



**Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza**



# Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria



## **1. ÍNDICE**

<b>2. RESUMEN</b>	<b>1</b>
2.1 Resumen	1
2.2 Abstract	2
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
3.1 Producción y comercialización de la miel en España	2
3.2 Aspectos bromatológicos	3
3.2.1 Agua	5
3.2.2 Azúcares	5
3.2.3 Fracción nitrogenada	6
3.2.4 Ácidos orgánicos	6
3.2.5 Vitaminas	6
3.2.6 Minerales	6
3.2.7 Compuestos fenólicos	7
3.2.8 Compuestos volátiles	7
3.3 Manejo y obtención de la miel	7
3.4 Contaminación microbiana de la miel	8
3.5 Enfermedades y tratamientos en apicultura	9
3.6 Problemática de la presencia de residuos de acaricidas en miel	11
3.7 Aspectos legales	13
3.8 Metodología de análisis	13
<b>4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
<b>5. METODOLOGÍA</b>	<b>16</b>
5.1 Revisión bibliográfica	16
5.2 Análisis experimental	16
5.2.1 Descripción de las muestras de miel	17
5.2.2 Miel libre de residuos	17
5.2.3 Descripción de la técnica de extracción QuEChERS	17
5.2.4 Obtención de un blanco amitraz	18
5.2.5 Preparación de los patrones de calibrado	19
5.2.6 Estudio de recuperación de la técnica QuEChERS	19
5.2.7 Preparación de blanco de calibrado	20

5.2.8 Preparación de muestra control	20
5.2.9 Determinación de residuos de amitraz mediante LC-MS/MS	20
5.2.10 Elaboración de la recta de calibrado	21
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
6.1 Estudio de recuperación de la técnica QuEChERS	22
6.2 Residuos de amitraz en las mieles analizadas	24
7. CONCLUSIONES	28
7.1 Conclusiones	28
7.2 Conclusions	29
8. VALORACIÓN PERSONAL	29
9. BIBLIOGRAFÍA	30
9.1 Legislación	33

## **2. RESUMEN**

### **2.1 Resumen**

Las abejas no solo producen miel y otros productos, sino que participan también en la polinización de las plantas preservando la biodiversidad del planeta. Más del 75% de los cultivos del mundo dependen en cierta medida de la polinización, permitiendo obtener mejores rendimientos y calidad de los productos.

Desde las últimas décadas la pérdida de colonias de abejas es alarmante perdiéndose en torno al 20% de las colonias anualmente en todo el mundo. El cambio climático, la varroosis y otras enfermedades, las deficiencias nutricionales, el uso de pesticidas, parecen ser las causas principales de la morbilidad y mortalidad de las abejas.

Amitraz es el acaricida de síntesis más utilizado en nuestro país frente al parásito *Varroa*, y la Unión Europea cuenta con LMR de amitraz para este alimento. La utilización de productos no autorizados o un uso incorrecto de productos autorizados puede conducir a la presencia de residuos en la miel con el riesgo para la salud que ello conlleva.

En el presente estudio se ha realizado la determinación de residuos de amitraz, en muestras de mieles aragonesas mediante extracción y purificación con la técnica QuEChERS y posterior identificación y cuantificación por cromatografía líquida (LC-MS/MS). El método QuEChERS ofrece una alternativa sencilla y rápida a las tradicionales extracciones líquido-líquido y en fase sólida.

Con esta metodología se ha obtenido un alto porcentaje de recuperación no habiéndose detectado amitraz en las muestras analizadas por encima del límite de detección de la técnica lo que demuestra la seguridad de la miel analizada y las buenas prácticas apícolas aplicadas.

## **2.2 Abstract**

Bees do not produce only honey and other products but they take part in plant's pollination supporting the planet biodiversity also. More than the 75% of the worldwide crops depends on pollination in some way, allowing to obtain better efficiency and quality products.

From the last decades, bee population is worryingly declining in around a 20% per year. The climate change, varroosis and other diseases, nutritional deficiencies and pesticides seems to be the main causes of bee morbidity and mortality.

Amitraz is the most used acaricide in our country against the mite *Varroa*, and the European Union has set MLR for amitraz for this food. The use of no authorized products or wrong use of authorized products can lead to the presence of residues in honey with its linked risk to health.

In the current study, a determination of residues of amitraz in Aragonese honey by QuEChERS extraction and following Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (LC-MS/MS) quantification has been carried out. QuEChERS technique offers a easy and fast alternative to the traditional liquid-liquid and solid-phase extraction.

With this methodology, high recovery values have been obtained not having detected amitraz in the samples over the detection limit, what shows the safety of the analyzed honey and the good beekeeping practices applied.

## **3. INTRODUCCIÓN**

### **3.1 Producción y comercialización de la miel en España**

Según datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2018a); en 2015 la producción de miel en España llegó a situarse en 33400 toneladas, con un descenso en los dos años siguientes debido a causas climáticas. A nivel de producción, 4 comunidades autónomas concentran el 70% de la producción de miel; Andalucía, Comunidad Valenciana, Castilla y León y Extremadura, siendo Aragón la novena Comunidad Autónoma en producción (Figura 1). En la zona norte y noroeste de España los tipos de

productores son apicultores pequeños o no profesionales censando en Aragón tan solo el 4% de las colmenas totales de España.

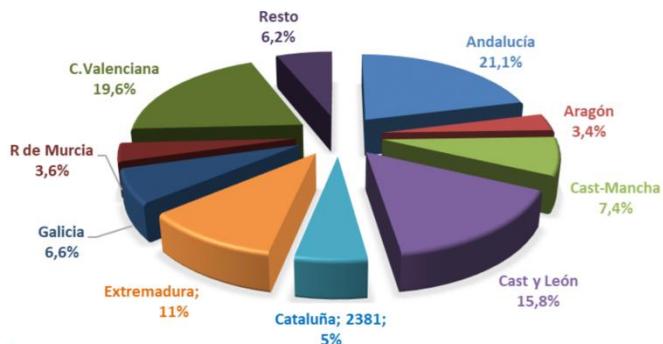


Figura 1. Producción de miel en España por Comunidades Autónomas en 2016 (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2018a)

España es el país comunitario más importante en cuanto a producción apícola, con un 16% del censo total comunitario. Aun así, en 2017 el volumen importado superó al exportado. La miel que importamos proviene mayoritariamente de China, con un incremento del 27% respecto al año 2016 suponiendo en 2017 el 58%. El volumen exportado por España se destina principalmente a Francia, Alemania y Portugal.

El consumo de miel en España per capita se mantiene estable en los últimos años, aunque en 2017 se ha visto un incremento y ha aumentado hasta los 0,9 kg/habitante/año (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2018a).

### 3.2 Aspectos bromatológicos

Según el Real Decreto 1049/2003, la miel es 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.

La miel se puede clasificar según su origen o su elaboración. Según su origen podría ser “miel de flores” o “miel de néctar” si ésta procede del néctar de plantas; o “miel de mielada” si procede en su mayor parte de excreciones de insectos chupadores de plantas presentes en las partes vivas de las plantas o de secreciones de las partes vivas de las plantas.

Según su elaboración o su presentación encontramos:

- Miel en panal: es la miel depositada por las abejas en los alvéolos operculados de panales recientemente construidos por ellas, o en finas hojas de cera en forma de panal realizadas únicamente con cera de abeja, sin larvas y vendida en panales, enteros o no.
- Miel con trozos de panal o panal cortado en miel: es la miel que contiene uno o más trozos de miel en panal.
- Miel escurrida: es la miel que se obtiene mediante el escurrido de los panales desoperculados, sin larvas.
- Miel centrifugada: es la miel que se obtiene mediante la centrifugación de los panales desoperculados, sin larvas.
- Miel prensada: es la miel obtenida mediante la compresión de los panales, sin larvas, con o sin aplicación de calor moderado, de hasta un máximo de 45°C.
- Miel filtrada: es la miel que se obtiene eliminando materia orgánica o inorgánica ajena a la miel de manera tal que se genere una importante eliminación de polen.

Por otro lado, encontramos la miel para uso industrial. Es la miel apropiada para usos industriales o para su utilización como ingrediente de otros productos alimenticios que se elaboran ulteriormente, que puede presentar un sabor o un olor extraños, o haber comenzado a fermentar o haber fermentado, o haberse sobrecalegado.

La miel contiene alrededor de 200 sustancias, principalmente azúcares junto a otros componentes como agua, enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, pigmentos, vitaminas, minerales y compuestos fenólicos. Dentro de los compuestos fenólicos los más destacados son flavonoides y ácidos fenólicos que le confieren propiedades como ser un antioxidante natural (Missio et al., 2016).

Según la Base de Datos Española de Composición de Alimentos - BEDCA (2019), la miel se compone de media de 76,8% de carbohidratos, siendo este el principal componente, un 17% de humedad, 0,5% de proteínas y cantidades menos significativas de vitaminas y minerales. Destaca aquí el ácido fólico con un 0,005% y la vitamina C en un 0,002%; Potasio en un 0,05% seguido del Sodio con un 0,02% suponiendo el total una energía de 315kcal por cada 100g.

