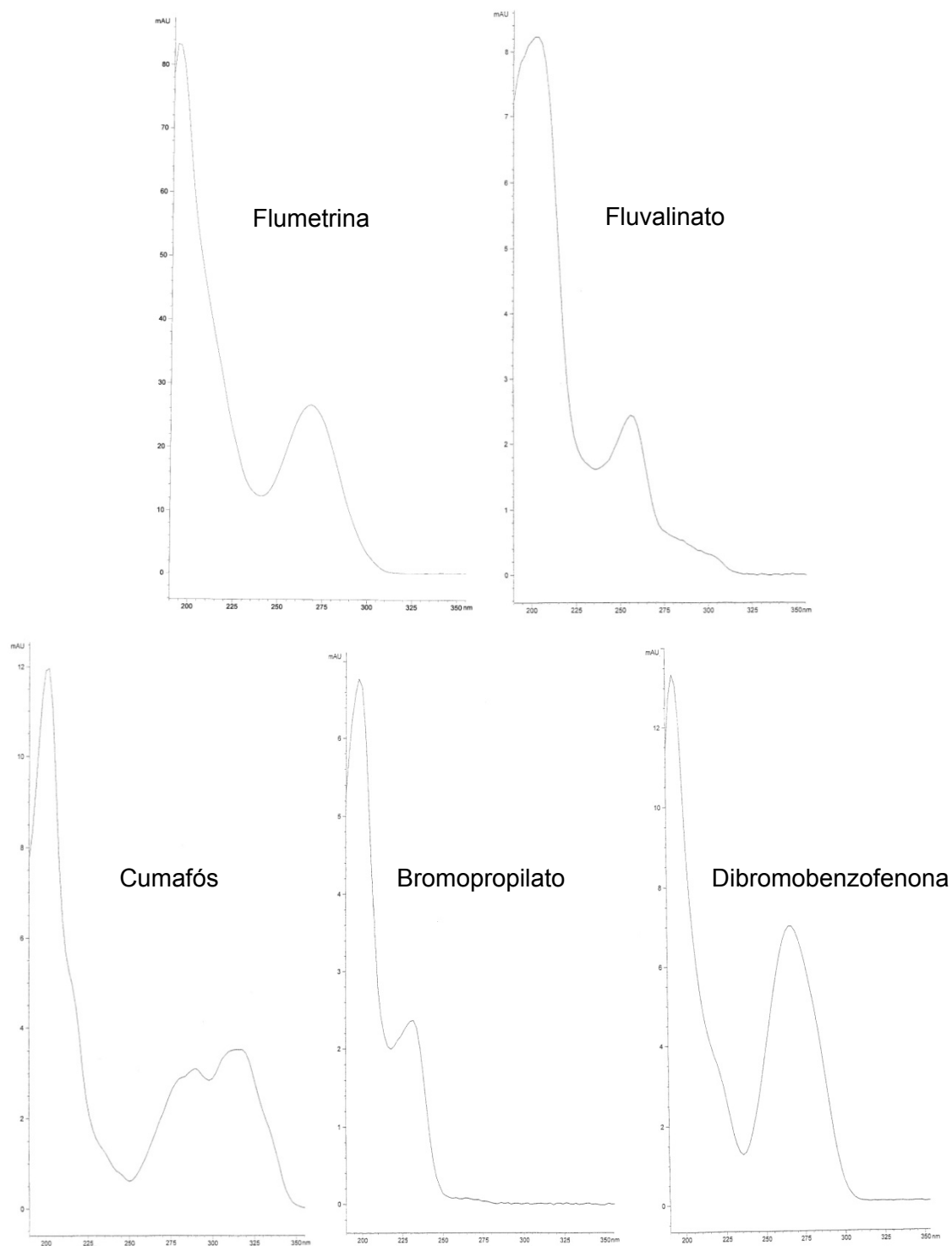


Identificación

Los máximos de absorción de los 5 analitos en la matriz presentan longitudes de onda máximas iguales a las de sus respectivos patrones de calibración, dentro de un margen de resolución de ± 2 nm. Además, como no existe una diferencia entre ambos espectros superior al 10% de la absorbancia del patrón, el espectro de cada analito no influye visualmente en el espectro del patrón de calibración.

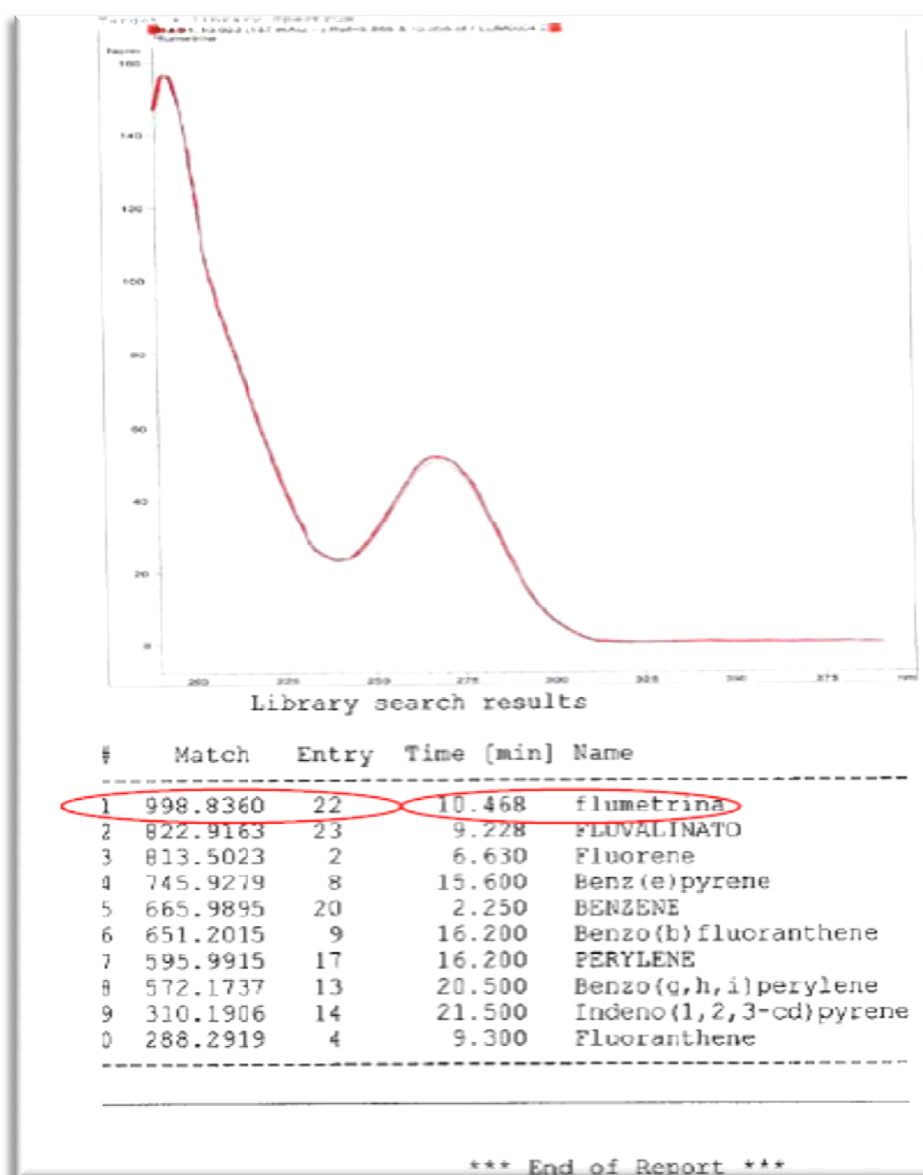
Las longitudes de onda óptima son 254 nm para el fluvalinato y la flumetrina, 315 nm para el cumafós, 233 nm para el bromopropilato y 270 nm para la 4,4'-dibromobenzofenona. Gráficamente, los espectros de estos cinco acaricidas se pueden apreciar en la figura 38. En dicha figura, se observa que la absorbancia máxima para los cinco analitos se sitúa alrededor de los 205 nm, pero el hecho de que a esa longitud de onda también den señal compuestos como el acetonitrilo o el metanol, hace que desechemos esas longitudes de onda cercanas a los 205 nm, ya que se dificultaría notablemente, la determinación cromatográfica.

Figura 38. Espectros de absorción de los cinco acaricidas de síntesis: flumetrina, fluvalinato, cumafós, bromopropilato y 4,4'-dibromobenzofenona.



La identificación de un analito, además de haberse realizado comparando los tiempos de retención, se ha efectuado comparando el espectro del pico problema con el espectro de cada analito de la biblioteca de espectros del equipo informático. Los resultados obtenidos en este estudio muestran similitudes entre diferentes picos de la matriz con el de los analitos de interés. A modo de ejemplo, en la figura 39 se puede apreciar dicha comparación espectral.

Figura 39. Comparación de los espectros de una solución patrón de flumetrina y una miel enriquecida con flumetrina.



Estudio de la linealidad

La representación gráfica de los pares de puntos señal/concentración, es lineal, siendo calculada la línea de regresión para cada analito mediante el método de mínimos cuadrados y obteniéndose valores de r^2 superiores a 0,999.

En nuestro estudio de *linealidad*, los rangos de respuesta lineal se obtuvieron mediante fortificación de mieles con disoluciones patrón a concentraciones comprendidas entre 10.000 y 8 ng/g miel. Los resultados del rango dinámico y del rango lineal se muestran en la tabla 24. De igual manera, en las figuras 40-43 se puede apreciar gráficamente el rango dinámico y lineal del método para la flumetrina, fluvalinato, cumafós, bromopropilato y 4,4'-dibromobenzofenona.

Tabla 24. Límite de detección absoluto (LDA), rango dinámico, rango lineal, límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).

	LDA (ng)	Rango dinámico (ng/g)	Rango lineal (ng/g)	LD (ng/g miel)	LC (ng/g miel)
Flumetrina	40	8-10.000	10-5.000	8	10
Fluvalinato	3,3	10-10.000	10-10.000	0,64	10
Cumafós	3,5	10-10.000	10-10.000	0,70	10
Bromopropilato	3,7	10-10.000	10-10.000	0,74	10
Dibromobenzofenona	1,7	10-10.000	25-10.000	0,35	25

