



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Evaluación de residuos de plaguicidas y metales tóxicos en miel de abejas producida en zonas de cultivos de fresa y cítricos**

**Adriana Mireya Zamudio Sánchez**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Agrarias  
Bogotá, Colombia  
2017

# **Evaluación de residuos de plaguicidas y metales tóxicos en miel de abejas producida en zonas de cultivos de fresa y cítricos**

**Adriana Mireya Zamudio Sánchez**

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

Director (a):

PhD., Amanda Consuelo Díaz Moreno

Línea de Investigación:

Calidad de los Alimentos

Grupo de Investigación:

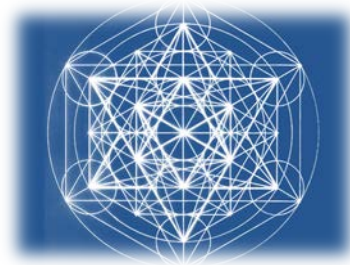
BIOALIMENTOS

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá, Colombia

2017



*«La ciencia no es perfecta, ... no es más que una herramienta, pero es la mejor herramienta que tenemos, se corrige a sí misma, esta siempre evolucionando y se puede aplicar a todo. Con esta herramienta conquistamos lo imposible»*

CARL SAGAN



## Agradecimientos

*Una vez finalizado este trabajo, miro en retrospectiva y simplemente aparece una sonrisa en mi rostro de inmenso agradecimiento para todos y cada uno de ustedes, quienes con su participación, aporte de ideas, conocimiento, amistad y fe en mi, hicieron posible que hoy en día culmine esta etapa profesional y de crecimiento personal, plena de gratos recuerdos, conocimientos y sobre todo de nuevas herramientas para compartir.*

*No cabe duda que este trabajo es el fruto de un equipo de trabajo generoso, al cual deseo presentarles mi sincero reconocimiento y gratitud. Agradezco a la Universidad Nacional de Colombia y su equipo de profesores y compañeros por sus valiosas enseñanzas y aportes. A la Universidad Jorge Tadeo Lozano, por todo su apoyo en el desarrollo de este trabajo, en cabeza de los Directores del Centro de Bio-Sistemas Dr. Oscar Duarte y Dra. Luz Stella Fuentes.*

*Agradezco de manera especial a la Profesora Consuelo Díaz, mi Directora de tesis, por su constante orientación, colaboración y comprensión, más allá de lo que estaba en su labor diaria y con quien he aprendido hermosas lecciones de vida.*

*De igual manera, agradezco al Dr. Rodrigo Vásquez Romero de CORPOICA por hacerme partícipe de su importante trabajo en el estudio de las abejas, la polinización y por el aporte de las muestras objeto de este trabajo.*

*Gracias a toda mi familia, por alentarme día a día y sembrar en mi la constancia, fe y fortaleza, que me han permitido crecer ante cada barrera y no encontrar hasta el momento límites en lo que la vida me ha propuesto para avanzar y ser mejor ser humano.*

*A mi compañera de Maestría Edith Castro, gracias por todo, y por ser un importante apoyo en este transcurrir académico. Ha sido muy enriquecedor este camino juntas.*

*A mi amigo Diego A Ahumada, gracias por su apoyo incondicional y generosidad al compartir su experiencia y conocimientos; por ser el pilar al que acudo siempre, con la seguridad de alcanzar nuevos horizontes.*

***Adriana Zamudio S.***

## Resumen

Las abejas debido a su actividad de pecoreo pueden ser utilizadas para diagnosticar la contaminación ambiental de su entorno. En este estudio se desarrollaron y validaron las metodologías para medir plaguicidas por UFLC/MS y metales tóxicos mediante digestión por microondas y cuantificación por absorción atómica de llama, de acuerdo con los requisitos internacionales para la evaluación de estos contaminantes. Fueron colectadas 62 muestras de miel de abejas en apiarios ubicados en cultivos de cítricos y fresa con polinización inducida de los departamentos de Cundinamarca y Meta, con el fin de evaluar el grado de contaminación ambiental por la presencia de plaguicidas y metales tóxicos.

Como resultado, se encontraron los plaguicidas dimetomorf, tebuconazol, pirimicarb, metalaxilo y carbofuran, en el 22.7% de las muestras de miel, en concentraciones inferiores al Límite de Detección y la presencia de Cd, Pb, Cu y Zn, por debajo de los LMR disponibles; no obstante, se detectó un contenido promedio de Hg (0,22 mg/kg para cítricos y 0,25 mg/kg en fresa) en niveles superiores a los límites máximos permitidos (0,05 mg/kg), lo que genera una alerta sobre el peligro de contaminación ambiental en la zona de estudio por los riesgos a la salud de los consumidores y el efecto negativo para las abejas.

Se destaca la sensibilidad de las abejas frente a los metales tóxicos debido al efecto de acumulación de estos elementos en el ambiente y su capacidad de transferirlos a la miel, mientras que para los plaguicidas su detección es menor, posiblemente debido a su proceso de degradación.

**Palabras clave:** UFLC/MS, bioindicador, contaminantes, abejas, inocuidad, microondas

## Abstract

The bees due to their foraging activity can be used to research about the environmental contamination of the surroundings. In this study, new methodologies was performed for determination of toxic metals by microwave digestion and quantification by flame atomic absorption, and pesticides by UFLC / MS. These methods were developed and validated in accordance with the international requirements for the evaluation of these contaminants. Sixty two samples of bee honey were collected in apiaries established for direct pollination in strawberry and citrus crops at departments of Cundinamarca and Meta, in order to evaluate the degree of environmental contamination due to the presence of pesticides and toxic metals.

As a result, the pesticides dimetomorph, tebuconazole, pirimicarb, metalaxyl and carbofuran were found in 22,7% of samples of honey at concentrations below LD. The presence of Cd, Pb, Cu and Zn, were below MRLs available; However, a high Hg content (0,22 mg/kg for citrus and 0,25 mg/kg for strawberry) was detected at levels above the MRL (0,050 mg/kg), which generates a warns about the danger of environmental contamination in the area by the risks to the health of the consumers and the negative effect on the bees.

The sensitivity of bees to toxic metals is highlighted due to their accumulation effect on the environment and their ability to transfer them to honey, whereas for pesticides their detection is lower, possibly due to their degradation process.

**Keywords:** UFLC / MS, bioindicator, contaminants, bees, inocuity, microwave

# Contenido

	<b>Resumen</b>	<b>VII</b>
<b>Lista de figuras.....</b>		<b>XI</b>
<b>Lista de tablas .....</b>		<b>XII</b>
<b>Lista de símbolos y abreviaturas .....</b>		<b>XIV</b>
<b>Introducción .....</b>		<b>16</b>
<b>1. Capítulo 1: Miel de abejas como un indicador medioambiental en cultivos de fresa y cítricos polinizados con <i>Apis mellifera</i> .....</b>		<b>20</b>
1.1 Apicultura en Colombia .....		20
1.2 Importancia de la polinización en la producción agrícola.....		21
1.2.1 Efecto polinizador de las abejas sobre cultivos frutales .....		24
1.2.1.1 Polinización en cultivos de fresa .....		26
1.2.1.2 Polinización en cítricos .....		27
1.3 Miel de abejas como indicador ambiental.....		29
1.4 Inocuidad química de la miel de abejas.....		31
1.5 Uso de plaguicidas en cultivos y sus efectos en la apicultura.....		32
1.5.1 Valores de referencia de plaguicidas en miel de abejas.....		41
1.5.2 Determinación analítica de plaguicidas.....		43
1.6 Metales tóxicos en miel de abejas.....		46
1.6.1 Valores de referencia de metales tóxicos en miel de abejas.....		48
1.6.2 Determinación analítica de metales tóxicos .....		49
<b>2. Capítulo 2: Desarrollo, validación y evaluación de residuos de plaguicidas en muestras de miel de abejas procedentes de zonas de cultivos polinizados de fresa y cítricos</b>		<b>53</b>
2.1 Introducción.....		53
2.2 Técnica analítica para determinación de residuos de plaguicidas .....		54
2.3 Muestreo .....		57
2.4 Materiales y métodos .....		61
2.5 Instrumentos y equipos .....		63
2.6 Resultados y discusión.....		65
2.6.1 Estudio de la relación cantidad de muestra / solvente de extracción.....		65
2.6.2 Selección del sistema de amortiguación de pH.....		66
2.6.3 Adición de las sales .....		68
2.6.4 pH de disolución amortiguadora .....		70
2.6.5 Adsorbentes de limpieza.....		72
2.6.6 Validación del sistema de medición .....		75
2.6.7 Evaluación de residuos de plaguicidas en las mieles en estudio .....		80

2.7	Conclusiones .....	91
<b>3.</b>	<b>Capítulo 3: Desarrollo, validación y evaluación de metales tóxicos en muestras de miel de abejas procedentes de zonas de cultivos polinizados de fresa y cítricos</b>	<b>93</b>
3.1	Introducción.....	93
3.2	Muestreo .....	94
3.2	Materiales y métodos.....	95
3.2.1	Material de referencia, reactivos y soluciones .....	95
3.2.3	Instrumentos y equipos .....	95
3.3	Desarrollo metodológico y variables estandarizadas.....	96
3.3.1	Validación.....	97
3.4	Resultados y discusión .....	98
3.4.1	Muestras de miel de abejas.....	98
3.4.2	Relación de mezcla de digestión .....	98
3.4.3	Volumen y concentración de la muestra .....	100
3.4.4	Validación del método .....	101
3.5	Evaluación de metales tóxicos en miel de abejas .....	104
3.5.1	Cadmio.....	104
3.5.2	Cobre .....	105
3.5.3	Plomo.....	107
3.5.4	Cinc.....	108
3.5.5	Mercurio .....	109
3.6	Conclusiones .....	111
<b>4.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>113</b>
4.1	Conclusiones .....	113
4.2	Recomendaciones .....	114

**Bibliografía 115**

## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 2-1.</b> Comparación de los porcentajes de recuperación al emplear acetato o citrato como sal de control de pH y otros compuestos con interferencias.....	67
<b>Figura 2-2.</b> Comparación del modo de adición de las sales de citrato para el control del pH en la extracción de plaguicidas en miel.....	68
<b>Figura 2-3.</b> Porcentajes de recuperación promedio (%R), número de compuestos con %R inferiores a 70% y con coeficientes de variación (%CV) mayores al 15 % para los diferentes valores de pH evaluados.....	71
<b>Figura 2-4.</b> Esquema general del método desarrollado para el análisis de residuos de plaguicidas en miel a través de UFLC-MS.....	75
<b>Figura 2-5 A y B.</b> Cromatogramas de plaguicidas detectados en mieles de cultivos de fresa, cromatograma del blanco de matriz y el nivel 1 de la curva de calibración. ....	85
<b>Figura 2-6. A, B y C.</b> Cromatogramas de plaguicidas detectados en mieles de cultivos de cítricos polinizados de cítricos, cromatograma del blanco de matriz y el nivel 1 de la curva de calibración. ....	91
<b>Figura 3-1.</b> Diagrama de metodología desarrollada para digestión de miel de abejas vía microondas.....	101
<b>Figura 3-2.</b> Relación de LMR y LC para Cd, Cu, Pb, Zn y Hg. ....	103

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1-1:</b> Contaminantes que afectan la calidad de la miel de abejas.....	31
<b>Tabla 1-2:</b> Plaguicidas neonicotinoides y sus efectos en abejas según la dosis. ....	37
<b>Tabla 1-3:</b> Uso de plaguicidas autorizados por el ICA en 2016 para fresa y cítricos. ....	38
<b>Tabla 1-4:</b> Tratamiento químico contra enfermedades o plagas en cultivo de cítricos ....	39
<b>Tabla 1-5:</b> Tratamiento químico contra parásitos en fresa. ....	40
<b>Tabla 1-6:</b> Tratamiento químico recomendado contra enfermedades en fresa .....	41
<b>Tabla 1-7:</b> LMR de plaguicidas en miel de abejas en la Unión Europea. ....	43
<b>Tabla 1-8:</b> Valores de referencia para metales tóxicos en miel de abejas.....	49
<b>Tabla 2-1.</b> Características del muestreo de mieles de cultivos de cítricos y fresa y selección de muestras para evaluación de contaminates.....	58
<b>Tabla 2-10.</b> Determinación de residuos de plaguicidas en miel de abejas proveniente de cultivo de cítricos polinizado con abejas.....	85
<b>Tabla 3-1.</b> Soluciones de las curvas de calibración empleadas para establecer LD y LC instrumental. ....	95
<b>Tabla 3-2.</b> Descripción del programa de microondas para digestión de las muestras de miel.....	95
<b>Tabla 3-3.</b> Datos analíticos para establecer la relación $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$ en plomo y cadmio. ....	99
<b>Tabla 3-4.</b> Datos analíticos para establecer la relación $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$ en Cobre y Cinc.....	99
<b>Tabla 3-5.</b> Parámetros de validación .....	102
<b>Tabla 3-6.</b> Evaluación de la linealidad del método. ....	102
<b>Tabla 3-8.</b> Cuantificación de Zn en muestras de miel de abejas provenientes de cultivos polinizados de de fresa y cítricos (mg/kg) .....	108



## Lista de símbolos y abreviaturas

ABREVIATURA	TÉRMINO
$\mu$	Microgramo
kg	Kilogramo
L	Litro
mL	Militro
mg	Miligramo
V	Voltio
Cd	Cadmio
Cu	Cobre
Hg	Mercurio
Pb	Plomo
Zn	Cinc
v/v	Relación volumen/volumen
$\lambda$	Longitud de onda
A.A.	Absorción atómica
<i>DDT</i>	Diclorodifeniltricloroetano
<i>ESI</i>	Ionización por Electro Espray
<i>ETAAS</i>	Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry
<i>FAAS</i>	Flame Atomic Absorption Spectrometry
<i>FAO</i>	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<i>FOES</i>	Flame Optical Emission Spectrometry
<i>ICA</i>	Instituto Colombiano Agropecuario
<i>ICP-OE</i>	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry
<i>ICTA</i>	Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos
<i>IFAS</i>	Instituto de Ciencias de Alimentación y Agricultura
<i>INVIMA</i>	Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos
<i>IVIA</i>	Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias
<i>HCH</i>	Hexaclorociclohexano
<i>LC</i>	Límite de Cuantificación
<i>LD</i>	Límite de Detección
<i>LMR</i>	Límite Máximo de Residuos
<i>NTC</i>	Norma Técnica Colombiana
<i>OC</i>	Organoclorados

---

<i>OMS</i>	Organización Mundial de la Salud
<i>OP</i>	Organofosforados
<i>PCB</i>	Policlorobifenilos
<i>pH</i>	Potencial de hidrógeno
<i>PSA</i>	Amina Primaria Secundaria
<i>PTFE</i>	Politetrafluoroetileno
<i>QUECHERS</i>	Rápido, Fácil, Barato, Efectivo, Robusto
<i>TBP</i>	Tributilfosfato
<i>TPP</i>	Trifenilfosfato
<i>UFLC/MS</i>	Cromatografía líquida ultrarápida con detector de masas
<i>USDA</i>	Departamento de Agricultura de Estados Unidos

# Introducción

El sector apícola enfrenta importantes retos productivos, causados por el efecto antrópico en los ecosistemas y el cambio climático. Hoy en día son necesarias políticas que visualicen este sector como fundamental al diseñar las estrategias de desarrollo agropecuario, ambiental, comercial, educativo y social. El vínculo de la apicultura y el desarrollo de los ecosistemas a nivel agrícola y pecuario, adicionalmente a los objetivos que persigue la producción de alimentos en cantidad, calidad, inocuidad, trazabilidad y sostenibilidad, es imprescindible para alcanzar la seguridad y soberanía alimentaria que requiere el país. En este contexto, el sector apícola tiene función protagónica en la polinización, en el valor nutricional de sus productos y en la sustentabilidad de la producción agrícola, por cuanto en la medida que se incrementa, mayor beneficio ambiental, económico y social aportará (Verde, 2014).

Gracias a la polinización entomófila, aproximadamente un tercio de los cultivos y la mayor parte de la flora silvestre permiten mantener la biodiversidad. Se calcula que en los últimos años la polinización ha representado un beneficio económico global alrededor de los 265 mil millones de euros, correspondientes al precio de las cosechas que dependen de la polinización natural, se estima que sin esta herramienta se bajaría la productividad agrícola hasta en un 75% (Greenpeace, 2013).

En el campo de la agricultura de cultivos en frutales y hortalizas, los beneficios económicos por la apicultura son de gran valor, dado que gracias a los procesos de polinización que realizan las abejas en estos cultivos, la producción se incrementa en cantidad y calidad dependiendo del tipo de cultivo polinizado. Este beneficio contribuye a mejorar la producción, lo que representa a su vez, una mejor comercialización de dichos productos.

Hoy en día existe un interés renovado en ayudar a la naturaleza a proporcionar servicios ecosistémicos de polinización, acompañada de iniciativas que conduzcan al empleo de las mejores prácticas de gestión agrícola y favorezcan la polinización silvestre, tales como la plantación de cercas vivas, el fomento de la diversidad vegetal, el empleo de compostaje orgánico o el uso prudente o reducido de plaguicidas (Pantoja, Smith-Pardo, García, Sáenz, & Rojas, 2014). Se destaca a los polinizadores como fuente vital para la producción hortícola y de forraje, así como para la producción de semillas de numerosos cultivos de raíces y fibras.

En nuestro país la polinización inducida es una técnica que se ha venido incrementando como medida de producción, hasta el punto de encontrar cosechas que dependen en gran parte del trabajo de las abejas (Silva, Arcos, & Gómez, 2005). Este es el caso de la fresa, la cual por presentar flores hermafroditas debe ser polinizada por acciones combinadas de la gravedad y el viento para generar el máximo tamaño posible de fruta. Sin embargo, numerosos estudios muestran que el rendimiento, tamaño y forma de fruta fresa depende de la adecuada polinización de sus flores por diversos insectos (Zaitoun, Al\_Ghzawi, Shannag, & Al-Tawaha, 2006).