Su composición, color, aroma y sabor dependen principalmente de las flores, la región, el clima y las especies de abeja involucradas en su producción y también se ve afectada por las condiciones climáticas, procesado, manipulación, envasado y almacenamiento (Missio et al., 2016).

### **3.2.1 Agua**

Encontramos mieles con niveles de agua de 14 a 18%. El contenido en agua es importante ya que contribuye a la estabilidad para resistir fermentaciones e influye en la granulación durante el almacenamiento. Un contenido en agua bajo favorece también una vida útil más larga (El Sohaimy, Masry and Shehata, 2015).

### **3.2.2 Azúcares**

Los monosacáridos representan el 75% de los azúcares de la miel, junto a un 10-15% de disacáridos y pequeñas cantidades de otros carbohidratos. Los azúcares son los responsables de propiedades como su valor energético, viscosidad, higroscopidad y granulación. En casi cualquier tipo de miel, la fructosa es el carbohidrato que encontramos en mayor proporción, seguida de la glucosa. Después encontramos los disacáridos como sacarosa, maltosa o isomaltosa; y trisacáridos como maltotriosa. Los disacáridos y trisacáridos se hidrolizan enzimáticamente a monosacáridos. Cuando la miel se almacena durante largo tiempo o se somete a calentamiento, las pentosas y hexosas se descomponen en compuestos no deseables como son los furanos. El principal a partir de pentosas es el furfural y el 5-hidroximetilfurfural de las hexosas. Se pueden usar como indicadores de perdida de frescura por la exposición a largos períodos de almacenamiento o a altas temperaturas (Missio et al., 2016).

La composición de azúcares no depende solo del origen floral de la miel. La mayoría de di y trisacáridos se forman por la acción de varias enzimas sobre los carbohidratos del néctar, reacciones que se producen con la reversión ácida durante el almacenamiento dando lugar a los disacáridos y azúcares complejos. Estos procesos dependen de factores como pH y contenido de agua (De la Fuente et al., 2011).

### **3.2.3 Fracción nitrogenada**

El contenido de aminoácidos y proteínas es relativamente pequeño, alrededor de un 0.7%. La miel contiene aminoácidos libres en cantidades de 100mg/100g de extracto seco, siendo el aminoácido principal prolina que es un indicador de la madurez de la miel; seguido de lisina. Los enzimas de la miel son segregados por la propia abeja o por las plantas. Destacan la diastasa que digiere almidón a maltosa y la invertasa que cataliza principalmente la conversión de sacarosa en glucosa y fructosa. Otras dos enzimas principales son la glucosa oxidasa y la catalasa, que regulan la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uno de los factores antibacterianos de la miel, además de fosfatases (Bogdanov, 2016).

### **3.2.4 Ácidos orgánicos**

Todas las mieles tienen ligera acidez y esto se debe a que está compuesta en un 0,57% aproximadamente de ácidos orgánicos. Estos derivan de la transformación de azúcares por enzimas secretadas por las abejas al transformar el néctar en miel, o directamente del néctar. El ácido predominante es el ácido glucónico cuya presencia proviene de la glucosa oxidasa. Además del ácido glucónico, el ácido cítrico se encuentra presente y estos 2 ácidos permiten diferenciar la miel de flores de la mielada (Missio et al., 2016).

### **3.2.5 Vitaminas**

Las vitaminas mayoritarias pertenecen al complejo B cuya fuente son los gránulos de polen que se quedan en suspensión. Las más destacadas son tiamina, riboflavina, ácido pantoténico, biotina y ácido fólico. Además, también encontramos vitamina C. Con la filtración se puede reducir el contenido en vitaminas por la retirada parcial del polen. Otra razón por la que puede disminuir el contenido en vitaminas es la oxidación de ácido ascórbico por el peróxido de hidrógeno producido por la glucosa oxidasa. (Missio et al., 2016)

### **3.2.6 Minerales**

La mayoría de mieles tienen un contenido mineral de 0.1 a 0.3% mientras que las mieles en forma de mielada pueden alcanzar el 1% del total. El potasio, con un promedio

de aproximadamente un tercio del total, es el elemento mineral principal, pero existe una amplia variedad de elementos traza. Varias investigaciones han demostrado que el contenido de elementos traza de la miel depende principalmente del origen botánico de la miel. (Bogdanov, 2016)

### **3.2.7 Compuestos fenólicos**

Dentro de los compuestos fenólicos, los componentes más destacados son ácido vanílico, ácido cafeico, quercetina, kaempferol, ácido gálico, ácido benzoico y otros. El principal componente funcional de la miel son los flavonoides pudiendo contribuir de manera significativa a su capacidad antioxidante. Se ha estudiado su estabilidad y parece ser que, tras el tratamiento térmico, muchos disminuyen. También en condiciones alcalinas son más inestables y su sensibilidad a la oxidación aumenta en presencia de agentes oxidantes como es el peróxido de hidrógeno que está presente en la miel, el cual es el oxidante más común de los flavonoides de la miel. (Missio et al., 2016)

### **3.2.8 Compuestos volátiles**

Son los responsables del aroma de la miel y se han llegado a identificar 400 componentes distintos en la fracción volátil. Estos pueden tener su origen en distintas fuentes siendo una de ellas la transferencia de este tipo de compuestos de la planta por lo tanto según el tipo de néctar variarán. También encontramos en casi todas las mieles alcoholes, cetonas y aldehídos, siendo los componentes volátiles más importantes furfural, benzaldehído y acetona. Los cuales varían a lo largo del tiempo. (Missio et al., 2016)

## **3.3. Manejo y obtención de la miel**

Como para cualquier alimento, los procedimientos y métodos de manejo, los equipos e instalaciones y los manipuladores que intervengan en su obtención han de cumplir con los requisitos higiosanitarios necesarios para ello. El respeto de unas prácticas correctas de higiene en todas y cada una de las etapas de producción es

imprescindible para garantizar la calidad y seguridad del alimento obtenido. (Departamento de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente, 2015)

Para obtener la miel, el proceso comienza por la recolección, corte o castra. Comprende las operaciones realizadas en el campo para retirar de las colmenas los panales llenos de miel, previamente “desabejados” mediante ahumado y cepillado o soplado de los mismos, y trasladarlos a una instalación donde se realiza la extracción de la miel.

Se comenzará con el desoperculado donde se elimina, mediante un instrumento afilado y generalmente caliente, la capa o lámina de cera (opérculo) con el que las abejas taponan las celdillas llenas de miel.

La extracción suele realizarse mediante centrífuga, ya que el prensado es una práctica en desuso que aporta una miel de peor calidad por las impurezas que contiene.

Tras la centrifugación sigue el filtrado para eliminar impurezas como restos de cera, insectos, materia vegetal, etc. evitando eliminar por completo las sustancias propias de la miel, como el polen. Para eliminar las burbujas de aire introducidas durante la extracción e impurezas que hayan quedado, se realiza la decantación y desespumado. Finalmente, la miel se envasa

Los contenedores y recipientes de la miel se almacenarán en un local adecuado, de fácil limpieza, al abrigo de la luz solar, baja humedad relativa y temperatura lo más constante posible, que nunca supere los 35°C. Los productos químicos, medicamentos veterinarios, productos de limpieza, etc. no se guardarán en la zona de almacenamiento de la miel. Se deben guardar en un armario cerrado para evitar contaminaciones cruzadas. El procesado de la miel se caracteriza por la reducida cantidad de residuos que genera y por las características de inocuidad de los mismos. (Departamento de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente, 2015)

### **3.4 Contaminación microbiana de la miel**

A nivel de consumidor, la miel es un producto bacteriostático, capaz de impedir la multiplicación de la mayoría de los microorganismos. Dada su composición (alto contenido en azúcar, pobre en proteínas y con una acidez elevada), los riesgos

microbiológicos ligados a su consumo son prácticamente inexistentes. (Departamento de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente, 2015)

Además, los gérmenes patógenos de las abejas son muy específicos y no pueden transmitirse al hombre por lo que la contaminación de la miel por gérmenes con posible repercusión sobre la salud de las personas tiene, casi exclusivamente, su origen en los procedimientos de obtención y manipulación de la misma. En consecuencia, la higiene del personal que manipula la miel, de las instalaciones, equipamientos y materiales que puedan entrar en contacto con el producto y las condiciones en que se realicen las distintas operaciones, son fundamentales en el control de la presencia de gérmenes. Por otra parte, una excesiva humedad en la miel puede favorecer la proliferación de hongos y levaduras que pueden condicionar la vida útil y la conservación de la misma (Departamento de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente, 2015)

### **3.5 Enfermedades y tratamientos en apicultura**

La varroosis es una patología de las abejas melíferas provocada por el ácaro *Varroa destructor*, que constituye en la actualidad el principal problema de los apicultores. El ácaro *Varroa* en estudio chupa la hemolinfa de las abejas y las crías, transmitiendo enfermedades y virus que impactan negativamente en las posibilidades de supervivencia de la colonia. (Kuan et al., 2018)

En España está vigente el Real Decreto 608/2006, por el que se establece y regula un Programa nacional de lucha y control de las enfermedades de las abejas de la miel. Esta norma incluye las enfermedades de elevada patogenicidad que afectan a las abejas de la miel como son la loque americana (*Paenibacillus larvae*), tropilaelapsosis (*Tropilaelaps spp*) y aethinosis (*Aethina tumida*). Además, también indica ciertas pautas para el tratamiento de la varroosis, que se realizará en el período septiembre-noviembre. No obstante, el órgano competente de la comunidad autónoma podrá, en atención a las especialidades de cada zona, o en atención a la trashumancia, establecer un período de inicio o finalización diferentes. En el caso de Aragón, según la Orden de 28 de febrero de 2007, se establece el período de tratamiento frente a la varroosis durante el período de marzo a mayo.