Figura 40. Estudio del rango dinámico y lineal de flumetrina

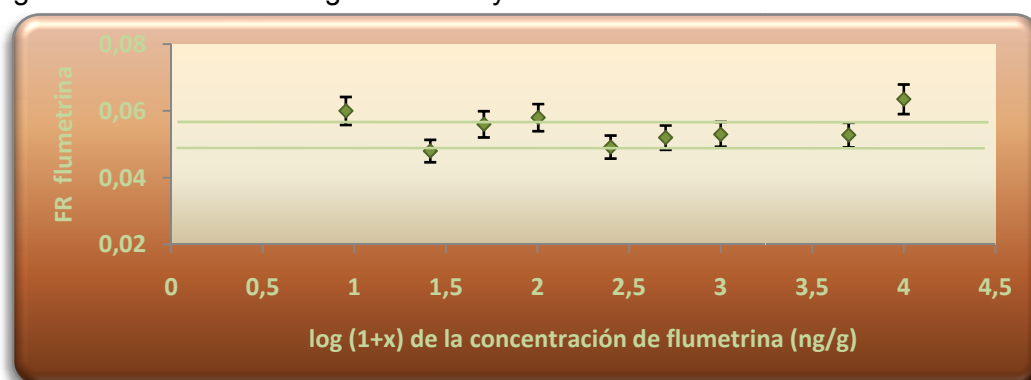


Figura 41. Estudio del rango dinámico y lineal de fluvalinato

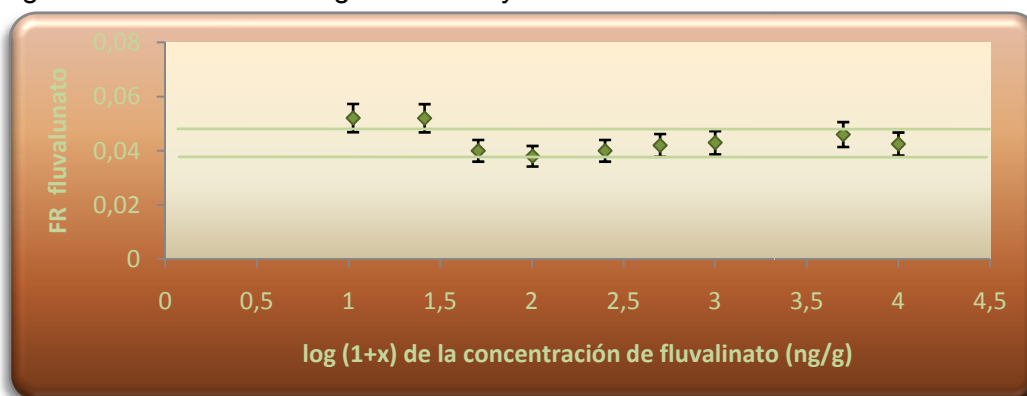


Figura 42. Estudio del rango dinámico y lineal de cumafós

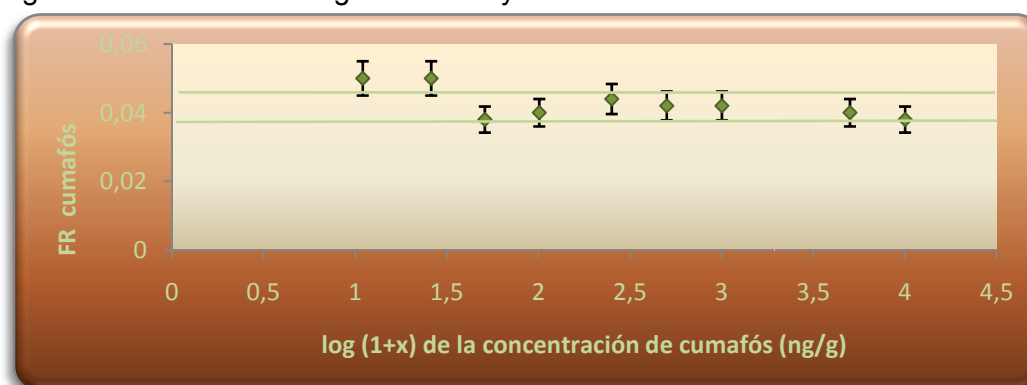


Figura 43. Estudio del rango dinámico y lineal de bromopropilato

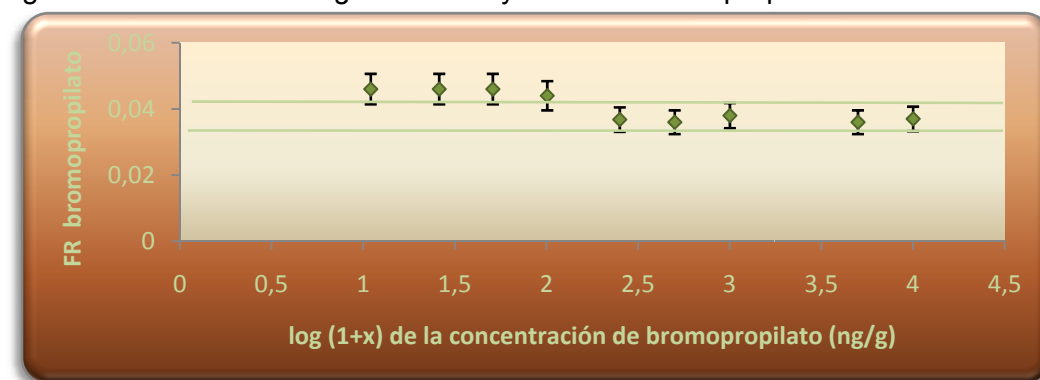
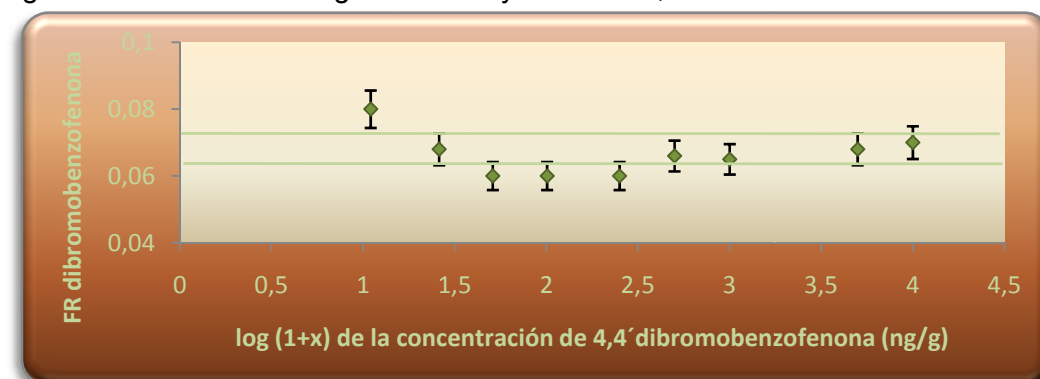


Figura 44. Estudio del rango dinámico y lineal de 4,4'-dibromobenzofenona



Estudios de precisión (repetibilidad y reproducibilidad)

Los resultados del estudio de *repetibilidad* y de *precisión intermedia o reproducibilidad intralaboratorio* muestran coeficientes de variación en todas las concentraciones y también entre ellas, siempre por debajo del 10%. El límite establecido por la Decisión 657/2002 de la Comisión Europea es del 20%.

Estudio de exactitud (recuperación).

El estudio de *recuperación* realizado por sextuplicado, a tres niveles de fortificación, 1000 ng/g miel, 100 ng/g miel y 50 ng/g miel, conforme a lo establecido por la Decisión 657/2002/CE de la Comisión Europea, ha dado como resultado recuperaciones superiores al 80% y, por consiguiente, cumple con las exigencias de dicha Decisión en la que se acepta porcentajes de recuperación entre el 80 y el 110% para concentraciones $\geq 10 \mu\text{g/kg}$. En las figuras 45 y 46 se pueden comparar dos cromatogramas de miel fortificada inicialmente con 100 μl de una disolución patrón y un extracto de miel fortificado tras el proceso de extracción a una concentración idéntica. La concentración de acaricidas presentes en el extracto fortificado tras el proceso de extracción se utiliza como valor de referencia. La relación entre ambos valores indica el porcentaje de recuperación de la técnica. Los resultados de este estudio de exactitud muestran porcentajes de recuperación en los tres niveles de fortificación ensayados dentro de los parámetros fijados por la normativa europea (Tabla 25).

Tabla 25. Estudio de recuperación de acaricidas sintéticos en miel a distintos niveles de fortificación.

Acaricida	Recuperación (%)			Recuperación Media (%)
	50 ng/g	100 ng/g	1000 ng/g	
Flumetrina	82,1	98,6	99,6	93,4 \pm 9,8
Fluvalinato	83,1	89,2	96,1	89,5 \pm 6,5
Cumafós	89,6*	97,9	99,5	95,7 \pm 5,3
Bromopropilato	89,4	84,7	94,6	89,6 \pm 5,0
Dibromobenzofenona	92,4	94,8	102,3	96,5 \pm 5,2

*Este porcentaje de recuperación corresponde a una concentración de 200 ng/g

Figura 45: Cromatograma de un extracto de miel fortificado con acaricidas a 100 ng/g tras el proceso de extracción ($\lambda=233$).

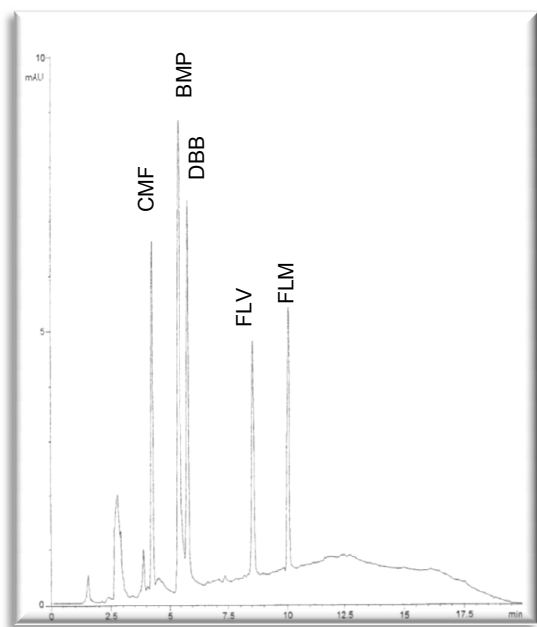
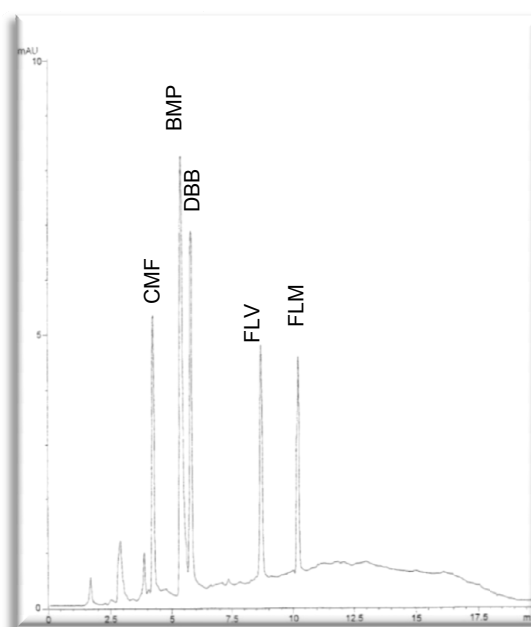


Figura 46: Cromatograma de una miel fortificada con acaricidas a 100 ng/g antes del proceso de extracción ($\lambda=233$).



FLM: Flumetrina; FLV: Fluvalinato; CMF: Cumafós; BMP: Bromopropilato; DBB: 4,4'-Dibromobenzofenona.

Estudio de la sensibilidad: Límite de decisión ($CC\alpha$) y Capacidad de detección ($CC\beta$).

Los resultados obtenidos en este estudio se indican en la tabla 26.

Tabla 26. Límites de decisión ($CC\alpha$) y Capacidad de detección ($CC\beta$) del método para la determinación de residuos de acaricidas de síntesis en miel.

Acaricida	s	$CC\alpha$ (ng/g miel)	$S_{Rintra\text{lab}}$	$CC\beta$ (ng/g miel)
Flumetrina	2,2	7,9	3,4	11,5
Fluvalinato	8,5	20,7	8,9	34,7
Cumafós	6,1	114,3	8,7	124,3
Bromopropilato	9,4	22,4	9,6	37,8
Dibromobenzofenona	6,0	14,7	6,3	24,5

s: Desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio de las muestras fortificadas a concentración similar al límite de decisión.

$S_{Rintra\text{lab}}$: Desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio.

Estudio de robustez

Comparando las medias de los resultados obtenidos de las combinaciones que poseían las medias de las mayúsculas (A_A a A_G) con las medias de las minúsculas (A_a a A_g), no se ha observado una diferencia significativa mayor al 5% entre las medias de los siete factores. Las fórmulas aplicadas y los resultados de las diferencias de las medias se muestran en la tabla 27.

Tabla 27. Diferencias de las medias de los siete factores para cada acaricida.

Media mayúsculas	Media minúsculas	Diferencia de las medias				
		FLM	FLV	CMF	BMP	DBB
$A_A = \Sigma(A_i)/4$	$A_a = \Sigma(a_i)/4$	-0,5	-0,3	-0,4	-0,5	-0,5
$A_B = \Sigma(B_i)/4$	$A_b = \Sigma(b_i)/4$	0,0	0,1	0,3	-0,2	-0,3
$A_C = \Sigma(C_i)/4$	$A_c = \Sigma(c_i)/4$	0,8	0,7	0,9	0,8	0,6
$A_D = \Sigma(D_i)/4$	$A_d = \Sigma(d_i)/4$	0,7	0,6	0,8	0,3	0,6
$A_E = \Sigma(E_i)/4$	$A_e = \Sigma(e_i)/4$	0,8	0,8	1,0	0,5	0,7
$A_F = \Sigma(F_i)/4$	$A_f = \Sigma(f_i)/4$	0,7	0,7	0,9	1,0	0,7
$A_G = \Sigma(G_i)/4$	$A_g = \Sigma(g_i)/4$	1,8	1,6	1,9	2,1	1,9

FLM: Flumetrina; FLV: Fluvalinato; CMF: Cumafós; BMP: Bromopropilato; DBB: 4,4'-Dibromobenzofenona.

Como la medición más realista del error aleatorio la dan las siete diferencias, se ha procedido a calcular la desviación estándar de las diferencias: D_i (S_{D_i}) para cada acaricida, teniendo en cuenta las siguientes fórmulas:

Diferencia
$D_a = \Sigma(A_i) - \Sigma(a_i)$
$D_b = \Sigma(B_i) - \Sigma(b_i)$
$D_c = \Sigma(C_i) - \Sigma(c_i)$
$D_d = \Sigma(D_i) - \Sigma(d_i)$
$D_e = \Sigma(E_i) - \Sigma(e_i)$
$D_f = \Sigma(F_i) - \Sigma(f_i)$
$D_g = \Sigma(G_i) - \Sigma(g_i)$

$$SDi = \sqrt{2 * \Sigma\left(\frac{Di^2}{7}\right)}$$

En la tabla 28 se indica la concentración de los acaricidas flumetrina, fluvalinato, cumafós, bromopropilato y 4,4'-dibromobenzofenona presentes en 7 x 3 muestras de miel fortificadas a 100 ng/g y tras ser sometidas cada una de éstas a un proceso de extracción diferente (Tabla 18).

Tabla 28. Resultado medio de los análisis de las 8 combinaciones.

Combinación	ng de acaricida/g de miel				
	FLM	FLV	CMF	BPP	DBB
1	98,6	89,2	97,9	84,7	94,8
2	94,9	85,8	93,6	81,0	91,3
3	95,4	86,3	94,0	81,6	92,0
4	96,7	87,4	95,2	83,9	93,7
5	95,9	86,7	94,7	82,1	92,1
6	97,3	87,9	96,1	83,4	93,8
7	97,6	88,0	96,2	83,7	94,2
8	95,8	86,5	94,6	81,8	92,5

FLM: Flumetrina; FLV: Fluvalinato; CMF: Cumafós; BMP: Bromopropilato; DBB: 4,4'-Dibromobenzofenona.

El valor de S_{Di} obtenido para cada uno de los cinco acaricidas no es significativamente mayor ($\alpha=5\%$) que la desviación estándar hallada en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio (Tabla 29). Por lo tanto, el conjunto de los 7 factores elegidos no influye en el resultado y, por consiguiente, el método es suficientemente robusto frente a las condiciones seleccionadas.

Tabla 29. Desviaciones estándar de las diferentes reproducibilidades.

Acaricida	s	$S_{Rintra\text{lab}}$	S_{Di}
Flumetrina	2,2	3,4	5,0
Fluvalinato	8,5	8,9	4,4
Cumafós	6,1	8,7	5,6
Bromopropilato	9,4	9,6	5,4
Dibromobenzofenona	6,0	6,3	5,1

s: Desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio de las muestras fortificadas a concentración similar al límite de decisión.

$S_{Rintra\text{lab}}$: Desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio.

S_{Di} : Desviación estándar de las diferencias.

La Decisión 657/2002/CE por la que se aplica la Directiva 96/23/CE en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados, indica que la validación de todo método de confirmación cuantitativo, debe conllevar la realización de una serie de parámetros como son el $CC\beta$, $CC\alpha$, la veracidad o recuperación, la precisión, la selectividad, la especificidad, la estabilidad y la robustez o aplicabilidad.

