



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

ANÁLISIS DE RESIDUOS DE ACARICIDAS EN MUESTRAS
DE MIELES ARAGONESAS

RESIDUE ANALYSIS OF ACARICIDES IN HONEY SAMPLES FROM ARAGÓN

Autor/es

SORAYA MAGOURA GALINDO

Director/es

CONSUELO PÉREZ ARQUILLUÉ
REGINA LÁZARO GISTAU

Facultad de Veterinaria

2017

Datos personales del alumno:

APELLIDOS, NOMBRE: MAGOURA GALINDO, SORAYA

DNI: 77135005 – C

CORREO ELECTRÓNICO: hyphen26@gmail.com

ÍNDICE

1. Resumen	1
1.1. Resumen	1
1.2. Abstract	2
2. Introducción.....	3
2.1. Miel: aspectos bromatológicos.....	3
2.2. Peligros abióticos e inocuidad de la miel	7
2.3. Tratamientos con acaricidas utilizados frente a <i>Varroa</i>	10
2.3.1. Parásito y enfermedad	10
2.3.2. Tipos de tratamientos acaricidas frente a <i>Varroa</i>	12
2.3.3. Características del cumafós y medicamento autorizado	14
2.4. Control de la presencia de residuos de acaricidas en miel	16
3. Justificación y objetivos	19
4. Metodología.....	20
4.1. Revisión bibliográfica	20
4.2. Análisis experimental.....	20
4.2.1. Muestras analizadas.....	20
4.2.2. Materiales, equipos y reactivos	20
4.2.3. Preparación de las muestras	22
4.2.4. Análisis de muestras.....	22
5. Resultados y discusión	26
6. Conclusiones.....	28
6.1. Conclusiones	28
6.2. Conclusions	28
7. Identificación de las aportaciones, que en materia de aprendizaje, han supuesto la realización de esta asignatura	29
8. Evaluación de la asignatura y sugerencias de mejora	29
9. Bibliografía.....	30

1. RESUMEN

1.1. RESUMEN

Bajo el punto de vista nutricional, la miel es un alimento rico en hidratos de carbono, principalmente fructosa y glucosa, y altamente energético ya que aporta en torno a 300 kcal/100g. Proviene 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.

Cabe destacar la importancia de la varroosis, parasitosis externa causada por el ácaro *Varroa destructor*, que afecta a las abejas melíferas (*Apis mellifera*) en todas sus fases de desarrollo. Es una de las enfermedades más graves de esta especie y, si no es convenientemente tratada, produce alta mortalidad en las colonias. Es por ello que se llevan a cabo tratamientos con medicamentos veterinarios a base de distintos acaricidas de síntesis o bien naturales como ácidos orgánicos, aceites esenciales, entre otros. En el presente trabajo se ha procedido al análisis de varias muestras de miel aragonesas para determinar la presencia de residuos de cumafós, mediante la aplicación de un método cromatográfico, puesto a punto y validado en el Laboratorio de la Unidad de Nutrición y Bromatología, basado en la extracción y purificación mediante extracción en fase sólida (SPE), seguido de identificación y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los resultados de dicho análisis fueron positivos, pero en ningún caso las concentraciones halladas de este residuo sobrepasaban los límites máximos permitidos legalmente, ni suponían un riesgo para la salud del consumidor teniendo en cuenta el nivel de ingesta diaria de dicho alimento.

1.2. ABSTRACT

From the nutritional point of view, honey is a food rich in carbohydrates, mainly fructose and glucose, and highly energetic and provides around 300 kcal/100 g. It comes from the nectar of plants or from the secretions of live parts of plants or from the excretions of sucking insects present in the living parts of plants, that bees collect, transform, combining them with their own specific substances, deposit, dehydrate, store and leave in hives to mature.

It is important to highlight the importance of varroosis, external parasitism caused by the *Varroa destructor* mite, which affects honey bees (*Apis mellifera*) in all stages of development. It is one of the most serious diseases of this specie and, if it is not properly treated, produces high mortality in the colonies. That is why treatments with veterinary medicinal products based on different synthetic or natural acaricides such as organic acids, essential oils, among others, are carried out. In the present work, samples of Aragonese honey were analyzed to determine the presence of coumaphos residues, by the application of a chromatographic method, developed and validated in the Laboratory of the Unit of Human Nutrition and Food Science, based on the extraction and purification by solid phase extraction (SPE), followed by identification and quantification by high performance liquid chromatography (HPLC). The results of these analysis were positive, but none of the coumaphos levels found exceeded the legally permitted maximum levels nor did they pose a risk to the consumer health taking into account the daily intake of honey.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. MIEL: ASPECTOS BROMATOLÓGICOS

La apicultura, entendida ésta como “una técnica que consiste en criar y sacar provecho de las abejas”, data de la época del Neolítico en los comienzos de la agricultura. Y, en España parece que fue practicada por primera vez por una población de norteafricanos asentados en el valle del Guadalquivir. Asimismo, la miel fue un alimento al que la civilización egipcia otorgó gran importancia no sólo como alimento sino también para emplearlo, por un lado, como medicamento con fines terapéuticos y, por otro, para cuidados de belleza; y que civilizaciones posteriores siguieron manteniendo.

La miel es un producto biológico que se modifica con el tiempo y cuya composición química varía dependiendo de factores como el origen floral, climatología o procedimiento de extracción empleado (Sainz y Gómez, 2000). La Norma de calidad relativa a la miel (Real Decreto 1049/2003) la 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 (también denominado mielada), que las abejas recolectan, transforman combinándolas con sustancias específicas propias, depositan, deshidratan, almacenan y dejan en colmenas para que madure”. Es decir, la miel se origina a partir de dos materias primas: el néctar y la mielada. A partir de la primera de ellas se obtiene la miel de flores y, a partir de la segunda, la miel de mielada o mielato (Sainz y Gómez, 2000).

Las abejas liban el néctar o mielada a través de su lengua y lo almacenan en el buche para transportarlo a la colmena. Durante este transporte en el buche, se produce la primera transformación del néctar en la futura miel por la acción del enzima invertasa que hidroliza el disacárido sacarosa en sus dos monosacáridos glucosa y fructosa, principales azúcares presentes en la miel. Una vez que la abeja llega a la colmena, regurgita gotas de dicho néctar de forma repetida produciéndose durante esta operación cierta deshidratación del mismo (hasta 30-40% de humedad) continuando, además, la acción enzimática. A continuación, la abeja lo deposita en la celdilla de la colmena donde prosigue la deshidratación hasta un 18 o 19%. Posteriormente, con el fin de evitar que a través del contacto de la miel con el aire esta absorba agua de nuevo, las abejas operculan o cierran las celdillas con cera, de modo que así se conserva la miel ya madura (Sainz y Gómez, 2000).

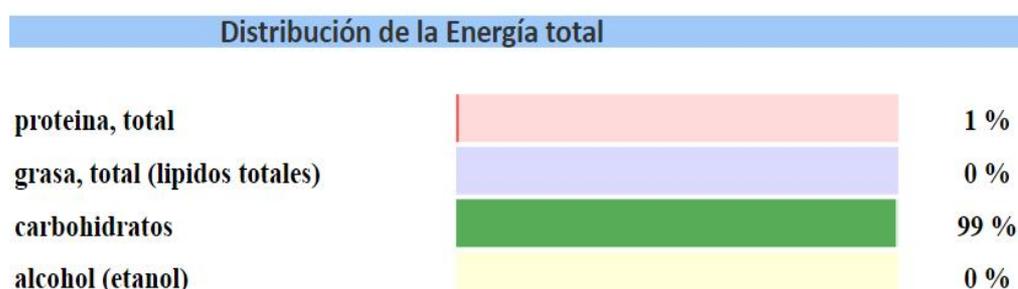
Para la obtención de la miel por parte del apicultor se realiza la siguiente secuencia de etapas:

1. Selección de cuadros: al seleccionar los cuadros de las colmenas es importante evitar recoger miel no madura porque puede causar problemas de fermentación o separación de fases. Para ello se deben seleccionar aquellos cuadros que tengan más de 2/3 partes de su superficie perfectamente operculada (Díaz, 2009).
2. Desoperculado de las celdillas: consiste en retirar la capa de cera colocada por las abejas en las celdas una vez que la miel está madura. Dicha operación puede realizarse manualmente con diferentes tipos de cuchillos y cardas o peines, o mediante el empleo de máquinas específicas (Molino, 2008).
3. Extracción: operación mediante la cual se obtiene la miel a través, generalmente, de un proceso de centrifugación. Los panales se colocan en el equipo y al girar la fuerza centrífuga expulsa la miel de las celdillas, la cual es recogida en la parte inferior a través de unos grifos que le dan salida (Molino, 2008).
4. Filtración: en la etapa previa al centrifugado han podido pasar restos de cera, propóleos, etc. los cuales han de ser eliminados. Para ello se realiza un filtrado que puede hacerse a presión y/o por gravedad.
5. Maduración: en esta etapa, las impurezas que han quedado en la miel ascienden a la superficie y son eliminadas. Además, durante el tiempo en que la miel está en el madurador (por lo general de 2 a 8 días), la miel sufre un proceso de deshidratación y cambios químicos (Adamczyk, 2007).
6. Almacenamiento y envasado: la miel limpia y decantada se almacena en bidones de diferente capacidad hasta el momento de su envasado. También es importante que el entorno sea seco, fresco y con buenas condiciones higiénicas.