Según Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2018b), la mortalidad invernal durante la campaña 2016-2017 de las abejas fue del 9,8%, con valores que variaron desde el 50,0 %, máximo registrado en Madrid, al 2,8% registrado en Galicia. En otoño de 2016, *Varroa destructor* se detectó en un 86% de los apiarios y el 53,5% de las colonias investigadas. Solamente un 50,0% de los apiarios presentó niveles muy leves o nulos de infestación.

En el otoño de 2016, a pesar de que un 87,5% aplicaron algún tratamiento para el control de *Varroa destructor* antes de la visita otoñal, un 4,8% presentó una tasa de infestación grave, indicando esto que la aplicación de los tratamientos no había sido lo suficientemente efectiva para su control. Cabe resaltar que en tan sólo un 38,5% de los apiarios investigados se aplicaron correctamente los tratamientos durante la campaña 2016, observándose una tendencia similar a las campañas anteriores. Esta situación puede contribuir a la disminución de la eficacia en el control y favorecer la aparición de resistencias. Por otro lado, en cuanto al grado de elección de tratamientos declarados para esta campaña 2016-2017 (Figura 2), se observa una utilización mayoritaria de amitraz, y una disminución importante del cumafós respecto de campañas anteriores.

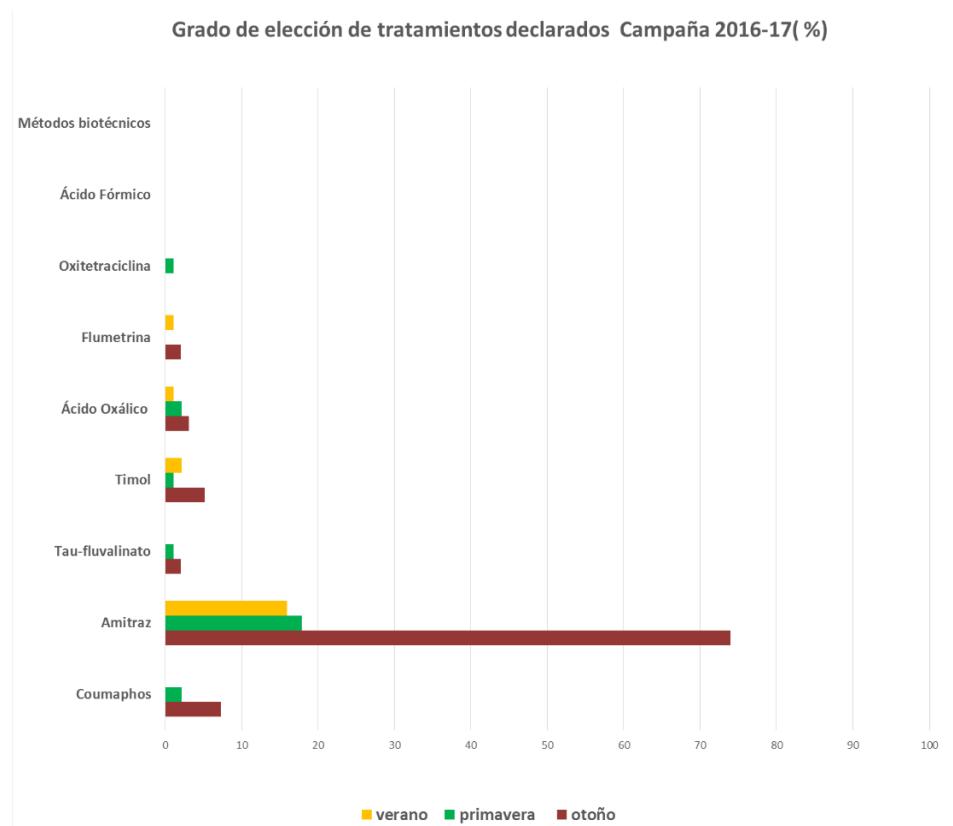


Figura 2. Porcentaje de elección de tratamientos declarados durante la Campaña 2015-2016 Fuente: Ministerio de Alimentación y Pesca y Agricultura 2018b

Según el Listado de Medicamentos Veterinarios Autorizados publicado por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (2018), solamente están autorizados los tratamientos frente a *Varroa*, siendo los compuestos autorizados amitraz, timol, flumetrina, ácido oxálico, tau fluvalinato, cumafós y ácido fórmico.

Podemos dividir los acaricidas que se usan para control de estos parásitos en 3 categorías: los orgánicos sintéticos, productos naturales o los pesticidas ácido orgánicos. Dentro de los orgánicos sintéticos encontramos que los más usados son el tau-fluvalinato, un piretroide que mata los ácaros al bloquear los canales sodio-calcio. Flumetrina, otro piretroide cuya actividad se regula por medio de los canales de sodio llevando a aumentar el influjo de sodio. El cumafós, organofosforado que inactiva la enzima acetilcolinesterasa y por tanto interfiere con la función de la señal nerviosa. El amitraz, formamidina que es un agonista octopaminérgico, y el cual hemos cuantificado en este estudio (Boncristiani et al., 2012).

### **3.6 Problemática de la presencia de residuos de acaricidas en miel**

Si bien los términos plaguicida y producto fitosanitario suelen usarse de manera indistinta, no son exactamente iguales. La forma más común de uso de un plaguicida es como producto fitosanitario pero su concepto abarca también otros posibles usos no relacionados con la protección de los cultivos vegetales.

Los productos fitosanitarios son plaguicidas que tienen alguna de las siguientes funciones: proteger a los vegetales o productos vegetales de organismos nocivos, antes o después de la cosecha; influir en los procesos vitales de los vegetales; mejorar la conservación de los productos vegetales y destruir o prevenir el crecimiento no deseado de vegetales o partes de los mismos.

La utilización de los plaguicidas en las cosechas puede conllevar la presencia de residuos, esto es, sustancias químicas resultantes de la utilización de un producto fitosanitario, incluidos sus metabolitos y los productos resultantes de su degradación o reacción. Con el fin de garantizar que la utilización de estas sustancias químicas es segura para los consumidores se establecen los Límites Máximos de Residuos en los alimentos (Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2018).

Estos Límites Máximos de Residuos (LMR) se definen como el límite legal superior de concentración de un residuo de plaguicida en alimentos o piensos establecido de conformidad con el Reglamento (UE) nº 396/2005, basado en las buenas prácticas agrícolas y la menor exposición del consumidor necesaria para proteger a todos los consumidores, incluidos aquellos más vulnerables (niños, vegetarianos, embarazadas...) (Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2015).

De los pocos peligros que la miel puede presentar para la salud de los consumidores, los más importantes derivan de la presencia, por encima de los límites legalmente establecidos, de agentes químicos, en especial de residuos procedentes de la inadecuada utilización de tratamientos veterinarios y productos de limpieza y de determinadas prácticas agrícolas (Departamento de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente, 2015). La presencia de este tipo de pesticidas en niveles superiores de los LMR es preocupante para la población, en particular aquellos segmentos de población sensibles como son las mujeres embarazadas y niños. Según estudios, los pesticidas organofosforados pueden causar inhibición del crecimiento del feto y acortar el periodo de gestación (Souza et al., 2016).

Existen dos rutas principales a partir de las cuales se produce la contaminación de la miel con pesticidas. Por un lado, los pesticidas que emplea el apicultor para los tratamientos se incorporan también a la miel y se acumulan en otros productos de la colmena. La otra ruta es de manera indirecta, la mala praxis a la hora de usar pesticidas en agricultura, empleándolos en cantidades excesivas; o en épocas de alta producción de néctar y pecoreo lo que lleva a la distribución de estos componentes por el medio ambiente a través del aire, agua, suelo y plantas lo cual hace consecuentemente que se contaminen los productos apícolas (Zheng et al., 2018).

Dada la elevada toxicidad de algunos pesticidas detectados, su alta estabilidad en la colmena y la distribución potencial por todos los productos apícolas, es necesario adoptar medidas para reducir la carga de pesticidas. El uso de pesticidas menos persistentes, la correcta aplicación de tratamientos veterinarios autorizados junto a la implementación de nuevas prácticas sostenibles es muy recomendado (Calatayud-Vernich et al., 2018).