Desafortunadamente, durante este proceso, microorganismos, sustancias químicas y partículas en el aire son interceptados por las abejas y se retienen en la superficie de su cuerpo o las inhalan. Es por ello, que las abejas y los productos de la colmena son utilizados como bioindicadores para el monitoreo ambiental, en especial de factores biológicos, químicos y antropogénicos, tales como plagas, contaminación de origen industrial/urbano y/o prácticas agrícolas (Rissato, Galhiane, do RN. Knoll, de Andrade, & de Almeida, 2006).

En Colombia la producción a partir de las abejas incluye los productos miel, polen y propóleos y en menor escala jalea real, apitoxina y miel de abejas sin aguijón. Esta producción se caracteriza por concentrarse en organizaciones de apicultores que actualmente se proyectan hacia el mercado internacional mediante la exportación de aproximadamente 2000 toneladas métricas por año, lo que representa el 0,1% de la producción mundial total (Laverde, Egea, Rodríguez, & Peña, 2010).

Para la comercialización de la miel en el mercado europeo, norteamericano y asiático, es necesario dar cumplimiento a la normatividad internacional de organismos reguladores como el Codex Alimentarius - FAO-OMS y la Comunidad Europea, encargados de garantizar la inocuidad química y biológica de los productos apícolas. La calidad y el origen de la miel de abejas son los principales factores para determinar el precio de comercialización (Laverde et al., 2010).

Este proyecto plantea la el desarrollo y validación de metodologías de análisis y evaluación de plaguicidas y metales tóxicos de muestras de miel de abejas provenientes de cultivos de fresa y cítricos polinizados con abejas *Apis mellífera*, con el fin de contar con herramientas analíticas para evaluar las prácticas de manejo de estos cultivos y el entorno ambiental.

Con el estudio de la inocuidad química de las mieles y el desarrollo de nuevas metodologías en el país para detección de plaguicidas mediante técnicas cromatográficas (UFLC/MS) y detección de metales tóxicos por digestión vía microondas y cuantificación por espectrofotometría de absorción atómica, este trabajo contribuye con el aporte de métodos analíticos confiables para el control de la inocuidad química de productos apícolas y ofrece al sector apícola alternativas para verificar los requisitos de calidad del producto con proyección en mercados externos.

Los objetivos del trabajo fueron los siguientes:

- **General**

Evaluar la presencia de residuos de plaguicidas y metales tóxicos en muestras de miel de abejas producidas en zonas de cultivos de fresa y cítricos.

- **Específicos**

Estandarizar y validar metodologías analíticas para determinar residuos de plaguicidas por cromatografía UFLC/MS y metales tóxicos por digestión vía microondas y cuantificación espectrofotométrica, en muestras de miel de abejas producidas en zonas de cultivos de fresa y cítricos.

Determinar la presencia de residuos de plaguicidas y metales tóxicos en muestras de miel de abejas producidas en zonas de cultivos de fresa y cítricos.

# **1. Capítulo 1: Miel de abejas como un indicador medioambiental en cultivos de fresa y cítricos polinizados con *Apis mellifera***

## **1.1 Apicultura en Colombia**

Debido a la variedad de clima y biodiversidad, Colombia presenta una importante aptitud para el desarrollo de la apicultura, sin embargo, la producción nacional de miel se destina principalmente al consumo interno y esporádicamente se exporta en pequeñas cantidades; en los últimos 10 años las exportaciones se reportan con destino a Ecuador, Venezuela y Estados Unidos (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2011).

El Consejo Nacional de la Cadena de las Abejas y la Apicultura en 2015, estima la existencia de alrededor de 96.000 colmenas y 2.400 apicultores, produciendo un rendimiento de miel de abejas alrededor de 32 kg/colmena, con una producción anual de 3.000 toneladas /año. Esta entidad a futuro estima que el potencial es de 1´000.000 de toneladas, teniendo en cuenta la diversidad de suelos, clima y flora adecuados para la producción apícola, aspectos de interés para impulsar esta actividad económica (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2015).

La miel de abejas se produce principalmente en la Costa Caribe (40 kg colmena/año), región en la que se obtienen los mayores rendimientos, por su parte, las mieles de la región andina son reconocidas por su composición, cualidades sensoriales y actividad biológica, con una producción promedio de 15 kg colmena/año (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2015). Cabe resaltar que en los últimos años se viene observando un incremento en el número de colmenas en departamentos como Antioquia y Magdalena y en la región Orinoquía, el cual obedece a proyectos recientes relacionados

principalmente con procesos de sustitución de cultivos ilícitos y disminución del impacto ambiental por minería y otras actividades (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2015).

El servicio de polinización en Colombia aún no es un rubro representativo de la producción nacional, sin embargo ya se registran experiencias en polinización de melón, cítricos, fresa y aguacate; la riqueza en polinizadores nativos hace que no sea percibido dentro del sector agrícola como una necesidad (a diferencia de otros países en donde se han extinguido las poblaciones naturales), sin embargo, estudios recientes realizados por CORPOICA, demuestran que el uso de abejas *Apis mellifera* en determinados cultivos incrementa la productividad de los mismos (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2015).

En la apicultura colombiana, la abeja *Apis mellefera* se destaca por su alta actividad polinizadora como abeja doméstica, siendo ésta un híbrido entre abejas alemanas (*Apis mellifera*) e italianas (*Apis mellifera ligustica*), caucasianas (*Apis mellifera caucasica*) y africanas (*Apis mellifera scutellata*). Debido a que estas abejas híbridas presentan características similares a las africanas, han sido denominadas como abejas africanizadas (Mantilla Cortés, 1997).

## **1.2 Importancia de la polinización en la producción agrícola**

La producción apícola es un servicio ecosistémico y cultural, con importante influencia en la seguridad alimentaria, por intermedio de la polinización de los cultivos se favorece de manera directa el rendimiento de la producción agrícola y la conservación del medio ambiente. Aproximadamente un tercio de los cultivos como nueces, frutas, vegetales y la mayor parte de la flora silvestre (hasta un 90%) precisa de la polinización para reproducirse y dependen de los insectos polinizadores (Greenpeace, 2013).

Debido a la polinización, se considera la apicultura como una estrategia importante para mantener la producción de los cultivos frutales y mejorar la calidad del fruto. Entre las ventajas de la polinización están el logro de un mayor rendimiento, calidad con respecto a atributos de tamaño y características fisicoquímicas como la intensidad del color y el dulzor del fruto.

La diversidad de productos generados por la explotación apícola, la contribución de las abejas como agentes polinizadores a la sostenibilidad de los sistemas de producción agrícola y la alta demanda de las industrias, hacen de la apicultura una alternativa de producción animal con especial interés para el fortalecimiento y diversificación del sector agropecuario colombiano.

Cerca del 78% de las especies de plantas con flor en climas templados y del 94% en climas tropicales se favorecen del proceso de la polinización entomófila, lo que equivale a más del 87% de todas las especies de angiospermas conocidas (Chautá-Mellizo, Campbell, Bonilla, Thaler, & Poveda, 2012; Klein et al., 2007).

En cultivos tropicales, el 70% de las 1.330 especies cultivadas se ve favorecido por estos polinizadores (Chautá-Mellizo et al., 2012). Mundialmente, el 87% de las especies cultivadas, que representan un 35% del suministro global de alimentos, se ven beneficiadas por este proceso (Hoehn, Tschardtke, Tylianakis, & Steffan-Dewenter, 2008; Klatt et al., 2014; Mallinger & Gratton, 2015), traducándose estos datos en un valor económico de la polinización que asciende a más de 153 billones de euros (Ricou, Schneller, Amiaud, Plantureux, & Bockstaller, 2014; Vilhena, Rabelo, Bastos, & Augusto, 2012). Sin esta herramienta de la naturaleza bajaría la productividad agrícola hasta en un 75%.

En el campo de la agricultura de cultivos en frutales y hortalizas, los beneficios económicos por la apicultura son de gran valor, dado que gracias a los procesos de polinización entomófila que realizan las abejas en estos cultivos, la producción se incrementa en cantidad y calidad dependiendo del tipo de cultivo polinizado. Este beneficio contribuye a mejorar la producción, lo que representa a su vez, una mejor comercialización de dichos productos.

Sin embargo, cuando el cultivo a polinizar presenta dificultades, como por ejemplo una época temprana de floración, problemas de incompatibilidad de los polinizadores, cantidad, distribución o cualquier otro factor que influye negativamente en la polinización del cultivo, es conveniente aumentar la cantidad de colmenas por hectárea, ya que es la manera más segura de incrementar la cantidad de abejas en las flores y por lo tanto de una polinización más efectiva. Otro factor que afecta la polinización efectiva sucede cuando hay presencia de otras plantas como las malezas que son atractivas para las

abejas, por lo que es necesario aumentar la cantidad de colmenas para compensar las abejas que no están polinizando las flores deseadas del cultivo (Avellaneda Barbosa, 2009).

Por esta razón surge la polinización dirigida, consistente en el desarrollo y aplicación de diferentes tratamientos en los que se impregna la colmena o la abeja con polen de la flor objetivo de polinización, acompañado en algunos casos de jarabe de azúcar; esto crea un mecanismo de fidelización de la abeja por la flor, lo cual no solo permite guiar a las abejas *Apis mellifera* hacia cultivos que se desean polinizar, sino que también busca incentivar a las abejas para que sus visitas a las flores no tan atractivas se incrementen, o sí las flores son visitadas hacerlas aún más atractivas y predilectas (Avellaneda Barbosa, 2009). En nuestro país, la polinización dirigida es una técnica que se ha venido incrementando como medida de producción hasta el punto de encontrar cosechas que dependen en gran parte del trabajo de las abejas (Silva et al., 2005). En este sentido, Vásquez et al., (2011) concuerda al establecer en su estudio de polinización dirigida en Colombia, que las abejas *Apis mellifera* produjeron incrementos en la producción frutal de  $74,5 \pm 20,2$  kg durante el período sin abejas a  $151,3 \pm 25,5$  kg una vez adaptadas las colonias; ello se origina en el aumento del número de frutas por planta (61,1%) que representa además un incremento económico (Vásquez Romero et al., 2011).

La diversidad de productos generados por la explotación apícola, la contribución de las abejas como agentes polinizadores a la sostenibilidad de los sistemas de producción agrícola y la alta demanda de las industrias, hacen de la apicultura una alternativa de producción animal con especial interés para el fortalecimiento y diversificación del sector agropecuario colombiano.

Es importante tener en cuenta que para realizar este proceso de polinización, cada día entre 10.000 y 25.000 abejas obreras hacen un promedio de 10 viajes para explorar un área de aproximada de 7 km en los alrededores de su hábitat, para la recolección de néctar, polen y agua de las flores (Vásquez, Ballesteros, Ortegón, & Castro, 2006). Durante este proceso, varios microorganismos, sustancias químicas y partículas en el aire son interceptados por las abejas y se retienen en la superficie de su cuerpo o son inhaladas permaneciendo en su tracto respiratorio. Debido a estos factores, las abejas y los productos de la colmena como la miel, pueden ser utilizados como bioindicadores para el monitoreo del impacto ambiental causado por factores biológicos, químicos y

físicos, tales como las plagas, la contaminación de origen industrial o plaguicidas (Rissato et al., 2006).

### **1.2.1 Efecto polinizador de las abejas sobre cultivos frutales**

Las abejas realizan un aporte importante a la productividad de muchos cultivos agrícolas por medio de la polinización, el 75% de los principales cultivos a nivel mundial requieren de un polinizador para incrementar la producción, así como las características físicas y organolépticas de la fruta, lo cual se refleja en los rendimientos por hectárea y en el retorno económico del cultivo. (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2011). Por esta razón, internacionalmente, las prácticas apícolas son apreciadas como instrumentos valiosos para recuperar, estabilizar y conservar los ecosistemas (Laverde et al., 2010).

La eficiencia polinizadora de cualquier visitante floral está estrechamente relacionado con la biología floral de la planta y el comportamiento de pecoreo del animal. Durante millones de años las flores desarrollaron mecanismos con pétalos de colores, olores y recompensas de néctar, polen, esencias y aceites para atraer otros organismos y obtener la polinización, este grado de especialización de la naturaleza implica que para que una especie animal cualquiera pueda ser catalogada como buen polinizador, tiene que cumplir ciertos requisitos como: a) Ser atraída en forma natural por las flores de esa especie, b) Ser fiel a la especie, c) Poseer el tamaño y comportamiento adecuados para remover el polen de los estambres y depositarlos en los estigmas, d) Transportar en su cuerpo grandes cantidades de polen viable y compatible y e) Visitar las flores cuando los estigmas tengan buena receptividad y antes del inicio de la degeneración de los óvulos (Nates Parra, 2005).

Las abejas y en especial la abeja *Apis mellifera*, cumplen con estos requisitos debido a que son atraídas naturalmente a las flores por sus colores y olores y muchas de ellas mantienen su constancia floral. En su anatomía, estos insectos son de tamaños variables y con adaptaciones morfológicas como presencia de corbículas y pelos plumosos o ramificados en diferentes partes del cuerpo. Además exhiben comportamiento de pecoreo por zumbido: las abejas utilizan los músculos indirectos del vuelo, localizados en el tórax, para hacer vibrar su cuerpo y de esta manera transmitir el movimiento a las anteras de plantas que expulsan el polen a través de un poro apical, lo que les permite estar en contacto con el polen, removerlo y traspasarlo de una flor a otra, facilitando de

esta manera el proceso de la polinización. Su eficiencia también se explica por su capacidad para comunicar la ubicación de los recursos florales a sus compañeras de nido. Viajan hasta un promedio de 4,5 km en áreas de forraje (Vanengelsdorp, 2010). Se afirma que el porcentaje de polinización decrece cuando se incrementa la distancia de la fuente de polen (Vásquez et al., 2006).

La actividad polinizadora está estrechamente relacionada con el grado de organización de la especie que realiza esta actividad. Se conoce que para lograr una óptima polinización se necesitan de 2 a 10 colmenas por hectárea, dependiendo del cultivo a polinizar y su capacidad de atracción. Se considera que en una colmena mediana habitan en promedio 60.000 abejas, de las cuales alrededor de 40.000 salen todos los días a recolectar polen y néctar con una frecuencia de 11 a 15 viajes por día, y que durante cada viaje visitan entre 30 y 50 flores, se tiene un total de 20'000.000 de flores visitadas por una colonia en un día. Igualmente, se considera que una abeja puede pecorear en promedio hasta una distancia de 1.500 m de radio, lo que hace suponer que ejercería su función polinizadora en aproximadamente 700 hectáreas de cultivo (Vásquez et al., 2006).

Entre los cultivos que dependen de la polinización por insectos o que aumentan su producción cuando abundan las abejas en época de floración, están los frutícolas (almendra, manzana, albaricoque o chabacano, aguacate, mora, arándano, cereza, pepino, zarzamora, grosella, uva, mango, melón, melocotón o durazno, nectarina o prisco, pera, caqui, ciruela, frambuesa, fresa y sandía) y los de semillero (alfalfa, esparrago, brócoli, coles de Bruselas, repollo, zanahoria, trébol, algodón, pepino, cebolla, rábano, calabaza, trébol de olor y nabo); ya que el polen de estas plantas es demasiado pesado y pegajoso para ser dispersado por el viento, en contraste con el de los cereales y las herbáceas, que son polinizados por este medio (Vásquez et al., 2006).

Los beneficios económicos de la polinización y su contribución al mejoramiento de las cosechas en los diferentes sistemas de producción agrícola, representa en los Estados Unidos, una proporción de 100 a 1.000 veces entre la renta directa de los productos de la colmena y los beneficios para la agricultura. Igualmente, en Italia se considera la importancia de las abejas polinizadoras por los beneficios en la agricultura, lo cuales son estimados como 60 veces superiores a los beneficios que producen los productos de la colmena (Vásquez et al., 2006).

De otra parte, investigaciones realizadas desde el año 2006 por Vásquez, establecen que la calidad externa de la fruta depende de un conjunto de factores exigidos por el consumidor final. Estos factores que se ven influenciados por el efecto polinizador de las abejas son el peso, la forma y el diámetro y sólidos solubles totales, lo que hace la fruta más agradable y con mayor aceptación en mercados de calidad y, por lo tanto, mejora los ingresos económicos de la producción.

En Colombia, actualmente los sistemas de producción apícola son utilizados para la producción de miel, polen y otros productos, e ignoran el potencial polinizador desarrollado por las abejas a través del proceso evolutivo y su contribución en el mejoramiento de la producción agrícola y comercial de una región. Gracias a la presencia de abejas en un cultivo, se logra una mayor y mejor distribución del polen dentro de él sin causar daño físico a la planta, lo que se refleja en mejores producciones durante la cosecha, con aumentos de 30% a 40% (Vásquez Romero et al., 2011).

### **1.2.1. Polinización en cultivos de fresa**

Los cultivos comerciales de fresa presentan flores hermafroditas, que están obligadas a ser polinizadas por acciones combinadas de la gravedad y el viento para generar el máximo tamaño posible de fruta. Informes científicos disponibles de diversos países muestran que el rendimiento, tamaño y forma de la fresa depende de la adecuada polinización de sus flores por diversos insectos (Crane,1990 y Mcgregor, 1976, en Zaitoun et al., 2006). La tasa de polinización de flores de fresas raramente supera el 60% en ausencia de insectos y por lo tanto disminuye la producción frutícola (Allen, 1937, en Zaitoun et al., 2006 ). Especies domesticadas de abejas como *Apis cerana* y *Apis mellifera* son polinizadores esenciales para la flor de la fresa. En países europeos y del Asia meridional, la polinización por las abejas silvestres mejora la calidad y cantidad de esta fruta (Free, 1970 y Sommeijer y Ruijter,1999 en Zaitoun et al., 2006). Universalmente, la tendencia se mueve actualmente hacia la utilización de las abejas y abejorros para la polinización de cosechas abundantes en el campo y en condiciones de invernadero (Zaitoun et al., 2006).