Organolépticamente, el color de la miel puede ser desde un tono casi incoloro hasta un tono pardo oscuro, puede tener una consistencia fluida, espesa o cristalizada (en parte o en su totalidad). Respecto a sabor y aroma, éstos pueden variar, pero esto se deriva del origen vegetal de este alimento (Real Decreto 1049/2003).

Bajo el punto de vista nutricional, la miel es un alimento altamente energético ya que aporta 315 kilocalorías por cada 100 gramos, siendo el 99% de esta energía la proveniente de hidratos de carbono (los cuales representan un 80% aproximadamente de la composición química total de la miel), principalmente azúcares sencillos, como son la fructosa y glucosa. La distribución de la energía total entre los principios inmediatos y el alcohol (etanol), según la Base de Datos Española de Composición de Alimentos (BEDCA, 2017), se refleja en la Figura 1. Los monosacáridos o azúcares sencillos representan alrededor de un 75% de los azúcares totales presentes en la miel, el resto de azúcares son disacáridos (entre un 10 y 15%) y una pequeña proporción son azúcares de otro tipo. La composición de azúcares (y la composición química en general) depende de factores como el origen botánico de la miel o el clima, entre otros. A pesar de esto, la mayoría de los tipos de mieles presentan mayor proporción del monosacárido fructosa respecto a la glucosa (Da Silva et al., 2016).

Figura 1: Distribución de la energía total en miel para los principios inmediatos y alcohol (etanol) (BEDCA, 2017).



En cuanto al contenido en agua, la citada Norma de calidad relativa a la miel permite que éste sea en la miel madura de un máximo del 20% en general (existen excepciones para la miel de brezo y miel para uso industrial donde se acepta hasta un contenido hídrico del 25%), ya que superar estos valores favorece el proceso de fermentación por levaduras presentes en la miel (Sainz y Gómez, 2000).

En cuanto a proteínas, el porcentaje presente en la miel no suele superar el 1% (Sainz y Gómez, 2000) y en ellas el aminoácido libre más abundante es la prolina representando entre el 50 y 85% de todos los aminoácidos. Además, dentro de esta pequeña proporción de proteínas, encontramos una fracción de enzimas, de los cuales los más abundantes son la diastasa, invertasa y glucoxidasa (Da Silva et al., 2016).

Referente a los ácidos orgánicos, estos representan en la miel un porcentaje bajo (0,57%), siendo el principal de ellos el ácido glucónico seguido del ácido cítrico, que contribuirían a la estabilidad del producto frente a los microorganismos.

Por otro lado, las pequeñas cantidades de vitaminas que están presentes, pertenecen principalmente a vitaminas del grupo B aunque también se encuentra en la mayoría de los tipos de miel la vitamina C. Respecto a minerales su contenido varía desde un 0,04% en mieles claras hasta un 0,2% en mieles oscuras siendo el potasio el elemento más frecuente en la miel (Da Silva et al., 2016).

Otras sustancias que pueden encontrarse en la miel son compuestos fenólicos, como flavonoides, que tienen un importante papel aromático y actividad antioxidante (Da Silva et al., 2016), o también componentes como el polen, el cual no se ha de retirar de la miel excepto cuando resulte inevitable en el proceso de eliminación de materia orgánica o inorgánica ajena a ella (Real Decreto 1049/2003).

Por otro lado, se debe tener en cuenta que en el momento de su comercialización debe responder a unas características en cuanto a contenido de fructosa y glucosa, sacarosa, agua, sólidos insolubles, ácidos libres, hidroximetilfurfural y conductividad eléctrica establecidos en la legislación (Real Decreto 1049/2003), esto puede verse reflejado en la Tabla 1.

Tabla 1: Características de composición de la miel en el momento de su comercialización (Real Decreto 1049/2003).

Parámetro	Miel	Contenido	
Azúcares	Fructosa + Glucosa	Miel de flores	≥ 60g / 100g
		Miel de mielada o mezclas	≥ 45g / 100g
	Sacarosa	En general	≤ 5g /100g
		Falsa acacia, alfalfa y otras	< 10g / 100g
		Espliego, borraja	≤ 15g /100g
Agua	En general	≤ 20%	
	Miel de brezo "Calluna" y mieles para uso industrial en general	≤ 23%	
	Miel de brezo "Calluna vulgaris" para uso industrial	< 25%	
Sólidos insolubles	En general	≤ 0,1g / 100g	
	Miel prensada	≤ 0,5g / 100g	
Conductividad eléctrica	Mezclas de mieles	≤ 0,8 mS/c	
	Miel de mielada y miel de castaño y mezclas de éstas	≥ 0,8 mS/c	
Ácidos libres	En general	≤ 50 meq/ 1000g	
	Miel para uso industrial	≤ 80 meq/ 1000g	
Hidroximetilfurfural	En general	< 40mg /kg	
	Miel de origen de regiones de clima tropical y mezclas de éstas	≤ 80mg /kg	

Para finalizar, la situación en el año 2016 del sector apícola, según datos del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente; es que España contaba con aproximadamente 29274 explotaciones y la comunidad autónoma de Aragón presentaba 1511 de ellas representando un 5,2%, tuvo una producción anual de miel próxima a las 1000 toneladas (de las 33000 toneladas aproximadamente producidas en total en España) y, con estos datos, se sitúa en el noveno lugar del ranking español en cuanto a número de explotaciones (MAPAMA, 2017).

2.2. PELIGROS ABIÓTICOS E INOCUIDAD DE LA MIEL

En la obtención de productos alimenticios destinados al consumo humano pueden actuar agentes susceptibles de incorporarse a la cadena alimentaria y entrañar algún riesgo para el consumidor. Son los denominados peligros que, en función de su origen, se clasifican en bióticos y abióticos (Gobierno de Aragón, 2014).

Respecto a la presencia de agentes de peligro susceptibles de incorporarse en la miel y entrañar algún riesgo para el consumidor, hay que tener en cuenta que la miel es un producto bacteriostático, capaz de impedir la multiplicación de la mayoría de los microorganismos. Dada su composición (alto contenido en azúcares, pobre en proteínas y con acidez elevada), los riesgos microbiológicos asociados a su consumo son prácticamente inexistentes (Gobierno de Aragón, 2014).

De los pocos riesgos que la miel puede presentar para la salud de los consumidores, estos son de tipo abiótico y los más importantes derivan de la presencia, por encima de los límites legalmente establecidos, de contaminantes químicos, en especial de residuos procedentes de la inadecuada utilización de tratamientos veterinarios y productos de limpieza, así como de determinadas prácticas agrícolas (Gobierno de Aragón, 2014).

La miel también puede contaminarse de forma indirecta, es decir, tras la aplicación de pesticidas en la agricultura, a través del suelo, aire, agua y flores que las abejas visitan y en las cuales recogen néctar para producir la miel; estos productos químicos pueden ser llevados a la colmena por los cuerpos de éstas y contaminar así la miel (Kujawski y Namiesnik, 2011).

El Reglamento (CE) n° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo estableció valores para los límites máximos de residuos (LMR) de plaguicidas en los productos vegetales, así como en los de origen animal. Desde 2008, la Comisión Europea fijó nuevos LMR para algunos plaguicidas en la miel y otros productos de apicultura, que van desde 0,005 mg/kg a 0,15 mg/kg de miel, entre los que se encuentran pesticidas como fipronil, cumafós o amitraz, entre otros (Reglamento (CE) n° 396/2005 y modificaciones posteriores).