### **3.7 Aspectos legales**

Dado que ciertos pesticidas son cancerígenos y otros pueden causar disfunción de los sistemas nervioso y reproductivo, estos residuos pueden ser extremadamente dañinos para los consumidores, incluso cuando están presentes en pequeñas dosis en los productos finales. Las abejas pueden importar diferentes pesticidas a la cadena alimenticia y retenerlos en los productos de la miel. Así, la creciente demanda de consumo de miel, provocada por el crecimiento constante de la población, está llevando a serios problemas por la presencia de pesticidas en estos productos. Por todo esto que se hayan establecido límites máximos de residuos para pesticidas en miel (Zheng et al., 2018).

Atendiendo a la legislación vigente, el límite máximo de residuo permitido de la sustancia activa amitraz es de 0,2 mg/kg miel, como dispone el anexo II del Reglamento (CE) nº 396/2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal. De hecho, este límite fue recientemente modificado al valor actual por el Reglamento (UE) 2017/623 que modifica al anterior citado. Este valor coincide también con el indicado por el Reglamento (UE) nº 37/2010 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal.

El Reglamento de ejecución (UE) 2018/470, donde incluyen las abejas, establece normas detalladas sobre el límite máximo de residuos a tener en cuenta a efectos de control de alimentos derivados de animales tratados en la UE que en este caso coincide con el dispuesto por la anterior normativa citada.

### **3.8 Metodología de análisis**

La determinación de residuos de pesticidas en los alimentos requiere un paso previo de preparación de la muestra debido a las bajas concentraciones de los analitos en la misma, las distintas propiedades químicas de los analitos y la complejidad de las matrices. Aunque la mayoría de estos procedimientos se llevan a cabo mediante técnicas convencionales, no siempre se obtienen extractos suficientemente limpios y ni una recuperación satisfactoria. Estas desventajas han conducido al desarrollo de nuevos enfoques con énfasis en la facilidad de su implementación, el uso de cantidades

significativamente más bajas de solventes orgánicos para obtener técnicas más sostenibles y la capacidad de detectar analitos en concentraciones muy bajas. (Souza et al., 2016).

El método QuEChERS, acrónimo en inglés de Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe, se desarrolló en 2003 para el análisis de residuos de pesticidas en frutas y hortalizas. Esta técnica se caracteriza por su alto rendimiento, bajo coste y simpleza de pasos cuyas siglas provienen de sus características en inglés rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro. Pero ha sido recientemente cuando ha sustituido los complejos pasos que se hacían anteriormente para analizar pesticidas en la miel adaptando este método de extracción (Zheng et al., 2018).

El procedimiento está basado en una extracción inicial de fase única que utiliza 10 o 15 g de muestra con acetonitrilo, a razón de 1 ml de acetonitrilo por 1 g de muestra. Se crea una partición líquido-líquido agregando un exceso de sales y tampones al extracto. Tras la centrifugación se recoge la capa de acetonitrilo, que contiene el pesticida. La matriz puede limpiarse más y eliminar el exceso de agua con un paso único de extracción en fase sólida por dispersión, mezclando el extracto en acetonitrilo con rellenos de MgSO<sub>4</sub> anhidro y amina primaria y secundaria (PSA). La mayor ventaja, aparte del tiempo y el esfuerzo, es que el extracto final se puede analizar directamente mediante GC/MS o por LC-MS/MS con una simple dilución (Anastassiades et al., 2003).

El volumen de solvente orgánico afecta a la eficacia de la extracción además de a la eficacia de la limpieza, por lo que es importante optimizar el volumen para obtener buenas recuperaciones durante el trabajo experimental. El uso de acetonitrilo proporciona extractos menos coloridos, lo que facilita el paso de la limpieza y mejora la LC-MS/MS posterior. El MgSO<sub>4</sub> se emplea para asegurar la sequedad de la muestra, llegando a una fase de separación y extracción de los componentes con una solución de acetonitrilo que mejora la sensibilidad. Para eliminar las interferencias con la matriz, se realiza un paso de limpieza con PSA. Ese tiene la capacidad de retener componentes de la matriz, como ácidos orgánicos polares, azúcares o ácidos grasos. Al eliminar los azúcares mejoran los porcentajes de recuperación, sumando C18 el cual elimina las sustancias grasas y no polares que causan interferencias (Souza et al., 2016; Zheng et al., 2018).

#### **4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

Todos los estudios coinciden en que la desaparición de colonias de abejas se debe a factores como el cambio climático, patógenos causantes de enfermedades y pesticidas. El ácaro *Varroa destructor* y los tratamientos para combatir la enfermedad que provoca, la varroosis, representan una problemática sanitaria muy importante tanto en la apicultura como en salud pública.

Es muy importante el desarrollo de técnicas para analizar la presencia de residuos de plaguicidas en la miel que sean específicas, sensibles y miniaturizadas además de sostenibles o respetuosas con el medio ambiente. Considerando que el amitraz es el acaricida más empleado en apicultura en España, es de interés controlar la presencia de sus residuos en la miel para garantizar la seguridad tanto a nivel apícola como del consumidor.

Por tanto, el **objetivo general** de este trabajo es analizar la presencia de residuos de amitraz en muestras de mieles aragonesas. Además, los **objetivos parciales** de este trabajo son los siguientes:

- Realizar una revisión bibliográfica sobre la contaminación de la miel con residuos de acaricidas.
- Validar en nuestro laboratorio la técnica QuEChERS de extracción y purificación de residuos de amitraz en miel.
- Aplicar la técnica QuEChERS al análisis de muestras de mieles aragonesas
- Identificar y cuantificar la posible presencia de residuos de amitraz en los extractos de las muestras mediante cromatografía líquida (LC-MS/MS)
- Evaluar los resultados obtenidos

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1 Revisión bibliográfica**

Para realizar la revisión bibliográfica de este trabajo, tanto a nivel científico como legal, se han consultado diversas bases de datos y otras fuentes de información. La herramienta AlcorZe, buscador de la Biblioteca de la Universidad de Zaragoza, permitió acceder a bases de datos con recursos de información fiables y veraces como ScienceDirect o Web of Science, entre otros. Las palabras clave “honey”, “beehive”, “pesticide”, “acaricide”, “extraction”, “amitraz” y “QuEChERS”, junto los operadores booleanos lógicos utilizados, permitió acotar hasta obtener las fuentes finalmente empleadas. También se consultaron otras bases de datos como la Base de Datos Española de Composición de Alimentos (BEDCA), desarrollada por una red de Centros de investigación públicos, Administración e Instituciones privadas. Así mismo, se ha consultado la página web del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) y de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). A nivel legal se han empleado tres bases de datos para buscar legislación vigente y consolidada; EUR-Lex da acceso al Derecho de la Unión Europea; para consultar legislación a nivel estatal se contó con Iberlex y, por último, a nivel autonómico el Gobierno de Aragón da acceso a su legislación consolidada mediante Aranzadi digital, servicio jurídico online que constituye una base de datos de legislación española a texto completo.

### **5.2 Análisis experimental**

La parte experimental de este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio físico-químico del área de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Veterinaria, a excepción de la determinación por cromatografía líquida (LC-MS/MS) que se realizó en el Laboratorio Agroambiental del Gobierno de Aragón.

### **5.2.1 Descripción de las muestras de miel**

Se analizaron 12 muestras de mieles aragonesas, de diferentes orígenes botánicos y de diferentes características sensoriales, claramente apreciables a nivel visual, como color y textura. Eran mieles crudas no sometidas a tratamiento térmico. Las mieles fueron proporcionadas por diferentes apicultores y estaban envasadas en frascos de cristal con tape metálico.

### **5.2.2 Miel libre de residuos**

Para hacer el análisis control, así como los patrones de calibración y el estudio de recuperación es necesario disponer de una miel libre de residuos. Para ello se seleccionó una miel de brezo perteneciente a la Indicación Geográfica Protegida “Miel de Galicia” (Figura 3).



Figura 3. Miel libre de residuos

### **5.2.3 Descripción de la técnica de extracción QuEChERS**

En primer lugar, hay que indicar que la cuantificación de los residuos se realiza mediante la técnica de patrón interno, por lo que hay que añadir dicho patrón interno tanto a los patrones de calibrado como a la muestra. En este estudio se ha utilizado trifenilfosfato (TPP) como patrón interno.

Para llevar a cabo la extracción de las muestras a analizar, primero se pesó 5 g de cada miel en un tubo de centrífuga de 50 ml.

Para cada muestra se añadió 20 µl de una disolución en acetonitrilo (10 mg/L) del patrón interno, (TPP). Posteriormente, se añadió 10 ml de agua Mili-Q y se agitaron los tubos de centrífuga durante 10 minutos.

Tras añadir 10 ml de acetonitrilo, se volvió a agitar 10 minutos añadiendo posteriormente las primeras sales de extracción que se componen de 4 g de MgSO<sub>4</sub>, 1 g de NaCl, 1 g de citrato trisódico dihidrato y 0,5 g de disodio hidrogenocitrato sesquihibdrato.

Tras agitar 10 minutos y centrifugar 5 minutos a 2500 g, se obtuvieron 2 fases diferenciadas (Figura 4). Se tomó una alícuota de la fase orgánica que contiene los residuos de pesticidas, en este caso amitraz.