Adamczyk *et al.* (2007), que realizan estudios de linealidad, sensibilidad, precisión (repetibilidad y reproducibilidad) y recuperación en cera, estudian alguno de los parámetros que se han citado anteriormente. Estos autores validan su metodología según los criterios del Grupo de discusión holandés para el análisis de residuos (ORA) para el fluvalinato, cumafós, bromopropilato y 4,4' dibromobenzofenona. Otros autores, si bien no realizan una validación completa, llevan a cabo estudios sensibilidad y recuperación de métodos analíticos para la determinación de alguno de los acaricidas estudiados en esta tesis, como Rissato *et al.* (2007) para el análisis de fluvalinato y bromopropilato mediante GS-MS; Martel *et al.* (2002) para fluvalinato, cumafós y bromopropilato mediante HPLC; Fernández *et al.* (2002), para cumafós mediante LC-APCI-MSD; y Jiménez *et al.* (1998) para fluvalinato por GC-ECD.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en nuestro laboratorio para parámetros tan importantes como son especificidad, identificación, linealidad, precisión o robustez, no pueden ser comparados con los de otros autores debido a la falta de datos presentes en la literatura. En concreto, es importante recalcar que no se ha encontrado dato alguno sobre parámetros de robustez. Conviene recordar que dicho parámetro se define como la susceptibilidad de un método analítico a los cambios de las condiciones experimentales. Por lo tanto, cuanto más robusto es un método menos susceptible es a pequeños cambios experimentales y, por consiguiente sus resultados serán más reproducibles y fiables.

Aunque no se han encontrado datos de valores $CC\alpha$ y $CC\beta$, otros parámetros relacionados con la sensibilidad (LD, LC) y con la exactitud (recuperación) de los métodos analíticos, sí que están presentes en la bibliografía científica. Los valores de recuperación y sensibilidad obtenidos en nuestro estudio son similares a los obtenidos por otros investigadores. De manera general, la sensibilidad de los diferentes métodos descritos para la determinación de acaricidas de síntesis en miel mediante cromatografía líquida está comprendida entre 1 y 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de miel y mediante cromatografía de gases entre 0,001 y 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de miel. En cuanto a los

porcentajes de recuperación de estas técnicas, los valores se hallan entre el 83 y el 103% (Adamczyk *et al.*, 2007; Blasco *et al.*, 2003; Martel *et al.*, 2002; Tsigouri *et al.*, 2001; Korta *et al.*, 2001; Bogdanov *et al.*, 1998; Gomis *et al.*, 1996; Atienza *et al.*, 1993; Van Buren *et al.*, 1992).

Por lo tanto, nuestra metodología analítica es válida para la extracción y determinación de residuos de los 5 acaricidas de síntesis estudiados en miel. Además, la determinación de los acaricidas mediante HPLC-DAD, no conlleva una disminución de la sensibilidad del método, en comparación con el empleo de otras técnicas como HPLC-APCI-MSD, o HPLC-FLD, o GC-ECD, o GC-NPD.

5.3. Estudio de la estabilidad de las tetraciclinas en diferentes mieles

5.3.1. Estudio del efecto del proceso de pasteurización en la degradación de las tetraciclinas

Los resultados de este estudio se pueden apreciar en las figuras 47-50. En dichas figuras se representa gráficamente el comportamiento de las cuatro tetraciclinas en las 11 mieles de diferentes orígenes botánicos. Se ha comparado la concentración de antibiótico en la miel fortificada en el momento inicial (tiempo 0) y la existente tras someter la miel al proceso de pasteurización. Así, la degradación media de oxitetraciclina fue de un 10,2%, la de tetraciclina de un 18,7%, la de clortetraciclina de un 13,0% y la de doxiciclina de un 10,1%.

Estos resultados fueron sometidos a un análisis estadístico de Anova media repetida, obteniéndose que existe una reducción significativa de la cantidad de las cuatro tetraciclinas debido al tratamiento de pasteurización con una $p=0,0001$.

No se han encontrado estudios similares en la literatura, salvo un estudio efectuado por Severo *et al.* (2006), en el que estudiaba el efecto del proceso de pasteurización en la degradación de oxitetraciclina, tetraciclina y doxiciclina en leche. En dicho estudio, sin detallar condiciones experimentales, los autores obtienen porcentajes de degradación similares a los obtenidos por nosotros para oxitetraciclina y tetraciclina (10,9% y 15,0% respectivamente). En cuanto a la doxiciclina el porcentaje de degradación obtenido por estos autores es superior al obtenido en nuestro laboratorio (27,7% frente a un 10,1%).

Figura 47. Degradación de oxitetraciclina en 11 mieles de diferentes orígenes.

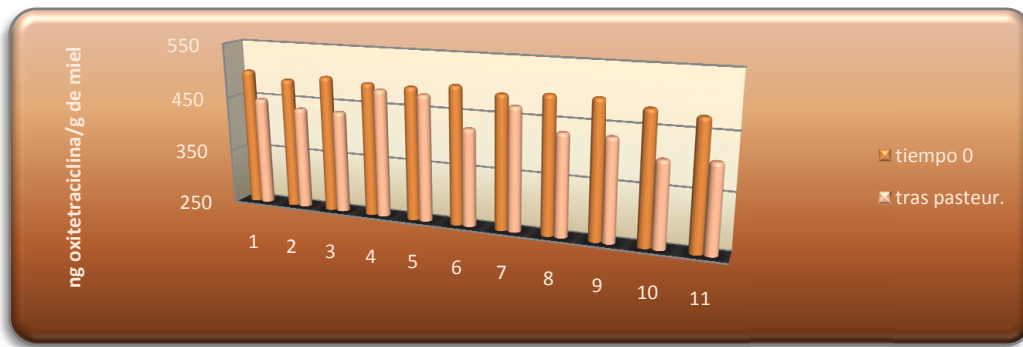


Figura 48. Degradación de tetraciclina en 11 mieles de diferentes orígenes.

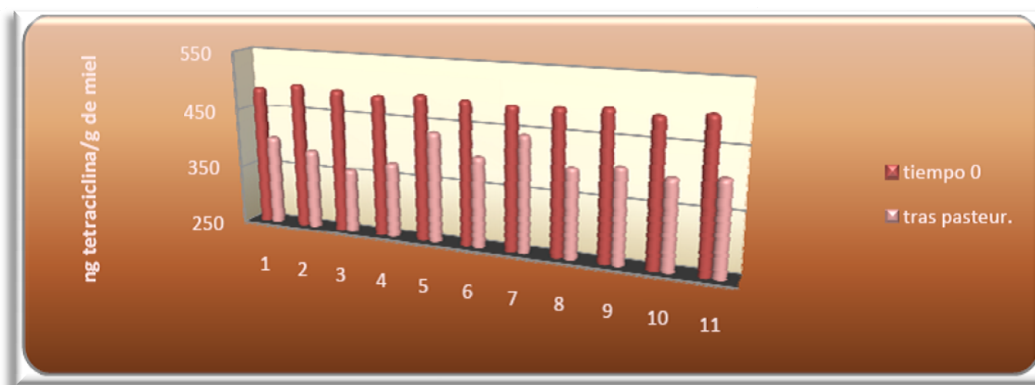


Figura 49. Degradación de clortetraciclina en 11 mieles de diferentes orígenes.

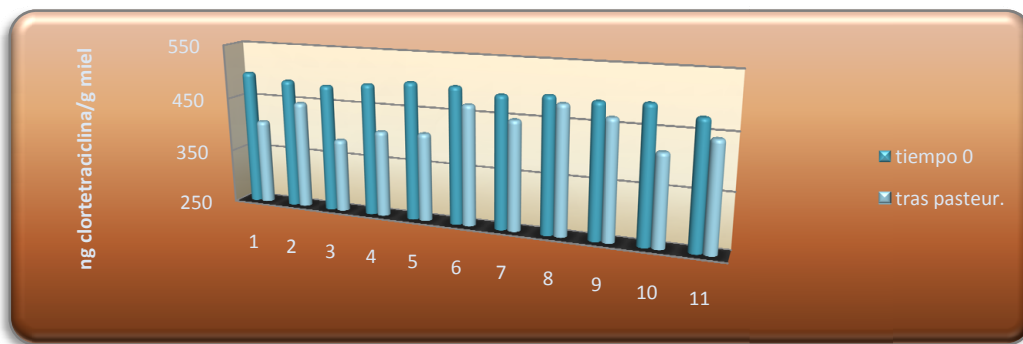
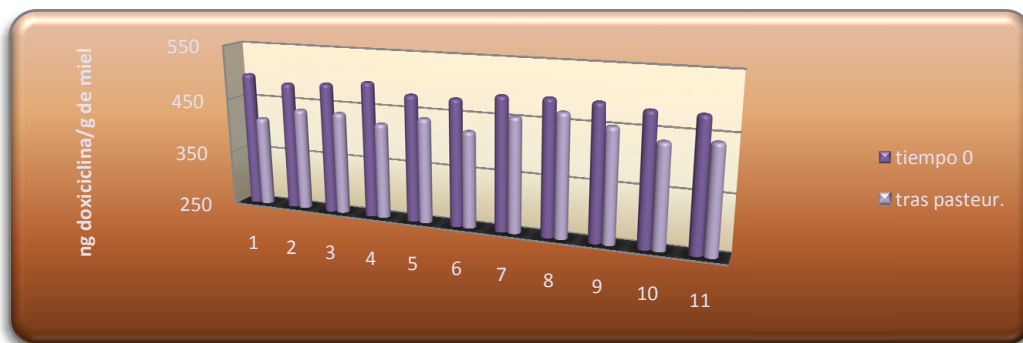


Figura 50. Degradación de doxiciclina en 11 mieles de diferentes orígenes.



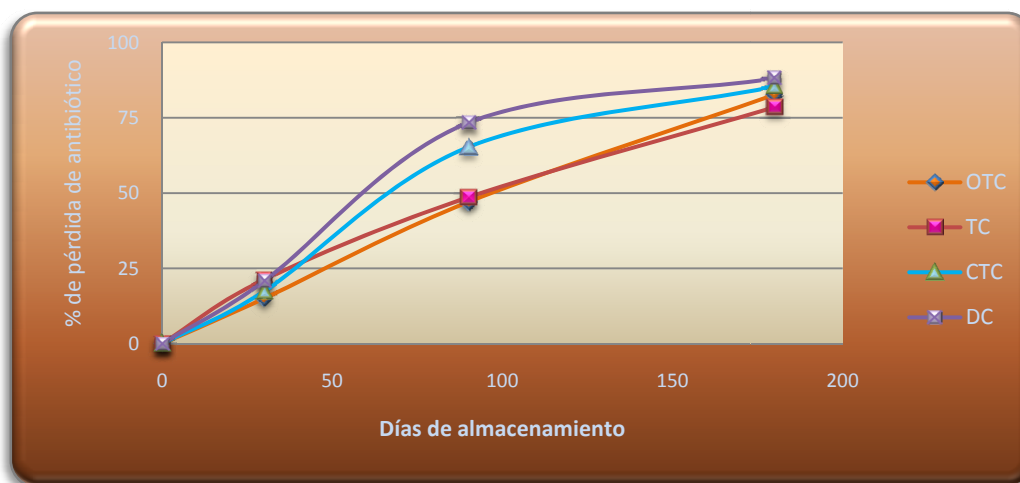
5.3.2. Estudio del efecto del tiempo de almacenamiento sobre la degradación de las tetraciclinas

En la tabla 30 se indican los porcentajes de degradación para las distintas tetraciclinas, en los intervalos de tiempo y condiciones establecidas del ensayo y en la figura 51 se observa gráficamente dicho efecto.

Tabla 30. Porcentaje de degradación de las cuatro tetraciclinas objeto de estudio según el tiempo de almacenamiento a 25° C y oscuridad.

	30 días	90 días	180 días
OTC	15%	47%	83%
TC	21%	49%	78%
CTC	17%	65%	85%
DC	21%	73%	88%

Figura 51. Pérdida media (%) de las cuatro tetraciclinas en miel según los días de almacenamiento a 25° C y oscuridad.



El tiempo medio para que se degrade el 50% de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina y doxiciclina es de 97, 93, 65 y 59 días, respectivamente.

En las figuras 52-55 se representa la concentración de las diferentes tetraciclinas conforme aumenta el tiempo de almacenamiento de los 11 tipos de mieles.

Los valores obtenidos del estudio de degradación fueron sometidos a un análisis estadístico de *t-Student*, obteniéndose que existe una reducción estadísticamente significativa de la concentración de las cuatro tetraciclinas debido al tiempo de

almacenamiento ($p=0,006$ para oxitetraciclina, $p=0,0001$ para tetraciclina, $p=0,0093$ para clortetraciclina y $p=0,007$ para doxiciclina).

Destaca una mayor degradación de oxitetraciclina, tetraciclina y clortetraciclina a los 180 días de almacenamiento en mieles “oscuras” como la de brezo, encina, bosque y montaña en relación a las mieles más claras.

Los resultados del análisis estadístico basado en matrices de correlación entre los parámetros físico-químicos de las mieles y la degradación de las tetraciclinas indican que existe una correlación significativa ($\leq -0,7$ y $\geq 0,7$) entre la degradación de algunas tetraciclinas y ciertos parámetros relacionados con el color de las mieles y su acidez. Concretamente, de los cuatro antibióticos, la tetraciclina es el más correlacionado con los parámetros físico-químicos ensayados, existiendo una correlación significativa entre su degradación y los parámetros de conductividad, acidez total y color (parámetros L, a y H). Del mismo modo, se ha hallado una correlación significativa ($\leq -0,7$ y $\geq 0,7$) entre la degradación de oxitetraciclina y los parámetros de color (parámetros a y H).

Figura 52. Cantidad de oxitetraciclina en miel según los días de almacenamiento.