También, pueden aparecer en la miel otro tipo de contaminantes como los metales pesados (cobre, mercurio, plomo, cadmio o arsénico), procedentes del medio ambiente o de su liberación a partir de los equipos empleados en la obtención de la miel por estar presentes en los materiales de éstos. Las concentraciones de dichos metales pesados varían de unas mieles a otras y de un lugar a otro, en función de los niveles de contaminación ambiental presentes (en relación a este tema, se están empleando colmenas y sus productos como indicadores de contaminación ambiental), así como de las condiciones y situación de los apiarios (Przybylowski y Wilczynska, 2001; Tuzen et al., 2007; Ru et al., 2013). En este sentido, una correcta práctica de higiene consiste en hacer una buena elección del lugar o asentamiento donde se instalan las colmenas, debiendo estar éste alejado de fuentes contaminantes. El problema de la presencia de estos contaminantes aparece cuando las concentraciones alcanzan niveles tóxicos para el ser humano. La legislación europea todavía no ha establecido unos límites máximos en miel para los metales pesados, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) han propuesto conjuntamente niveles aceptables de 15 µg/kg para el arsénico, 5 µg/kg para el mercurio y 7 µg/kg para el cadmio (Da Silva et al., 2016).

Con el fin de evitar, reducir o controlar dichos peligros, la reglamentación europea acerca de la producción de alimentos, integrada en el denominado coloquialmente “Paquete de Higiene”, responsabiliza a los agentes implicados en la misma de garantizar la máxima higiene de los elementos y procesos que constituyen el objeto de su actividad empresarial, obligando a la implantación de medidas de autocontrol, basadas en los principios del Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC) y apoyadas en las prácticas correctas de higiene (PCH). En esa concepción, la producción primaria constituye el elemento básico de la cadena alimentaria, aspecto que adquiere especial relevancia en el caso de la producción de miel por tratarse de un alimento que puede llegar al consumidor final sin apenas manipulación.

Todas las actividades de la apicultura deben considerarse producción primaria (Gobierno de Aragón, 2014). Ello incluye la apicultura propiamente dicha (incluso en caso de que las colmenas se encuentren lejos de las instalaciones del apicultor), la recogida de miel, su centrifugación y el envasado en las instalaciones del apicultor. Dado que la implantación de un sistema APPCC es únicamente obligatorio en fases posteriores a la producción primaria (Reglamento (CE) nº 852/2004), las prácticas correctas de higiene adquieren una importancia trascendental, como mecanismo para alcanzar los altos niveles de seguridad que la reglamentación comunitaria exige a los productores de alimentos.

Los apicultores, como productores de alimentos destinados al consumo humano, son los responsables de garantizar la seguridad de sus productos de manera que no entrañen ningún riesgo para la salud de los consumidores. Es necesario, por tanto, conocer los peligros o riesgos asociados a la producción apícola y establecer todos los mecanismos necesarios para controlarlos y, hasta donde sea posible, evitarlos.

Para ello habrán de aplicarse prácticas correctas de higiene en todas las acciones involucradas en la producción, recogida y acondicionamiento de los productos de la explotación. Si a pesar de todo surgiera un problema será preciso detectar de forma rápida el origen del mismo y sólo es posible asegurar esta trazabilidad registrando las informaciones necesarias en relación con dichos procesos (Gobierno de Aragón, 2014).

Valorando todo lo anterior, la miel no ha generado apenas notificaciones / informaciones en la Unión Europea. En los últimos años (de 2012 a 2016) se generaron un total de 24 notificaciones relacionadas con miel y jalea real. Entre los peligros hallados se encontraban, entre otros, residuos de sulfonamidas, fluvalinato, tetraciclinas o cloranfenicol y en ninguna de dichas notificaciones aparecían implicadas mieles de origen español, pero sí de otros países miembros de la Unión Europea como Ucrania, Lituania o Moldavia y países terceros como Israel, China o México (RASFF, 2016).

2.3 .TRATAMIENTOS CON ACARICIDAS UTILIZADOS FRENTE A VARROA

Las abejas pueden sufrir enfermedades a causa de bacterias, virus, hongos y parásitos, entre otros agentes. La varroosis es la parasitosis más extendida a nivel mundial, de gran importancia sanitaria y económica para la apicultura.

2.3.1. Parásito y enfermedad

Varroa destructor es el principal parásito de *Apis mellifera* y, puede causar el colapso de colonias no tratadas en pocos años (Gracia et al., 2017). Hasta el año 2000 esta especie de *Varroa* fue confundida con otra, *Varroa jacobsoni*, la cual se observó que no era capaz de reproducirse en *Apis mellifera*. Anteriormente, el huésped de *Varroa destructor* era el género *Apis cerana*, característico de la miel oriental, posteriormente fue diseminándose sobre la abeja occidental, *Apis mellifera*. Actualmente, *Varroa destructor* se ha distribuido por numerosos lugares del mundo a excepción de Australia donde todavía no se ha detectado su presencia (Rosenkranz et al., 2010).

En cuanto a su ciclo biológico, este se compone de dos etapas principales, la etapa forética, durante la cual *Varroa destructor* se alimenta de la hemolinfa de las abejas adultas y, la etapa reproductiva, la cual se lleva a cabo en las celdas de cría de las abejas (Rosenkranz et al., 2010). Esta fase reproductiva comienza con la entrada de la hembra progenitora fecundada en el interior de la celda cuando las larvas de abeja tienen seis días de vida y dichas celdas aún no están operculadas (Clément et al., 2012).

Tras aproximadamente 60 horas, cuando la celda ya está operculada, el ácaro hembra pone el primer huevo del que nacerá un macho (los siguientes serán todas hembras) (Flores et al., 2007). En una temporada activa una sola hembra de *Varroa destructor* puede completar hasta un máximo de diez ciclos y durante cada ciclo (cada 30 horas) pone de dos a seis huevos. Los parásitos de *Varroa destructor* recién nacidos comienzan inmediatamente su alimentación de la abeja en crecimiento (Formato et al., 2015).

Cuando nace la nueva abeja, con ella emergerán la hembra de *Varroa destructor* progenitora junto a aquellas descendientes también hembras que dispusieron de tiempo suficiente para alcanzar la madurez (Flores et al., 2007). Dichas hembras intentarán saltar sobre abejas adultas de mediana edad que pasen cercanas a la celda, donde se hallan las crías, donde pasarán a su etapa forética (etapa en la cual se alimentarán de la hemolinfa de

las abejas adultas mediante picaduras realizadas con su afilado aparato bucal) antes de entrar en una nueva celda de la cría donde se reproducirán (Formato et al., 2015).

La consecuencia de esta parasitosis externa es la enfermedad denominada varroosis, la cual presenta daños directos sobre las crías de abejas que influyen en su desarrollo normal de actividades, e indirectos por la transmisión de enfermedades.

Los principales síntomas de esta patología son falta de asistencia a la reina y de realización de tareas típicas, cría dispersa por las tasas de mortalidad o pérdida de peso en las abejas, debido a la succión de hemolinfa por parte del ácaro, lo cual hace que presenten también una importante disminución de células sanguíneas y proteínas repercutiendo negativamente en el desarrollo de las larvas. Sin embargo, la consecuencia quizás más importante es el papel de *V. destructor* como agente vector de agentes patógenos en el momento en que el ácaro pica a las abejas (Rosenkranz et al., 2010). Esto favorece la transmisión y desarrollo de enfermedades secundarias ya sean de origen bacteriano o vírico, tanto en abejas adultas como crías, como son la loque o virus de la parálisis aguda y virus de las alas deformadas, respectivamente (Clément et al., 2012).

Desde el punto de vista de la apicultura esto se traduce en la generación de mermas en la producción. A tasas de infestación bajas, los síntomas clínicos pueden no ser visibles e incluso no detectarse la infestación. Las tasas moderadas de infestación pueden reducir el crecimiento de la población de abejas melíferas y, por lo tanto, el rendimiento de la miel, pero los síntomas clínicos pueden todavía no ser evidentes. Es decir, el umbral de daño no está correlacionado con un número fijo de ácaros por colonia, es bastante variable y depende de la población de abejas y de crías, de la estación y de la presencia de virus en la abeja (Rosenkranz et al., 2010).

Además, dicha enfermedad está incluida dentro de la lista de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2017) como enfermedad de declaración obligatoria relacionada con las abejas, que se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2: Lista de la OIE de enfermedades de las abejas de declaración obligatoria (OIE, 2017).