Esta alícuota se transfirió a un tubo que contenía las segundas sales (25 mg de PSA, 150 mg de MgSO<sub>4</sub> y 150 mg de C18 por cada ml de extracto). Tras una nueva agitación durante 10 minutos, el tubo se centrifugó a 2500 g durante 5 minutos obteniéndose de nuevo dos fases claramente diferenciadas, como se ve en la Figura 5. Se tomó una alícuota de la fase orgánica ya limpia, con el analito extraído, y se pasó a viales de cromatografía para proceder a su análisis mediante LC-MS/MS.

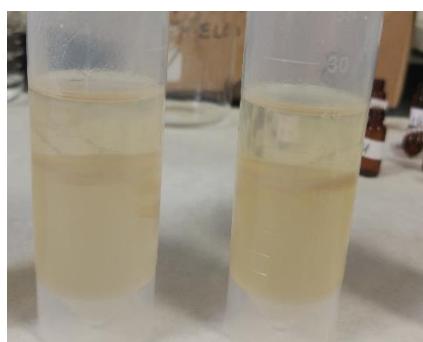


Figura 4. Separación de fases tras la adición de las primeras sales de extracción.

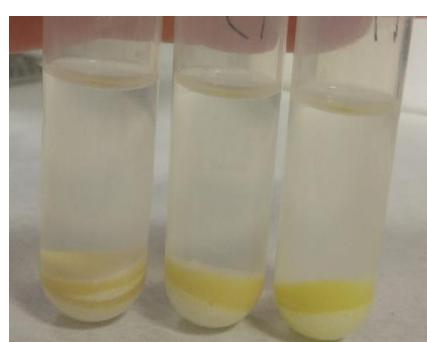


Figura 5. Solución con el analito objeto de estudio extraído en la fase orgánica (sobrenadante).

#### 5.2.4 Obtención de un blanco matriz

La aplicación de la técnica QuEChERS a la muestra de miel libre de residuos nos permite disponer de un extracto que se utilizará como control de los análisis, así como para la fortificación con patrones de amitraz tanto para el estudio de la recuperación de la técnica como para la preparación de la recta de calibrado. Para ello se procedió según lo

descrito en el apartado 5.2.3, pero sin la adición del patrón interno TPP. Para obtener un volumen de extracto suficiente, la extracción se hizo por duplicado.

### 5.2.5 Preparación de los patrones de calibrado

Se preparó una disolución madre (DM) de amitraz en acetonitrilo de 1 mg/ml, pesando 10 mg de amitraz y llevando a un volumen final de 10 ml.

A continuación, a partir de dicha DM se preparó una disolución intermedia de amitraz con TPP (2,5 mg/L).

Finalmente, se prepararon en viales de cromatografía los patrones de calibrado a 5 concentraciones diferentes de acuerdo con lo indicado en la Tabla 1.

Tabla 1. Preparación de los patrones de calibración

Concentración final ( $\mu\text{g/L}$ )	Volumen de amitraz + TPP (2,5mg/L) ( $\mu\text{L}$ )	Volumen de acetonitrilo ( $\mu\text{L}$ )	Volumen del extracto blanco matriz ( $\mu\text{L}$ )
5	2	98	900
10	4	96	900
25	10	90	900
50	25	75	900
250	100	0	900

### 5.2.6 Estudio de recuperación de la técnica QuEChERS

Para realizar este estudio se fortificó previamente el extracto de blanco matriz a tres concentraciones diferentes: 10, 100 y 200 ppb de amitraz. Para ello, se pesaron 5 g de la miel libre de residuos y se añadió el volumen necesario de una disolución concentrada de amitraz para obtener las concentraciones indicadas.

Posteriormente se procedió a aplicar la técnica de extracción QuEChERS según lo descrito en 5.2.3.

### **5.2.7 Preparación de un blanco de calibrado**

Se preparó un vial de blanco, sin miel. Para obtenerlo se siguió el procedimiento de la técnica QuEChERS indicado en el apartado 5.2.3 usando únicamente los solventes del procedimiento.

### **5.2.8 Preparación de una muestra control**

Se elaboró un control partiendo de 5 g de miel libre de residuos que se sometió al proceso de extracción, obteniendo una muestra con patrón interno TPP pero sin residuos de pesticidas.

### **5.2.9 Determinación de residuos de amitraz mediante LC-MS/MS**

Para poder realizar la determinación de residuos de amitraz en las muestras extraídas mediante QuEChERS, se enviaron los extractos al Laboratorio Agroambiental para su análisis.

Las condiciones de análisis se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de medida establecidas para el análisis por LC-MS/MS

	Polaridad	Transición	Voltaje del capilar	Voltaje colisión	Dwell time
NFD	Pos.	163.1 >	107.4	88	19.5
	Pos.	163.1 >	117	88	19
	Pos.	163.1 >	122	88	14
	Pos.	163.1 >	163.1	88	5
Amitraz	Pos.	294.1 >	122	44	24
	Pos.	294.1 >	163	44	13
	Pos.	294.1 >	253	44	10
TPP	Pos.	327 >	152	76	16.5
	Pos.	327 >	215	76	20
					0.015

En la Figura 6 se muestra el cromatograma de una muestra fortificada con amitraz a 10 µg/kg. El límite de detección de la técnica es de 0,01 mg de amitraz/kg de miel. Como se ve, el amitraz se encuentra a los 12,93 minutos de LC-MS/MS.

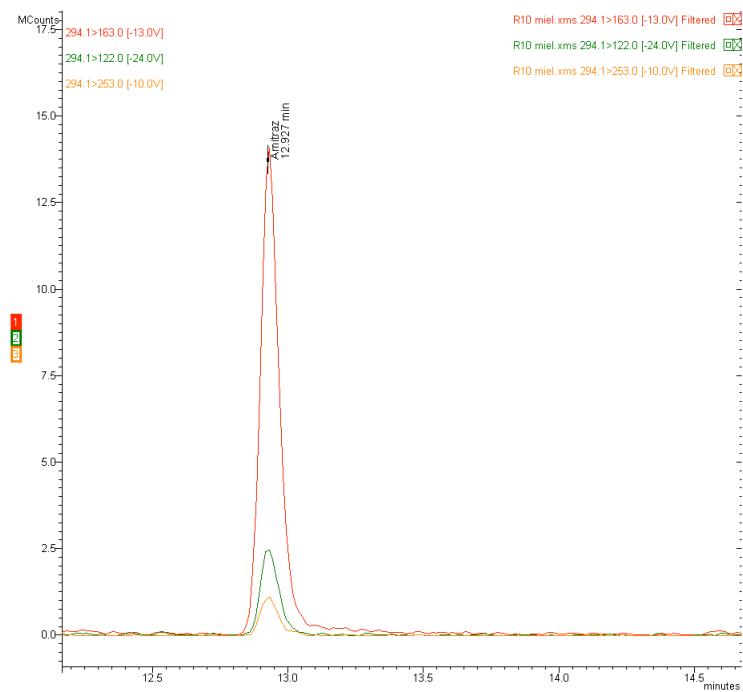


Figura 6. Cromatograma de una muestra fortificada con amitraz a 10 µg/kg.

### 5.2.10 Elaboración de la recta de calibrado

Se elaboró la recta de calibrado con los patrones previamente preparados según el apartado 5.2.5. Para realizar la recta de calibrado para el patrón interno (TPP) se emplearon concentraciones de 10, 25 y 50 µg/l. En el caso de la curva de calibrado de amitraz, se llevó a cabo mediante los 5 patrones elaborados a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 250 µg/l (Figura 7).