Estudios en Colombia (Vasquez et al., 2011) muestran que, para el caso de la fresa y mora, los incrementos de la producción se relacionan, con la introducción de abejas *Apis mellifera* en estos cultivos; la calidad de los frutos tipo exportación se incrementa entre

30% y 40%, dependiendo de la variedad ya que la acción polinizadora de la abeja permite que la fruta sea homogénea y con mayor contenido de pulpa.

### **1.2.2 Polinización en cítricos**

En el caso de los cítricos, aunque existen numerosas investigaciones para este cultivo, no existe buena información sobre el real efecto de los polinizadores en cítricos. Todavía existe mucha controversia sobre el potencial de polinización de las abejas y las estrategias de gestión necesarias para garantizar la adecuada polinización de los cultivos cítricos (Sanford, 2011).

Estudios publicados por el Instituto de Ciencias de Alimentación y Agricultura (IFAS), Universidad de Florida, informa "requisitos de polinización de los cítricos" (Sanford, 2011), afirma que los cítricos cuentan con flores consideradas como completas, debido a que cuentan con ambos sexos en la misma flor, por lo que la autopolinización ocurre en algunos cultivos de cítricos de manera independiente de los polinizadores. Sin embargo, las abejas como polinizadores permanecen a lo largo de los cítricos en cualquier caso, generando beneficios en esta clase de cultivos como: 1) Creciente número de variedades de cítricos que requiere polinización cruzada porque no se autopolinizan. 2) Relación lineal positiva entre el tamaño del fruto y el número de semillas por fruto y 3) el uso de las abejas para la polinización cruzada es consistente y eficaz al garantizar rendimientos adecuados y económicamente favorables.

Estudios del servicio de investigación agrícola en su publicación "Agriculture Handbook 496" y citados por la Universidad de Florida (Sanford, 2011), establecen algunas evidencias como resultado de la polinización de cultivos cítricos así:

Pomelo: aunque el consenso sugiere que no es necesaria la polinización, hay evidencia que la polinización libre beneficia al menos una variedad (Marsh), y establece que en cada 4 frutas se tuvo dos veces más número de semillas.

Limonas: literatura rusa revela que los limones se benefician de la polinización. Esto está en oposición a la mayoría de los estudios estadounidenses que indican que la contribución es mínima. Sin embargo, hay evidencia que demuestra que la falta de semillas es resultado de la autopolinización y este hecho puede contribuir a la reducción en la sostenibilidad del fruto en sí.

Limas: Se han realizado pocos estudios. Un estudio sugiere que estos frutos se beneficiarían de polinización al obtener incrementos en el rendimiento de un 20%.

Naranjas: Existe una gran variabilidad de opiniones dependiendo de la variedad de la naranja. Sin embargo en ciertas variedades, podido establecer los siguientes hechos:

- Valencia: la mayoría de los investigadores afirman que esta variedad se beneficia poco de la polinización por las abejas. Sin embargo, un estudio indicó que el tamaño de la fruta se incrementó junto con el número de semillas.
- Naranjas dulces: Algunos estudios revelan que hay indicios de polinización beneficiosa. También se ha sugerido que la reducción de su producción con los años puede ser compensado por la polinización de abejas.
- Pomelo: esta variedad parece ser cultivada comercialmente sólo en el Oriente y se autopoliniza. La evidencia sugiere que la polinización por las abejas es importante si la planta es autofértil o autoestéril.

Mandarina: Muchas variedades a pesar de ser flores completas no se autopolinizan sino que requieren polinización cruzada. En este caso la polinización es más crítica, por lo que se ha investigado mucho más sobre este grupo que otros.

Por su parte en Colombia, proyecciones realizadas en la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), en las que utilizan la polinización dirigida con abejas *Apis mellifera* en algunos cultivos comerciales, muestran cómo se logra aumentar el valor económico de estos sistemas productivos en un porcentaje considerable. Así cultivos de cítricos como la naranja ha presentado incrementos de 37% en la producción de la variedad 'Hamlin' y establecen como en la mandarina se obtiene un incremento en la producción, dependiendo de la distancia y la ubicación de las colonias en el cultivo, siendo mayor (43%) cuando se ubican dentro del cultivo (Vásquez et al., 2006).

De igual manera, otro estudio (León Ruiz, 2010), evaluó la eficiencia que tiene la polinización dirigida con abejas (*Apis mellifera*) sobre un cultivo de naranja (*Citrus sinensis*) con las variedades valencia y ombligona ubicado en el municipio de Sasaima en el que se encontró que la naranja de la variedad ombligona al ser expuesta su flor a la polinización presentó un 17,74% más de peso cuando no estaban sometidas a este

tipo de polinización; lo mismo le sucedió a la variedad valencia la cual presentó en su fruto un 20,41% más de peso, en consecuencia la producción anual de naranja ombligona aumentó en un 13,64% y para la producción de la variedad valencia se obtuvieron aumentos en un 74,99%, para el mismo año.

Cabe anotar que si bien la polinización tiene un marcado efecto en la eficiencia de la producción agrícola, también es de resaltar que bajo este esquema de manejo se obtienen mieles con características diferenciadas, de acuerdo a la flora circundante. Por tanto se establece que existe una relación mutua benéfica entre las plantas y las abejas.

### **1.3 Miel de abejas como indicador ambiental**

Hoy en día la modificación del entorno que desarrolla el hombre ha tenido como resultado un gran impacto sobre el ecosistema a tal punto que, por ejemplo, actividades industriales, mineras, entre otras, han dejado consigo gran variedad de compuestos químicos que han desencadenado el deterioro progresivo de los recursos naturales. Muchos de estos compuestos extraños al ecosistema o xenobióticos, además de ser tóxicos, poseen la capacidad de permanecer inalterados durante largos periodos de tiempo, resistiéndose a los procesos de degradación química y biológica. La conservación de sus propiedades fisicoquímicas permite su propagación y acumulación en diferentes compartimientos ambientales existentes (Rodríguez, 2011).

Una vez que están presentes en la naturaleza, los contaminantes pueden afectar a diferentes organismos que pertenecen a dichos compartimientos. En este contexto, las abejas gracias al papel polinizador que desarrollan, tienen la capacidad de interactuar en diferentes compartimientos y permanecer expuestas a estos agentes tóxicos. De esta manera, cuando los contaminantes entran en contacto directo con las abejas, pueden ser transportados, almacenados y concentrados en la colmena junto con la miel (Rodríguez, 2011).

- ***Miel de abejas como alimento***

La miel de abejas y los demás productos de la colmena han sido tradicionales en varias culturas alrededor del mundo, en algunas de ellas incluso poseen valor místico. Se caracterizan por su alto valor nutricional y sus propiedades terapéuticas. Hoy en día su

consumo crece gracias a su identificación como alimentos e ingredientes naturales, sanos e inocuos en todo el mundo (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2011).

La miel de abejas, es principalmente un producto biológico que se modifica con el tiempo, cuya composición química varía dentro de ciertos límites en función de su origen floral, de factores edáficos y climáticos, del material libado, así como del procedimiento utilizado en su extracción y comercialización (Díaz Moreno, 2009).

Las abejas prefieren flores con néctar del 30% al 50% de sacarosa que de otra concentración de azúcares, la cantidad de néctar en una flor y la concentración de azúcar está fuertemente influido por factores del medio ambiente como la humedad relativa, el medio ambiente influye en la concentración de azúcares del néctar.

Químicamente, la miel producida por las abejas melíferas (*Apis mellifera*), se compone de más de 300 compuestos químicos que pertenecen a diferentes grupos de compuestos químicos como: hidratos de carbono, agua, polisacáridos, ácidos grasos, proteínas, minerales, colorantes, compuestos volátiles, enzimas, hormonas y vitaminas en cantidades que dependen del origen de la planta de la cual se produce la miel (Kujawski & Namieśnik, 2008). Además de compuestos fenólicos, pigmentos, cera y granos de polen. La composición de minerales en una muestra de miel está entre 0,02 y 1,03, con un promedio de 0,17%. Los elementos más comunes son; potasio (K), sodio (Na), calcio (Ca), magnesio (Sarker et al.), hierro (Fe), cobre (Cu), manganeso (Mn), cloro (Cl), fósforo (P), azufre (S) y silicio (Si). Los elementos menos comunes son; cromo (Cr), litio (L), níquel (Ni), plomo (Chautá-Mellizo et al.), cinc (Zn), osmio (Os), berilo (Be), vanadio (V), zirconio (Zr), plata (Ag), bario (Ba), galio (Ga), bismuto (Bi), oro (Au), germanio (Ge), estroncio (Sr), estaño (Sn). Los minerales pueden hacer una contribución significativa al color de la miel (Díaz Moreno, 2009).

Adicionalmente, a la miel se le atribuyen propiedades medicinales como: actividad antibacteriana, capacidad cicatrizante y actividad antioxidante. Estas son características importantes del producto para avanzar en la diferenciación de las clases de mieles como componente de valor agregado (Sánchez, Castañeda, Muños, & Tellez, 2013).

## 1.4 Inocuidad química de la miel de abejas

La presencia de xenobióticos como, metales tóxicos y plaguicidas en productos apícolas puede provenir del entorno de las abejas se ubican en un radio de hasta 3 km y puede llegar a la colmena básicamente por (i) la aplicación directa de algunos de estos compuestos sobre los productos en cualquiera de los procesos de producción, transporte y/o almacenamiento, (ii) la presencia de estos compuestos en plantas y posterior transporte a las colmenas por parte de las abejas, (iii) la contaminación de las fuentes de agua de la zona, así como la presencia de estos contaminantes en el aire, como por ejemplo en el material particulado y por último (iv) la biomagnificación, principalmente de compuestos con alta persistencia como los plaguicidas (Al-Waili, Salom, Al-Ghamdi, & Ansari, 2012).

En este sentido, la normativa de la Unión Europea, establece que la miel como producto natural debe estar libre de sustancias químicas. Sin embargo, la producción y comercialización de la miel puede verse afectada por la presencia de xenobióticos a través de diferentes fuentes de contaminación (Tabla 1-1).

Los contaminantes ambientales incluyen plaguicidas, metales pesados tóxicos, bacterias, y materiales radiactivos. Numerosos estudios han demostrado que los residuos de plaguicidas son la causa de mutaciones genéticas y la degradación celular; además, de los problemas de salud pública, ya que la presencia de plaguicidas en los productos apícolas disminuye su calidad (Al-Waili et al., 2012).

**Tabla 1-1:** Contaminantes que afectan la calidad de la miel de abejas.

<b>Clase de contaminante</b>
<b>1. Metales pesados:</b> Pb, Cd y Hg
<b>2. Isotopos radiactivos</b>
<b>3. Contaminantes orgánicos:</b> PCB's
<b>4. Plaguicidas:</b> (Insecticidas, fungicidas, herbicidas y bactericidas)
<b>5. Bacterias patógenas</b>
<b>6. Organismos genéticamente modificados</b>

<b>B. CONTAMINANTES EN LOS APIARIOS</b>
<b>1. Acaricidas:</b> Compuestos sintéticos lipofílicos y sustancias no tóxicas como ácidos orgánicos y componentes de aceites esenciales
<b>2. Antibióticos para el control de enfermedades:</b> Tetraciclinas, estreptomicina, sulfonamidas y cloranfenicol
<b>3. Repelentes químicos:</b> Paradiclorobenceno, usado en el control de la polilla de la cera

Fuente: (Al-Waili et al., 2012).

## 1.5 Uso de plaguicidas en cultivos y sus efectos en la apicultura

Una de las prácticas agrícolas de impacto en el ecosistema tiene que ver con las actividades dirigidas a garantizar altos rendimientos de producción en los cultivos. Por tal razón, la agricultura moderna depende cada vez más del uso de productos químicos para el control de malas hierbas, hongos y plagas de artrópodos, por lo que con frecuencia las abejas pueden llegar a ser expuestas a productos químicos ambientales como consecuencia de sus actividades de pecoreo; principalmente por este aspecto, la orientación de la regulación de plaguicidas ha estado relacionada con la protección de las abejas de acuerdo con el riesgo de intoxicación directa. Sin embargo, actualmente las sustancias que se aplican han cambiado y los daños causados por la toxicidad aguda no son la única amenaza para las abejas. En cambio, los efectos sub-letales, como parálisis, desorientación o los cambios de comportamiento, son evidentes tanto a corto plazo como por la exposición a largo plazo (Greenpeace, 2013).

En el 2013, el movimiento Greenpeace, publicó el documento *“El declive de la abejas”*, donde describe los efectos subletales observados para dosis bajas de insecticidas en las abejas, así:

- 1) Efectos fisiológicos de distintos niveles como tasas de desarrollo, en los que cambia el tiempo requerido para alcanzar la edad adulta y se observan malformaciones en las celdillas de los panales.
- 2) Alteración del patrón de pecoreo según efectos evidentes en el aprendizaje y la orientación.

3) Interferencias en el comportamiento alimentario, mediante efectos repelentes, que inhiben la alimentación o de reducción de la capacidad olfativa.

4) Impacto de los plaguicidas neurotóxicos en los procesos de aprendizaje tal como problemas en el reconocimiento de flores y colmenas, de orientación espacial, que son muy relevantes y han sido estudiados y ampliamente identificados.

Estos efectos negativos sirven como advertencia de los impactos inesperados que podrían tener los plaguicidas tóxicos para las abejas.

De otra parte, es importante considerar otras prácticas culturales causantes del paulatino deterioro del medio ambiente como la instalación de monocultivos, los cuales afectan la disponibilidad de zonas aptas para apicultura, ya que restringen la oferta de alimento a una sola planta, que en la gran mayoría de los casos no es suficiente para cumplir con las necesidades nutritivas de las abejas (Vásquez et al., 2006).

Por este motivo existe preocupación mundial ya que actualmente son evidentes los efectos del deterioro ambiental, tales como la desaparición de especies polinizadoras silvestres, como abejorros, abejas solitarias, avispas, dípteros y coleópteros. La disminución de estas especies y su aporte a la polinización, tiene su origen principalmente en la implementación de técnicas inadecuadas en los procesos de producción, como el uso indiscriminado de insecticidas, herbicidas y abonos químicos, la tala continua de bosques y la contaminación de las fuentes hídricas; además, en el incremento de las superficies dedicadas al establecimiento de nuevas poblaciones humanas, que ha llevado a una degradación progresiva del medio ambiente, extinguiendo algunas especies de la flora y fauna y obligando a otras a migrar e invadir otros ecosistemas, disminuyendo sustancialmente el número de individuos entre especies y aumentando sensiblemente la incidencia de plagas y enfermedades en animales y cultivos (Vásquez et al., 2006).

De acuerdo con lo anterior, características comunes de productos apícolas como la composición, cualidades sensoriales y actividad biológica de la miel, el polen y el propóleos, son altamente correlacionadas con la ubicación geográfica de los apiarios debido a que la abeja emplea como materia prima para su elaboración néctar y polen tomado de las especies vegetales del entorno sin delimitaciones (Sánchez et al., 2013).

Por tanto, estos insectos polinizadores, así como los productos apícolas (miel y polen), se utilizan como indicadores para estimar el nivel de contaminación del ecosistema

En resumen, son variados los factores que disminuyen la calidad higiénica de la miel y por tanto dificultan su comercialización sin olvidar los efectos en los rendimientos en la producción agrícola que dependen de la polinización y la posibilidad de identificar los procesos de contaminación del entorno ambiental a través de productos apícolas como la miel (Bogdanov, 2006; Rodríguez, 2011)

En consecuencia, hoy en día en Colombia existe creciente interés en realizar el seguimiento y evaluación de contaminantes en mieles con fines de exportación bajo la modalidad de denominación de origen y de los programas de comercio justo, en la cual se pretende obtener el mejor precio al apicultor con la mejor calidad del producto (Laverde et al., 2010), por lo que es necesario contar en Colombia con las herramientas analíticas confiables y al alcance del apicultor para diagnosticar la inocuidad química de la miel a comercializar.

En este contexto, debe tenerse en cuenta que el movimiento de agroquímicos es función de las condiciones ambientales, el tipo de aplicación, las condiciones climáticas, entre otros, y se encuentra presente desde su origen por efecto de la aplicación o por fuentes de generación, hasta los sitios donde no se desea la presencia de estos, como aguas, suelos, flora y fauna.

De otra parte, el empleo de productos prohibidos o no recomendados para las enfermedades de las abejas, genera un enorme riesgo para la salud del consumidor, debido a que pueden representar efectos adversos en los consumidores de los productos apícolas, así como en las personas que se encuentran directamente relacionadas con la aplicación, manejo y/o transporte (Bogdanov, 2006).

Los plaguicidas son un grupo significativo de xenobióticos que afecta la biota de su entorno, por lo que deben ser monitoreados en cada uno de los componentes con los que interacciona con el fin de establecer el nivel de riesgo en la salud de los seres vivos (Mukherjee, 2009).

Los plaguicidas se usan en todo el mundo en el control de enfermedades de las abejas y las plagas y su administración es incontrolada y sin la aplicación de protocolos

aprobados. Esta aplicación no controlada puede causar la contaminación del medio ambiente, especies animales y seres humanos (Aliferis, et al., 2010).

Los residuos de plaguicidas en mieles incluyen acaricidas, ácidos orgánicos, insecticidas, fungicidas, herbicidas, y bactericidas. Muchos de estos contaminantes están prohibidos debido a su probado efecto nocivo para la salud, tales como efectos cancerígenos en los seres humanos. Estas sustancias tóxicas son utilizadas para controlar varroasis y ascospheriosis como por ejemplo acaricidas como amitraz, celazole, bromopropilato, coumaphos, flumetrina y taufluvalinato (Al-Waili et al., 2012).