Infección de las abejas melíferas por <i>Melissococcus plutonius</i> (Loque europea).
Infección de las abejas melíferas por <i>Paenibacillus larvae</i> (Loque americana).
Infestación de las abejas melíferas por <i>Acarapis woodi</i> .
Infestación de las abejas melíferas por <i>Tropilaelaps spp.</i>
Infestación de las abejas melíferas por <i>Varroa spp.</i> (Varroosis).
Infestación por <i>Aethina tumida</i> (Escarabajo de las colmenas).

2.3.2 Tipos de tratamientos acaricidas frente a *Varroa*

Para prevenir la implantación de *Varroa destructor* y el desarrollo de las consecuencias que su presencia en las colmenas conlleva, los apicultores hacen uso de diferentes sustancias químicas, tanto de síntesis como de origen natural, para el control de las poblaciones de este ácaro.

A nivel nacional, existe un programa de lucha y control de las enfermedades de las abejas de la miel en el cual se establece, en caso de varroosis, la obligatoriedad de realizar un tratamiento al año en el período de septiembre a noviembre y con un producto bajo la supervisión de un veterinario (Real Decreto 608/2006).

De los acaricidas de síntesis, los más utilizados son aquéllos que tienen como principios activos cumafós, fluvalinato, amitraz, cimiazol y/o flumetrina. La mayoría de estos pesticidas son fáciles de aplicar y económicos. Sin embargo, son persistentes y se acumulan después de tratamientos repetidos (Rosenkranz et al., 2010). Por lo tanto, estos acaricidas también poseen algunas desventajas como las que se mencionan a continuación: pueden dejar residuos en la cera y/o miel y, también, en los últimos años, la utilización masiva de muchas sustancias químicas contra *V. destructor* se ha traducido en el desarrollo de resistencia en los ácaros a los acaricidas (Gracia et al., 2017).

Estas razones son causa de que se haya promovido el uso de otros métodos de control como es el empleo de sustancias naturales, entre ellas, sobre todo, algunos ácidos orgánicos como el ácido fórmico o el ácido oxálico y, aceites esenciales como el timol.

Las ventajas generales de estos compuestos naturales son: elevada eficacia contra *V. destructor* (con el ácido fórmico como el único acaricida, éste es capaz de matar ácaros dentro de las celdas de cría selladas), bajo riesgo de presencia de residuos y de su acumulación en productos de abeja (dado que la mayoría de estas sustancias son solubles en agua y/o volátiles y, además, ingredientes naturales de miel) y, baja probabilidad de provocar resistencia en los ácaros después de tratamientos repetidos (Rosenkranz et al., 2010).

Sin embargo, también hay algunas desventajas de estos compuestos naturales. El ácido láctico y el ácido oxálico deben ser aplicados en condiciones sin cría y, por lo tanto, no son adecuados en regiones sin paro de cría durante el invierno (Rosenkranz et al., 2010). En presencia de cría la efectividad del ácido oxálico es menor respecto a cuando no la hay, en estas circunstancias la mortalidad que se obtiene en el ácaro es de aproximadamente el 98% frente al 40% obtenido cuando sí hay crías (Gregorc y Planinc, 2002; Smodis et al., 2011).

La eficacia de algunos de estos compuestos naturales depende de la presión de evaporación dentro de la colonia. Por tanto, las condiciones climáticas y las presentes dentro de la colmena y el modo de aplicación tienen que ser cuidadosamente afinados para conseguir el efecto óptimo. Esto es crucial ya que el índice terapéutico, es decir, el rango entre la eficacia en el parásito y la toxicidad para el huésped, no es muy grande (Rosenkranz et al., 2010). De acuerdo con esto, la eficacia del timol depende de la evaporación del principio activo dentro de la colmena, basándose en las temperaturas climáticas y en las condiciones de las colonias (Rosenkranz et al., 2010).

En definitiva, las condiciones ambientales, especialmente la temperatura externa, influyen en la evaporación del timol y por lo tanto en su efectividad. Por ello, los productos a base de timol deberían idealmente aplicarse cuando el intervalo de temperatura es de 15-20°C. También se ha observado que el espacio aéreo existente en la colmena por encima de los panales influye en la eficacia del producto, resultando ser más efectivo cuando el espacio disponible es mayor debido a que mejora la circulación del aire permitiendo así una

evaporación y propagación más completa y constante del timol en la colmena (Lodesani y Costa, 2008).

En lo que respecta a la presencia de residuos de estos compuestos en la miel que puedan aportar olores o sabores desagradables, sí que se detectan en la mayoría de muestras que se analizan pero las concentraciones son mínimas, dado que al ser sustancias volátiles disminuyen rápidamente, no llegando a producir defectos sensoriales (Serra et al., 2014). En algún estudio, como el llevado a cabo por Adamczyk et al. (2005) sí se detectaron cantidades más altas de residuos de timol. Aun así los tratamientos naturales pueden ser considerados como buenas alternativas para los acaricidas sintéticos especialmente porque no representan un riesgo sanitario teniendo en cuenta que son compuestos que están también presentes de forma natural en la miel, por lo que estas cantidades no comprometen la seguridad alimentaria (Bogdanov et al., 1999).

2.3.3. Características del cumafós y medicamento autorizado

El cumafós es una sustancia organofosforada que es activa por contacto, ingestión y acción de vapor; y que causa la fosforilación de la enzima acetilcolinesterasa de los tejidos, permitiendo la acumulación de acetilcolina en las uniones neuro-efectoras colinérgicas y en las uniones mioneurales del músculo esquelético y los ganglios autónomos. En definitiva, actúa como un inhibidor de la acetilcolinesterasa, interfiriendo, por tanto, en la señalización y función nerviosa (Del Carlo et al., 2010; Rosenkraz et al., 2010). Estas características hacen que sea empleado para combatir enfermedades o infestaciones en las abejas por los apicultores.

Todo medicamento para poder ser empleado debe constar de una autorización y registro emitida por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Este certificado se otorga al laboratorio que fabrica el medicamento, tras una serie de verificaciones entre las que constan su efectividad e inocuidad para los consumidores de los productos alimenticios obtenidos de los animales tratados.

Actualmente en España el único medicamento veterinario autorizado para combatir la varroosis que presenta cumafós como sustancia activa es el comercialmente llamado CHECKMITE de la firma Bayer, el cual es aplicado en forma de tiras: 2 por colmena, colgando las tiras entre dos cuadros de cría y dejándolas durante 42 días.

Así también, respetando las buenas prácticas apícolas, tienen que ser evitadas las aplicaciones durante el flujo de la miel y el tratamiento se debe completar al menos dos semanas antes de la recolección del néctar por las abejas. Se recomienda tratar las colmenas en primavera antes del primer flujo de miel o en otoño después del último flujo de miel. Las abejas están expuestas a cumafós por su contacto con las tiras dispuestas entre los marcos en el centro de la colonia. El contacto social entre ellas es el factor principal para la distribución de cumafós entre la población de abejas. Del ciclo de vida de *V. destructor*, el medicamento sólo afecta a la fase forética del ácaro con la hembra fecundada pegada sobre las abejas obreras; la sustancia activa no alcanza a la fase reproductiva. Las hembras adultas fecundadas de *V. destructor* atraviesan la membrana intersegmental de las abejas y succionan la hemolinfa por lo que se hallan expuestas de un modo indirecto a concentraciones relevantes de cumafós (AEMPS, 2017).

Además, existen otros 11 medicamentos más autorizados frente a varroosis, pero que presentan distintas sustancias activas (Tabla 3). Recientemente se ha registrado un nuevo medicamento veterinario, para tratar la varroosis, autorizado por la AEMPS, comercialmente denominado VARROMED, el cual presenta como sustancia activa una combinación de ácido fórmico y ácido oxálico que debe ser administrada rociando la solución en los espacios ocupados por las abejas en las cámaras de cría.

Tabla 3: Listado de medicamentos veterinarios autorizados por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios para abejas actualizado en Junio de 2017 (AEMPS, 2017).