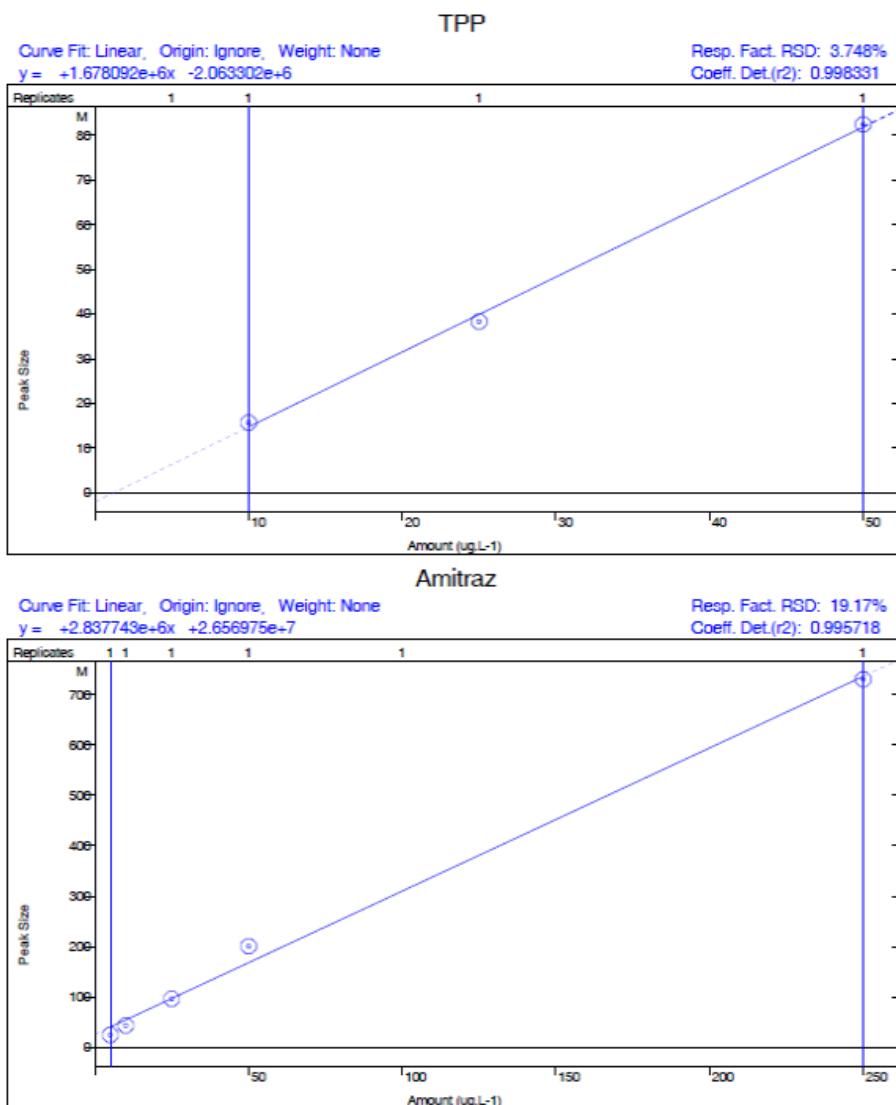


Figura 7. Recta de calibrado del patrón interno (TPP) y amitraz

Posteriormente, se inyectaron los extractos de las muestras analizadas.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Estudio de recuperación de la técnica QuEChERS

Los porcentajes de recuperación de la técnica se muestran en la Tabla 3, obteniéndose para el amitraz una recuperación media de  $94,3 \pm 0,6\%$  para las tres concentraciones estudiadas las cuales se inyectaron por triplicado. Este resultado es satisfactorio de acuerdo con las referencias internacionales. Al cuantificar el amitraz en

las muestras fortificadas, y comparar la media de los resultados obtenidos de la Tabla 3 respecto a las concentraciones teóricas elaboradas de 0,01, 0,1 y 0,2 mg/kg para F10, F100 y F200, respectivamente, se puede apreciar la exactitud de la técnica empleada. Además, se hallaron estos resultados con RSD inferior al 20%.

Tabla 3. Resultados de las muestras de miel fortificadas

	Amitraz (mg/kg)	Recuperación (%)
F10	0,0095	95
F100	0,094	94
F200	0,188	94

Si comparamos los resultados obtenidos con los de otros estudios sobre residuos de pesticidas en miel, encontramos resultados similares para la mayoría de pesticidas que han empleado este mismo análisis. En el estudio de Calatayud-Vernich et al. (2017), el porcentaje de recuperación de las muestras fue de un rango de 50 a 120%. En la misma línea, recuperaciones entre 81,6 y 108,9% y coeficiente de variación menor o igual al 20% obtuvieron en su estudio Souza et al. (2016) al analizar mediante QuEChERS y UHPLC-MS/MS 116 pesticidas. También Lozano et al. (2018) consiguieron recuperaciones de 70% a 120% y con alta precisión con un RSD inferior al 20%.

Zheng et al. (2018) analizaron 5 residuos de pesticidas mediante QuEChERS seguido de LC-MS/MS. Obtuvieron porcentajes de recuperación de la miel de 62 a 108% con una RSD < 9%. Concretamente para el amitraz sus resultados variaron de 72,24% a 97,60% de recuperación, con un RSD de 1,28 hasta 9,06. Gawel et al. (2019) encontraron también que, de los 207 pesticidas analizados en miel, el 98% de los componentes mostraron unos porcentajes de recuperación en el rango 70-120% y todas las muestras tuvieron una repetitibilidad buena con un RSD < 20%.

En un estudio que compara 2 técnicas de extracción distintas muy empleadas como extracción de líquidos con soporte (SLE) y QuEChERS, analizaron en miel cuatro residuos de pesticidas diferentes y resaltaron que los porcentajes de recuperación son casi idénticos, siendo un poco superiores en SLE, pero en ambos a entorno el 70% (Kujawski et al., 2014).

Al comparar la extracción en fase sólida con QuEChERS en miel, obtuvieron siempre un RSD inferior al 20% y porcentajes de recuperación que iban del 30 al 96%. Aunque la extracción en fase sólida les dio mejores resultados con la miel tanto en precisión como exactitud que la QuEChERS, determinaron que QuEChERS es más económico y consume menos tiempo obteniendo valores de recuperación equivalentes siendo globalmente más eficiente QuEChERS (Calatayud-Vernich et al., 2016). Juan-Borrás, Domenech y Escriche (2016), realizaron y validaron mediante LC-MS/MS el análisis para 13 pesticidas distintos, incluyendo dos metabolitos del amitraz (2,4-dimetilanilina y 2,4-dimetilformamidina), obteniendo mayores porcentajes de recuperación, del rango de 70 a 120%, con un RSD inferior al 20% al igual que la mayoría de estudios comparados.

Finalmente, Gil et al. (2017) obtuvieron, de los 116 pesticidas analizados en cera de abeja, un porcentaje de recuperación para la mayoría de ellos dentro del rango de 60 a 128%, siendo para la mayoría de un 98%. Concluyeron que el método fue eficaz y sensible para monitorizar los residuos de pesticidas y sus productos de degradación en la cera. Con QuEChERS consiguieron evitar altas interferencias para la mayoría de los componentes lo que permite buena reproducibilidad.

## **6.2 Residuos de amitraz en las mieles analizadas**

Encontramos los resultados obtenidos con la cuantificación del residuo de amitraz en las muestras tras el todo el análisis en el cromatograma de la Figura 8.

En ninguna de las muestras obtenidas a partir de mieles aragonesas se ha detectado amitraz por encima del límite de detección de la técnica empleada.

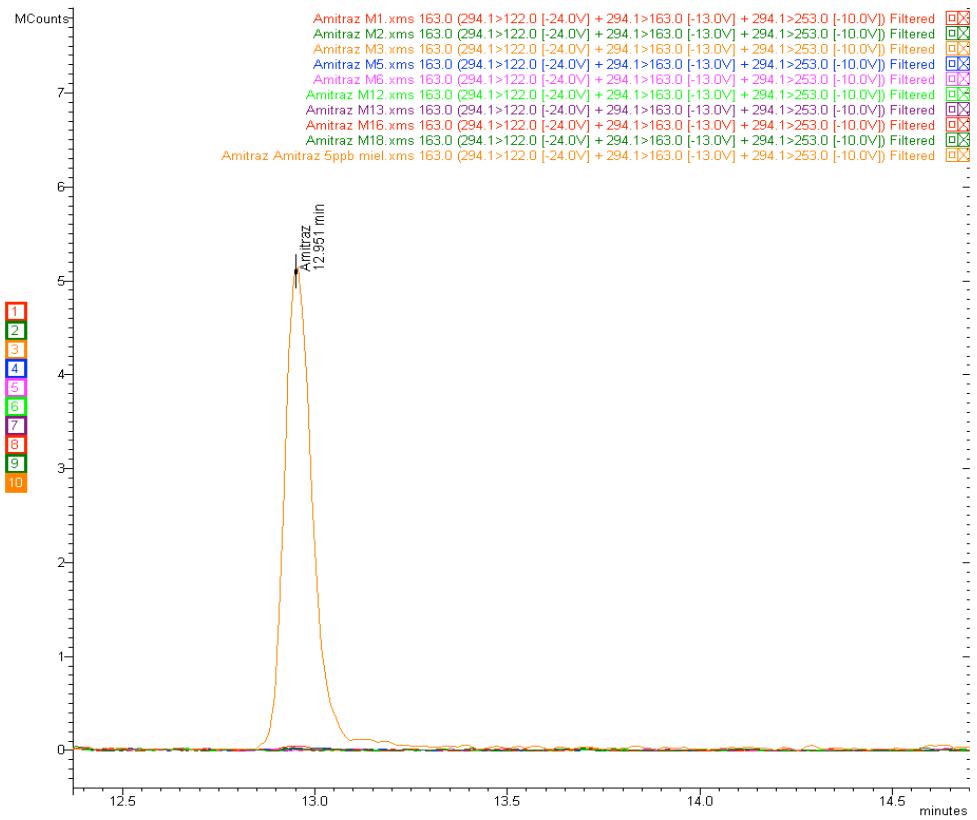


Figura 8. Cromatograma de algunas muestras analizadas y de una miel fortificada a 5 ppb

Souza et al. (2016) cuantificaron 116 pesticidas mediante QuEChERS seguido de UHPLC-MS/MS. Analizaron 100 muestras de distintas mieles y en tan solo una muestra detectaron un pesticida por encima de su LMR, el triclorfón, con 0,029 mg/kg siendo el LMR 0,01 mg/kg. El triclorfón es un insecticida organofosforado usado para controlar distintos tipos de parásitos.