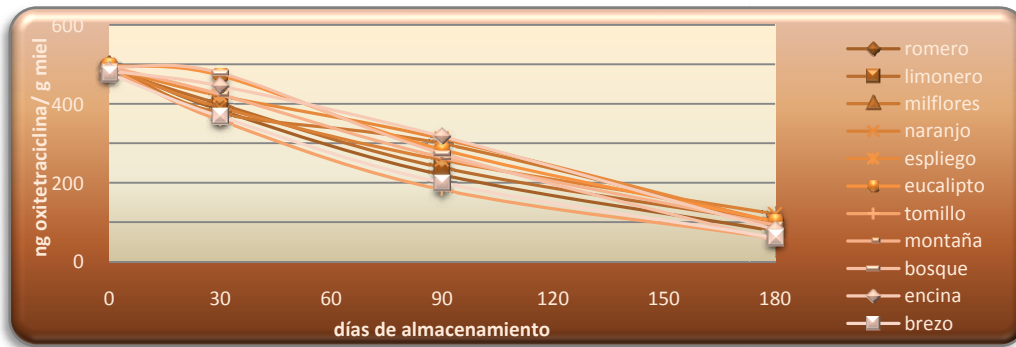


Figura 53. Cantidad de tetraciclina en miel según los días de almacenamiento.

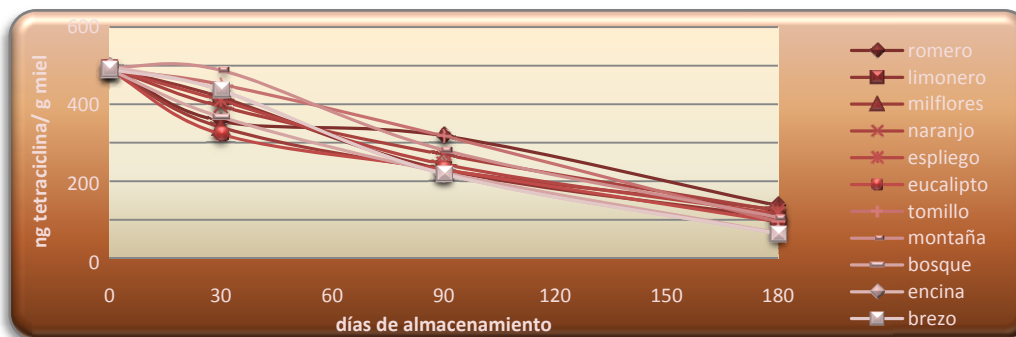


Figura 54. Cantidad de clortetraciclina en miel según los días de almacenamiento.

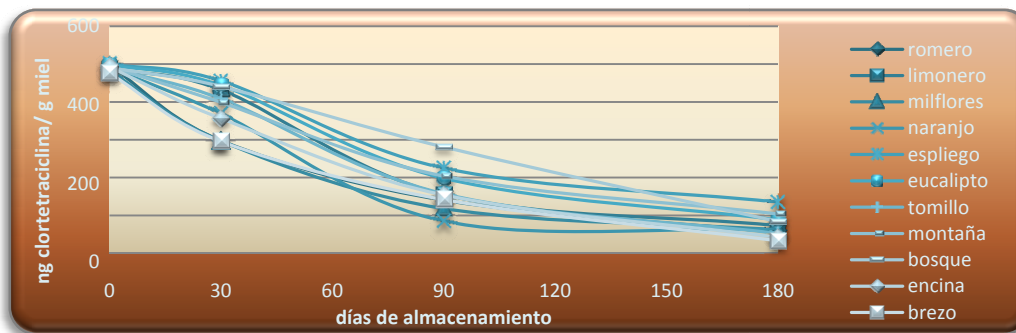
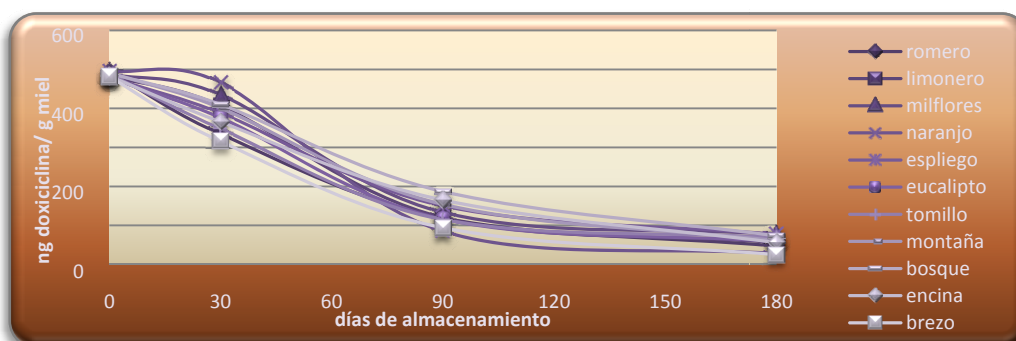


Figura 55. Cantidad de doxiciclina en miel según los días de almacenamiento.



Aunque se han realizado estudios de degradación de tetraciclinas (OTC) en disolventes y en tableta de medicación en la propia colmena (Kochansky, 2000; Alippi *et al*, 1999; Liang *et al.*, 1998), son escasos los estudios recientes sobre la degradación de tetraciclinas en miel que permiten comparar sus resultados con los obtenidos en nuestro laboratorio.

Así, ensayos llevados a cabo por Argauer *et al.*, (1991) difieren considerablemente con nuestros resultados, ya que indican que el tiempo para que se degrade el 50% de la oxitetraciclina en miel es tan sólo 12 días. Esta diferencia notable se puede deber a que estos autores mantienen la miel almacenada a una temperatura de 34°C frente a los 25° C utilizada por nosotros, existiendo con ello una aceleración de los procesos bioquímicos degradativos.

Resultados similares a los nuestros, son los obtenidos por Matsuda *et al.* (1990), donde el tiempo medio para que se degrade el 50% de la oxitetraciclina es de 42 y 70 días, estando almacenada la miel a 35° C y a 25° C, respectivamente.

Como se ha comentado anteriormente, no se han encontrado datos de degradación de otras tetraciclinas diferentes a la oxitetraciclina, salvo los presentados en un estudio efectuado por Severo *et al.* (2006), en el que estudiaban la degradación de la oxitetraciclina, tetraciclina y doxiciclina en yogur. En dicho estudio los autores obtuvieron porcentajes de degradación a los 30 días superiores a los obtenidos en nuestro estudio (52% para OTC, 67% para TC y 61% para DC). El motivo de esta diferencia puede ser que para la elaboración del yogur se utiliza leche tratada térmicamente y, además, se producen reacciones enzimáticas que pueden acelerar esta degradación.

En relación a la diferente degradación de las mieles dependiendo de su color, hallada en nuestros estudios, se puede deber al hecho de que las mieles oscuras (brezo, encina, bosque y montaña) tienen más minerales, por lo que el efecto quelante entre la tetraciclinas y los minerales se dará con mayor intensidad y, por consiguiente, las tetraciclinas en forma libre estarán en menor cantidad.

5.4. Estudio de la estabilidad de la flumetrina en la colmena

Como se ha indicado anteriormente, se eligieron 5 colmenas que no habían sido tratadas previamente con flumetrina ni con fluvalinato, hecho que se constató mediante el análisis de las muestras de miel. Los resultados fueron negativos a estos residuos. En la figura 56 se muestra un cromatograma de una miel extraída de una de estas colmenas. En este cromatograma se aprecia la ausencia de residuos de flumetrina. A modo comparativo en la figura 57 se representa un cromatograma de miel de esa misma colmena tras ser sometida al tratamiento veterinario con flumetrina.

Figura 56. Cromatograma de una miel sin residuos de tratamientos veterinarios

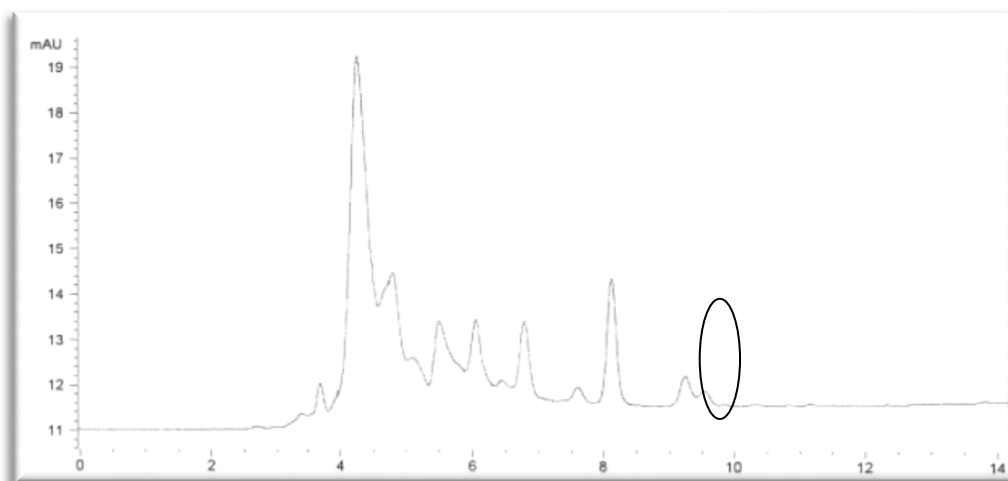
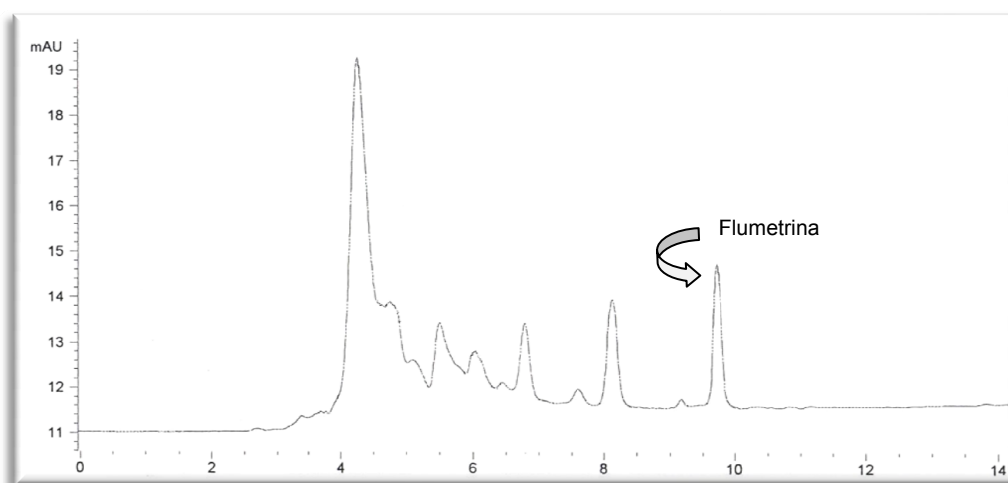


Figura 57. Cromatograma de una miel con residuos de flumetrina



Los resultados del estudio de evaluación de la presencia de flumetrina en mieles procedentes de estas colmenas tratadas se muestran en las figuras 58 y 59. En dichas figuras se observa la ausencia del pico de flumetrina (9,9 minutos, a una longitud de onda de 254 nm). Es decir, no existen residuos de flumetrina en la miel ni tras 6 semanas ni tras 8 semanas de tratamiento veterinario.

Figura 58. Cromatograma de mieles de las 5 colmenas, extraídas a las 6 semanas del tratamiento veterinario con flumetrina (longitud de onda 254 nm).

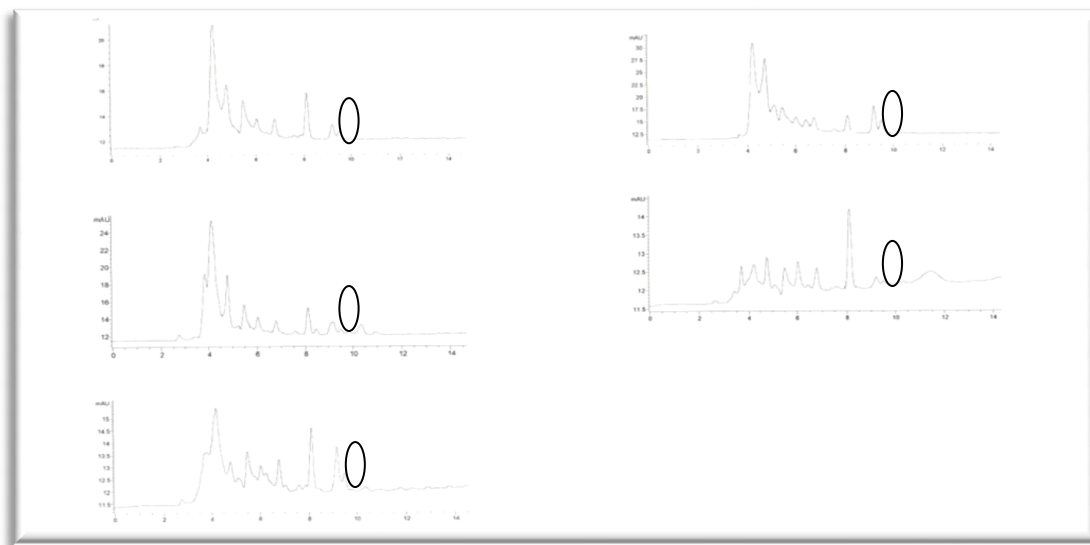
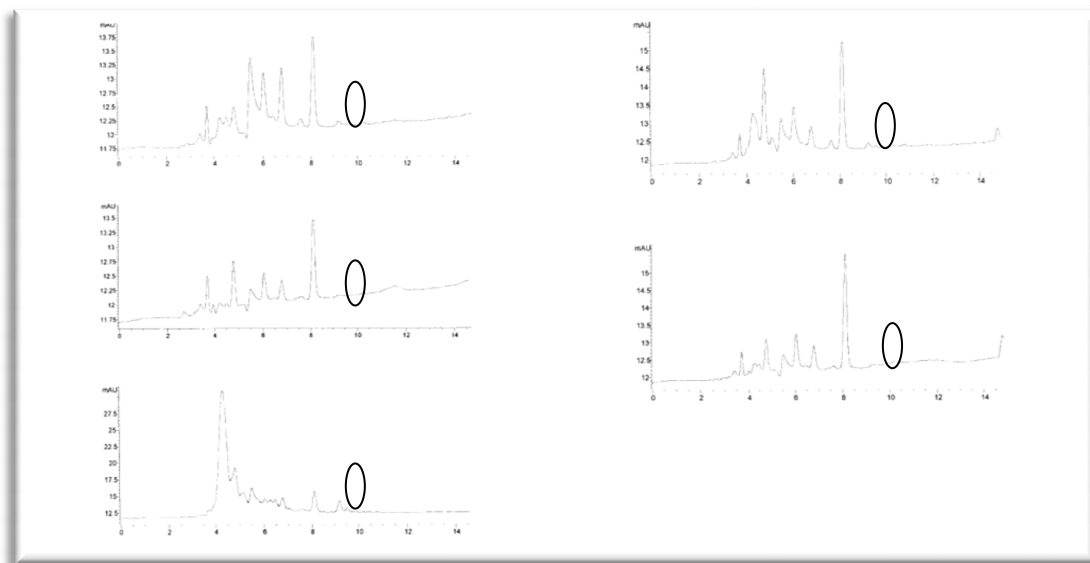


Figura 59. Cromatograma de mieles de las 5 colmenas, extraídas a las 8 semanas del tratamiento veterinario con flumetrina (longitud de onda 254 nm).