El uso de estos productos químicos dentro de colmenas conlleva un riesgo de contaminación directa de miel y otros productos de la colmena. Más de 150 diferentes plaguicidas se han encontrado en muestras de la colonia. Los residuos más elevados de pesticidas son de varroacidas que se acumulan en la cera de abejas, el polen y el pan de abejas. (Al-Waili et al., 2012)

De acuerdo con (Al-Waili et al., 2012) los límites máximos de residuos (LMR) difieren de un país a otro lo cual causa problemas en la comercialización. Alemania, Italia y Suiza han establecido diferentes límites máximos de residuos de amitraz, bromopropilato, cumafos, cyamizole, flumetrina, y fluvalinato. La Agencia de Protección Ambiental de los EE.UU ha establecido LMR para amitraz (1 mg/kg), coumafos (0,1 mg/kg), y fluvalinato (0,05 mg/kg) (Mukherjee, 2009). Por su parte entidades internacionales como el Parlamento Europeo establecieron en el reglamento 396/20 de 2005, los valores de LMR de plaguicidas en productos de origen vegetal y animal. Desde el 1 de setiembre de 2008, la Comisión Europea estableció nuevos límites de residuos de plaguicidas en la miel, los cuales se encuentran en el rango de 10 y 50 µg/kg.

La mayoría de los estudios buscan determinar los residuos de acaricidas para controlar el ácaro *Varroa jacobsoni*.

De otra parte, entre los insecticidas más comunes usados en el control de cultivos y que afectan la apicultura y sus productos en Europa incluyen: 1) Los organoclorados (OC), como el lindano y sus isómeros del hexaclorociclohexano (HCH), aldrina, dieldrina,

endrina, isómeros del DDT, heptacloro, heptacloro epóxido, metoxicloro, endosulfán. Muchos OC ya no se utilizan en la agricultura, pero todavía están presentes en el medio ambiente. 2) Los plaguicidas organofosforados (OP) como dialifos, trichlorophon y diclorvos. 3) Carbamatos: plaguicidas que contienen un grupo amino R1-NH-CO-OR2 (Bogdanov, 2006).

No menos importante es el grupo de insecticidas conocido como neonicotinoides se caracteriza por ser de acción sistémica. Es decir, que al aplicarlos no se mantienen en el exterior de la planta, sino que entran en su sistema vascular y se distribuyen por ella. Algunos neonicotinoides se utilizan para revestir las semillas (semilla en píldoras) y protegerlas al plantarlas. Cuando la semilla comienza a germinar y crecer, los neonicotinoides se distribuyen por los tallos y las hojas de la planta, y pueden finalmente alcanzar el agua de gutación y más tarde el polen y el néctar. Un mayor uso de neonicotinoides significa más posibilidades de exposición de los polinizadores a estas sustancias químicas durante periodos más largos, pues los insecticidas sistémicos se pueden encontrar en diversos lugares durante el ciclo de vida de una planta (Greenpeace, 2013).

El uso de estas sustancias está muy extendido en Europa y, en concentraciones altas, ha demostrado tener efectos graves en las abejas, principalmente en las abejas melíferas. De hecho se han identificado impactos como resultado de la exposición crónica y a dosis bajas subletales. Los efectos observados incluyen trastorno de la capacidad pecoreadora (las abejas se pierden al volver a la colmena tras pecorear y son incapaces de orientarse con eficacia), trastorno de la capacidad de aprendizaje (memoria olfativa, esencial para el comportamiento de la abeja), mayor mortalidad y desarrollo disfuncional, desde el estado de larvas hasta el crecimiento de las abejas reinas (la Tabla 1-2 contiene un resumen de los daños potenciales de las siete sustancias químicas prioritarias en este informe).

Frente al Informe de Greenpeace y otros estudios relacionados, la Comisión Europea emitió recientemente la Regulación (EU) No 485/2013 donde establece la prohibición a partir del 1 de diciembre de 2013, del uso de plaguicidas neocotinoides como clotinidina, tiametoxan e imicloprid, usados ampliamente para combatir plagas en plantas y semillas

de cereales, debido a que se reconoce su efecto nocivo en las abejas presentes en los cultivos.

- Plaguicidas en cultivos de fresa y cítricos

La mayor parte de los plaguicidas de uso agrícola se aplican directamente al suelo, sobre cultivos o directamente sobre las frutas para controlar los parásitos y las enfermedades que las dañan. Como resultado de la aplicación de plaguicidas gran parte de estos compuestos se liberan a la atmósfera, contaminando el aire del entorno, y una vez que un plaguicida se introduce en el ambiente es influenciado por procesos que determinan su persistencia y movimiento como son los movimientos de aguas superficiales, la filtración en aguas subterráneas o la dispersión en la atmósfera, entre otros.

**Tabla 1-2:** Plaguicidas neonicotinoides y sus efectos en abejas según la dosis.

Plaguicida	LD <sub>50</sub> oral mg/abeja	Efecto en Abejas
<b>Imidacloprid (Neonicotinoide)</b>	0,0037	A bajos niveles comparables a concentraciones de campo, y combinado con el piretroide (I-cialotrin), se aumenta la mortalidad de las obreras y disminuye el éxito en búsqueda de alimento en los abejorros, comprometiendo la salud de la colonia.
<b>Tiametoxam (Neonicotinoide)</b>	0,0050	Deterioro de la función cerebral y del intestino medio, así como la reducción de la esperanza de vida de la abeja africanizada.
<b>Clotnidina (Neonicotinoide)</b>	0,0038	Reducción de la actividad de pecoreo de las abejas melíferas y empleo de más tiempo en los vuelos de pecoreo
<b>Fipronil (Fenilpirazol)</b>	0,0042	Se reduce la capacidad de aprendizaje de las abejas. Es uno de los plaguicidas que más afecta al aprendizaje.
<b>Clorpirifos (organofosforado)</b>	0,25	A bajas concentraciones afecta a la fisiología y reduce la actividad motora de las abejas melíferas
<b>Cipermetrina (Piretroide)</b>	0,035	La exposición a largo plazo a niveles bajos conlleva efectos negativos en la salud de la colonia de abejas melíferas, incluida la salud de las larvas
<b>Deltametrin (Piretroide)</b>	0,079	En la aplicación de campo/niveles de residuos reduce los viajes de pecoreo y afecta a las capacidades de aprendizaje en las abejas melíferas

Fuente: (Greenpeace, 2013).

Como consecuencia de los procesos de aplicación y dispersión, los plaguicidas pueden entrar como contaminantes en el suelo, corrientes de agua subterráneas, ríos o lagos, o encontrarse en alimentos para el consumo humano (frutas y verduras) o en los productos procesados (jugos de fruta).

De acuerdo con los registros ICA 2016 los plaguicidas autorizados en Colombia para los cultivos de fresa y cítricos seleccionados en este estudio, se describen en la Tabla 1.3.

**Tabla 1-3:** Uso de plaguicidas autorizados por el ICA en 2016 para fresa y cítricos.

<b>Plaguicida</b>	<b>Aplicación autorizada en cultivos de fresa y cítricos</b>
Abamectina	Cítricos, Fresa, Naranja, Tangelo, Limón, Mandarina
Avermectinas	Cítricos
Azoxystrobin	Naranja, Fresa
Benomil	Fresa
Carbendazim	Fresa
Cholothalonil	Fresa
Clorpirifos	Naranja, Limón, Mandarina, Tangelo
Diafenthiuron	Naranja, Limón, Mandarina, Tangelo
Difenoconazole	Naranja, Fresa
Dimethomorf	Fresa
Fenazaquin	Fresa
Fipronil	Cítricos
Folpet	Fresa
Fosetyl aluminium	Cítricos
Glifosato	Cítricos
Glifosinate amonium	Cítricos
Imidacloprid	Naranja
Milbectin	Fresa
Paraquat	Cítricos
Porchloraz	Fresa, Naranja, Tangelo
Pyridaben	Limón, Mandarina, Tangelo
Pyrimethanil	Fresa
Tebuconazole	Naranja, Limón, Mandarina, Tangelo, Fresa
Tetradifon	Naranja, Limón, Mandarina, Tangelo
Thiamtozan	Naranja, Mandarina, Tangelo, Toronja, Limón
Trifloroxystrobin	Naranja
Λ Cyhalotrim	Naranja, Mandarina, Tangelo, Toronja, Limón

Fuente: ICA, 2016. Registros de venta de plaguicidas químicos de uso agrícola.

El tema de los residuos de plaguicidas en frutos cítricos tiene carácter especial debido a que por el carácter lipófilo de la mayor parte de las moléculas que se utilizan como plaguicidas en cítricos, estas sustancias penetran con facilidad en las celdillas de aceites

esenciales que tapizan la corteza de los frutos cítricos y quedan allí bloqueadas y retenidas, con lo que su persistencia es mayor de lo que serían en otro tipo de productos vegetales. Meses después de aplicado un plaguicida, aunque se aplique cuando el fruto es pequeño aún se detectan sus residuos que, aunque se diluyen por el crecimiento del fruto y al final se encuentren a bajos niveles, difícilmente desaparecen (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), 2014).

El tratamiento en campo más usado para el control de plagas y enfermedades utiliza compuestos tipo insecticidas y herbicidas, entre otros, así:

- **Tratamiento de plagas y enfermedades en cítricos**

Las principales enfermedades y plagas que atacan los cultivos de cítricos son tratadas de manera química para obtener resultados inmediatos con plaguicidas recomendados así:

**Tabla 1-4:** Tratamiento químico contra enfermedades o plagas en cultivo de cítricos

<b>Enfermedad o plaga</b>	<b>Tratamiento químico recomendado</b>
<b>Ácaros</b>	Dicofol, Fenbutestan, Piridaben.
<b>Caparreta</b>	Fosmet, Metidation, Metil Azinfos, Piriproxifen.
<b>Parlatoria (piojo gris)</b>	Aceite mineral (generación de verano), Buprofecin, Clorpirifos, Metidation, Azinfos Metil, Piriproxifen.
<b>Piojo rojo</b>	Aceite mineral, Clorpirifos, Metil Azinfos, Metidation, Piriproxifen.
<b>Serpetas</b>	Aceite mineral, Malation, Metidation, Piriproxifen.
<b>Pulgones</b>	Metomilo, Clorpirifos.
<b>Mosca blanca</b>	Buprofecin, piridaben + aceite.
<b>Ceratitis capitata</b>	Malation.
<b>Minador de las hojas</b>	Abamectina, Diflubenzurón, Imidacloprid (aplicado al tronco o en riego por goteo), Azadiractina (aplicada al tronco).
<b>Aguado</b>	Oxicloruro de cobre, Fosetil-Al.
<b>Podredumbre de cuello y gomosis</b>	Oxicloruro de cobre, Metalaxil, Fosetil-Al.
<b>Herbicidas</b>	Diuron, Paracuat, Dicuat, Glifosato, Trifluralina, Napropamida Sulfosato

Fuente: (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), 2014).

▪ **Tratamiento de plagas y enfermedades en fresa**

El problema básico de la lucha química en la fresa es el peligro de presencia de residuos de plaguicidas en los frutos tratados, que por su toxicidad pueden afectar a los consumidores.

Por eso hay que tener en cuenta en primer lugar las prácticas de manejo de cultivo, que en muchos casos pueden evitar o reducir la aplicación de productos fitosanitarios, y en segundo lugar utilizar en la lucha química compuestos de baja toxicidad y rápida degradación. También se recomienda tener en cuenta la sensibilidad de la fresa, especialmente en la flor a los efectos fitotóxicos de algunos plaguicidas (Ministerio de agricultura alimentación y medio ambiente (España), 2014).

A continuación en la Tabla 1-5 y Tabla 1-6 se ilustran los tratamientos químicos recomendados para el tratamiento de plagas y enfermedades en fresa y por tanto, la posibilidad de encontrarlos en los productos apícolas como la miel (Ministerio de agricultura alimentación y medio ambiente (España), 2014).

**Tabla 1-5:** Tratamiento químico contra parásitos en fresa.

<b>Parásito</b>	<b>Tratamiento químico recomendado</b>
Orugas dormideras	Acefato, Clorpirifos, Triclorfón
Mosca blanca	Cipermetrin, Decamtrin, Fenvalerato
Araña rroja - Tarsonemus	Clorbencilato, Dicolfol, Tetradifón, Tetradifón + Naled, Azufre
Pulgones	Acefato, Fenitroton, Lindano, Malatión, Pirimicarb
Tortricidos - Heliothis	Acefato, Carbaril, Cipermetrín, Decametrín, fenvalerato, Triclorfón
Antónimo	Carbaril, Fenitroton, Lindano, Malation
Caracoles	Metaldehido (granulado), Mitiocarb (granulado)

**Fuente:** (Ministerio de agricultura alimentación y medio ambiente (España), 2014).

**Tabla 1-6:** Tratamiento químico recomendado contra enfermedades en fresa

Enfermedad	Plaguicida recomendado
Hongos de cuello y raíz	Benzimidazoles: Benomilo, Carbendazim, Metiltiofanato, Tiabendazol, Otros fungicidas: Captan, Tiram
Manchas foliares	Clotalonil, Diclofluanida, Folpet, Maneb, Mancozeb, Propineb, Zineb
Mildiu	Captan, Captafol, Clortalonil, Compuestos cúpricos, Diclofluanida, Folpet, Mancozeb, Maneb, Propineb
Botrytis	Diciclidina, Diclofluanida, Totifluanida +, Triadimefón, Vinclozolina
Oidium (Ceniza)	Bupirimato, Cloraniformetano, Clortalonil, Dinicap, Datilinfos, Quinimetonato, Totifluanida +, Traidimefon, Azufre
Bacteriosis	Oxicloruro de cobre

**Fuente:** (Ministerio de agricultura alimentación y medio ambiente (España), 2014).

### 1.5.1 Valores de referencia de plaguicidas en miel de abejas

Los principales países importadores de miel de abejas aplican normatividad en materia de sanidad, calidad e inocuidad cada vez más estricta, los permisos que otorgan a los exportadores exigen el cumplimiento de normas de calidad, inclusive más estrictas que aquellas contempladas en el Codex Alimentarius, como por ejemplo, que el país esté inscrito como exportador y que el producto a importar este sujeto a sistemas de trazabilidad (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2011).

En el caso de la norma de la Comunidad Europea, se exigen requisitos fisicoquímicos, microbiológicos, de control de residuos y especialmente de plaguicidas, de etiquetado, de trazabilidad y de empaque. Las exportaciones de productos dependen principalmente de las exigencias del importador, que se traducen generalmente en volúmenes altos (a partir de contenedores) y constantes.

El país proveedor, en este caso Colombia, debe estar inscrito como tal y disponer de un plan aprobado por la Unión Europea, respecto al control de residuos y básicamente cumplir con las siguientes normas (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2011) :

1) Directiva 96/23/CE del Consejo, relativa a las medidas de control aplicables respecto a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos. 2) Decisión 94/860/CE de la Comisión, sobre requisitos aplicables a la importación de productos apícolas de terceros países para su utilización en la Apicultura. 3) Decisión de la Comisión, se refiere a las importaciones de miel.

La tendencia es que todos los países refuercen su normativa en materia de calidad e inocuidad, que la trazabilidad sea un requisito indispensable y que los sistemas de inspección, vigilancia y control sean cada vez más sofisticados.

Por su parte, en Colombia existe normatividad específica para miel de abejas contenida en la Norma Técnica Colombia 1273 y en la Resolución recientemente derogada No. 1057 de 2010 del Ministerio de Protección Social, relacionadas con los requisitos de calidad e inocuidad. La Resolución contiene normativa sobre las plantas de cosecha para miel de abejas, características fisicoquímicas y microbiológicas, de empaque y etiquetado. También se prohíbe etiquetar como miel de abejas productos que no correspondan a las características fisicoquímicas y organolépticas que contiene la norma. Frente a la normatividad mundial, la colombiana es deficiente en controles microbiológicos y de residuos de plaguicidas.

En general, en materia de contaminantes en alimentos, Colombia se acoge a los límites máximos de residuos determinados por el codex alimentarius, sin embargo, para productos apícolas, la legislación es incipiente en la actualidad, por tanto es necesario acogerse a la legislación europea teniendo en cuenta que la principal demanda de miel de abejas se encuentra en los países de la Unión Europea, principalmente, esta información se detalla en la tabla 1-7.

**Tabla 1-7:** LMR de plaguicidas en miel de abejas en la Unión Europea.

<b>Límite Máximo de Residuo*</b>			
<b>COMPUESTO</b>	<b>mg/kg</b>	<b>COMPUESTO</b>	<b>mg/kg</b>
3-OH Carbofuran	*	Imidacloprid	0,05
3,4-Dicloropropilanilida	*	Indoxacarb	0,05
Acefato	0,02	Isoprocarb	*
Acetamiprid	0,05	Linuron	*
Ametrina	*	Lufenuron	0,02
Atrazina	0,05	Metalaxyl	0,05
Azinfos Metil	*	Metamidofos	*
Azosxistrobin	0,05	Metomil	0,02
Befuracarb	*	Metoxyfenozida	0,05
Benalaxil	*	Mevinphos	*
Buprofezin	0,05	Monocrotofos	*
Carbaryl	0,05	Nitenpiram	*
Carbendazina	1,0	Oxamil	0,05
Carbofuran	0,05	Penconazol	0,05
Cimoxanil	0,05	Piraclostrobin	0,05
Clorfenaprid	*	Pirimetanil	0,05
Dazomet	0,05	Pirimicarb	0,05
Difenoconazol	0,05	Propamocarb	0,05
Dimetoato	*	Simazina	0,01
Dimetomorf	0,05	Tebuconazol	0,05
Dinotefuran	*	Temefos	*
Epoxiconazole	0,05	Thiametoxan	0,05
Espinosad A y D	0,05	Tiabendazol	*
Etoprofos	*	Tiacloprid	0,2
Fenexhamid	0,05	Tiodicarb	0,02
Flusilazole	0,05	Tridemoprh	0,01
Hexaconazol	*	Trifloxistribina	0,05
Imazalil	0,05		

\*No hay valor reportado

Fuente: (European Commission, 2017).