También Zheng et al. (2018), usan QuEChERS seguido de LC-MS/MS para determinar simultáneamente una serie de pesticidas en miel, entre ellos el amitraz, al igual que en la determinación realizada en este estudio. Aquí es en 43 muestras de distintos orígenes botánicos y geográficos. Los analitos objetivo, cimiazol, fipronil, cumafós, fluvalinato, amitraz, y su metabolito, se extrajeron con éxito de la miel. No detectaron amitraz en ninguna de las muestras ya que se degrada rápidamente en sus metabolitos 2,4-dimetilanilina (DMF) y 2,4-dimetilformamidina (DMA), siendo estos 2 compuestos detectados en 37 de las muestras de miel, pero por debajo del límite de cuantificación

situado en 0,005 mg/kg, por lo tanto, presente en cantidades inferiores a los LMR establecidos.

Mediante extracción por QuEChERS seguido de detección por LC-MS/MS y GC-MS/MS, Lozano et al. (2018) detectaron residuos de pesticidas siempre por debajo de los LMRs establecidos para todos los productos apícolas analizados. Solo en un caso las muestras superaron los LMRs establecidos en la miel, cuantificaron el amitraz en valores superiores con 648 µg/kg, aunque de todos los productos apícolas analizados en este estudio señalan que el menos contaminado es la miel.

En el estudio de Gawel et al. (2019), evalúan en 155 muestras de miel de Polonia residuos de 207 pesticidas, incluyendo el amitraz entre ellos, mediante QuEChERS y LC-MS/MS y GC-MS/MS. En las muestras encontraron un total de 21 pesticidas entre los que se encuentran los metabolitos del amitraz, cumafós, tau-fluvalinato, tiacloprid y carbendacima, entre otros. En el 35% de las muestras de hecho, encontraron amitraz en forma de sus metabolitos incluso una de estas muestras superaba los LMRs hallando niveles de 0,6 mg/kg. Solo en un 15% de las muestras carecían en su totalidad de residuos de pesticidas. Lo más frecuente en el 77% de los casos es la presencia de neonicotinoides, tiacloprid o acetamiprid. En cuanto a la determinación del contenido de amitraz, la media de amitraz era de 0,061 mg/kg y de 0,024 mg/kg y 0,017 mg/kg para sus metabolitos DMF y N-2,4-dimetilfenil-N-metilformamidina (DMPF), respectivamente.

En otro estudio realizado sobre 35 muestras de otro producto apícola, la cera de abeja, el 86% de las muestras tenían residuos de 4 o más pesticidas. En 13 muestras encontraron una toxicidad elevada para las abejas siendo los principales responsables acrinatrina, flumetrina y clorpirifós. Señalaron que el amitraz era el único acaricida de los estudiados que es inestable en la cera de abeja y se degrada casi totalmente en un día en esa matriz. En cambio, encontraron cumafós en altos niveles en cera de abejas de España en el 100% de las muestras. El clorfenvinfos también lo detectaron en el 100% de las muestras analizadas con una concentración media de 1491 ng/g. Acrinatrina, que ya no está autorizado como tratamiento veterinario en la apicultura, se encontró con una frecuencia mayor al 80% en ciertos tipos de colmenas recicladas, lo que indica un uso irregular de este piretroide contra *Varroa*. A nivel de insecticidas, detectaron diclofentión, etión, carbendacima y azinfós-metilo (Calatayud-Vernich et al., 2017).

En otro estudio no encontraron residuos de pesticidas en miel excepto bajas cantidades de fluvalinato en algunos apiarios. En cambio, encontraron una gran variedad de pesticidas en la cera de esos mismos apiarios. Sí que encontraron amitraz en forma de DMP en las abejas de todos los apiarios de localizaciones distintas durante el invierno, proveniente de los tratamientos contra *Varroa* del otoño (Alburaki et al., 2018).

Juan-Borrás, Domenech y Escriche (2016) analizaron mediante LC-MS/MS muestras obtenidas a partir de 22 tipos distintos de mieles comerciales de origen español. En todas las muestras se detectó al menos un residuo de los once pesticidas que investigaron y tan solo en el 18% de las mismas detectaron únicamente un pesticida. El límite de cuantificación lo establecieron en 3 µg/kg y la presencia de residuos de pesticidas era detectable a partir de 1 µg/kg. En el 100% de las muestras detectaron amitraz o alguno de sus metabolitos con un valor medio de 12,4 µg/kg. En segundo lugar, detectaron cumafós en el 63% de las muestras en cantidad media de 4 µg/kg y acetamiprid en el 45% de las mismas. Señalaron en el estudio que, de todos los pesticidas detectados, el 94% se emplean para tratamientos veterinarios.

Los análisis confirmaron la presencia de casi 50 residuos de pesticidas en todas las muestras, que provenían de 50 muestras de cera de abeja de apiarios de toda España. Los residuos de insecticidas y acaricidas fueron el grupo de pesticidas que se encontró en valores más elevados de hasta 9,55 mg/kg. En Estados Unidos por ejemplo la concentración de tau-fluvalinato media es de 3,60 mg/kg y de cumafós 1,24 mg/kg, en Francia de 0,79 mg/kg. Los residuos detectados con mayor frecuencia son el tau-fluvalinato (100% muestras) a pesar de haberse dejado de utilizar por muchos productores cuando se empezaron a encontrar ácaros resistentes en toda Europa, cumafós (90%) y bromopropilato (70%), entre otros pesticidas pesticidas, siendo lo más frecuente la mezcla de tau-fluvalinato, clorfeninfos y cumafós en un 82% de las muestras. Llegaron a la conclusión de que la aparición de estos compuestos podría deberse a su uso frecuente por parte de los apicultores en los tratamientos de *Varroa*. Es difícil decir si su presencia en muestras de panales de cera representa una contaminación reciente o histórica porque estos productos químicos resisten la temperatura de fusión de la cera y, por lo tanto, pueden acumularse durante décadas (Gil et al., 2017).

## **7. CONCLUSIONES**

### **7.1 Conclusiones**

1. La revisión bibliográfica ha evidenciado la existencia de un número importante de estudios que demuestran la presencia de residuos de productos fitosanitarios y acaricidas en la miel, lo que plantea un problema de salud pública y requiere una vigilancia permanente.
2. La aplicación de la técnica QuEChERS en nuestro laboratorio ha conseguido los buenos porcentajes de recuperación (94-95%) que proporciona esta técnica y que cumple los requisitos establecidos por la Comisión Europea.
3. Las muestras de miel analizadas mediante la técnica QuEChERS seguida determinación cromatográfica (LC-MS/MS) ha revelado que ninguna de ellas presentaba residuos de amitraz por encima del límite de detección (0,01 mg/kg miel), cumpliendo por tanto con la legislación vigente en la Unión Europea en cuanto a límites máximos de residuos en este alimento.
4. Los resultados obtenidos demuestran la aplicación de unas buenas prácticas veterinarias por parte tanto de los apicultores como de los veterinarios responsables en la lucha frente a *Varroa*.
5. Los resultados obtenidos contribuyen a la evaluación del riesgo de la presencia de residuos de amitraz en miel. Las mieles analizadas presentan un bajo riesgo para la salud del consumidor en cuanto a este peligro. No obstante, son necesarias las medidas de vigilancia continua con objeto de controlar este riesgo.

## **7.2 Conclusions**

1. The bibliographic review has evinced the existence of important number of studies which prove the presence of phytosanitary residues and acaricides in honey, what set out a public safety problem and demand a permanent vigilance.
2. The implementation of QuEChERS technique in our laboratory has achieved the good recovery percentages (94 – 95%) that this technique provides and accomplishes the European Comission's requirements.
3. The analyzed honey samples through QuEChERS technique followed by chromatographic determination LC-MS/MS, has revealed that any of them counted with residues of amitraz over the detection limit (0,01 mg/kg honey), achieving therefore with the current legislation in the European Union with regard to maximum residue level in that food.
4. The obtained results prove the application of good veterinary practices by both beekeepers and veterinarians in charge of the fight against *Varroa*.
5. The obtained results contribute to the risk evaluation of the presence of residues of amitraz in honey. The analyzed honeys shows a low risk for consumer safety regarding this danger. Nevertheless, measures of constant vigilance are needed with the aim of controlling this risk.

## **8. VALORACIÓN PERSONAL**

El haber podido llevar a cabo la asignatura de “Trabajo de Fin de Grado” me ha permitido, hablando de una manera general; profundizar, desarrollar y mejorar habilidades de búsqueda de información a través de los motores de búsqueda especializados, acotando según interés. La mayoría de la bibliografía consultada han sido

estudios científicos en inglés lo que permite desarrollar mayor fluidez a la hora de leer e interpretar los mismos para futuras ocasiones.

Teniendo en cuenta específicamente el trabajo presente realizado sobre el análisis de residuos de amitraz en mieles aragonesas mediante la técnica QuEChERS, en primer lugar, me ha dado la oportunidad de investigar más en profundidad un alimento como es la miel, consumido a nivel mundial y sobre el que carecía de ciertos conocimientos en el ámbito de su procesado, seguridad e higiene.