Nombre del medicamento	Número de registro	Titular de la autorización	Sustancia Activa	Indicaciones
APIVAR	1283 ESP	VETO PHARMA	AMITRAZ	VARROOSIS
APIGUARD	1487 ESP	VITA (EUROPE) LIMITED	TIMOL	VARROOSIS
BAYVAROL 3,6 mg TIRAS PARA COLMENAS	1713 ESP	BAYER HISPANIA, S.L.	FLUMETRINA	VARROOSIS
ECOXAL	1749 ESP	CEVA SALUD ANIMAL, S.A.	ÁCIDO OXÁLICO	VARROOSIS
THYMOVAR	1962 ESP	ANDERMATT BIOVET GmbH	TIMOL	VARROOSIS
APISTAN	2680 ESP	VITA (EUROPE) LIMITED	TAU FLUVALINATO	VARROOSIS
CHECKMITE	2737 ESP	BAYER HISPANIA, S.L.	CUMAFÓS	VARROOSIS
APITRAZ 500 mg TIRA PARA ABEJAS	2782 ESP	LABORATORIOS CALIER, S.A.	AMITRAZ	VARROOSIS
MAQS ÁCIDO FÓRMICO 68,2 g TIRAS PARA COLMENAS PARA ABEJAS	3031 ESP	NOD EUROPE LTD	ÁCIDO FÓRMICO	VARROOSIS
AMICEL VARROA	3157 ESP	LABORATORIOS MAYMO, S.A.	AMITRAZ	VARROOSIS
POLYVAR 275 mg TIRAS PARA COLMENAS	3526 ESP	BAYER HISPANIA, S.L.	FLUMETRINA	VARROOSIS
VARROMED	EU/2/16/203/001-002	BEEVITAL GMBH	ÁCIDO FÓRMICO/ ÁCIDO OXÁLICO DIHIDRATO	VARROOSIS

2.4. CONTROL DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE ACARICIDAS EN MIEL

El uso de medicamentos veterinarios en animales destinados a la producción de alimentos deriva la consecuencia de que en dichos alimentos producidos puedan permanecer restos de tales sustancias utilizadas, es decir, residuos de ellas. Con el fin de asegurar que la utilización de las sustancias activas contenidas en los productos veterinarios es segura para los consumidores se establecen los límites máximos de residuos (LMR). Término que se define legalmente como “el contenido máximo de residuos resultante de la utilización de un medicamento veterinario (expresado en mg/kg o en µg/kg sobre la base del peso en fresco) autorizada en la Comunidad o reconocida como admisible en un producto alimenticio” (Reglamento (UE) nº 2377/1990).

La legislación existente respecto a límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en productos alimenticios es otra herramienta más al igual que la realización de unas prácticas correctas de higiene o la implantación de un sistema APPCC, mencionadas en apartados anteriores, para controlar y garantizar la seguridad alimentaria a los consumidores. En este sentido, para proteger la salud pública, las sustancias farmacológicamente activas, atendiendo a la evaluación científica de su seguridad, fueron clasificadas en cuatro anexos del Reglamento (CEE) nº 2377/90. El anexo I contiene las sustancias farmacológicamente activas para las que se ha fijado un límite máximo de residuos, el anexo II contiene las sustancias para las que no es necesario fijar un límite máximo de residuos, el anexo III contiene las sustancias para las que se ha fijado un límite máximo de residuos provisional y el anexo IV, las sustancias para las que no puede establecerse límite máximo alguno porque sus residuos, sea cual sea su límite, constituyen un riesgo para la salud humana. Toda esta información se simplifica en el Reglamento (UE) nº 37/2010 donde todas las sustancias farmacológicamente activas se enumeran en un único anexo, por orden alfabético, que consta de dos cuadros distintos: uno para las sustancias autorizadas, que figuran en los anexos I, II y III del Reglamento (CEE) nº 2377/90, y uno para las sustancias prohibidas, enumeradas en el anexo IV del mismo Reglamento (Reglamento (UE) nº 37/2010).

En la Tabla 4 se exponen los LMR, que sí están establecidos, para los residuos procedentes de tratamientos veterinarios autorizados mencionados en la Tabla 3.

Tabla 4: Límites máximos de residuos de acaricidas permitidos en miel y otros productos de apicultura en la Unión Europea empleados frente a la varroosis de las abejas.

Acaricida	LMR (mg / kg)
Amitraz	0,2
Cumafós	0,1

Por otro lado, existen también otros acaricidas para los cuales no hay establecidos LMR en miel, es decir, después de la evaluación de la sustancia farmacológicamente activa correspondiente utilizada en el medicamento veterinario, se observa o considera que no es necesario para la protección de la salud pública fijar un límite máximo de residuos (Reglamento (CEE) nº 2377/90). Este es el caso de la flumetrina para la cual no se establece dicho LMR en miel. Sin embargo, sí se establece sobre otros alimentos de origen animal: 10 µg/kg en músculo y riñón, 150 µg/kg en grasa y 20 µg/kg en hígado de las especies bovina y ovina; y 30 µg/kg en leche bovina. Del mismo modo ocurre con el ácido oxálico, ácido fórmico y timol, que aparecen en la lista de sustancias no sujetas a un límite máximo de residuos.

Es importante destacar que estos LMR no son límites toxicológicos, sino que son límites toxicológicamente aceptables, basados en una buena práctica agrícola y que representan la cantidad máxima de un residuo que es posible encontrar en un producto alimentario como consecuencia del uso legal y racional de ese medicamento evaluado. Los LMR no son límites toxicológicos porque no representan la cantidad máxima de esa sustancia activa que puede ser perjudicial para la salud de los consumidores. Es decir, la superación de un LMR no implica necesariamente la existencia de un riesgo para la salud. Por otro lado, se dice que los LMR son toxicológicamente aceptables porque su cumplimiento asegura que no producen efectos tóxicos en los individuos, ni a corto ni a largo plazo (AECOSAN, 2015).

Con el fin de evaluar el riesgo toxicológico del consumo de miel, es decir, si la salud de los consumidores puede verse afectada por la presencia de residuos de cumafós, es necesario estimar la ingesta de él a través de este alimento (IDE) y compararla con la ingesta diaria admisible (IDA) establecida por la Agencia Europea de Evaluación de Medicamentos (EMEA).

La IDE de un compuesto asociada al consumo de un alimento se calcula multiplicando la concentración del contaminante en el alimento por la ingesta diaria media de ese alimento (Molino, 2008).

La IDA se define como la dosis máxima de una sustancia contenida en un alimento, expresada respecto a la masa corporal que puede ser ingerida durante toda la vida sin mostrar riesgo apreciable para la salud (FAO, 2017). En el caso del cumafós, la EMEA estableció en 2001 un valor de 250 ng/kg de peso corporal, que si se considera el peso medio de un individuo de 70 kg esto se traduce en un IDA de 17,5 µg (EMEA, 2001).

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La aplicación de unas buenas prácticas en el uso de medicamentos veterinarios para el tratamiento de la varroosis de las abejas, es esencial para evitar la presencia de sus residuos en productos de la colmena y evitar que puedan afectar la salud de los consumidores. De esta manera se garantiza, además, el cumplimiento de la normativa relativa a higiene y salud pública. En base a esta justificación, se han planteado los siguientes objetivos:

En primer lugar, el **objetivo general** es proceder a la realización de un análisis de residuos de acaricidas en mieles aragonesas mediante la aplicación de un método puesto a punto y validado en la Unidad de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Zaragoza, para detectar la posible presencia de cumafós en ellas. Este método está basado en la extracción y purificación mediante sistema de extracción en fase sólida (SPE), seguido de identificación y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Además, se han planteado **objetivos específicos**:

- Conocer la base científica del tema de estudio mediante una revisión bibliográfica, utilizando para ello diferentes bases de datos de la Universidad de Zaragoza, así como consulta de libros, tesis doctorales y otras fuentes.
- Realizar el análisis de muestras de miel aragonesas para identificar y cuantificar la presencia de residuos de cumafós.
- Revisar y evaluar los resultados analíticos obtenidos en otros estudios para poder comparar y discutir con nuestros resultados.
- A partir de los resultados obtenidos, evaluar el riesgo para la salud pública de las mieles analizadas.
- Con todos los datos obtenidos, elaborar la memoria final de este estudio.

4. METODOLOGÍA

4.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Para el desarrollo de la revisión bibliográfica de este Trabajo de Fin de Grado se han utilizado diferentes bases de datos: *Web of Science*, *Science Direct*, BEDCA (composición de alimentos), Iberlex (legislación), *EU Pesticides database*. Entre las revistas científicas utilizadas se encuentran *Food Chemistry*, *Food and Chemical Toxicology*, *Journal of Invertebrate Pathology*, *Food Control*. Así también, se han consultado libros disponibles en la biblioteca de la Facultad de Veterinaria.

4.2. ANÁLISIS EXPERIMENTAL

4.2.1. Muestras analizadas

Se procedió a analizar un total de seis muestras de miel de distinto origen botánico y geográfico procedentes todas ellas de distintos municipios de la Comunidad Autónoma de Aragón.