### 1.5.2 Determinación analítica de plaguicidas

En la actualidad, el análisis de residuos contaminantes orgánicos en productos apícolas se realiza mediante dos tipos de métodos, los presuntivos y los de confirmación. Los

presuntivos tienen como objetivo detectar la presencia de uno o varios residuos en una muestra sospechosa. Se considera en este grupo los métodos de inmunoensayos y los microbiológicos de ensayo receptor, en el que el analito se une al receptor, siendo el modo de detección el colorimétrico. Los de confirmación, según el Codex, se basan en técnicas instrumentales más avanzadas como la electroforesis capilar y la cromatografía líquida de alta eficiencia acopladas a espectrometría de masas. Estas metodologías son recomendadas por su elevada capacidad de cuantificación y sensibilidad. Cada uno de los métodos posee ventajas y desventajas en aspectos de costo, respuesta y especificidad, que los hacen adecuados o no para cada fin propuesto. Sin embargo, diferentes entes de control han establecido que es necesario contar con métodos que permitan realizar la cuantificación y confirmación de los residuos, y es allí donde los métodos instrumentales tienen una enorme ventaja (Le Bizec, Pinel, & Antignac, 2009; Molina, Molina, Althaus, & Gallego, 2003).

La gran mayoría de métodos para la determinación cuantitativa de residuos plaguicidas en productos apícolas emplea métodos cromatográficos, estas metodologías están compuestas de 3 etapas fundamentales, que corresponden a extracción, limpieza y análisis instrumental (Marazuela & Bogialli, 2009). Debido a la naturaleza de sus estructuras químicas y las bajas cantidades en las que se encuentran estos compuestos, existe una tendencia mundial al empleo de la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas para su análisis instrumental (Herrera-Herrera, Hernández-Borges, Rodríguez-Delgado, Herrero, & Cifuentes, 2011; Kishida, 2007; Koesukwiat, Jayanta, & Leepipatpiboon, 2007; Romero-González, Aguilera-Luiz, Plaza-Bolaños, Frenich, & Vidal, 2011). Por su parte los métodos de limpieza más comunes son: cromatografía de permeación en gel, dispersión en fase sólida y extracción en fase sólida (Kantiani, Farré, & Barceló, 2009). Finalmente, la etapa de extracción se ha identificado, como la más crítica en la determinación de residuos plaguicidas en productos apícolas; esta etapa depende de los grupos de compuestos que se vayan a determinar y en general se ha establecido que el método por excelencia para este análisis corresponde a la extracción sólido-líquido (para polen y cera) y extracción líquido-líquido para mieles (Kantiani et al., 2009; Le Bizec et al., 2009).

- **Método QuEChERS**

En el último lustro, se han logrado importantes avances en las metodologías para la preparación de muestras de residuos de plaguicidas. Las investigaciones realizadas por Anastassiades et al., 2003, en el desarrollo de un nuevo método para la preparación de muestras de residuos de plaguicidas en frutas y que ha servido de base para realizar desarrollos analíticos de vanguardia en el campo de los productos alimenticios de origen animal. Las metodologías resultantes corresponden adaptaciones del método QuEChERS (siglas en inglés de rápido, fácil, económico, eficaz, robusto y seguro), que se han utilizado con enorme éxito para analizar cientos de plaguicidas en una variedad de alimentos. Mediante el empleo de esta metodología, bajo algunas modificaciones, se ha reportado el análisis de productos veterinarios, plaguicidas y otros contaminantes (Villar-Pulido, Gilbert-López, García-Reyes, Martos, & Molina-Díaz, 2011).

Lehotay, (2003) creador del método QuEChERS, ha aplicado esta metodología para la identificación y cuantificación de residuos veterinarios en leches, carnes y otros productos de origen animal. Dentro de los grupos de compuestos con los que se lograron obtener resultados adecuados corresponden a los antihistamínicos, quinolinas y otros antibióticos (Lombardo-Agüí, García-Campaña, Gámiz-Gracia, & Cruces-Blanco, 2012; Pérez-Burgos et al., 2012; Salvia, Vulliet, Wiest, Baudot, & Cren-Olivé, 2012; Villar-Pulido et al., 2011).

El método QuEChERS funciona satisfactoriamente para diferentes grupos de familias químicas de plaguicidas, como los organofosforados, organoclorados, piretroides, carbamatos, plaguicidas ácidos y básicos (Cajka, Hajslova, Lacina, Mastovska, & Lehotay, 2008). De esta manera la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas facilita el análisis de un número elevado de compuestos en un tiempo muy corto; con el empleo de esta técnica ha sido posible analizar más de 200 compuestos en un sólo análisis cromatográfico (Ahumada & Zamudio, 2011).

- **Identificación y cuantificación**

El análisis de residuos de plaguicidas se encuentra reportado en literatura con una amplia gama de técnicas desde el empleo de electrodos modificados (Law & Higson, 2005), hasta el empleo de métodos quimiométricos que involucran el análisis

multivariable, modelos matemáticos, la informática y su integración con los datos proporcionados por la química analítica (Li, He, & Xu, 2007). Sin embargo, a pesar de la gran variedad de técnicas instrumentales, la cromatografía de gases de alta resolución y la cromatografía líquida de alta eficiencia son las técnicas por excelencia (Fernandez, 2007). Esta enorme preferencia hacia estas técnicas analíticas se ha dado por la alta capacidad de separación de mezclas complejas, la rapidez en los análisis y la alta sensibilidad.

En el caso de presencia de residuos que exceden los límites máximos establecidos por los organismos reguladores es necesario realizar una confirmación de la presencia positiva del analito, para tal fin se suele utilizar el mismo sistema cromatográfico cambiando su selectividad o se pueden emplear los sistemas cromatográficos acoplados a espectrometría de masas (SANTE, 2015).

En Colombia, el Laboratorio de Inocuidad Química del Centro de Bio-Sistemas de la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, ha sido pionero en la implementación del método QuEChERS para el análisis de residuos de plaguicidas en frutas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (D. A. Ahumada & Zamudio, 2011; D. A. Ahumada, Zamudio, & España, 2012). Así mismo, investigaciones más recientes desarrolladas en el Laboratorio de Inocuidad Química modificaron esta metodología para el análisis de contaminantes en suelos (Ahumada & Bojacá 2013). En el año 2011 el Laboratorio de Inocuidad Química en alianza con el Instituto de Ciencia y Tecnología de alimentos (ICTA) ha desarrollado metodologías para la determinación de residuos de plaguicidas en algunos productos de origen animal como la miel (Rodríguez, 2011). Este Laboratorio se ha perfilado a realizar investigaciones en el desarrollo de nuevas metodologías para análisis de contaminantes en matrices más complejas como el polen (D. A. Ahumada, Rodríguez, Zamudio, & Mojica, 2012; D. A. Ahumada & Zamudio, 2011).

## **1.6 Metales tóxicos en miel de abejas**

La presencia de los metales en la miel puede poner en peligro la salud de los consumidores humanos. Estos metales pueden provenir de fuentes externas, como industrias de fundición, emisiones de las fábricas, procesos de metalurgia no ferrosa,

emisiones de gasolina con plomo en las carreteras, entre otros; procedimientos incorrectos durante las etapas de producción y de conservación de la miel, así como productos agroquímicos tales como abonos que contienen cadmio (Cd) y/mercurio (Hg) (Pisani, Protano, & Riccobono, 2008). Estos metales pueden conducir a un deterioro de la calidad de la vida humana cuando se acumulan a un nivel de concentración tóxica.

Los elementos esenciales como flúor (F), Zn, Cu, Si, V, Sn, Se, Mn, yodo (I), níquel Ni, molibdeno (Mo), Cr, cobalto(Co), son elementos seguros y adecuados para el cuerpo si están presentes dentro de un rango específico de la ingesta (Dosis diaria recomendada). Más allá de este rango, también se pueden observar efectos tóxicos.(Ru, Feng, & He, 2012).

De acuerdo con esto, los elementos tóxicos representan un riesgo para la salud humana y para los ecosistemas, aun en bajas concentraciones. Estos elementos provienen de diferentes fuentes: combustibles, aerosoles urbano-industriales, desechos líquidos y sólidos de origen animal y humano, industria minera, química y textil, etc. En el sector agropecuario son fuentes contaminantes las aguas residuales utilizadas para riego, enmiendas, compost, plaguicidas y fertilizantes.

Debido a que los seres humanos somos incapaces de metabolizar metales tóxicos, estos tienden a bioacumularse en el organismo de acuerdo con la alta afinidad con el grupo sulfidrilo de las proteínas, hasta alcanzar niveles altos de toxicidad. De esta manera, la ingesta de estos elementos puede generar graves daños a la salud del consumidor.

En los últimos años, se han realizado estudios de las concentraciones de los diferentes metales en la miel en países europeos como Croacia (Bilandžić et al., 2014), Francia (Devillers et al., 2002), Italia (Pisani et al., 2008), Polonia (Przybyłowski & Wilczyńska, 2001), Eslovenia (Golob, Doberšek, Kump, & Nečemer, 2005), y Turquía (Citak, Silici, Tuzen, & Soylak, 2012; Silici, Uluozlu, Tuzen, & Soylak, 2008; M Tuzen, Silici, Mendil, & Soylak, 2007; Mustafa Tuzen, Soylak, & Elci, 2005). La mayoría de estos estudios se enfocaron en la investigación de metales tóxicos en la miel como un importante indicador de la contaminación del medio ambiente. La presencia de estos metales en niveles por encima de lo permitido afecta la producción y calidad de los cultivos, así como las

calidades de la atmósfera y los cuerpos de agua, amenazando la salud y la vida de los animales y los seres humanos a través de la cadena alimenticia. Su monitoreo es importante como herramienta de control y prevención de estos efectos.

Estos metales también llegan a la miel a través de matrices ambientales como el aire y el suelo que contienen metales tóxicos, provenientes principalmente de la industria y el tráfico, los que también pueden contaminar las colonias de abejas y sus productos. El Pb, presente en el aire y proveniente principalmente del tráfico automotor puede contaminar el aire y luego directamente el néctar y la miel. Generalmente, el Pb no se transporta por plantas. Por otro lado, el Cd procedente de industria de la metalurgia, y de fertilizantes, se transporta desde el suelo a las plantas y a continuación, puede contaminar el néctar y la miel (Bogdanov, 2006).

También debe tenerse en cuenta que el grado de contaminación de la miel depende del origen floral de las plantas visitadas por las abejas. Por ejemplo, las mieles procedentes de árboles caduceofolios son generalmente menos contaminados que las mieles de otra procedencia botánica. Las mieles producidas a partir del néctar de las plantas aromáticas se caracterizan por muy altas concentraciones de metales pesados, porque estas plantas tienden a concentrar los contaminantes con mayor facilidad que las plantas herbáceas (Pohl, 2009).

### **1.6.1 Valores de referencia de metales tóxicos en miel de abejas**

Con el fin de asegurar el consumo seguro de la miel, es necesario determinar la presencia y concentración de metales pesados en la miel. La Normatividad de la Comunidad Europea, Codex Alimentarius y Resolución colombiana 1057 del Ministerio de Protección Social, al respecto especifican que para poder comercializar las mieles no deben contener metales pesados en concentraciones que puedan causar daño para la salud de los seres humanos. Entre los metales de mayor interés en la miel que constituyen un riesgo para el medio ambiente debido a su gran estabilidad química, se puede mencionar Cu, Zn, Cd, Pb, arsénico (As) y Hg (Chautá-Mellizo et al.).

Hoy en día no se conoce una legislación nacional o internacional completa que establezca los límites máximos de residuos para los metales tóxicos en miel de abejas y

otros productos apícolas. Actualmente se reportan esfuerzos aislados para establecer la normatividad en los países consumidores, principalmente.

**Tabla 1-8:** Valores de referencia para metales tóxicos en miel de abejas.

<b>METAL</b>	<b>NTC 1273 (mg/kg)</b>	<b>Reporte USDA (mg/kg)</b>	<b>Legislación Brasil (mg/kg)</b>	<b>Legislación Polonia (mg/kg)</b>
<b>Pb</b>	0,1	2	*	0,3
<b>Cu</b>	0,05	*	10	*
<b>Zn</b>	*	*	*	20
<b>Cd</b>	*	1	*	0,03
<b>Hg</b>	*	0,05	*	0,01

\* Valores no reportados

Fuente: Autor.

A pesar de los múltiples controles que existen para la comercialización de productos apícolas, actualmente la Unión Europea no ha especificado límites máximos de residuos para metales en algunos de ellos, por lo que se han sugerido algunos valores para Pb de 1 mg/kg y para Cd de 0,1 mg/kg (Bogdanov S., Haldimann M., Luginbühl W., & Gallmann P., 2007). En Colombia inicialmente han sido adoptados del Codex Alimentarius límites máximos de residuos en la miel de abejas para Cd y Pb, bajo la norma NTC 1273, por un valor de 0,05 mg/kg y 0,1 mg/kg, respectivamente, esta información se resume en la Tabla 1-8.

### 1.6.2 Determinación analítica de metales tóxicos

Para el análisis de metales tóxicos en productos de la colmena la espectrofotometría de llama es una herramienta sólida, ya sea, en modo de absorción (FAAS por sus siglas en inglés Flame Atomic Absorption Spectrometry) o de emisión (FOES por sus siglas en inglés Flame Optical Emission Spectrometry) con llama de acetileno/aire o acetileno/NO<sub>2</sub>. Sin embargo, el uso de equipo con horno de grafito (ETAAS por sus siglas en inglés Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry) o plasma acoplado inductivamente con una antorcha de 8000 °C (ICP-OES por sus siglas en inglés Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry) permiten obtener mejores resultados con respecto a límites de detección (Bogdanov S. et al.) (Bogdanov S. et al.) y de cuantificación (LC) (Pohl, 2009).

- **Preparación de la muestra**

Existen diversas metodologías para la mineralización de las muestras como la disolución de la miel en agua acidificada, la degradación de la materia orgánica por ácido nítrico concentrado y calcinación. La digestión húmeda es un método de pretratamiento de muestras ambientales ampliamente descrito. Su principio se basa en la descomposición de la matriz con ácidos concentrados (principalmente ácido nítrico) y con la adición de peróxido de hidrógeno como oxidante, seguido por calentamiento de la muestra en sistemas abiertos o cerrados (Vincenvica-Gae), con esto se logra alterar las sustancias orgánicas y liberar los metales de la compleja matriz de la miel, dejándolos en solución, lo cual es requisito para la adecuada cuantificación por absorción atómica, (llama, grafito horno) o las fuentes de excitación (ICP). Sin embargo, este tratamiento de la muestra consume bastante tiempo e incluye etapas que pueden ser fuentes potenciales de pérdida del analito debido a sobrecalentamiento o contaminación de la muestra por diversas fuentes dentro del procedimiento analítico (Pohl, 2009).

Tratando de superar este riesgo, algunos autores proponen la disolución y homogenización de la muestra de miel en soluciones de agua caliente seguidos por acidificación en ácido nítrico (Vincenvica-Gae) y realizar la cuantificación directa o realizar la mineralización por digestión ácida. Este tratamiento no altera la matriz orgánica de la miel ni los extractos de especies del metal. Además, que evita que variaciones en las propiedades físico-químicas de los soluciones estándar y de muestra, pero presenta numerosas interferencias físicas y químicas que pueden ocurrir en la llama o en el plasma. También elimina la probabilidad de acumulación de residuos carbonosos en las cabezas de los quemadores o de los nebulizadores de los espectrómetros usados (Pohl, 2009).

Sin embargo, por los métodos anteriormente descritos, cabe la posibilidad de sufrir pérdidas de algunos elementos volátiles a altas temperaturas como Cd, Ni, Pb y Zn, por lo cual la digestión húmeda con la ayuda de bombas de PTFE selladas como los recipientes de alta presión de los sistemas de digestión vía microondas, son recomendables para descomponer la miel, ya que parece ser más fiable que la incineración en seco o calcinación con aditivos como  $Mg(NO_3)_2$ ,  $NH_4NO_3$ . Además, la digestión de las muestras por esta vía reduce las posibilidades de contaminación de la

muestra al mismo tiempo que se disminuyen las cantidades de los reactivos y el tiempo de preparación. En este caso, las porciones de muestra pueden ser relativamente pequeños es decir de 0,2 a 2 g usando  $\text{HNO}_3$  concentrado y mezclas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en proporciones v/v de 1:1; 3:1; 4:1 o 5:1, o sólo  $\text{HNO}_3$  concentrado. Los digestos resultantes se diluyen con agua a 50 ml, 25 ml, 10 ml o 5 ml (Pohl, 2009) de acuerdo con el equipo instrumental disponible y los límites de detección y cuantificación alcanzados para esta matriz.

De acuerdo con lo anterior , para el desarrollo de este aspecto del proyecto, los metales tóxicos que se incluyeron corresponden a: Cu, Zn, Cd, Pby Hg (Ru et al., 2012).



## **2. Capítulo 2: Desarrollo, validación y evaluación de residuos de plaguicidas en muestras de miel de abejas procedentes de zonas de cultivos polinizados de fresa y cítricos**

En este capítulo se describen cada uno de los procesos realizados para el desarrollo del método analítico, para la detección y cuantificación de los residuos plaguicidas en estudio mediante cromatografía líquida ultrarrápida acoplada a espectrometría de masas.