Son escasos los estudios de campo en los que se aborde de forma simultánea el efecto acaricida del producto utilizado, así como evaluación de la estabilidad y grado de contaminación de la miel por un determinado residuo tras el tratamiento veterinario efectuado. Es necesario señalar que en este trabajo se ha estudiado de forma coordinada el grado de parasitación de las colmenas por *Varroa destructor* junto al efecto acaricida del producto utilizado (estudio realizado por la Unidad de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza), así como la evaluación de la estabilidad y grado de contaminación de la miel por flumetrina tras el tratamiento veterinario (estudios realizados en nuestro laboratorio), siendo muy escasos los trabajos existentes con este mismo planteamiento.

Nuestro estudio corrobora los resultados obtenidos por otros autores (Szerletics-Túri, 1999a; FAO, 1996) y vienen a confirmar que la presencia de flumetrina en miel se debe a un mal manejo apícola.

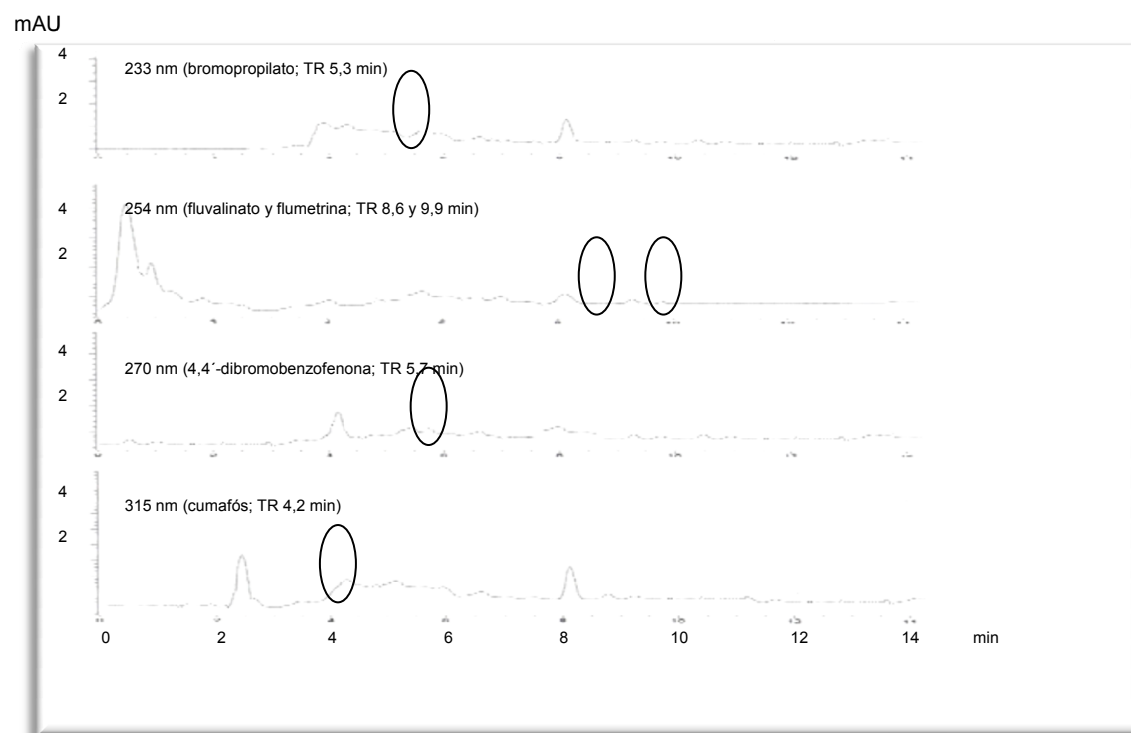
En 1998, un experimento llevado a cabo por Szerletics-Túri en Hungría sirvió para que el producto comercial que contenía flumetrina fuera autorizado en dicho país como tratamiento frente a la varroosis. Los resultados de este estudio indicaban que un correcto tratamiento con tiras de 3,6 mg de flumetrina durante 2-6 semanas, no dejaba residuos del analito en la miel.

Dos años antes, en 1996, la FAO se sirvió de 11 estudios llevados a cabo en Alemania, Austria y Reino Unido, para elaborar un informe en el que se proponía entre otros, un posible LMR de flumetrina en miel. En estos ensayos de campo, las colmenas fueron tratadas con la misma dosis de medicamento que se ha administrado en nuestro caso y tampoco hubo presencia de residuos en la miel a las seis semanas de haber administrado el medicamento veterinario con flumetrina.

5.5. Análisis de residuos de acaricidas de síntesis en muestras de miel.

En ninguna de las 20 muestras de miel analizadas se encontraron residuos de flumetrina, fluvalinato, cumafós, bromopropilato, ni 4,4'-dibromobenzofenona, por encima de los límites de decisión del método ($CC\alpha$). En la figura 60 se presenta un cromatograma de una de las muestras analizadas.

Figura 60. Cromatograma de una muestra de miel cruda.



Estos resultados pueden deberse a varias causas. En primer lugar, hay que tener en cuenta que el fluvalinato se aplica cada vez menos en España como tratamiento frente a *Varroa*, ya que si bien legalmente su uso está permitido, pueden producirse resistencias del ácaro a este compuesto y dejar de ser eficaz (Macedo *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2002; Milani *et al.*, 2002; Elzen *et al.*, 2000; Mozes-Koch *et al.*, 2000; Trouiller *et al.*, 1998; Colin *et al.*, 1997; Milani, 1995; Slabezki *et al.*, 1991). Por otro lado, los tratamientos con cumafós y bromopropilato no están autorizados en España, por lo que no es esperable la presencia de estos residuos, a menos que provengan de tratamientos clandestinos. Otra razón podría ser que muchos acaricidas de síntesis como el fluvalinato, bromopropilato y cumafós son lipofílicos, mostrando mayor preferencia por la cera que por la miel. Así, Bogdanov *et al.* (1997) después de un tratamiento de las colmenas con fluvalinato, encontraron una concentración 8.000 veces más alta en las muestras de cera que en las de miel.

Fernández *et al.* (1997), Atienza *et al.* (1993) y Sancho *et al.*, (1991) realizaron estudios sobre la presencia de fluvalinato en un total de 145 mieles españolas procedentes de diferentes orígenes. El análisis de las muestras reveló la presencia de residuos de fluvalinato en el 33% de todas ellas (10–750 µg/kg). Una de las razones que explicaría la presencia de este residuo, podría ser que en este periodo (1990-1993) se aplicaba intensivamente el tratamiento con fluvalinato frente a la varroosis en nuestro país. Sin embargo, en nuestro estudio, las muestras se tomaron en otro periodo (2005-2007), con menor aplicación debido a las resistencias mostradas por el ácaro *Varroa destructor* a este compuesto. Además, en alguno de los estudios citados se trataron colmenas, con presencia de miel, en la época de mielada; en otros, se prensó el panal para obtener la miel, lo que favoreció la presencia de residuos en la misma.

En cuanto a la presencia de otros acaricidas de síntesis, encontrados en mieles españolas, sólo constan en la literatura científica dos estudios de Fernández *et al.* (1994 y 1993), en los que analizan la presencia de residuos de bromopropilato y cumafós, encontrando concentraciones de 1-5 µg de cumafós/kg miel en el 14% de 177 muestras y 5-60 µg de bromopropilato/kg miel en el 16% de un total de 101 muestras.

Tan sólo se ha encontrado un estudio en el que se haya analizado la presencia de flumetrina en 33 muestras de miel austriaca, no encontrándose residuos de flumetrina (Menkissoglu-Spiroudi *et al.*, 2001).

Por último, no se han encontrado estudios en los que se haya analizado la presencia de 4,4'-dibromobenzofenona en miel.

La ausencia de este tipo de residuos de acaricidas en las mieles aragonesas analizadas constata el buen estado sanitario de las mismas.

Con el fin de evaluar si la salud de los consumidores puede verse afectada por la presencia de residuos de los acaricidas investigados en las muestras analizadas, es necesario, a partir de los niveles de contaminación de la miel, estimar la ingesta de éstos (IDEs) y compararla con los niveles toxicológicamente aceptables (IDAs).

La IDE de un contaminante asociada al consumo de un alimento se calcula multiplicando la concentración de dicho contaminante en el alimento por el consumo medio diario del alimento en cuestión. En nuestro estudio, como se ha dicho anteriormente, no se encontraron residuos de ninguno de los acaricidas de síntesis

estudiados por encima del límite de detección. En este caso, para evaluar el riesgo, se utiliza el valor del límite de detección como si fuera el nivel de contaminación presente en las muestras, ya que no podemos asegurar que estos acaricidas no estén presentes en las muestras de miel a niveles por debajo de dicho límite. Los límites de detección, en nuestro estudio, son 8 µg/kg de miel para flumetrina; 0,64 µg/kg de miel para fluvalinato; 0,70 µg/kg de miel para cumafós; 0,74 de miel µg/kg para bromopropilato y 0,35 µg/kg de miel para 4,4'-dibromobenzofenona.

Por otro lado, la ingesta anual de miel en la dieta española, en el año 2006, fue de 0,5 kg *per cápita* (MAPA, 2007), lo que implica una ingesta diaria de 1,4 g de miel por persona. En consecuencia, la IDE de los acaricidas estudiados es de 0,185 ng/kg peso corporal, para flumetrina; 0,015 ng/kg peso corporal, para el fluvalinato; 0,016 ng/kg peso corporal para cumafós; 0,017 ng/kg peso corporal para bromopropilato y 0,009 ng/kg peso corporal para 4,4'-dibromobenzofenona.

La IDA (ingesta diaria admisible) se define como la dosis máxima de una sustancia que puede ser ingerida diariamente por un individuo durante toda la vida sin que le resulte perjudicial. Representa la centésima parte de la dosis máxima que no provoca efectos nocivos en especies animales estudiadas más sensibles. Se expresa como mg sustancia/kg peso corporal/día

La Agencia Europea de Evaluación de Medicamentos (EMA) ha establecido una IDA de 1800 ng/kg peso corporal para la flumetrina (EMA, 1995), 500 ng/kg peso corporal para el fluvalinato (EMA, 1995) y 250 ng/kg peso corporal para cumafós (EMA, 2001). Por otro lado, la FAO ha establecido una IDA de 800 ng/kg peso corporal para bromopropilato (FAO, 1993). No existe IDA para dibromobenzofenona.

Si relacionamos las IDEs con los valores de IDA, se observa que, en todos los casos, éstas son inferiores al 1% de la IDA establecida (FLM: 0,01%, FLV: 0,003%, CMF: 0,006%, BMP: 0,002%), lo que significa que el riesgo toxicológico para el consumidor es muy bajo.

6. CONCLUSIONES

“Después de cada línea de llegada, hay una de salida”. Agnes Gonxha (Teresa de Calcuta).

Primera

Los métodos analíticos optimizados y validados en este estudio satisfacen los criterios establecidos a nivel internacional. Es destacable la importancia de las metodologías presentadas ya que no existen métodos oficiales aprobados en miel para los residuos estudiados.

Segunda

Los métodos analíticos optimizados para el análisis rutinario de residuos de tetraciclinas y acaricidas de síntesis en muestras de miel son rápidos, sencillos y eficaces.

Tercera

El método analítico optimizado en nuestro estudio para residuos de acaricidas de síntesis en miel permite, por primera vez, la determinación multiresidual de flumetrina, fluvalinato, cumafós, bromopropilato y 4,4'-dibromobenzofenona en miel, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Cuarta

La extracción en fase sólida con cartuchos de 1 g de C₁₈, sin fase de lavado y elución con 13 ml de acetato de etilo:metanol (9:1), realizando una filtración positiva del extracto con un filtro de membrana de 0,22 µm, y una identificación y cuantificación mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de barrido de espectros (HPLC-DAD), permite una adecuada determinación de residuos de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina y doxiciclina en muestras de miel.

Quinta

La extracción en fase sólida con cartuchos de 0,5 g de C₁₈, lavando con 3 x 3 ml de metanol:agua (1:1), utilizando cartuchos de Na₂SO₄ y eluyendo los analitos de la columna con 10 ml de hexano, y una identificación y cuantificación mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de barrido de espectros (HPLC-DAD), permite una adecuada determinación de residuos de flumetrina, fluvalinato, cumafós, bromopropilato y 4,4'-dibromobenzofenona en muestras de miel.

Sexta

En el método de determinación multirresidual de tetraciclinas en miel, la no utilización de la fase de lavado y el empleo de filtros de membrana, son críticos para la obtención de un extracto libre de impurezas y una exactitud satisfactoria del método.