4.2.2. Materiales, equipos y reactivos

4.2.2.1. Material

- Vaso de precipitados de vidrio de 50 ml
- Pipeta de vidrio graduada de 25 ml
- Varilla de vidrio
- Viales con tapón de rosca
- Pipetas Pasteur de vidrio

4.2.2.2. Reactivos

- Patrón del acaricida cumafós del Laboratorio Dr. Ehrenstorfer (Alemania) 0,1 g, 95% de pureza
- Miel libre de acaricidas

- Columna Isolute C18 (0,5 g)
- Columna Sep - Pak C18 (0,5 g), trifuncional IST Ref. 221-0050-C
- Cartuchos de desecación de 2,5 g de sulfato de sodio anhidro de Isolute (International Sorbent Technology, Inglaterra)
- Agua destilada ultrapura Milli Q
- Metanol grado HPLC Lab Scan (Irlanda)
- Hexano grado HPLC
- Acetonitrilo grado HPLC Lab Scan (Irlanda)
- Nitrógeno ultrapuro C55 Carburos metálicos (España)

4.2.2.3. Equipos

- Balanza analítica monoplato Sartorius CP 224 S (Alemania), con precisión de 0,00001 g
- Equipo de extracción en fase sólida Vacuum Manifold Visiprep de Supelco (EEUU) + vaso de residuos
- Bomba de vacío modelo XX5522050 Millipore (EEUU) (máximo 100 kPa de vacío)
- Rotatubos MS 2 Minishaker IKA (EEUU)
- Sistema Sample concentrator SBHCONC/1, Stuart
- Congelador Liebherr GS 5211 (- 20°C) (Alemania)
- Cromatógrafo líquido de alta resolución HP Series 1100, inyector manual con un *loop* de 20 µl y detector de barrido de espectros (DAD)
 - Columna cromatográfica de fase reversa de C18 de 250 mm de longitud, 4,6 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula, ODS2 Waters Spherisorb (Irlanda).
 - Microjeringa Hamilton (Suiza) 75 SNR, 50 µl
 - Estación de trabajo HP – Chemstation de Agilent (Alemania) controlado por un ordenador HP71

4.2.3. Preparación de las muestras

De acuerdo con la Orden de 12 de Junio de 1986 por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis para la miel, es necesario realizar una preparación de las muestras para que éstas sean homogéneas y representativas de la miel que se somete a examen.

La miel es una matriz compleja por lo que su análisis no se puede realizar en una sola etapa, es decir, es necesario realizar varios pasos de forma previa a la identificación y cuantificación del analito. El primero de ellos consiste en la preparación de la muestra que consta, en primer lugar, de una limpieza mediante filtración para retirar los elementos que no forman parte de la matriz como restos de cera, piedras y otras impurezas. En este caso, las muestras se encontraban en buen estado de limpieza por lo que no fue necesario realizar dicho acondicionamiento previo. A continuación, se pesa la cantidad de muestra necesaria (5 g) y se procede a disolverla en una solución (15 ml) de metanol y agua Milli Q (1:1, v/v), con el propósito de favorecer las posteriores fases del análisis.

4.2.4. Análisis de las muestras

Una vez realizada la preparación de las muestras, el objetivo es extraer el analito de interés. Para la consecución de este fin se procede a la realización de una extracción en fase sólida (SPE). Ésta 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 (Souza et al., 2016). 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 y solvente de elución).

Una columna de SPE es un lecho de partículas adsorbentes de sílice porosa, revestidas de moléculas orgánicas, mantenido entre dos discos porosos dentro de un tubo desechable. La retención selectiva de los analitos se consigue por interacción entre la superficie de las partículas y el analito disuelto. Existen numerosas fases adsorbentes y, la elección de una u otra dependerá de las características del analito que se quiera determinar (polar, apolar, ionizable) y de la matriz (si es acuosa, orgánica, etc). A modo de resumen existen tres tipos, adsorbentes de fase normal (extracción de analitos polares en fase sólida polar con solvente de elución apolar), adsorbentes de fase reversa (extracción de analitos apolares en

fase sólida apolar con solvente de elución polar) y adsorbentes de intercambio iónico (extracción de analitos ionizables en base a interacciones iónicas).

La fase adsorbente más utilizada para la extracción de contaminantes orgánicos es la fase reversa C18, esto es que la sílice va enlazada al grupo octadecilo (Molino, 2008).

La técnica de extracción en fase sólida consta de cinco pasos (Figura 2):

1. **Activación.** El primer paso consiste en impregnar la fase sólida con un solvente orgánico para aumentar así la superficie y facilitar la interacción con el analito. En nuestro caso se hizo uso de metanol (2 ml por muestra).
2. **Acondicionamiento.** El acondicionamiento permite “alinearse” la fase estacionaria lejos de la superficie de 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. En este caso como se trata de una matriz acuosa, se emplea como solvente agua destilada Milli Q (2 ml por muestra). La última fase de acondicionamiento de la columna es hacer pasar 5 ml de solución metanol – agua Milli Q (1:1). Cualquier solvente orgánico residual se elimina en esta etapa, asegurando que los analitos de interés sean retenidos en la parte superior de la columna.

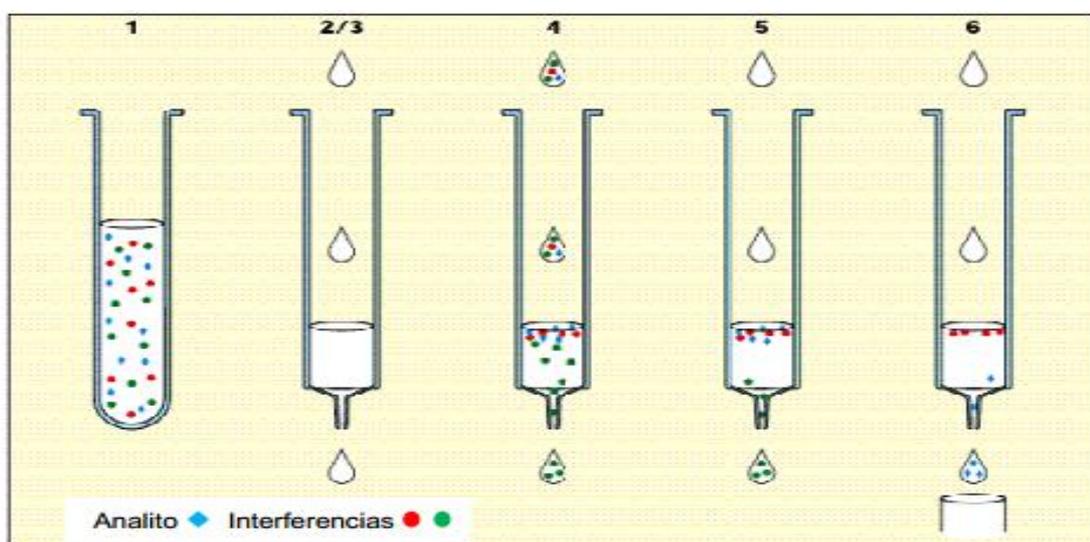
Con estos dos pasos obtenemos la columna preparada y acondicionada, a continuación se procede al paso de las muestras disolución de miel por la columna.

3. **Retención.** El objetivo es retener los componentes de interés (cumafós) en la fase adsorbente mientras que los componentes que no interesan o interferencias deben eluirse y desecharse. El volumen y flujo del solvente que pasa por la columna se controla mediante una válvula de la estación de vacío. Durante el proceso la fase sólida ha de mantenerse siempre húmeda, puesto que el secado de la misma puede traer consigo una pérdida de muestra.
4. **Lavado de la columna.** Antes de proceder a la elución de los analitos, interesa eliminar los contaminantes retenidos en el adsorbente para que solo queden los analitos de interés. Para ello se lava tres veces con 3 ml de solvente metanol: agua (1:1) y se seca. Tras este proceso se cambian las guías del *Vacuum Manifold* y se colocan unos cartuchos de sulfato de sodio anhidro de 2,5 g para eliminar la presencia de dos fases en el extracto final, es decir, para eliminar restos de

humedad que puedan quedar en la muestra y queden retenidos, por tanto, en el cartucho.

5. Elución del analito. Para ello se emplea como solvente de elución 10 ml de hexano. A continuación, los extractos resultantes se someten a concentración por sequedad en corriente de nitrógeno ultrapuro. Finalizado esto, se reconstituyen con 1 ml de acetonitrilo, se reparte la solución en viales con tapón de rosca mediante pipeta Pasteur y se almacenan en congelación a -20°C hasta su análisis por HPLC.