Al investigar en el área de los pesticidas, he profundizado más sobre un tema en auge por la repercusión que tiene a nivel mundial, permitiéndome adquirir mayor conciencia de la problemática y la necesidad de investigación continua sobre el mismo.

En tercer lugar, al haber llevado a cabo un trabajo con una parte experimental, he podido mejorar en mis buenas prácticas y capacidades de trabajo en laboratorio de una manera independiente por lo que he desarrollado tanto personal como profesionalmente más confianza y experiencia. Además, la técnica empleada era bastante novedosa y desconocida para mí.

Como conclusión final, esta asignatura me ha permitido confluir conocimientos y habilidades varias adquiridas durante el grado, así como algunos nuevos, en los ámbitos de la higiene y seguridad alimentarias, legislación, bromatología, nutrición, tecnología alimentaria en el sector de la miel y química analítica. Por todo ello, es una asignatura que tanto a nivel académico como personal resulta gratificante.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. (2015). *¿Qué son los LMR?* Madrid: AECOSAN.
2. Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. (2018). Residuos de productos fitosanitarios. Disponible en: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/detalle/residuos\\_productos\\_fitosanitarios.htm](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/detalle/residuos_productos_fitosanitarios.htm) [Consultado 04/06/2019]
3. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. (2018). Listado de Medicamentos Veterinarios autorizados por la AEMPS para abejas. Disponible

- en: <https://www.aemps.gob.es/medicamentosVeterinarios/saludVeterinaria/Medabejas/home.htm> [Consultado 10/05/2019]
4. Alburaki, M., Chen, D., Skinner, J. A., William, G. M., Tarpy, D. R., Adamczyk, J. y Stewart, S. D. (2018). ‘Honey Bee Survival and Pathogen Prevalence: From the Perspective of Landscape and Exposure to Pesticides’. *Insects*, 9(65), pp. 1-15 doi: 10.3390/insects9020065.
  5. Annastasiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D. y Schenck, F. J. (2003). Fast and ‘Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce’. *Journal of AOAC International*, 86(2), pp. 412 - 431
  6. Base de Datos Española de Composición de Alimentos-BEDCA. (2019). Miel. Disponible en: <http://www.bedca.net/bdpub/index.php> [Consultado 10/05/2019].
  7. Bogdanov, S. (2018). ‘Honey Composition’. *The Honey Book*. Bee Product Science, pp. 27-36.
  8. Boncristiani, H., Underwood, R., Schwarz, R., Evans, J. D., Pettis, J. y vanEngelsdorp, D. (2012). ‘Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*’. *Journal of Insect Physiology*, 58(5), pp. 613–620. doi: 10.1016/j.jinsphys.2011.12.011.
  9. Calatayud-Vernich, P., Calatayud, F., Simó, E. y Picó, Y. (2016). ‘Efficiency of QuEChERS approach for determining 52 pesticide residues in honey and honey bees’, *MethodsX*. Elsevier B.V., 3, pp. 452–458. doi: 10.1016/j.mex.2016.05.005.
  10. Calatayud-Vernich, P., Calatayud, F., Simó, E. y Picó, Y. (2017). ‘Occurrence of pesticide residues in Spanish beeswax’. *Science of the Total Environment*, 605–606, pp. 745–754. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.06.174.
  11. Calatayud-Vernich, P., Calatayud, F., Simó, E. y Picó, Y. (2018). ‘Pesticide residues in honey bees, pollen and beeswax: Assessing beehive exposure’. *Environmental Pollution*, 241, pp. 106–114. doi: 10.1016/j.envpol.2018.05.062.
  12. De la Fuente, E., Ruiz-Matute, A. I., Valencia-Barrera, R. M., Sanz, J. y Martínez Castro, I. (2011). ‘Carbohydrate composition of Spanish unifloral honeys’, *Food Chemistry*, 129(4), pp. 1483–1489. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.05.121.
  13. Departamento de Agricultura, Ganadería y Medioambiente (2015) *Guía de Prácticas Correctas de Higiene para el sector de la miel*. Zaragoza: Gobierno de Aragón.

14. El Sohaimy, S. A., Masry, S. H. D. y Shehata, M. G. (2015). ‘Physicochemical characteristics of honey from different origins’. *Annals of Agricultural Sciences*, 60(2), pp. 279–287. doi: 10.1016/j.aoas.2015.10.015.
15. Gawel, M., Kiljanek, T., Niewiadowska, A., Semeniuk, S., Goliszek, M., Burek, O. y Posyniak, A. (2019). ‘Determination of neonicotinoids and 199 other pesticide residues in honey by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry’. *Food Chemistry*, 282, pp. 36–47. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.01.003.
16. Gil, M. D., Uclés, S., Lozano, A. B., Sosa, A. y Fernández-Alba, A. R. (2017). ‘Multiresidue method for trace pesticide analysis in honeybee wax comb by GC-QqQ-MS’. *Talanta*, 163, pp. 54–64. doi: 10.1016/j.talanta.2016.10.083.
17. Juan-Borrás, M., Domenech, E. y Escriche, I. (2016). ‘Mixture-risk-assessment of pesticide residues in retail polyfloral honey’. *Food Control*, 67, pp. 127-134. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.02.051
18. Kuan, A. C., DeGrandi-Hoffman, G., Curry, R. J., Garber, K. V., Kanarek, A. R., Snyder, M. N., Wolfe, K. L. y Purucker, S. T. (2018). ‘Sensitivity analyses for simulating pesticide impacts on honey bee colonies’. *Ecological Modelling*, 376, pp. 15–27. doi: 10.1016/j.ecolmodel.2018.02.010.
19. Kujawski, M. W., Barganska, Z., Marciniak, K. Miedzianowska, E., Kujawski, J. K., Słebioda, M. y Namiesnik, J. (2014). ‘Determining pesticide contamination in honey by LC-ESI-MS / MS - Comparison of pesticide recoveries of two liquid-liquid extraction based approaches’. *LWT-Food Science and Technology*, 56, pp. 517–523. doi: 10.1016/j.lwt.2013.11.024.
20. Lozano, A., Hernando, M. D., Uclés, S., Hakme, E., Fernández-Alba, A. R. (2018). ‘Identification and measurement of veterinary drug residues in beehive products’. *Food Chemistry*, 274, pp. 61-70. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.08.055
21. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2018a). *El sector apícola en cifras. Principales Indicadores Económicos*. Madrid: MAPA.
22. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2018b). *Informe de resultados del programa de vigilancia 2016-2017 sobre las pérdidas de colonias de abejas*. Madrid: MAPA.
23. Missio da Silva, P., Gauche, C., Valdemiro Gonzaga, L., Oliveira Costa, A. C. y Fett, R. (2016). ‘Honey : Chemical composition , stability and authenticity’. *Food Chemistry*, 196, pp. 309–323. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.09.051.

24. Souza, P. A., Da Silva, F. A., Corrêa, E. N., Silva. G., De Abreu, M. B. y Fernandes, C. (2016) ‘Multiclass method for pesticides quantification in honey by means of modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS’. *Food Chemistry*, 211, pp. 130–139. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.05.036.
25. Zheng, W., Park, J., Abd El-Aty, A. M., Kim, S., Cho, S., Choi, J., Yi, H., Cho, S., Ramadan, A., Jeong, J. H., Shim, J. y Shin, H. (2018). ‘Development and validation of modified QuEChERS method coupled with LC – MS / MS for simultaneous determination of cymiazole, fipronil, coumaphos, fluvalinate, amitraz, and its metabolite in various types of honey and royal jelly’. *Journal of Chromatography B*, 1072, pp. 60–69. doi: 10.1016/j.jchromb.2017.11.011.

## 9.1 Legislación

### Legislación comunitaria

1. Reglamento de ejecución (UE) 2018/470 de la Comisión de 21 de marzo de 2018 que establece normas detalladas sobre el límite máximo de residuos a tener en cuenta a efectos de control de alimentos derivados de animales tratados en la UE según lo dispuesto en el artículo 11 de la Directiva 2001/82/CE. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L79, de 22 de marzo de 2018.
2. Reglamento (UE) 2017/623 de la Comisión de 30 de marzo de 2017 que modifica los anexos II y III del Reglamento (CE) n.o 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos del acequinocilo, el amitraz, el cumafós, el diflufenicán, la flumequina, la metribuzina, la permetrina, la piraclostrobina y la estreptomicina en determinados productos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L93, de 6 de abril de 2017.
3. 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. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L15, de 20 de enero de 2010.
4. 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. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L70, de 16 de marzo de 2005.

### **Legislación estatal**

5. 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. *Boletín Oficial del Estado*, n. 131, de 2 de junio de 2006.
6. Real Decreto 1049/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Norma de calidad relativa a la miel. *Boletín Oficial del Estado*, n. 186, de 5 de agosto de 2003.

### **Legislación autonómica**

7. Orden de 28 de febrero de 2007, del Departamento de Agricultura y Alimentación, por la que se establece el período de tratamiento frente a la varroosis en la Comunidad Autónoma de Aragón. *Boletín Oficial de Aragón*, n. 29, de 9 de marzo de 2007.