Séptima

En el método de determinación multirresidual de acaricidas de síntesis en miel, la introducción de una correcta fase de lavado y el empleo de cartuchos de Na₂SO₄, son críticos para la obtención de un extracto libre de impurezas y una exactitud satisfactoria del método.

Octava

Es la primera vez que se realiza la validación de un método analítico de residuos en miel conforme a todos los parámetros exigibles por la Decisión Europea 2002/657/CE para la validación de métodos analíticos e interpretación de resultados (especificidad, selectividad, estabilidad identificación, linealidad, precisión, exactitud, veracidad o recuperación, sensibilidad: $CC\alpha$ y $CC\beta$, robustez o aplicabilidad).

Novena

La pasteurización de la miel fortificada produce una degradación de las tetraciclinas, reduciendo significativamente la cantidad de las mismas en la miel. Esta degradación es variable según el tipo de tetraciclina y origen botánico de las muestras de miel.

Décima

Las tetraciclinas presentes en muestras de miel fortificada, sufren un proceso degradativo a lo largo del tiempo de almacenamiento y en condiciones de oscuridad. El tipo de miel influye en tal proceso, así en las mieles oscuras se degradan más rápidamente que en las claras, existiendo además una correlación entre la conductividad, la acidez y algunos parámetros colorimétricos (L, a y H) en el caso de oxitetraciclina y tetraciclina.

Undécima

No se han hallado residuos de flumetrina en muestras de miel a las seis y ocho semanas después del tratamiento de colmenas con Bayvarol®.

Duodécima

En las 20 muestras de miel cruda de diferentes orígenes botánicos y geográficos de Aragón, no se han encontrado residuos de flumetrina, fluvalinato, cumafós, bromopropilato y 4,4'-dibromobenzofenona, en ninguna de ellas por encima de los límites de detección del método utilizado.

Decimotercera

Teniendo en cuenta el consumo diario de miel en España, el perfil toxicológico de los acaricidas de síntesis estudiados, y la ausencia de estos residuos en las muestras analizadas, se han estimado ingestas diarias de estos acaricidas con la miel por debajo del 1% de su ingesta diaria admisible. Por todo ello, el riesgo sanitario de estos compuestos asociado al consumo de estas mieles es muy bajo.

7. RESUMEN

Con el fin de valorar los riesgos para la salud pública derivados de la presencia de residuos de tratamientos veterinarios en miel, se hace necesario el desarrollo de métodos analíticos que permitan la obtención de datos fiables sobre el grado de contaminación de esta matriz.

En el presente trabajo se han desarrollado y optimizado sendos métodos de análisis multiresiduo para la detección y cuantificación de residuos de antibióticos y acaricidas de síntesis en miel. Dichos métodos han sido sometidos a procesos de validación, siguiendo los criterios fijados por la Decisión de la Comisión Europea 657/2002/CE o reconocidos internacionalmente. Se han realizado estudios de campo en colmenas evaluando la degradación de flumetrina en la miel tras el tratamiento con Bayvarol[®]. Los estudios de degradación de tetraciclinas en miel bajo diferentes condiciones de ensayo se han llevado a cabo en laboratorio. Se ha analizado la presencia de residuos de acaricidas en mieles de la Comunidad Autónoma de Aragón. Por último, se ha valorado el riesgo sanitario derivado de la presencia de estos compuestos en las muestras de miel analizadas.

El método multiresidual de análisis de tetraciclinas (oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina y doxiciclina) en miel consiste en una preparación, extracción en fase sólida con cartuchos de C₁₈, sin fase de lavado, e identificación y cuantificación de los antibióticos mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de barrido de espectros (HPLC-DAD). Para la validación del método se han realizado estudios de linealidad, sensibilidad, repetibilidad, reproducibilidad y exactitud, a dos concentraciones diferentes de los analitos (50 ng/g y 350 ng/g). En relación a la sensibilidad del método estudiado, los límites de detección y de cuantificación de los 4 analitos son 1 ng/g miel y 5 ng/g miel, respectivamente. La repetibilidad y la reproducibilidad han mostrado valores de desviación estándar relativa inferiores a 10% para todos los analitos. Los porcentajes de recuperación están comprendidos entre 82 y 103%.

El método multiresidual de análisis de acaricidas de síntesis (flumetrina, fluvalinato, cumafós, bromopropilato y 4,4'-dibromobenzofenona) en miel consiste en una preparación, extracción en fase sólida con cartuchos de C₁₈, y de Na₂SO₄, e identificación y cuantificación de los acaricidas mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de barrido de espectros (HPLC-DAD). Para la validación del método se han realizado estudios de especificidad, selectividad, estabilidad identificación, linealidad, precisión, exactitud, veracidad o recuperación, sensibilidad: $CC\alpha$ y $CC\beta$ y robustez. En relación a la sensibilidad del método estudiado, los límites

de decisión ($CC\alpha$) y capacidad de detección ($CC\beta$) de los 5 analitos oscilan entre 8 y 115 ng/g miel, y entre 11 y 125 ng/g miel, respectivamente. La repetibilidad y la reproducibilidad han mostrado valores de desviación estándar relativa inferiores al 10% para todos los analitos. Los porcentajes de recuperación están comprendidos entre 89 y 97%.

Se ha llevado a cabo un estudio para determinar la estabilidad de las tetraciclinas en la miel mediante el cálculo de la degradación de estos antibióticos tras el proceso de pasteurización, y tras el almacenamiento prolongado a 25° C y en condiciones de oscuridad. La degradación de las 4 tetraciclinas por el proceso de pasteurización varía entre un 10 y un 19%. La degradación media de las 4 tetraciclinas debida al tiempo y oscuridad es de 18,5 % a los 30 días, 58,5% a los 90 días, y 83,5% a los 180 días. Se ha observado una correlación significativa ($\leq -0,7$ y $\geq 0,7$) entre la degradación de algunas tetraciclinas y ciertos parámetros relacionados con el color de las mieles, su acidez y su conductividad.

Se ha realizado un estudio de estabilidad de la flumetrina en la colmena tras un tratamiento convencional con dicho acaricida. Se evidenció la ausencia de este tipo de residuo en miel tras seis y ocho semanas posteriores al tratamiento.

Se analizaron 20 muestras de miel cruda de Aragón, correspondientes a los años 2005, 2006 y 2007, mediante la metodología descrita en esta tesis para la determinación multirresidual de acaricidas de síntesis. En ninguna de las muestras se encontraron residuos de flumetrina, fluvalinato, cumafós, bromopropilato, 4,4'-dibromobenzofenona, por encima de los respectivos límites de decisión del método ($CC\alpha$).

La Agencia Europea de Evaluación de Medicamentos ha establecido una IDA (Ingesta Diaria Admisible) de 1800 ng/kg peso corporal para la flumetrina (EMEA, 1995), de 500 ng/kg peso corporal para el fluvalinato y de 250 ng/kg peso corporal para el cumafós (EMEA, 2001). La FAO ha establecido una IDA de 800 ng/kg peso corporal para bromopropilato (FAO, 1993). No existe IDA para 4,4'-dibromobenzofenona. Si relacionamos las IDEs (Ingestas Diarias Estimadas) con los valores de IDA, se observa que, en todos los casos, éstas son inferiores al 1% de la IDA establecida. Valorando el perfil toxicológico y a tenor de los resultados obtenidos, esta contaminación no constituye un riesgo significativo para la salud del consumidor derivado del consumo de estas mieles.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Adamczyk, S., Lázaro, R., Pérez-Arquillué, C., Herrera, A. 2007. "Determination of synthetic acaricides residues in beeswax by HPLC with photodiode array detector". *Analytica Chimica Acta, Volume 581, 1, 95-101*.
- Adamczyk, S., Lázaro, R., Pérez-Arquillué, C., Conchello, P., Herrera, A. 2005. "Evaluation of residues of essential components in honey after different Anti-Varroa treatments". *J. Agric. Food Chem., 53, 26, 10085-10090*.
- Albero, B, Sanchez-Brunete, C, Tadeo, JL. 2001. "Multiresidue determination of pesticides in honey by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography with electron-capture detection". *J AOAC Int 84:1165-1171*.
- Alfredson, G., Branzell, C., Granelli, K., Lundström, A. 2005. "Simple and rapid screening and confirmation of tetracyclines in honey and egg by a dipstick test and LC-MS/MS". *Analytica Chimica Acta, 529, 47-51*.
- Alippi, A., Albo, G., Leniz, D., Rivera, I., Zanelli, M., Roca, A., 1999. "Comparative study of tylosin, erythromycin and oxytetracycline to American foulbrood of honey bees". *J. of Apicultural Research. 38, 149-158*.
- Al-Rifai, J. N. Akeel, 1997. "Determination of pesticide residues in imported and locally produced honey in Jordan" *J. Apicult. Res. 36 155-161..*
- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M.R. 1999. "Resistance of antimicrobial drugs and feed additives in animal products: regulatory aspects". *Livest. Prod. Sci. 59., 183-198*.
- Anderson D., Trueman J. W. H. 2000. "Varroa jacobsoni (Acari: Varroidae) is more than one species". *Experimental & Applied Ácarology, 24, 165-189*.
- Argauer, R.J., Moats WA., 1991. "Degradation of oxytetracycline in honey as measured by fluorescence and LC assays". *Apidologie. 22, 109-115*.
- Assil, H.I., Sporns, P. 1991. Elisa and HPLC methods for analysis of fumagillin and its decomposition products in honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39, 2206-2213*.
- Atienza, J., Jiménez, J.J., Bernal, J.L. Martín, M.T. 1993. "Supercritical fluid extraction of fluvalinate residues in honey. Determination by high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr. A 655, 95*.

- Ayet, J. (2007). Document de travail des services de la Commission. "Document accompagnant le troisième rapport de la Commission au Conseil et au Parlement européen sur l'application du règlement (CE) n° 797/2004 du Conseil relatif aux actions visant à améliorer les conditions de la production et de la commercialisation des produits de l'apiculture".
- Barcarolo, R., Tealdo, E., Tutta, C. 1988. "Multiresidue determination of organochlorine and triazine pesticides in homogenized milk". *Journal of high resolution chromatography & chromatography communications* 11, 77, 539-541.
- Barker, S., Long, A., Short, C. 1989. "Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion". *J. Chromatogr. A* 47, 2, 353-361.
- Bermejo, M. F. 1991. "Química analítica general, cuantitativa e instrumental". Vol. 2. Ed. Paraninfo, S. A. Madrid.
- Bernal, J.L., Nozal, M.J., Rivera, J.M., Jiménez, J.J., Atienza J. 1996. "On-line solid-phase extraction coupled to supercritical fluid chromatography with diode array detection for the determination of pesticides in water". *J. Chromatogr. A* 754, 147.
- Bernal, J., Nozal, M., L., Jiménez, J., Atienza J. 1997. "Matrix effects in the determination of acaricides and fungicides in must by gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection". *J. Chromatogr. A* 778, 111.
- Bernal, J.L., Jiménez, J.J. Nozal, M.J., Higes, M., Llorente J. 2000. "Gas chromatographic determination of acrinathrine and 3-phenoxybenzaldehyde residues in honey". *J. Chromatogr. A* 882, 239.
- Blanco-Gomis D., Castaño A., Megido, V., Gutiérrez, M. 1994. "High-performance liquid chromatographic determination of cymiazole in honey with UV and electrochemical detection". *Chromatographia* 39, 602.
- Blanco-Gomis, D.B., Mangas, J.J., Castaño, A., Gutiérrez, M.D. 1996. "Determination of acaricides in honey by liquid chromatography with ordinary, narrow-bore, and microbore columns". *Anal.Chem.* 68, 3867-3870.
- Blasco, C., Fernández, M., Picó, Y., Font, G. 2004. "Comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction for determining six OPPs insecticides in honey by liquid chromatography-mass spectrometry" *J. Chromatogr. A*. 1030, 77-85.

- Blasco, C., Fernández, M., Pena, A. Lino, C., Silveira, G., Picó, Y., Font A., 2003. "Assessment of pesticide residues in honey samples from Portugal and Spain ". *J. Agric. Food Chem.* 51, 8132.
- Bogdanov, S., Imdorf, A., Kilchenmann, V. 1998. "Acaricide residues in some bee products". *Journal of Apicultural Research* 37, 2, 57-67.
- Bogdanov, S., Imdorf, A., Kilchenmann, V., Gerig, L. 1990. "Residues in beeswax, winter sugar stores and honey after treatments with Apistan and Folbex VA". Proceeding of the Fourth International Symposium on the Harmonization of Methods for Testing the Toxicity of Pesticides to Bees, May 15-18, 1990, Rez near Prague, Czechoslovakia, 1-3.
- Bogdanov, S., Kilchenmann, V., Imdorf, A. 1997. "Acaricide residues in beeswax and honey". In A. Mizarhi & Y.Lensky, *Bee products properties, applications, apitherapy*, New York: Plenum Press 239-246.
- Calderón, V., González, J., Díez, P., Berenguer, J.A. 1996. "Evaluation of a multiple bioassay technique for determination of antibiotic residues in meat with standard solution of antimicrobials". *Food Additives and Contaminants* 13, 13-19.
- Cardenal, J.A., Calvo, J.C., Gómez, M., Calvo, G., Aranda, M.J., Estévez M.A., Estévez M.J. 200. "Seguridad alimentaria y medicamentos veterinarios en apicultura (I)". *Vida Apícola* 133, 51-58.
- CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) 1986. "Colorimetry". Publication CIE, 15(2).
- Colin, M.E., Vandame, R., Jourdan, P., Di Pasquale S. 1997. "Fluvalinate resistance of *Varroa jacobsoni* Oudemans (Acari: Varroidae) in the Mediterranean apiaries of France". *Apidologie* 28, 375-384.
- Comisión Europea (Documento N° SANCO/3103/2000), (1999/2000). Quality control procedures for pesticide residues analysis. Guidelines for Residues Monitoring in the European Union. Second edition.
- Crespo, J.M., Cardenal, J.A., Quesada, P.D., Gómez, A. 2006. "Primeras aportaciones en etiología de las principales enfermedades de las abejas". *Vida Apícola* 138, 21-27.