Figura 2: Esquema de la extracción en fase sólida (SPE) (Molino, 2008).



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

De forma simultánea al análisis de las muestras se realiza una etapa de calibración. La etapa de calibración consiste en la realización de una recta de calibrado con patrones de cumafós en metanol de 100, 200, y 500 ng/g con efecto matriz. Para ello se extraen 5 g de miel exenta de residuos siguiendo el mismo protocolo de extracción de muestras que se indicará posteriormente. El mililitro de extracto resultante se reparte en 9 insertos de vial en alícuotas de 0,1 ml y estos insertos en sus respectivos viales se evaporan a sequedad en corriente de nitrógeno con cuidado de no perder muestra ni contaminar; así obtenemos la matriz.

Una vez obtenida la matriz se preparan los siguientes viales para la curva de calibración:

- Blanco matriz: matriz + 0,1 ml metanol
- Nivel I de calibración: matriz + 0,5 ml de patrón cumafós 100 ng/g en metanol.
- Nivel II de calibración: matriz + 0,5 ml de patrón cumafós 200 ng/g en metanol.
- Nivel III de calibración: matriz + 0,5 ml de patrón cumafós 500 ng/g en metanol.

Finalmente, estos viales se guardan en congelación a -20°C hasta su análisis por HPLC.

El análisis de las muestras finaliza con la identificación y cuantificación del compuesto de interés mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector barrido de espectros (DAD). Como fase móvil se emplea agua y acetonitrilo con un flujo de 1 ml/min y una elución en gradiente, con un gradiente inicial del 80% de acetonitrilo que alcanza el 100% a los 12 min y disminuye nuevamente al 80% hasta el minuto 15. El volumen de inyección es de 20 µl, la determinación del cumafós se realiza a una longitud de onda óptima de 315 nm y el tiempo de análisis cromatográfico es de 18 min.

En primer lugar, se introducen en el equipo los patrones de cumafós en metanol preparados para realizar la curva de calibración y, posteriormente, los extractos de las muestras problema.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en las seis muestras de miel analizadas fueron los reflejados en la Tabla 5.

Tabla 5: Concentración de cumafós en las muestras de miel analizadas.

Muestra de miel	Cumafós (ng/g)
1	26,5
2	9,1
3	12,0
4	37,0
5	8,8
6	15,2

Teniendo en cuenta que el LMR establecido por la legislación en la Unión Europea es de 100 ng/g de miel, ninguna de las muestras analizadas alcanza este valor.

De los datos encontrados en la literatura científica en los que se analiza la presencia de residuos de distintos acaricidas en mieles españolas, entre ellos el cumafós, no hay presencia de éste (Fernández et al., 1997) o los niveles detectados son bajos como es el caso del estudio de Juan - Borrás et al. (2016) quienes detectaron 4 µg/kg o, también en el realizado por Gómez et al.(2012) donde encontraron 5,1 µg/kg.

En el ámbito europeo, en un estudio realizado en Alemania sobre 1.000 muestras de miel, en el 28% de ellas se detectó cumafós pero a niveles de ng/g inferiores al máximo permitido, 100 ng/g. Así también, en análisis de mieles realizados en Francia los niveles detectados tampoco alcanzan el LMR (Fernández et al., 2002).

Con el fin de evaluar el riesgo toxicológico del consumo de estas mieles derivado de la presencia de residuos de cumafós, es necesario estimar su ingesta diaria (IDE) y compararla con la ingesta diaria admisible (IDA).

Durante el año 2015, el consumo per cápita de miel en España fue de 0,4 kg (MERCASA, 2016), lo que se traduce en una ingesta diaria de 1,1 g por persona. Por tanto, si se realiza el cálculo de la IDE considerando los resultados de concentración de cumafós detectado en el análisis de las seis muestras de miel y, la ingesta media diaria, se obtienen los valores reflejados en la Tabla 6. Comparando las IDEs obtenidas con la IDA, se observa que en todos los casos la ingesta es bastante inferior, menor del 1% del IDA, esto significa que el riesgo toxicológico para el consumidor es muy bajo (Tabla 6).

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos en otros estudios. En uno de ellos realizado sobre 50 muestras de miel de España y Portugal (Blasco et al., 2003) se examinaron los residuos de 42 plaguicidas (plaguicidas organoclorados, pesticidas organofosforados y carbamatos). La mayoría de los plaguicidas encontrados fueron organoclorados, con un 50% de gamma-hexaclorociclohexano. Sin embargo, estos y otros estudios, tanto en Europa como en otros países, concluyeron que la miel no contribuye sustancialmente a la ingesta diaria admisible de plaguicidas debido a las cantidades consumidas y los niveles de contaminación generalmente muy bajos (Grigoryan, 2016).

Tabla 6: Valores de la estimación de ingesta de cumafós de las diferentes mieles analizadas (IDE) y comparación con la ingesta diaria admisible (IDA) para un individuo de 70 kg de peso corporal.

Muestra de miel	Concentración de cumafós (ng/g)	Consumo diario de miel per cápita(g)	IDE (µg)	IDA (µg)	Comparación de valores de IDE frente a los valores de IDA (%)
1	26,5	1,1	0,03	17,5	0,16
2	9,1		0,01		0,05
3	12,0		0,01		0,07
4	37,0		0,04		0,23
5	8,8		0,01		0,05
6	15,2		0,02		0,09

6. CONCLUSIONES

6.1. CONCLUSIONES

Primera. La revisión bibliográfica ha revelado la existencia de datos científicos sobre la presencia de cumafós en miel. Esta información es básica para poder realizar una adecuada discusión de los resultados obtenidos en este estudio así como una correcta evaluación del riesgo.

Segunda. Las muestras han sido analizadas según el método descrito detectándose la presencia de cumafós en todas ellas, si bien la concentración máxima detectada ha sido de 37 ng/g de miel, muy por debajo del LMR (100 ng/g) establecido para el cumafós por la legislación europea.

Tercera. La evaluación toxicológica de las mieles analizadas en base a la IDA establecida para este acaricida permite estimar un riesgo muy bajo a partir del consumo de esta miel.

6.2. CONCLUSIONS

First. The bibliographic review has revealed the existence of scientific data on the presence of coumaphos in honey. This information is basic to be able to make a proper discussion of the results obtained in this study as well as a suitable risk assessment.

Second. Samples were analyzed according to the method described, detecting the presence of coumaphos in all of them, although the maximum level detected was 37 ng/g of honey, far below the established MRL (100 ng/g) for the coumaphos by European legislation.

Third. The toxicological evaluation of the analyzed honeys on the basis of the established ADI for this acaricide allows to estimate a very low risk from the consumption of this honey.

7. IDENTIFICACIÓN DE LAS APORTACIONES, QUE EN MATERIA DE APRENDIZAJE, HAN SUPUESTO LA REALIZACIÓN DE ESTA ASIGNATURA

La realización de este Trabajo de Fin de Grado me ha servido para tomar contacto con un sector de la alimentación del cual no tenía apenas conocimientos como es el sector de la miel. He podido adquirir conocimientos acerca del principal problema actualmente en la apicultura para la producción de miel, así como los métodos disponibles para prevenirlo y la relación de los residuos que éstos pueden dejar en la miel con la seguridad alimentaria a nivel de la salud del consumidor.

Además, me ha ayudado a familiarizarme con textos científicos, la mayoría de ellos escritos en lengua inglesa, aprendiendo vocabulario y esquemas de estructuración de los mismos.

8. EVALUACIÓN DE LA ASIGNATURA Y SUGERENCIAS DE MEJORA

La elaboración de un Trabajo de Fin de Grado ayuda a mejorar la capacidad de síntesis al trabajar y recopilar información de distintos textos científicos relacionados con un determinado tema, a escribir con orden y claridad, interpretar bibliografía y, sobre todo, a aprender de forma autónoma acerca de un tema.