Con el fin de demostrar que el método desarrollado cumple con el fin propuesto en este trabajo, también se describe con evidencia objetiva las características de desempeño y limitaciones propias del método con base en la validación tipo 2 realizada.

Finalmente, se realiza en muestras seleccionadas la validez del método desarrollado, mediante la evaluación de residuos de los plaguicidas en muestras de miel de abejas provenientes de zonas de cultivos polinizados de fresa y cítricos de los Departamentos de Cundinamarca y Meta.

### **2.1 Introducción**

El sector apícola enfrenta importantes retos productivos, causados por el efecto antrópico en los ecosistemas y el cambio climático. Hoy en día son necesarias políticas que visualicen este sector como fundamental al diseñar las estrategias de desarrollo agropecuario, ambiental, comercial, educativo y social. El vínculo de la apicultura y el desarrollo de los ecosistemas a nivel agrícola y pecuario, con los objetivos que persigue la producción de alimentos en cantidad, calidad, inocuidad, trazabilidad y sostenibilidad, es imprescindible para alcanzar la seguridad y soberanía alimentaria que requiere el país.

Una de las prácticas agrícolas de mayor impacto en el ecosistema, se relaciona con el control químico de plagas, el cual busca garantizar altos rendimientos de producción en los cultivos. Esta práctica, trae como principal consecuencia un aumento en la frecuencia y dosis de exposición de las abejas. Por lo anterior, la actual regulación para plaguicidas químicos no sólo está orientada a la protección del consumidor sino que también busca la protección de las abejas (Greenpeace, 2013), como principales polinizadores en la naturaleza.

## **2.2 Técnica analítica para determinación de residuos de plaguicidas**

Para el caso específico del análisis de muestras de miel, es reconocido que debido a la complejidad de esta matriz, es necesario realizar exhaustivos procesos de limpieza que permitan eliminar interferentes, por lo cual a nivel mundial se ha reportado diversos métodos para ello (Rial-Otero, 2007). Inicialmente, la mayoría de los procedimientos de preparación de la muestra se llevaban a cabo mediante técnicas convencionales, tales como la extracción líquida líquida (LLE). Sin embargo, hoy en día se reconocen enormes desventajas por ser métodos costosos que usan altas cantidades de solventes orgánicos, que son generalmente tóxicos para el analista y pueden contaminar el ambiente. Estas limitaciones han llevado al desarrollo de nuevas técnicas mucho más convenientes, que consumen menos solventes orgánicos y tienen la capacidad de detectar analitos en concentraciones muy bajas. En los últimos años, los esfuerzos en el campo de la química analítica se han concentrado en la capacidad analítica a nivel microescala en donde la preparación de la muestra está asociada con una mayor selectividad y sensibilidad (Tette, Guidi, de Abreu Glória, & Fernandes, 2016).

En este estudio se propuso el desarrollo del método para el análisis de 56 plaguicidas, dentro de los que se encuentran moléculas organofosforadas, organonitrogenadas, azoles, triazinas, carbamatos, benzimidazoles, entre otros, mediante modificaciones al método QuEChERS.

El método original "QuEChERS" ( $MgSO_4$  y NaCl, no tamponado) es el más simple y funciona adecuadamente; sin embargo, es importante elegir los métodos tamponados (AOAC 2007.01) que emplea  $MgSO_4$  y acetato de sodio, y EN 15662 que combina

MgSO<sub>4</sub>, cloruro sódico, citrato tribásico de sodio dihidrato y citrato de sodio dibásico sesquihidrato) al analizar compuestos que son afectados por el pH del medio. Los métodos tamponados facilitan el control del pH durante la fase de extracción y optimizan la recuperación de los plaguicidas sensibles a los valores de pH.

El método QuEChERS consiste es un sistema de extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) que implica dos etapas fundamentales, una primera etapa de extracción simple seguida de una fase de limpieza del extracto mediante extracción en fase sólida por dispersión.

En la primera etapa, se realiza una extracción con un disolvente orgánico, generalmente acetonitrilo, en presencia de diferentes sales. Las sales que pueden ser empleadas en esta etapa son el sulfato de magnesio, el cloruro sódico, el citrato tribásico de sodio dihidrato y citrato de sodio dibásico sesquihidrato. La función de cada una de estas sales en la etapa de extracción es diferente, y por tanto deben ajustarse a la matriz en estudio:

- Sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>) mejora la recuperación del analito al facilitar la partición de los pesticidas en la fase orgánica (acetonitrilo) por retener agua.
- Cloruro sódico (NaCl) ayuda a controlar la polaridad favoreciendo la separación de fases entre el contenido de agua y la orgánica.
- Acetato de sodio actúa a la regulación del pH.
- Sales de citrato se emplean para ajustar del pH a valores de 5,5 donde se extraen la mayoría de los componentes ácidos y básicos de la muestra.

La segunda etapa corresponde a una limpieza o “clean- up” del extracto mediante la extracción en fase sólida dispersiva. Este paso facilita la eliminación del agua residual y de los compuestos presentes en la matriz del alimento que podrían provocar interferencias en el análisis, como los lípidos, azúcares, ácidos orgánicos y pigmentos. Las sales y sorbentes empleados en esta fase pueden ser:

- Sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>): elimina el exceso de agua residual.
- Amina primaria/secundaria (PSA): elimina ácidos orgánicos, ácidos grasos, azúcares y pigmentos de antocianina.
- Sorbente C18: elimina grasas, esteroides y otras interferencias no polares de la muestra.

Posteriormente, una vez se cuente con el extracto limpio, debe considerarse la etapa de cuantificación y de confirmación, si es el caso, mediante técnicas analíticas acorde con el análisis de residuos y la normatividad vigente.

Por esta razón la técnica cromatográfica y su detección tiene especial importancia en el análisis y cuantificación de los plaguicidas a nivel de trazas. Así, mediante cromatografía HPLC, usando distintos tipos de detectores, puede resultar complicado si los compuestos interaccionan entre sí o con la columna. Estas interacciones pueden causar una resolución pobre y/o picos asimétricos que dificultan la integración y cuantificación. Por su estructura es común que los plaguicidas no presenten grupos cromóforos o fluorescentes para ser determinados mediante cromatografía líquida de ultravioleta (LC-UV) o cromatografía líquida con fluorescencia (LC-FD), o presentan una polaridad muy elevada y no pueden retenerse correctamente en la columna de LC utilizada. (Botero, 2016)

Inicialmente, los detectores usados en LC no aportaban información sobre la estructura del compuesto. Se trataba de detectores convencionales como UV-VIS, barrido de diodos o fluorescencia. Con el acoplamiento LC-MS la técnica tuvo dificultades instrumentales por los problemas que supone la introducción directa de elevados flujos de fase móvil del sistema LC en el detector MS, el cual requiere trabajar en condiciones de alto vacío. En este caso, se hizo necesaria una interfase que regulara las condiciones físicas (presión, temperatura, etc...) en las que se opera en LC y MS., finalmente, se lograron desarrollar interfases robustas que trabajaran a presión atmosférica (APIs), bien como electrospray (ESI) o en modo de ionización química (APCI). Ambas interfases son las más utilizadas en la actualidad y permiten abordar la determinación de analitos ionizables tanto en modo de ionización negativo como positivo (Botitsi, 2011, Picó, 2006, Soler, 2008 en Botero, 2016).

Posteriormente, con el fin de mejorar la selectividad y especificidad en la separación y detección estos compuestos, se ha optó por disminuir el tamaño de partícula de la fase estacionaria, lo que obligó a utilizar sistemas capaces de soportar las altas presiones generadas al fluir la fase móvil a través de la columna. Así, dependiendo del tamaño de partícula que contiene la fase estacionaria, se puede distinguir entre cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con partículas de 10  $\mu\text{m}$  a 3  $\mu\text{m}$ , cromatografía líquida ultrarrápida (UFLC) con tamaño de partícula de hasta 2  $\mu\text{m}$  y cromatografía líquida de

ultra resolución (o ultra presión) (UHPLC), con partículas menores a 2  $\mu\text{m}$ , con el resultado de cromatogramas más cortos y picos más estrechos y altos, con mejor relación señal/ruido (S/N), acortando además el tiempo de análisis y mejorando la sensibilidad.

Estas técnicas (UFLC y UHPLC) son capaces de detectar compuestos con límites de cuantificación más bajos. Además son más respetuosas con el medio ambiente, ya que en este tipo de cromatografía se reduce el volumen de los disolventes usados comparados con HPLC.

De acuerdo con lo anterior, el método por el cual han optado diferentes investigadores, corresponde a un método muy efectivo y confiable conocido como método QuEChERS modificado. Aunque este método resulta ser una excelente alternativa cuando se dispone de analizadores de masas en tándem, al emplear detectores como un espectrómetro de masas con un cuadrupolo sencillo, se reduce el tiempo de análisis hasta en un 75% con respecto al HPLC, alcanzando los niveles de especificidad y selectividad necesarios para un alto número de compuestos, pues la cantidad de interferentes puede limitar el análisis multirresiduo. (Rodríguez, D et al 2014, Orso D. et al 2014).

En este sentido, y de acuerdo con la tecnología disponible, este trabajo tiene como objetivo desarrollar un método para la determinación de plaguicidas seleccionados de diferentes familias químicas, mediante el empleo de UFLC acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupólo simple y su correspondiente validación de nivel 2 la cual consiste en evaluar: selectividad, exactitud, linealidad, límites de detección y límites de cuantificación (Peters, Drummer, & Musshoff, 2007).

## 2.3 Muestreo

En este estudio un total de 62 mieles fueron recolectadas en los años 2012 y 2013 de cultivos de cítricos y fresas polinizados con abejas *Apis mellífera* en la zona rural de los departamentos de Meta y Cundinamarca. Se recolectaron 27 muestras de miel en los apiarios ubicados en cultivos de cítricos del departamento del Meta en 5 apiarios en momentos diferentes (C1 a C5) y 35 mieles recolectadas en cultivos de fresa del departamento de Cundinamarca, agrupadas en 6 apiarios en momentos diferentes (F1 a F6). Los dos grupos de muestras fueron recolectados incluyendo réplicas de un mismo

apiario de acuerdo con el número de colmenas disponibles. La tabla 2-1 describe las características del muestreo y la selección de muestras para su evaluación de contaminantes.

El muestreo fue realizado en marco del Proyecto *“Efecto de factores genéticos, medio ambientales y de manejo sobre la calidad y la producción de miel y polen en cinco cultivos frutícolas promisorios exportables de Colombia”* desarrollado por CORPOICA y financiado por Colciencias.

**Tabla 2-1.** Características del muestreo de mieles de cultivos de cítricos y fresa y selección de muestras para evaluación de contaminantes.

Apiario	Fecha	Réplica	Evaluación Plaguicidas	Evaluación Metales tóxicos	Apiario	Fecha	Réplica	Evaluación Plaguicidas	Evaluación Metales tóxicos
C1	Dic/2012	R1	❖	X	F1	Nov/2012	R1	❖	X
		R2	❖	X			R2	❖	X
		R3	❖	X			R4	❖	X
		R4	❖	X			R5	❖	X
		R5		X			R6	❖	X
C2	Dic/2012	R1	❖	X	F2	Nov/2012	R10		X
		R2	❖	X			R1	❖	X
		R3	❖	X			R2	❖	X
		R4	❖	X			R3	❖	X
		R5		X			R4	❖	X
C3	Ene/2013	R1	❖	X	F3	Feb/2013	R5	❖	X
		R2	❖	X			R6		X
		R3	❖	X			R7		X
		R4		X			R1	❖	
		R7		X			R2	❖	X
C4	Jun/2013	R1	❖	X	F3	Feb/2013	R4	❖	
		R2	❖	X			R5	❖	X
		R3	❖	X			R6		X
		R4	❖	X			R7		X
		R5	❖	X	F4	Feb/2013	R1	❖	
		R7		X			R2	❖	X
		R9		X			R3	❖	X
C5	Oct/2013	R1	❖	X	F5	Jul/2013	R4	❖	
		R5	❖	X			R1	❖	X
		R6		X			R2	❖	X
		R7		X			R3	❖	X
Resumen análisis de muestras			Plaguicidas	Metales tóxicos					
Subtotal muestras cítricos evaluación			18	27	F6	Jul/2013	R4	❖	X
Subtotal muestras fresa evaluación			26	30			R1	❖	X
Total muestras (62)			45	56			R2	❖	X
							R3	❖	
							R4	❖	X
					R6		X		
					R10		X		

❖ Muestras de mieles en las que se evaluaron plaguicidas

X Muestras de mieles en las que se evaluaron metales pesados

Cada una de las unidades experimentales apícolas fueron ubicadas dentro de los cultivos con polinización dirigida con abejas *Apis mellifera* y se tomaron muestras en varias cosechas con el objetivo de evaluar la posible contaminación de miel de abejas, debido al entorno del cultivo.

Las zonas de los cultivos de cítricos pertenecen al piedemonte mixto llanero con terrazas originadas de sedimentos aluviales, en esta zona el clima fluctúa entre cálido, muy húmedo y húmedo; los suelos son profundos, de texturas moderadamente finas a finas, bien drenados, muy fuertes a extremadamente ácidos, con fertilidad baja y presentan toxicidad por aluminio (Vásquez Romero et al., 2011).

De igual manera, en la Tabla 2-2, se describen las especies botánicas identificadas como fuente alimenticia para las abejas en la zona de estudio.

**Tabla 2-2.** Especies botánicas identificadas como fuente de alimento para las abejas en cultivos de cítricos del Meta.

FUENTE	PIDEMONTE LLANERO	PLANICIE ALUVIAL
<b>NÉCTAR</b>	a) 27,6% de especies frutales para comercialización como la naranja valencia ( <i>Citrus sinensis</i> ), tangelo mineola ( <i>Citrus reticulata x Citrus paradisi</i> ), mandarina arrayana ( <i>Citrus reticulata</i> ) y el limón común ( <i>Citrus limonium</i> ), con dos épocas de floración al año.	20% de especies frutales para comercialización como la naranja valencia ( <i>Citrus sinensis</i> ), mandarina arrayana ( <i>Citrus reticulata</i> ), el limón común ( <i>Citrus limonium</i> ) y limón tahití ( <i>Citrus aurantifolia</i> ), con dos épocas de floración al año.
	b) Un 6,9% de especies arbustivas como el flor amarillo ( <i>Diplotaxis tenuifolia</i> ) y el mastranto ( <i>Hyptis suaveolens</i> ), con dos épocas de floración.	Un 15% de especies usadas para el consumo en las empresas como el banano ( <i>Musa paradisiaca L.</i> ), el arazá ( <i>Eugenia stipitata</i> ), el chontaduro ( <i>Bactris gasipaes Kunth</i> ) y flor amarillo ( <i>Diplotaxis tenuifolia</i> ), con dos épocas de floración al año.
	c) Un 6,8% de especies arbóreas, como la tiatilia (spp.) y el cucharo ( <i>Clusia discolor</i> ), con dos épocas de floración.	
	d) Un 3,4% de las especies son forrajeras, como el matarratón ( <i>Gliricidia sepium</i> ), con dos épocas de floración entre los meses de enero, abril a mayo, agosto a diciembre, la cual es una floración media; y durante los meses de febrero a marzo, junio a julio, la cual es la mayor floración.	

Fuente: (Vásquez Romero et al., 2011).

Para el caso del cultivo de fresa las muestras se colectaron de 6 apiarios en cultivos de fresa con polinización dirigida con abejas *Apis mellifera*, localizados en el Departamento de Cundinamarca.

Las zonas de los cultivos de fresa corresponden a relieve montañoso, afectado en sectores por erosión hídrica ligera y moderada, el clima es frío húmedo, los suelos van de profundos a superficiales, moderadamente drenados y fertilidad de moderada a alta (Vásquez Romero et al., 2011).

En relación a las especies botánicas identificadas en este proyecto y su uso alimenticio para las abejas, la Tabla 2-3 describe las especies fuente de néctar en cultivos de fresa.

**Tabla 2-3.** Especies botánicas identificadas en Cundinamarca como fuente de alimento para las abejas en cultivos de fresa.

FUENTE	ESPECIES BOTÁNICAS
NÉCTAR	a) 12,1% fueron catalogadas como 'malezas' entre las que se destacan la gualola ( <i>Polygonum spp.</i> ), diente de león ( <i>Archicoria amarga</i> ), lengua de vaca ( <i>Verbesina punctata</i> ) y chilco ( <i>Sapium jamaicense</i> ); con épocas de floración diferentes durante el año.
	b) 6,1% son fuentes forrajeras tales como el trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ) y trébol blanco ( <i>Trifolium repens</i> ) con floraciones durante todo el año.
	c) 3,0% es clasificado por los productores como barbecho, el nabo forrajero ( <i>Raphanus sativus</i> ), con floración durante todo el año.
	d) 3,0% son especies aromáticas como el romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ), con épocas de floración durante todo el año.

Fuente: (Vásquez Romero et al., 2011).

El análisis de composición y calidad fisicoquímico de estas muestras de miel fue realizado en Laboratorio de Análisis Fisicoquímico del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos ICTA de la Universidad Nacional de Colombia, las metodologías, técnicas empleadas y los resultados fueron descritos en el proyecto CORPOICA "**Efecto de factores genéticos, medio ambientales y de manejo sobre la calidad y la producción de miel y polen en cinco cultivos frutícolas promisorios exportables de Colombia**", concluyendo que las mieles colectadas se encuentran dentro de los

parámetros de caracterización fisicoquímica admitidos en la Norma Técnica ICONTEC 1273 y la normatividad Internacional.

Las muestras fueron almacenadas en frascos de vidrio, bajo condiciones de congelación hasta su procesamiento analítico, la evaluación de residuos de plaguicidas y metales tóxicos, fueron realizados en el Laboratorio de Inocuidad Química del Centro de Bio-Sistemas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano.