- De Greef, M., De Wael, L., Van Laere, O. 1994. "The determination of the fluvalinate residues in the Belgian honey and beeswax". *Apiacta XXIX*, 83-87.
- De Jong, D. 2004. "Diagnóstico y control de loque americana". *Vida Apícola* 126, 44-45.
- Decisión de la Comisión Europea del 12 de Agosto del 2002 (657/2002/CE), por la que se aplica la directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y a la interpretación de los resultados.
- Demócrito de Abdera en los Libros I-II del Banquete de los eruditos. Trad. de Lucía Rodríguez-Noriega Guillén. *Madrid: Biblioteca Clásica Gredos. 1998. 194-195.*
- Demoly, P., Romano, A. 2005. "Update on Beta-Lactam allergy diagnosis". *Curr Allergy Asthma Rep.* 1, 9-14.
- Diéguez, S., Soraci, A., Bedascarrasbure, E., Libonatti, C. 2000. "Metodología analítica para la detección de residuos de oxitetraciclina en miel". *RIA (1): 159-166.*
- Díez, P., Calderón, V. 1997. "Empleo de antibióticos en veterinaria". *Revista Española de Quimioterapia.* 10, 275-280.
- Elzen, P.J., Baxter, J.R., Spivak, M., Wilson W.T. 2000. "Control of *Varroa jacobsoni* Oud. resistant to fluvalinate and amitraz using coumaphos". *Apidologie* 31, 437.
- EMEA. 1995. "Tau Fluvalinate Summary Report. Committee for veterinary medicinal products. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Veterinary Medicines evaluation Unit.". (<http://www.emea.eu.int>).
- EMEA. 1995. "Oxitetraacycline, Tetracycline and Chlortetracycline Summary report. Committee for veterinary medicinal products. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Veterinary Medicines evaluation Unit.". (<http://www.emea.eu.int>).
- EMEA. 1996. "Doxycycline Summary report. Committee for veterinary medicinal products. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Veterinary Medicines evaluation Unit.". (<http://www.emea.eu.int>).
- EMEA. 1998, 2000. "Flumethrin Summary Report. Committee for veterinary medicinal products. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Veterinary Medicines evaluation Unit". (<http://www.emea.eu.int>).

- EMEA. 1999. "Antibiotics resistance in EU associated with therapeutical use of veterinary medicines". EMEA/ CVMP/342/99-Final, London.
- EMEA. 2001. "Coumaphos Summary report. Committee for veterinary medicinal products. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Veterinary Medicines evaluation Unit.". (<http://www.emea.eu.int>).
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 1993. Bromopropylate (70). FAO/WHO Joint Meeting of Pesticide Residues, Geneva 20-29 September 1993. 29-61. (<http://www.fao.org>).
- FDA (Food and Drug Administration), 1994. "Pesticide Analytical Man. Vol. I. Methods which detect multiple residues". US. Dep. Health and Human Services. 3rd ed.
- FDA (Food and Drug Administration). 2000. "Guideline for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation".
- FDA (Food and Drug Administration). 2003. "pesticides tolerances". (<http://www.cfsan.fda.gov>).
- Fernández, M., Picó, Y., Mañes J. 2002. "Analytical Methods for Pesticide Residues Determination in Bee Products". *J. Food Protec.* 65, 9. 1502-1511.
- Fernández, M., Simal, J. 1993. "Gas Chromatographic-mass spectronic method for the simultaneous determination of amitraz, bromopropylate, coumaphos, cimiazol and fluvalinato residues in honey". *Analyst.* 118, 1519-1522.
- Fernández, M.A., Sancho, T., Simal, J., Creus, Huidobro J., 1997. "Acaricide residues in honey from Galicia (N.W. Spain)". *J.F. Food Protec.* 60, 78.
- Floris, I., Satta, A., Garau, V.L., Melis, M., Cabras, P., Aloul, N. 2001. "Effectiveness, persistence, and residues of amitraz plastic strips in apiary control of *Varroa Destructor*". *Apidologie* 32, 577-585.
- Fong, W.G., Moye, H.A., Seiber, J.N., Toth, J.P. 1999. In: Winefordner, J.D. (ed) Pesticide residues in foods: methods, techniques, and regulations. Wiley-Interscience, New York.
- Galeano, T., Guiberteau, A., Salinas, F. 1990. "Rapid determination of sulfathiazile, oxytetracycline and tetracycline in honey by high performance liquid chromatography". *Analytical Letters* 23 (4): 607-616.

- García-Lorca F. 1918. "El canto de la miel". Libro de poemas.1921. Alejandro Castañón García. (<http://www.xuliocs.com/Esquisa/alexandrab.htm>).
- Geertsen, G., Pedersen, B. 2004. "Determination of residual tetracyclines in honey by HPLC-UV; Optimizing and validation. Danish Veterinary and Food Administration".
- Gnädinger, F. 1989. "The beekeepers and the residues in honey. Present status in Europe and progress in the Varroa mite control". Proc. Meet. EC-Expert Group, Udine 1988, *R Cavalloro ed., CEC Luxemburg, 365-368*.
- Gómez, D., Navaza, J., Quintáns, L., 2004. "Estudio viscométrico preliminar de las mieles de bosque denominación específica *miel de Galicia*". *Ciencia y Tecnología Alimentaria. 4, 4, 234-239*.
- Gomis, D.B., Mangas, J.J., Castaño, A., Gutiérrez, M.D. 1996. "Determination of acaricides in honey by liquid chromatography with ordinary, narrow-bore, and microbore columns". *Anal.Chem. 68, 3867-3870*.
- Halvatzis, S. Timotheou-Potamia, M., Calokerinos, A. 1993. "Continuous-flow chemiluminometric determination of tetracyclines in pharmaceutical preparations and honey by oxidation with N-bromosuccinimide". *Analyst. 118, 633-637*.
- Harris, D. C. 2001. "Análisis químico cuantitativo". *Ed. Reverte, S. A. Barcelona*.
- Heering, W., Usleber, E., Dietrich R., Martbauer E., 1998. "Inmunochemical screening for antimicrobial drug residues in commercial honey". *The Analyst, 123, 2759-62*.
- Herrera, A., Pérez-Arquillue, C., Conchello, P., Bayarri, S., Lázaro, R., Yagüe, C., Ariño, A. 2005. "Determination of pesticides and PCBs in honey by solid-phase extraction cleanup followed by gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection ". *Anal. Bioanal. Chem. 381, 695*.
- International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requeriments for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 1995. "validation of the Analytical Procedures ICH-Q2A". Genova.
- Ivie, G., Rowe, L. 1986. "Chemistry of drugs used against arthropod Parasites. Chemotherapy of parasitic diseases". *Plemun Press New York, 507- 529*.
- Jansson, C. 2000. "Multiresidue method for the gas chromatographic determination of pesticides in honey after solid-phase extraction cleanup". *J. AOAC Int. 83, 714*.

- Jean-Prost, P. 2001. "Apicultura". *Ediciones Mundi-Prensa, Madrid-Barcelona-Méjico*.
- Jimbo, K., Monma, C., Matsumoto, M., Maruyama, T., 1992. "Simplified Detection Method for Residual Tetracyclines and Sulfa Drugs in Honey by Microbiological Assay". *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H. 33, nº 3, 217-222*.
- Jiménez, J.J., Bernal, J.L., Nozal, M.J., Novo, Higes, M., Llorente, J. 2000. "Determination of rotenone residues in raw honey by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr. A 871, 67*.
- Jiménez, J.J., Bernal, J.L., Nozal, M.J., Toribio, L., Martín, M.T. 2002. "Capillary gas chromatography with mass spectrometric and atomic emission detection for characterization and monitoring chlordimeform degradation in honey ". *J. Chromatogr. A 946, 247*.
- Jiménez, J.J., Bernal, J.L., Atienza. J. 1996. "CGC/AED and CGC/ECD/NPD comparison for the determination of acaricides in honey after hexane/acetone extraction". *Chromatografía 42, 130*.
- Jiménez, J.J., Bernal, J.L., Nozal, M.J., Toribio, L., Martín, M.T.1998. "Solid-phase microextraction applied to the analysis of pesticide residues in honey using gas chromatography with electron-capture detection". *J. Chromatogr. A 823, 381*.
- Jurgens, U. 1981. "Zur hochdruckflüssigchromatographischen Analyse von Arzneimittelrückständen in Honig". *Z Lebensm Unters Forsch 173, 356-358*.
- Klein, E., Weber, W., Hurler, E., Mayer, L. 1986."Gaschromatographische Bestimmung von Isopropyl-4,4-dibrombenzilat (Brompropylat), 4,4-Dibromobenzophenon und verschiedenen Akariziden in Honig und Warbenwachs". *Deutsche Lebensmittel-Rundschau 82., 6, 185-187*.
- Kochansky, J. 2000. "Analysis of oxytetracycline in extender patties". *Apidologie 31, 517-524*.
- Kochansky, J., Wilzer, K., Feldlaufer, M. 2001. "Comparison of the transfer of coumaphos from beeswax into syrup and honey". *Apidologie 32, 119-125*.
- Korta, E., Bakkali, A., Berrueta, L., Gallo, B., Vicente, F., Kilchenmann, Bogdanov S. 2001. "Study of acaricides stability in honey. Characterization of Amitraz degradation products in honey and beewax". *J. Agric. Food Chem. 49, 5835-42*.

- Levy, S, Fitzgerald, G. y Macone, A. 1976. "Changes in intestinal flora of farm personnel after introduction of tetracycline supplemented feed on a farm". *New England J. Med.* 295, 583-588.
- Liang, Y., Denton, M.B., Bates, R. 1998. "Stability studies of tetracycline in methanol solution". *Journal of Chromatography A*, 827, 45–55.
- Llorente, J. 2007. "El síndrome de despoblamiento de colmenas. Programa Nacional de lucha contra las enfermedades de las abejas de miel". Ponencia en Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. Noviembre de 2007.
- Lodesani, M., Pellacani, A., Bergomi, S., Carpana, E., Rabitti, T., Lasagni, P. 1992. "Residue determination for some products used against Varroa infestation in bees". *Apidologie* 23, 257-272.
- Macedo, P.A., Ellis, M.D., Siegfried, B.D. 2002. "Detection and quantification of fluralinate resistance in Varroa mites in Nebraska". *American Bee Journal* 523-6.
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). 2007. "La Alimentación en España 2006, Consumo. Millones de kg/l/un". (<http://www.mapa.es/alimentación>).
- MAPA. 2007. Programa Nacional de medidas de ayuda a la apicultura en España. 2008-2010. MAPA. Dirección General de Ganadería. Subdirección General de porcino, avicultura y otras producciones ganaderas.
- Martel, A.C., Zeggane, S. 2002. "Determination of acaricides in honey by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection". *J. Chromatogr. A*. 954, 173-180.
- Mascher, A., Lavagnoli, S., Curatolo, M. 1996. "Determination of residual oxitetracycline in honey with an immunoassay kit". *Apidologie*. 27, 229-233.
- Matsuka, M., Nakamura, H. 1990. "Oxitetracycline residues in honey and royal jelly". *Journal of Apicultural Research* 29. 112-117.
- Maver, L., Poklukar, J. 2003. "Coumaphos and amitraz residues in Slovenian honey". *Apiacta* 38, 54-57.
- Menkissoglu, U., Diamantidis, G.C., Georgiou, V.E., Thrasyvoulou. A.T. 2000. *J.AOAC Int.* 83, 178.

- Menkissoglu-Spiroudi, U., Tsigouri, A.D., Diamantidis, G.C., Thrasyvoulou, A.T., 2001. "Residues in honey and beeswax caused by beekeeping treatments". *Fresenius Environmental Bulletin* 10, 5, 445-450.
- Milani, N., Della-Vedova, G. 2002. "Decline in the proportion of mites resistant to fluvalinate in a population of *Varroa destructor* not treated with pyrethroids". *Apidologie* 33, 417-421.
- Milani, N. 1995. "The resistance of *Varroa jacobsoni* Qud. to pyrethroids: a laboratory assay". *Apidologie* 26, 415-429.
- Miller, P. 2007. "Teoría de los emjambres". *National Geographic*, julio 2007, 90-111.
- Mitra, S. 2003. "Sample preparation techniques in analytical chemistry". *John Wiley and Sons Inc. Hoboken, New Jersey*.
- Moreno, A. "Manual de Control de Enfermedades Apícolas (Descripción, diagnóstico y tratamiento)". (<http://www.promer.cl/getdoc.php?docid=751>).
- Mozes-Koch, R., Slabezki, Y., Efrat, H., Kalev, H., Kamer, Y., Yakobson, B.A., Dag, A. 2000. "First detection in Israel of fluvalinate resistance in the varroa mite using bioassay and biochemical methods". *Experim. Appl. Acarol.* 24, 35-43.
- Münstedt, T., Rademacher, E., Petz, M. 2002. "HPLC, Charm II and ELISA: advantages and disadvantages for the analysis of tetracyclines in honey". International Symposium APIMONDIA. Preventing Residues in Honey, Celle, 10.-11. (<http://www.apiservices.com/apimondia>).
- Mutinelli, F. 2003. "European legislation governing the authorisation of veterinary medicinal products with particular reference to the use of drugs for control of honey bee diseases". *Apiacta* 38, 156-168.
- Nakaya, K., Kobayashi, Y., Tanahashi N. 1991. "Fluorometric determination of tetracyclines in honey by high performance liquid chromatography". *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 32 p. 43.
- Nakazawa, H., Ino, S., Kato, K., Watanabe, T., Ito, Y., Oka H. 1999. "Simultaneous determination of residual tetracyclines in foods by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry". *J. Chromatogr. B* .732, 173-180.