En definitiva, a nivel personal considero que es una asignatura oportuna en el plan de estudios.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Adamczyk, S. (2007). “Análisis de residuos de acaricidas naturales y de síntesis en productos de la colmena”. *Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza*.
2. Adamczyk, S., Lázaro, R., Pérez, C., Conchello, P., Herrera, A. (2005). “Evaluation of Residues of Essential Oil Components in Honey after Different Anti-*Varroa* Treatments”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (26), 1085 – 1090.
3. AECOSAN (Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición). (2015). “¿Qué son los LMR?”. [Disponible en: <http://www.aecosan.msssi.gob.es>]. [Último acceso: 7 de septiembre de 2017].
4. AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios). (2017). “Listado de medicamentos veterinarios autorizados por la AEMPS para abejas”. [Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/medicamentosVeterinarios/saludVeterinaria/Med-abejas/home.htm>]. [Último acceso: 25 de agosto de 2017].
5. BEDCA (Base de Datos Española de Composición de Alimentos). (2017). “Miel”. [Disponible en: <http://www.bedca.net/bdpub/index.php>]. [Último acceso: 25 de agosto de 2017].
6. Blasco, C., Fernandez, M., Pena, A., Lino, C., Silveira, M., Font, G., Picó, Y. (2003). “Assessment of pesticide residues in honey samples from Portugal and Spain”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (51), 8132 – 8138.
7. Bogdanov, S., Kilchenmann, V., Fluri, P., Buhler, U., Lavanchy, P. (1999). “Influence of organic acids and components of essential oils on honey taste”. *American Bee Journal* 139 (1), 61 – 63.
8. Clément, H., Bruneau, E., Barbaçon, J.M., Bonnaffé, P., Domerego, R., Fert, G., Le Conte, Y., Ratia, G., Reeb, C., Vaissière, B. (2012). “Tratado de apicultura. El conocimiento y el cuidado de la abeja, las técnicas apícolas y los productos de la colmena”. Editorial Omega S.A. Barcelona.
9. Da Silva, P., Gauche, C., Valdemiro, L., Oliveira, A., Fett, R. (2016). “Honey: Chemical composition, stability and authenticity”. *Food Chemistry* 196, 309 - 323.

10. Del Carlo, M., Pepe, A., Sergi, M., Mascini, M., Tarentini, A., Compagnone, D. (2010). "Detection of coumaphos in honey using a screening method based on an electrochemical acetylcholinesterase bioassay". *Talanta* 81, 76-81.
11. Díaz, A.C. (2009). "Influencia de las condiciones de almacenamiento sobre la calidad físico – química y biológica de la miel". *Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza*.
12. EMEA.(2001). "Coumafos Summary Report. Committee for veterinary medicinal products". The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. *Veterinary Medicines Evaluation Unit*. [Disponible en: <http://www.ema.europa.eu>]. [Último acceso: 7 de septiembre de 2017].
13. EU Pesticides Database. 2017. "Honey and other apiculture products". [Disponible en: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=product.resultat&language=EN&selectedID=375>]. [Último acceso: 25 de agosto de 2017].
14. FAO. (2017). "Glosario de términos: Residuos de Medicamentos Veterinarios en los alimentos". Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. *Codex Alimentarius*. [Disponible en: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/vetdrugs/glossary/es/>]. [Último acceso: 12 de septiembre de 2017].
15. Fernández, M., Picó, Y., Mañes, J. (2002). "Analytical methods for pesticide residue determination in bee products". *Journal of Food Protection* 65 (9), 1502 – 1511.
16. Fernández, M.A., Sancho, M.T., Simal, J., Creus, J.M., Huidobro, J.F., Simal-Lozano, J. (1997). "Acaricide residues in honeys from Galicia (N.W. Spain)". *Journal of Food Protection* 60 (1), 78 – 80.
17. Flores, J.M., Padilla, F., Pérez, A. (2007). "Aspectos aplicados del ciclo biológico de *Varroa* y de su dinámica estacional". *El Colmenar* 88.
18. Formato, G., Menegotto, A., Jannoni, R. (2015). "Varroa (varroosis)". *Tecnologías y prácticas para pequeños productores agrarios, F.A.O.* [Disponible en: <http://teca.fao.org/es/read/8694>]. [Último acceso: 25 de agosto de 2017].
19. Gobierno de Aragón. (2014). "Guía de prácticas correctas de higiene para el sector de la miel". [Disponible en: <http://www.aragon.es/>]. [Último acceso: 25 de agosto de 2017].

20. Gómez, M.L., Plaza, P., Romero, R., Martínez, J.L., Garrido, A. (2012). “Comprehensive qualitative and quantitative determination of pesticides and veterinary drugs in honey using liquid chromatography–Orbitrap high resolution mass spectrometry”. *Journal of Chromatography A* 1248, 130 – 138.
21. Gracia, M.J., Moreno, C., Ferrer, M., Sanz, A., Peribáñez, M.A., Estrada, R. (2017). “Field efficacy of acaricides against *Varroa destructor*”. *PLOS ONE* 12 (2).
22. Gregorc, A., Planinc, I. (2002). “The Control of *Varroa destructor* Using Oxalic Acid”. *The Veterinary Journal* 163, 306 – 310.
23. Grigoryan, K. (2016). “Safety of Honey”. *Regulating safety of traditional and ethnic foods* 12, 217 – 246.
24. Juan – Borrás, M., Domenech. E., Escriche. I. (2016). “Mixture risk-assessment of pesticide residues in retail polyfloral honey”. *Food Control* 67, 127 – 134.
25. Kujawski, M.W., Namiesnik, J. (2011). “Levels of 13 multi-class pesticide residues in Polish honeys determined by LC-ESI-MS/MS”. *Food Control* 22, 914 – 919.
26. Lodesani, M., Costa, C. (2008). “Maximizing the efficacy of a thymol based product against the mite *Varroa destructor* by increasing the air space in the hive”. *Journal of Apicultural Research and Bee World* 47, 113 – 117.
27. MAPAMA (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente). (2017). “El sector de la miel en cifras. Principales indicadores económicos en 2016”. [Disponible en: <http://www.mapama.gob.es>]. [Último acceso: 22 de agosto de 2017].
28. Molino, F. (2008). “Estudio de la contaminación de la miel por residuos procedentes de tratamientos sanitarios en apicultura”. *Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza*.
29. OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). (2017) Enfermedades, infecciones e infestaciones de la lista de la OIE en vigor en 2017. [Disponible en: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2017/>]. [Último acceso: 25 de agosto de 2017].
30. Orden de 12 de junio de 1986 por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis para la miel. BOE núm. 145, de 18 de junio de 1986.
31. Przybylowski, P., Wilczynska, A. (2001). “Honey as an environmental marker”. *Food Chemistry* 74, 289 - 291.

32. RASFF (Food and Feed Safety Alert). (2016). [Disponible en: https://ec.europa.eu/food/safety/rasff/reports_publications_en]. [Último acceso: 7 de septiembre de 2017].
33. Real Decreto 1049/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Norma de calidad relativa a la miel. BOE núm. 186, de 5 de agosto de 2003.
34. Real Decreto 608/2006, de 19 de mayo, por el que se establece y regula un Programa nacional de lucha y control de las enfermedades de las abejas de la miel. BOE núm. 131, de 2 de junio de 2006.
35. Reglamento (UE) nº 2377/1990 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. DOUE núm. 224, de 18 de agosto de 1990.
36. Reglamento (CE) nº 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios. DOUE núm. 139, de 30 de abril de 2004.
37. Reglamento (CE) nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo. DOUE núm. 70, de 16 de marzo de 2005.
38. Reglamento (UE) nº 37/2010 de la Comisión, de 22 de diciembre de 2009, relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. DOUE núm. 15, de 20 de enero de 2010.
39. Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B. (2010). "Biology and control of *Varroa destructor*". *Journal of Invertebrate Pathology* 103, 96-119.
40. Ru, Q.M., Feng, Q., He, J.Z. (2013). "Risk assessment of heavy metals in honey consumed in Zhejiang province, southeastern China". *Food and Chemical Toxicology* 53, 256-262.
41. Sainz, C., Gómez, C. (2000). "Mieles españolas. Características e identificación mediante análisis del polen". Ediciones Mundi - Prensa. Madrid – Barcelona – México.
42. Serra, J., Ventura, F., Ruiz, J.A. (2014). "Residues of essential oils in honey after treatments to control *Varroa destructor*". *Journal of Essential Oil Research* 26, 22– 28.

43. Smodis, M.I., Nakrst, M., Zvokelj, L., Gregorc, A. (2011). "The acaricidal effect of flumethrin, oxalic acid and amitraz against *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera carnica*) colonies". *Acta Veterinaria BRNO* 80, 51 – 56.
44. Souza, P.A., Rocha, L., De Abreu, M.B., Fernandes, C. (2016). "Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods". *Talanta* 149, 124 – 141.
45. Tuzen, M., Silici, S., Mendil, D., Soylak, M. (2007). "Trace element levels in honeys from different regions of Turkey". *Food Chemistry* 103, 325 - 330.