## 2.4 Materiales y métodos

### ▪ ***Materiales de referencia, reactivos y soluciones***

Se trabajó con estándares de plaguicidas de pureza mayor al 95%, proveniente de las casas comerciales Dr. Ehrenstorfer y Chemservice. Las soluciones madre fueron preparadas en concentraciones cercanas a 500 µg/mL en acetonitrilo o metanol y almacenadas en frascos ámbar a -20 °C. La mezcla de plaguicidas se preparó en metanol, tomando diferentes volúmenes de cada una de las soluciones madre hasta obtener un rango de concentraciones entre 0,64 y 9,95 µg/mL. Esta solución se almacenó en frasco ámbar a -20 °C. Los solventes empleados en este estudio fueron J.T. Baker grado HPLC. Para los ensayos de extracción se utilizaron sales de QuEChERS Restek Q-Sep TM y para la limpieza de los extractos se emplearon los adsorbentes Restek dSPE Q-Sep TM. Se empleó como estándar subrogado trifenilfosfato (TPP) y como estándar interno (E.I.) tributil fosfato (TBP)).

### ▪ ***Mieles de partida***

Para el desarrollo del método, se emplearon 4 mieles obtenidas de apiarios experimentales y mieles comerciales. Todo el material fue analizado antes y durante todo el proceso de desarrollo del método analítico, con el propósito de asegurar que no se tuviera presencia de ninguno de los plaguicidas estudiados, así como de controlar los procesos de contaminación cruzada.

### ▪ ***Método inicial de extracción de plaguicidas para el desarrollo de la etapa***

Para realizar el desarrollo del método, se partió del método QuEChERS AOAC 2007.01 (Anastassiades, et al., 2003) para mieles; para ello en un tubo de centrifuga se pesaron

5 g de muestra, se adicionó TPP (fosfato de trifenilo) y la mezcla de plaguicidas (concentraciones entre 0,10  $\mu\text{g/ml}$  y 5,0  $\mu\text{g/mL}$ ). Se dejó en reposo por 15 min y, transcurrido ese tiempo, se adicionaron 10 mL de agua y 10 mL de acetonitrilo. Se agitó de manera manual por 1 min y posteriormente, se adicionaron 4,0 g de  $\text{MgSO}_4$  anhidro y 1,0 g de AcONa, nuevamente se agitó manualmente por 1 min. Después de esto, se centrifugó a 6000 rpm por 5 min y, se tomaron 10 mL del sobrenadante, los cuales se transfirieron a un tubo de centrifuga de 15 mL. Para el proceso de limpieza, por cada mililitro de extracto se adicionaron 25 mg de PSA (amina primaria/ secundaria) y 150 mg de  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se agitó manualmente por 30 s y se centrifugó por 2 min a 6000 rpm. Se tomaron 5 mL de extracto y se concentraron con un flujo de nitrógeno hasta llevar a casi sequedad, posteriormente se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  del EI y se reconstituyó con 1 mL de una mezcla Agua-ACN( 7:3). Finalmente, el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  de PTFE, se transfirió a un vial de cromatografía (Anastassiades, Lehotay, Štajnbaher, & Schenck, 2003). Durante el desarrollo del método, en todos los experimentos se realizaron un mínimo de cinco réplicas.

#### ▪ **Calibración analítica y análisis de datos**

Previo a la cuantificación de cada analito, se realizó un proceso de evaluación de efecto matriz, mediante la comparación de la pendiente de la curva de calibración de cada plaguicida en solvente y en matriz, en la cual se encontraron porcentajes de efecto matriz entre el 69% al 130%, lo cual concuerda con estudios previos (D. Ahumada & Guerrero, 2010; D. A. Ahumada, Rodríguez, et al., 2012); lo anterior indicó la necesidad de realizar los diferentes niveles de calibración en blancos de matriz. Para el caso de los ensayos de recuperación se cuantificó con un solo punto de calibración, de acuerdo a las recomendaciones del documento SANTE. Para la evaluación de la linealidad del sistema, se prepararon las curvas de calibración de las dos mezclas de plaguicidas en blanco de matriz y estas estaban compuestas por 6 puntos de calibración, donde cada uno de ellos se inyectó 4 veces en el sistema analítico, los puntos se distribuyeron equidistantemente. Todos los análisis estadísticos se realizaron a través del paquete estadístico R Commander a un nivel de confianza del 95%.

- **Validación del sistema de medición**

Con el fin de demostrar que el sistema de medición funciona adecuadamente para el propósito, se realizó una validación de nivel 2. Para la evaluación de la exactitud del método, como recuperación y precisión en condiciones de repetibilidad y de precisión intermedia, se fortificaron muestras de miel a tres niveles de concentración. El primer nivel (LC) correspondía al límite máximo de residuos, una concentración inferior a este o en su defecto concentraciones cercanas a 10 µg/kg. El segundo y tercer nivel de fortificación correspondieron a 2 y 5 veces el primer nivel (LC).

## 2.5 Instrumentos y equipos

- **Condiciones cromatográficas**

El análisis cromatográfico fue llevado a cabo en un cromatógrafo líquido ultra rápido (UFLC por sus siglas en inglés Ultra Fast Liquid Chromatograph) Shimadzu Prominence (Maryland, CA, EUA), acoplado a un detector selectivo de masas LCMS-2020. Los análisis fueron llevados a cabo en una columna Shim Pack (6 cm x 2 mm d.i., tamaño de partícula de 2,2 µm y fase estacionaria C18), se trabajó en modo de gradiente con ácido fórmico al 0,10% (v/v) y acetato de amonio 5 mM en agua Milli-Q (A), la fase orgánica empleada fue acetonitrilo. (B). El programa de elución utilizado expresado como porcentaje de B, inicia a 0% (0 min) aumenta a 20% en 0, 10 min, posteriormente llega hasta 25% a los 0,30 min y luego aumenta hasta el 100% en los siguientes 10 min, finalmente se mantiene por 0,20 min. Para restituir la fase móvil a la condición inicial del análisis se programa de 100% a 0% de B en 2 min donde se mantiene por 5 min para equilibrar la columna. La adquisición de los datos se realizó durante los primeros 8 min. El volumen de inyección fue 5,0 µL, la temperatura de columna 40 °C y el flujo de fase móvil 0,30 mL/min. (Ahumada, et al., 2012, Ahumada, et al.,2014)

- **Condiciones de la interfaz y espectrómetro de masas**

Con el propósito de obtener una mejor sensibilidad, para la identificación y cuantificación de los 56 plaguicidas propuestos en el estudio, el estándar interno (TBP) y el estándar subrogado (TPP), se trabajó con dos métodos de adquisición independientes. Aunque las condiciones cromatográficas fueron las mismas, las condiciones de la interfaz y del

espectrómetro si variaron. En este sentido, el equipo operó en modo electrospray ( ESI ), con un flujo de gas de secado de 10 L/min y un flujo de gas nebulizador de 1,5 L/min, las temperaturas del bloque de calentamiento y de la línea de eliminación del solvente correspondieron a 200 °C para el primer método de adquisición y 250 °C para el segundo (Ahumada et al., 2011, Ahumada et al., 2012 ).

**Tabla 2-4.** Iones de cuantificación (T) para los compuestos estudiados y tiempos de retención para los dos métodos de adquisición empleados.

MÉTODO 1			MÉTODO 2		
Compuesto	t <sub>retención</sub> ( min )	Ion T ( m/z )	Compuesto	t <sub>retención</sub> ( min )	Ion T ( m/z )
Acefato	2,6	201	Metamidofos	2,5	142
Monocrotofos	2,8	241	Propamocarb	2,6	189
Oxamil	2,9	237	Dinotefuran	2,7	203
Metomil	3,06	163	Linuron	2,7	-247
Carbendazim	3,2	192	Nitenpiram	2,8	271
Imidacloprid	3,5	-254	thiametoxan	3,0	292
Dimetoato	3,6	230	dazomet	3,0	163
Tiabendazol	3,2	202	mevinphos	3,2	225
Cimoxanil	3,9	-197	3-OH carbofuran	3,2	255
Tiodicarb	4,8	355	Acetamiprid	3,3	223
Carbofuran	4,8	222	Tiacloprid	3,7	-297
Atrazina	5,2	216	Dinotefuran	2,7	203
Metalaxyl	5,3	280	Simazina	4,1	202
Pirimicarb	4,8	239	Carbaryl	4,6	219
Imazalil	4,7	297	Isoprocarb	5,9	235
3,4-dicloropropilanilida	5,9	-216	Ametrina	6,2	269
Pirimetanil	6,03	200	Tridemoph	6,6	298
Dimetomorf	5,9	390	Epoconazole	6,7	330
Azosistrobin	6,5	404	Fenexhamid	7,8	-300
Tebuconazol	6,8	308	Etoprofos	7,8	284
Metoxyfenozida	6,9	369	Flusilazole	7,9	357
Hexaconazol	7,0	-358	Penconazol	8,1	325
Espinosad A	6,3	733	Piraclistrobin	9,8	388
Benalaxil	7,7	326	Trifloxistribina	9,2	409
Difenoconazol	7,7	408	Lufenuron	9,4	-509
Azinfos Metil	7,8	368	Buprofezin	9,9	306
Espinosad D	6,5	747	Clorfenaprid	7,7	-349
Indoxacarb	8,3	528	Temefos	9,7	467

NOTA: los signos (-) en los iones representan que se realizó la detección en modo negativo

Los análisis fueron llevados de manera simultánea en modo positivo y negativo, el voltaje aplicado en el capilar correspondió a 4500 V y -4500 V respectivamente. Todos los análisis fueron realizados en modo SIM, la Tabla 2-4 muestra los iones seleccionados para la cuantificación, y el tiempo de retención de cada compuesto, las tres primeras columnas muestran las condiciones para el método de adquisición 1, mientras que las tres últimas columnas son para el método de adquisición 2. Estos compuestos, fueron seleccionados acorde con la legislación nacional e internacional (Unión Europea. Reglamento (CE) No 396/2005), el nivel de afectación a las abejas, su uso en Colombia, sensibilidad en el instrumento y la disponibilidad del material de referencia para la calibración del instrumento.

## 2.6 Resultados y discusión

El método QuEChERS presenta dos versiones, que son reconocidas como métodos oficiales para el análisis de residuos de plaguicidas. La primera corresponde al método de partida AOAC 2007.01 (Anastassiades, et al., 2003), en la cual se hace uso de unas sales de acetato de sodio para realizar el control de pH en el proceso de extracción; la segunda versión del método considera el uso de sales de citrato y corresponde a la versión europea del método EN 15662 (Anastassiades, y Tasdelen, 2007). De esta manera, con el propósito de determinar cuál método es el más adecuado, en el presente trabajo se evaluaron los dos métodos en lo referente a:

- Cantidad de muestra y su relación con el solvente de extracción.
- Sistema de amortiguación de pH
- Estrategias para la adición de sales pH de disolución amortiguadora.
- Adsorbentes de limpieza de extractos

### 2.6.1 Estudio de la relación cantidad de muestra / solvente de extracción

Con el objetivo de obtener límites de cuantificación acordes con la legislación existente para mieles (Unión Europea. Reglamento (CE) No 396/2005) se partió del método

europeo (citratos) y se realizaron ensayos en los que se incrementaron la cantidad de muestra desde 3 g hasta 10 g y se disminuyó la cantidad de solvente desde 10 mL hasta 5,0 mL. En estos ensayos se encontró que los porcentajes de recuperación de varios compuestos, como metalaxil, acefato, oxamilo, entre otros, disminuyó notablemente. Asimismo, la cantidad de interferencias que se obtuvieron al incrementar la relación cantidad de muestra/solvente de extracción impidió la detección adecuada de varios compuestos. En este sentido, como parte del desarrollo del método y en vista de los resultados obtenidos en esta primera etapa se decidió trabajar con 5 g de muestra y 10 mL de solvente orgánico e incluir una etapa de concentración de la muestra.

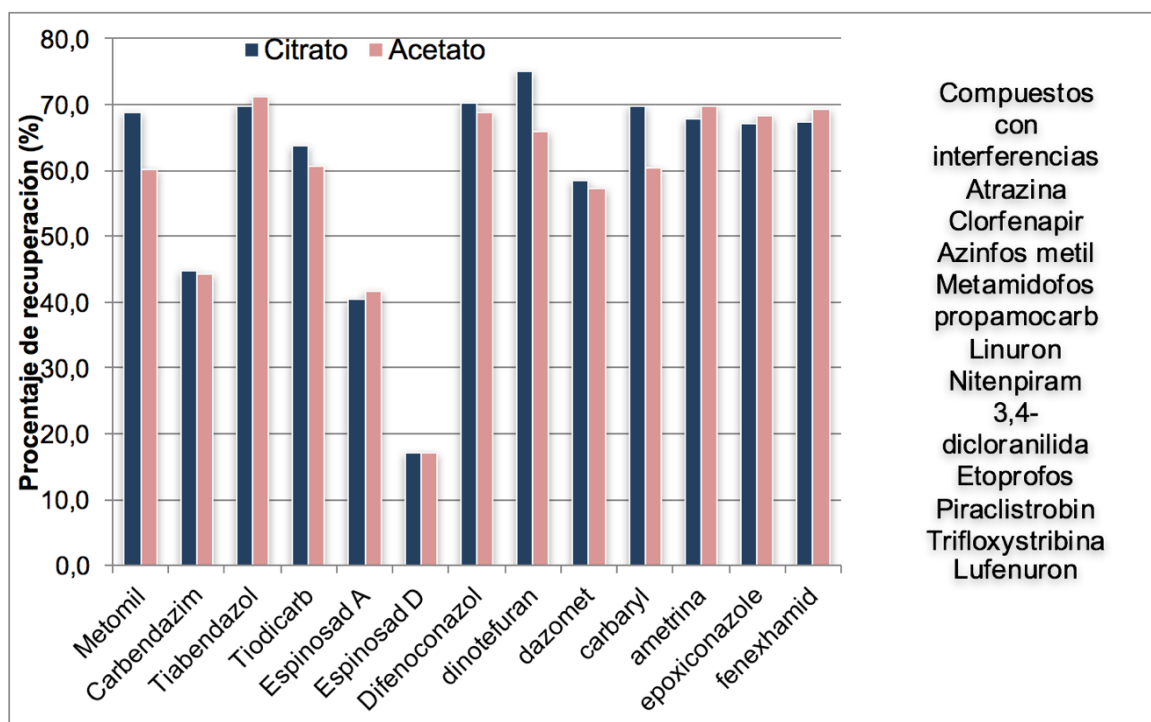
### **2.6.2 Selección del sistema de amortiguación de pH**

Los resultados mostraron que mediante el método del acetato, 14 compuestos presentaron interferencias que impidieron realizar la integración de las señales cromatográficas, para el caso del método del citrato se presentaron 13 interferencias. Lo anterior implica, que debido a una baja selectividad de los métodos no es posible la cuantificación de cerca del 24% de los compuestos bajo estudio. La Figura 2.1, muestra los compuestos para los cuales se tuvo interferencias y una recuperación inferior al 70% en al menos uno de los métodos. De otra parte, los compuestos restantes presentaron recuperaciones entre el 70 % y el 120 %, recuperación que se considera aceptable para este tipo de determinaciones (SANTE/11945, 2015).

Se realizó un análisis de varianza, con el propósito de evaluar si existen diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ), sin embargo los resultados no fueron del todo concluyentes, pues para la mayoría de los casos no se presentan diferencias significativas entre los sistemas evaluados, pero al comparar con los criterios de la Unión Europea si se observan diferencias. Por ejemplo, para dinotefuran se encontró una probabilidad de aceptar  $H_0$  mayor a 0,05, es decir no hay diferencias significativas, pero al observar la Figura 2-1, se encuentra que para el caso del citrato este compuesto cumple con lo establecido por la Unión Europea. Por este motivo, los análisis estadísticos se omitieron en este estudio y todos los resultados y discusión se centra en lo establecido en los criterios de la Unión Europea para este tipo de métodos analíticos.

Como se observa en la Figura 2-1, existen casos críticos en los que la recuperación se encuentra por debajo del 50%, por ejemplo Espinosad (A y D) y Carbendazim. Los

demás compuestos aunque su valor es inferior al 70%, presentan valores de recuperación muy cercanos a este valor. Por otro lado, en la evaluación de las precisiones de cada uno de los métodos, se encontró que mediante el método del acetato, se presentaron coeficientes de variación superiores al 15% en 11 casos, mientras que para el método del citrato se encontraron 8 casos. El método europeo mostró una mejor exactitud, lo cual se refleja en mejor selectividad, mayor número de compuestos con recuperación aceptable y menor dispersión en los resultados.

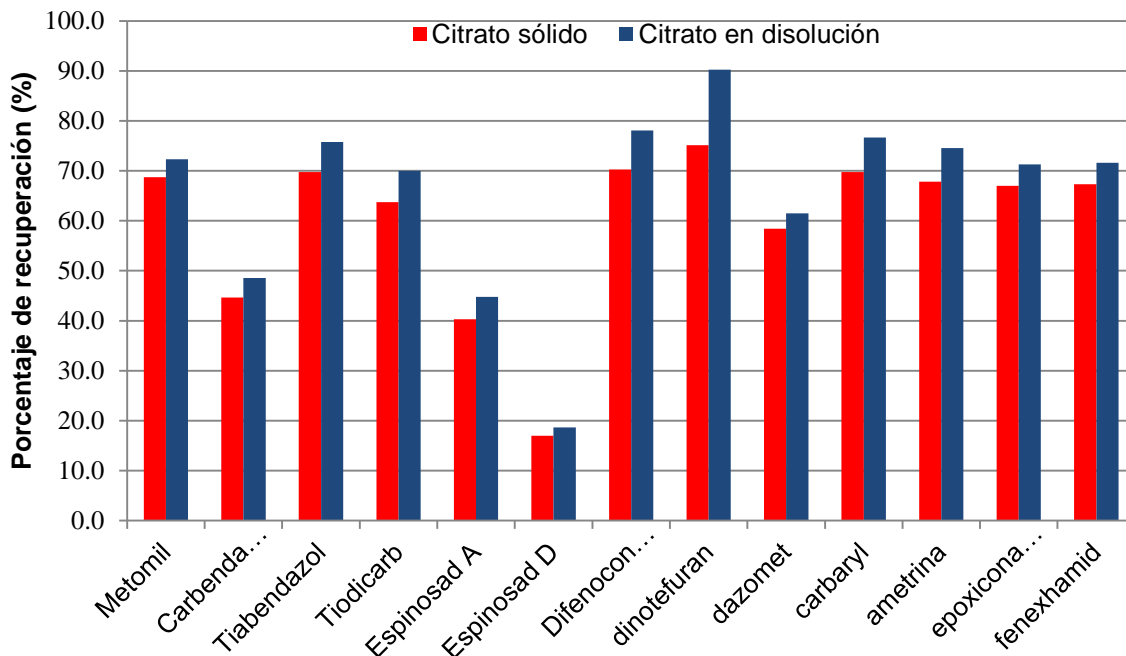


**Figura 2-1.** Comparación de los porcentajes de recuperación al emplear acetato o citrato como sal de control de pH y otros compuestos con interferencias.