- Norma UNE 82009-1:1998. "Exactitud (veracidad y precisión) de los resultados y métodos de medición".
- OCU, 2003. "Antibióticos en alimentos. Un verdadero problema". *OCU-SALUD* 46,7-14.
- Oka, H., Ito, Y., Ikai, Y., Kagami, T., Harada K. 1998. "Mass Spectrometric Analysis of Tetracycline Antibiotics in Foods". *Journal of Chromatography A*, 812: 309-319
- Oka, H., Ikai Y., Hayakawa, J., Harada, K., Asukabe, H., Suzuki, M., Himei, R., Morie, M., Nakazawa, H., McNeil, J., 1994. "Improvement of Chemical Analysis of Antibiotics. Identification of Residual Tetracycline in Honey by frit FAB/LC/MS Using a Volatile Mobile Phase". *J. of Agri. And Food Chemistry*. 42, 2215-2219.
- Oka, H., Ikai Y., Hayakawa, J., Harada, K., Suzuki, M. 1994. "Improvement of chemical analysis of antibiotics. Part XIX: Determination of tetracycline antibiotics in milk by liquid chromatography and thin-layer chromatography/fast atom bombardment mass spectrometry". *Journal of AOAC International* 77, 4, 891-895.
- Oka, H., Ikai, Y., Kawamura, N., Uno, K., Yamada, M. 1987. "Simultaneous analysis of seven tetracyclines in honey". *J. of Chromatography*. 400, 253-261.
- Oka, H., Ikai Y., Kawamura, N., Uno, K., Yamada, M., Harada, K., Asukabe, H., Morie, Y., Suzuki, R. 1987. "Improvement of chemical analysis of antibiotics. Part IX: simple methods for residual tetracyclines analysis in honey using a tandem cartridge clean-up system". *J. Chromatogr. A* 389, 417-426.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 1997. "The medical impact of the use of antimicrobials in food animals". Ginebra, Suiza.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2001. "Antibiotics resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups". Ginebra, Suiza
- ORA (Dutch Discussion Group for Residue Analysis). Haagsma N., Ellen G., Stephany R. W., Ruig W. G. 1995 "Definitions for the determination of drug residues in food of animal origin".
- Orden Ministerial del 12 de junio de 1986, por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis para la miel. Publicada en el BOE 145 del 18/06/1986.
- Pagliuca, G., Gazzotti, T., Serra, G, Sabatini, A., 2002 "A scientific note on the determination of oxytetracycline residues in honey by HPLC-UV detection". *Apidologie*. 33, 583-584.

- Pastor, N., Morais, S., Maquieira, A., Puchades, R. 2007. "Synthesis of haptens and development of a sensitive immunoassay for tetracycline residues. Application to honey samples". *Anal. Chim. Acta.* 2. 594(2):211-8.
- Pena, A., Pelantova, N., Lino, C., Silveira, M., Solich, P. 2005. "Validation of an analytical methodology for determination of oxitetracycline and tetracycline residues in honey by HPLC-FLD". *J Agric Food Chem.* 53 (10), 3784.
- Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., Friss, C., Jones, R., Nightingale, C., Preston, R. Waddell, J. 2004. "Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data". *J Antimicrob. Chemother.* 53, 28-52.
- Piana, G. 1989 "La miel: alimento de conservación natural." *Ed. Mundi Prensa. Madrid.*
- Puerta, F., Flores, J.M., Ruiz, J.A., Ruz, J.M., Campano, F. 2001. "Enfermedades de las Abejas. Prevención, diagnóstico y tratamiento". *Edita COAG Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía (España).*
- Ramis-Ramos, G., García, M.C. 2001. "Quimiometría" *Ed. Síntesis. Madrid.*
- Real Decreto 1049/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Norma de calidad relativa a la miel. BOE núm. 186.
- Reglamento (CEE) nº 2377/90 del Consejo, de 26 de junio de 1990, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal.
- Reybroeck, W. 2003. "Residues of antibiotics and sulphonamides in honey on the Belgian market". *APIACTA* 38, 23-30.
- Rial-Otero, R., Gaspar, E.M., Moura, I., Capelo, J.L. 2007. "Chromatographics-based methods for pesticide determination honey: An overview". *Talanta.* 71, 503-514.
- Richtlinien zur Bekämpfung der Bienenkrankheiten, Ausgabe März. 2003. Zentrum fuer Bienenforschung, Eidgenoessische Forschungsanstalt fuer Milchwirtschaft, Liebefeld, Ch-3003 Bern, 1-38. (<http://www.alp.admin.ch>).
- Rissato, S.R., Galhiane, M.S., Knoll, F., Apon, B. 2004. "Supercritical fluid extraction for pesticide multiresidue analysis in honey: determination by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometry detection ". *J. Chromatogr. A* 1048, 153.

- Rissato, S.R., Galhane, M.S., de Almeida, M.V., Gerenutti, M., Apon, BM. 2007. "Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography-mass spectrometry and application in environmental contamination". *Food Chem.* 101, 1719–1726.
- Ritter, W. 2001. "Enfermedades de las abejas". *Editorial Acribia, S.A. Zaragoza (España)*.
- Rouessac, F., Rouessac, A. 2003. "Análisis químico: Métodos y técnicas instrumentales modernas". *Ed. McGraw Hill*.
- Russo, M.V., Neri, B. 2002. "Fluvalinate Residues in Honey by Capillary Gas Chromatography- Electron Capture Detection - MS". *Chromatographia* 55 607.
- Sabatini, AG., Carpara, E., Serra, G. y Colombo, R. 2003. "Presence of acaricides and antibiotics in samples of Italian honey". *APIACTA* 38, 46-49.
- S. G. Porcino, Avicultura y otras Producciones Ganaderas.2006. Comisión de la UE y Departamento de Aduanas e Importaciones Especiales (Agencia Tributaria) 2006.
- SAG, 2006. Programa Nacional para el control de la loque americana, Gobierno de Chile, División de protección pecuaria, Servicio Agrícola y Ganadero. (<http://www.sag.gob.cl>).
- SAGARPA. 2007. Manual de patología apícola. Programa nacional para el control de abeja africana Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación de Méjico. (<http://www.sagarpa.gob.mx/ganadería>).
- Sáinz, C., Gómez, C. 2000. "Mieles Españolas. Características e identificación mediante análisis del polen". *Ediciones Mundi-Prensa. Madrid-Barcelona-México*.
- Salvachúa, J. C., Robles, E.M. 2005. "Harvesting, collection and traditional processing of honey". *Alimentación, Equipos y Tecnología, 2005, 24. 199, 91-100*.
- Sánchez, C., Alberó, B., Miguel, E., Tadeo, J. 2002. "Determination of insecticides in honey by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography with NPD and mass spectrometric confirmation". *J. AOAC Int.* 85, 128.
- Sancho, T., Muniategui, S., Huidobro, J.F., Simal, J. 1991. "Análisis de residuos de fluvalinato en la miel mediante GC/ECD". *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 31, 3, 417-422.

- Severo da Silva, L., Rath, S., Rey, F. 2006. "Residues in the whey, a raw material used in the food industry. Effect of processing on the degradation of tetracyclines in milk and milk products". *Toxicology Letters* 164S, s274.
- Sheth, H.B., Sporns, P. 1990. "Enzyme immunoassay for screening of sulfathiazole in honey". *Journal of AOAC International*. 73(6). 871-874.
- Silveira, H., Gomes, W. 2004. "Application of the matrix solid phase dispersion (MSPD) technique in the analysis of pesticides in okra by GC-MS". *Quim. Nova* 27, 892.
- Slabezki, Y., Gal, H., Lensky, Y. 1991. "The effect of fluvalinate application in bee colonies on population levels of *Varroa jacobsoni* and honey bees (*Apis mellifera* L.) and on residues in honey and wax". *Bee Science* 1, 4, 189-195.
- Sporns, P., Kwan, S., Roth, L. 1986. "HPLC Analysis of Oxitetracycline Residues in Honey". *J. of Food Protection*". 49, 383-388.
- Szerletics-Túri, M. 1999a. "Determination and control of bee-acaricide flumethrin in honey and beeswax". *Acta Alimentaria* 28, 1, 85-94.
- Szerletics-Túri, M., Szalai Mátray, E. 1999b. "Determination of Acrinathrin residues in honey and beeswax". *Acta Veterinaria Hungarica* 47, 2, 173-179.
- Takeba, K., Kanzani, M., Murakami, F., Matsumoto, M. 1984. "Simplified analytical Method for Tetracyclines Residues in Honey by HPLC". *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.* 35, 187-191.
- Tekel, J., Hatrik, S. 1996. "Pesticide residue analyses in plant material by chromatographic methods: clean-up procedures and selective detectors". *J. Chromatogr. A* 754, 397-410.
- Thompson, H.M., Brown, M.A., Ball R.F., Medwin, H.B. 2002. "First report of *Varroa destructor* resistance to pyrethroids in the UK". *Apidologie* 33, 357-366.
- Thompson, H.M., Waite, R., Wilkins, S., Brown, M., Bigwood, T., Shaw, M., Ridgway, C., Sharman, M. 2005. "Effects of European foulbrood treatment regime on oxytetracycline levels in honey extracted from treated honeybee (*Apis mellifera*) colonies and toxicity to brood". *Food Addit Contam.* 2005. 22 (6).573-8.
- Thrasylvoulou, A.T., Pappas, N. 1988. "Contamination of honey and wax with malathion and coumaphos used against the varroa mite". *Journal of Apicultural Research* 27, 1, 55-61.

- Tolosa, I., Readman, J. W., Mee, L. D. 1996 "Comparison of the performance of solid-phase extraction techniques in recovering organophosphorus and organochlorine compounds from water". *Journal of chromatography. A.* 725,1, 93-106.
- Tremolada, P., Bernardinelli, I., Colombo, M., Spreafico, M., Vigh, M. 2004. "Coumaphos distribution in the Hive Ecosystem: Case study for modeling applications". *Exotoxicology* 13, 589-601.
- Trouiller, J. 1998. "Monitoring *Varroa jacobsoni* resistance to pyrethroids in western Europe". *Apidologie* 29, 537-546.
- Tsigouri A., Menkissoglu-Spiroudi U., Thrasyvoulou A. 2001. "Study of Tau-fluvalinate persistence in honey". *Pest Management Science* 57, 467-471.
- Tsigouri, A., Menkissoglu-Spiroudi, U., Thrasyvoulou, A., Diamantidis, G. 2003. "Fluvalinate residues in Greek honey and beeswax". *Apiacta* 38, 50-53.
- Tsipi, M., Triantafyllou, D., Hiskia. A. 1999. "Determination of organochlorine pesticide residues in honey, applying solid phase extraction with RP-C18 material". *Analyst* 124, 473.
- Van Buren, N., Marien, J., Velthuis, H., Oudejans, R. 1992. "Residues in beeswax and honey of Perizin, an acaricide to combat the mite *Varroa Jacobsoni* Oudemans (Acari: Mesostigmata)". *Environ. Entmol.* 21, 4. 860-865.
- Viñas, P., Balsalobre, N., López-Herroz, H., Hernández-Córdoba, M., 2004. "LC with ultraviolet absorbance detection for the analisis of tetracycline residues in honey". *J. of Chromatography A.* 1022, 125-129.
- Volante, M., Galarini, R.V., Miano, M., Cattaneo, I., Pecorelli, M., Bianchi, M.T., Marinoni, L., Cossignani, P., Damiani. 2001. *Chromatographia* 54, 241.
- Waliszewski, S., Infanzón, R., Carvajal, O., Maxwell, M. 2003. "Removing T- fluvalinate residues from press-extracted honey". *J. Sci. Food Agri.* 83, 1225-27.
- Waliszewski, S., Pardio, V., Waliszewski, K., Ochoa, A., Infanzon R. 1998. *J. Sci. Food Agric.* 77, 149.
- Wallner, K. 1999. "Varroacides and their residues in bee products". *Apidologie* 30, 235-248.

- Wan G.H., Hua, C., Hai-Song, Z., Jian, Z., Li-Juan, L., Xiao-Feng, Y. 2005. "Determination of tetracyclines residues in honey using high-performance liquid chromatography with potassium permanganate–sodium sulfite– β -cyclodextrin chemiluminescence detection". *J. Chromatography B.* 824, 1-2, 57-64.
- Willians, D.L. 2000. "A Veterinary Approach to the European Honey Bee (*Apis mellifera*)". *The Veterinary Journal*, 160, 61–73.
- Witte, W. 2000. "Anti microbial therapy in a historical perspective". *Acta vet. Scand Supple.* 93, 7-16.
- Xie, H., Chuan, D., Weijun, J., Yansheng, W., Changsong, L., Sushe, Z., Bailing, Z. 1996. "Solid surface room temperature phosphorescence of tetracycline Antibiotics". *Analytica Chimica Acta* 319, 239-247.
- Yu, J., Wu, C., Xing, J., Jun, J. 2004. "Development of new solid-phase microextraction fibers by sol-gel technology for the determination of organophosphorus pesticide multiresidues in food". *J. Chromatogr. A.* 1036, 101.
- Zerba, E. 1988. "Insecticidal activity of pyrethroids on insects of medical importance". *Parasitology Today*, 4 (7), 53-57.
- Zimmermann, S., Gierschner, K.H., Vorwohl, G. 1993. "Bestimmung von Brompropylat, 4,4'-Dibrombenzophenon, Coumaphos und Fluvalinat in Bienenwachs". *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 89, 11, 341-343.

Páginas web consultadas

<http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert>

<http://www.biblioredes.cl/NR/rdonlyres/73CDB6E4-0878-46F3-A10E-8807194E44F9/70291/MIEL.doc>

<http://www.drugs.com/vet/bees.html>

http://www.infoagro.com/agricultura_ecologica/apicultura.htm

http://www.fao.org/ag/agp/agpp/Pesticid/JMPR/Download/96_eva/flumethr.pdf

<http://www.sahpa.com/manejoapicola.htm>