Los resultados indicaron, que para el caso de los plaguicidas en estudio y en la matriz de interés, se encontró que al realizar la extracción con las sales de citrato resulta más conveniente. Sin embargo, es de resaltar que la versión europea del método, adicional a las sales de citrato, se incluye la adición de NaCl, lo cual incrementa la fuerza iónica y por consiguiente mejora la transferencia de los analitos a la fase orgánica. En vista de estos resultados, se decidió trabajar con este sistema amortiguador de pH.

### 2.6.3 Adición de las sales

El método original indica que la adición de las sales de citrato, el NaCl y el  $MgSO_4$ , se realizan una vez se ha adicionado el agua a la miel y esta mezcla se ha homogenizado. En este proceso, se observó que las sales se aglomeraban y la dispersión de estas a través de la mezcla de extracción (miel-agua-acetonitrilo), no era sencilla de realizar. Adicionalmente, el calentamiento que ocurría debido a la hidratación del sulfato de magnesio era bastante significativo. Por lo cual, se decidió disolver las sales de citrato y cloruro de sodio, para realizar su adición junto con el agua, es decir en lugar de adicionar sólo agua para el proceso de homogenización de la sal, se adicionaron 10 mL de una solución amortiguadora de citratos (pH = 6,8), la cual tenía la cantidad de sales equivalente al método QuEChERS, a excepción del  $MgSO_4$ . Posterior a esta adición, se realizó una homogenización de la mezcla, se adicionó el acetonitrilo y se realizó la extracción con agitación por 10 min en un vórtex, luego se destapó el tubo y se realizó la adición del  $MgSO_4$ , para continuar con agitación con la mano. Algunos de los resultados obtenidos a través de estas modificaciones se presentan en la Figura 2-2.



**Figura 2-2.** Comparación del modo de adición de las sales de citrato para el control del pH en la extracción de plaguicidas en miel.

La Figura 2-2, muestra que para 8 de los 12 compuestos que no se recuperan con el método tradicional, se logran obtener porcentajes superiores al 70%, lo cual indica que el sesgo del método disminuyó. Sin embargo, de acuerdo a los resultados mostrados en la Figura 2-2, se encuentra que carbendazim, tiodicarb, dazomet y espinosad (A y D) siguen presentando porcentajes de recuperación bajos.

La mejora en la recuperación se atribuye a varios factores, por un lado, el proceso de extracción se realiza sin la presencia del sulfato de magnesio, en la mezcla de la miel, la disolución amortiguadora y el acetonitrilo obtienen una mejor homogenización, sumado a que no existen procesos de calentamiento, por la adición del sulfato de magnesio en el momento de la extracción. De otra parte, al adicionar la disolución amortiguadora, se cree se tiene un mejor control del pH al ser una mezcla homogénea, lo que optimiza la migración de los plaguicidas hacia el acetonitrilo, mientras que si se agregan las sales de citrato directamente a la miel, sólo hasta que se disuelva la totalidad de estas sales en la mezcla de miel-agua se logra el control del pH, debido a que la viscosidad de la miel no facilita obtener una solución homogénea en un periodo corto de tiempo. Sumado a lo anterior, al realizar la adición del sulfato de magnesio a la mezcla, el calor liberado parece disiparse más rápidamente, pues si bien se forma la aglomeración del método original, esta es más fácil y rápida de disolver a través de la agitación manual. Se cree que el uso del vórtex también contribuye al aumento de los porcentajes de recuperación pues, por un lado facilita la transferencia de masa del analito hacia la fase orgánica y por otro se aplica durante un mayor tiempo, lo que garantiza que exista una migración mas eficiente de los componentes de la matriz solubles hacia la fase acuosa, disminuyendo los posibles interferentes durante la cuantificación; de hecho como se mostrará posteriormente, la recuperación y precisión del método mejoran.

Finalmente y como era de esperar, las modificaciones realizadas al método no redujeron la cantidad de compuestos con interferencias, es decir con este método se obtuvo el mismo número de compuestos que no se pudieron determinar debido a problemas de selectividad. Inclusive, en los perfiles cromatográficos obtenidos para los blancos con el uso de este método, se observó una mayor cantidad de ruido en comparación con el método original. Lo anterior es atribuido a las modificaciones realizadas, pues junto con los analitos existe una mayor cantidad de compuestos de la matriz que se coextraen. De acuerdo a los resultados mostrados en la Figura 2-2, se encuentra que las

modificaciones realizadas al método mejoran sus condiciones de manera notable, de tal manera que se procedió el siguiente paso para el desarrollo del método.

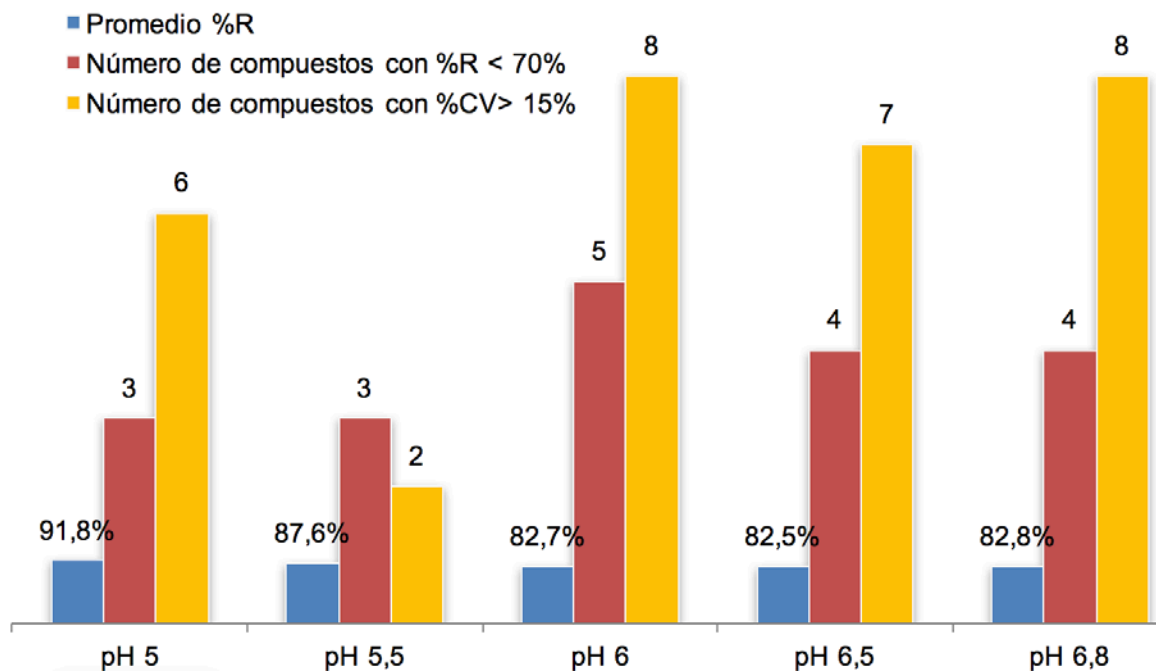
#### **2.6.4 pH de disolución amortiguadora**

En diferentes trabajos se encuentran estudios relacionados con la influencia del pH sobre la recuperación de algunos compuestos. Sin embargo, en todos los estudios se menciona el término “pH aparente”, pues esta magnitud es medida en acetonitrilo y no en una solución acuosa (Anastassiades, y Tasdelen, 2007). En este sentido y acordes con la instrumentación y materiales de referencia con los que se cuenta para la calibración de los instrumentos de pH, se optó por evaluar la influencia del pH de la disolución de amortiguación sobre la exactitud de los analitos, para ello se ajustaron las disoluciones con ácido fórmico a 4 diferentes valores de pH, la Figura 2-3 muestra un resumen de los resultados obtenidos, allí se presentan el promedio de recuperación de todos los compuestos, el número de compuestos que tienen porcentajes de recuperación inferiores a 70% y el número de compuestos para los que el método no es preciso, es decir porcentajes de coeficiente de variación superiores al 15%. Como es de esperar, nuevamente para los compuestos que se presentan en la lista de la Figura 2-1, no fue posible su cuantificación.

La Figura 2-3, muestra que al comparar los tres valores de pH más altos, se encuentran que estos no varían de manera considerable, al igual que el número de compuestos con recuperaciones bajas o dispersiones altas. Sin embargo, para los dos valores de pH más bajos si se observa que tanto la recuperación como la precisión del método es incrementada, pues tienen sólo 6 y 2 compuestos con %CV mayores al 15%, y sólo 3 compuestos en ambos casos con recuperaciones inferiores al 70%.

La mejora tanto de la precisión como de la recuperación de los compuestos con el cambio del pH, se atribuye a un mayor estabilidad de los compuestos a estos valores de pH. En diferentes reportes se encuentra que el valor “aparente de pH” (en acetonitrilo) al cual la extracción de los plaguicidas es más eficiente se encuentra entre 5,5 y 5,8, lo que indicaría que posiblemente el resultado de la mezcla de la miel con las disoluciones amortiguadoras de valores de pH más bajos (5,0 y 5,5), proporcionen valores de pH en el sistema de extracción (miel + disolución) similar a este valor reportado en otros estudios. La estabilidad de los compuestos, no sólo puede originar errores sistemáticos (menores

porcentajes de recuperación), sino que también puede originar errores aleatorios, pues pequeños cambios en otras magnitudes de influencia como la temperatura o el tiempo de extracción pueden traducirse en el aumento de errores aleatorios.



**Figura 2-3.** Porcentajes de recuperación promedio (%R), número de compuestos con %R inferiores a 70% y con coeficientes de variación (%CV) mayores al 15 % para los diferentes valores de pH evaluados.

En este sentido, por ejemplo el mejor promedio en los porcentajes de recuperación de los compuestos se logra con el pH más bajo (5,0), lo cual indicaría que es el pH al cual la mayoría de los compuestos presentan los menores errores sistemáticos. Sin embargo, a este valor de pH el método de extracción es menos robusto, ya que cualquier mínimo cambio en otra variable de influencia genera un aumento en los errores aleatorios, por lo cual se presentan mayores coeficientes de variación que para el valor de pH de 5,5. De esta manera, se cree al realizar la extracción a un pH de 5,5, se tiene un mayor control del error aleatorio, pues como se puede observar en la Figura 2-3, es donde se tiene una mejor precisión (<CV) y una buena exactitud conforme a los rangos de la Unión Europea (70%-130%) Por lo tanto, a partir de este ensayo se concluye que dentro de los valores de pH evaluados la mejor condición corresponde a 5,5.

Finalmente, los compuestos que presentaron porcentajes de recuperación menores al 70% a pH 5,0, correspondieron a los isómeros del espinosad y carbendazim. Para el

caso de los primeros no fue posible encontrar los valores de pKa; por lo cual se cree que estos compuestos sufren algún tipo de hidrólisis o descomposición que impide una adecuada extracción. En cuanto al carbendazim, el pKa es 4,48, por tanto, es posible que al encontrarse la molécula ionizada la extracción por parte de el solvente orgánico no sea eficiente (Anastassiades, et al., 2013).

### **2.6.5 Adsorbentes de limpieza**

Una vez establecidas las mejores condiciones en la etapa de extracción de los compuestos, con el propósito de mejorar la selectividad del método, se procedió a estudiar el empleo de diferentes adsorbentes para la limpieza de los extractos. De acuerdo a la composición química de las mieles, se considera que los principales compuestos que interfieren en el proceso de detección de los plaguicidas, pueden ser vitaminas, fenoles, pigmentos, aminoácidos, ácidos orgánicos e inclusive azúcares (White, 1975, en Bogdanov 2007). La reducción de la presencia de ácidos, aminoácidos y azúcares, se realiza a través del empleo de PSA, que en el caso de la miel es fundamental por eliminar los componentes mayoritarios e interferentes de la matriz que son los azúcares y el remanente de agua se reduce a través del sulfato de magnesio. De esta manera, para mejorar el proceso de limpieza se adicionaron otros adsorbentes que correspondieron a octadecilsilano (C18; 20 mg por cada mL de extracto) y carbón negro grafitizado (CNG; 20 mg por cada mL). La Tabla 2-5, muestra un resumen de los resultados obtenidos a través del uso de diferentes sistemas de limpieza. Es de aclarar, que para este estudio se partió de blancos de miel, se obtuvieron extractos libres de plaguicidas, se mezclaron y fueron fortificados antes del proceso de limpieza, lo cual buscaba reducir la variación producida por el proceso de extracción (D. A. Ahumada, Zamudio, et al., 2012).

La Tabla 2-5, evidencia que el empleo de otro tipo de adsorbentes mejora la selectividad de los compuestos, pues se observa un descenso en el número de compuestos con interferentes, respecto a la limpieza únicamente con PSA para cualquiera de los sistemas evaluados. En la tabla anterior, se observa que las mejores alternativas para la limpieza de los extractos, se obtiene al hacer uso de C18, pues en los dos sistemas en los que se usó mejoró la selectividad para casi la totalidad de los compuestos.

Para el caso de tiociclam y de metilazinfos, no se pudo mejorar la selectividad del método; inclusive se realizaron algunos experimentos adicionales en los que se aumentó la cantidad de adsorbentes usados, pero no fue posible lograr dicho propósito, y en su lugar se obtuvieron porcentajes de recuperación menores para algunos compuestos. Para el caso específico del tiociclam, debido a su naturaleza polar, se cree que es necesario realizar otro tipo de limpieza como cromatografía de intercambio iónico, de columna en fase normal o la adición de otro adsorbente más polar como la sílica que permita retener los interferentes de naturaleza polar y dejar libre el tiociclam en el extracto. Para el caso del metil azinfos, se considera que la interferencia de origen tiene una estructura muy similar a este compuesto.

**Tabla 2-5.** Porcentajes de recuperación obtenidos en la evaluación de diferentes sistemas de limpieza.

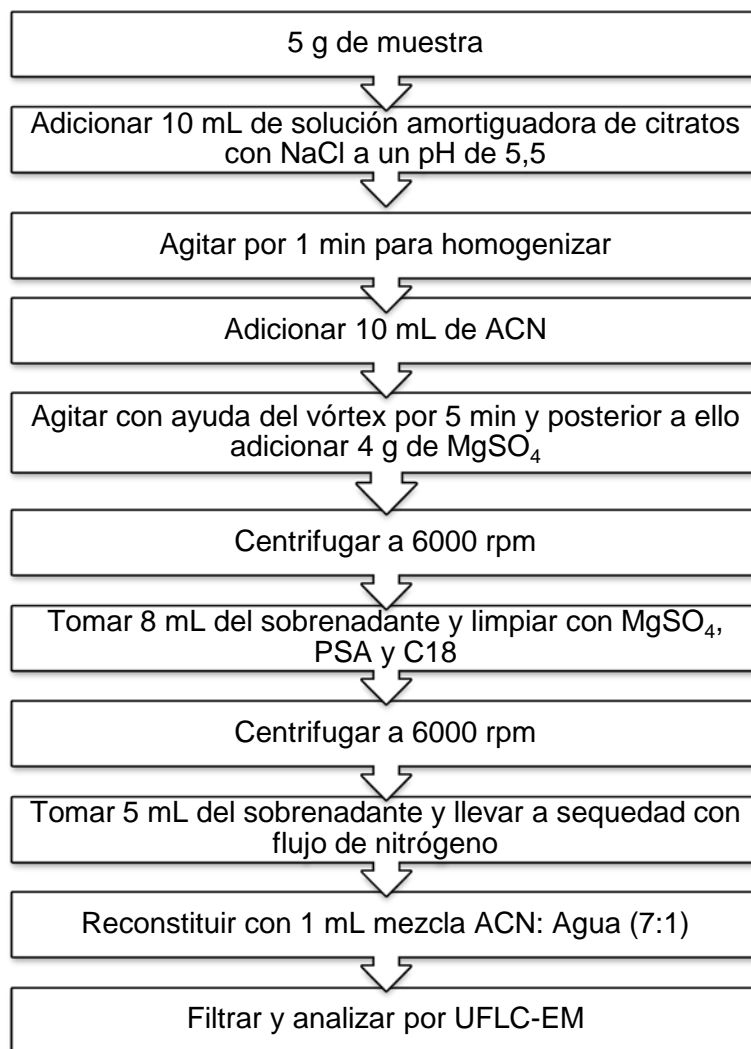
NOMBRE DEL COMPUESTO	Promedio % de recuperación			
	PSA	PSA+CNG	PSA+C18	PSA+C18+CNG
Metamidofos	I	I	87,6	80,2
Propamocarb	I	I	93,5	90,2
Linuron	I	I	100,9	96,8
Nitempiram	I	I	100,3	95,3
3,4-dicloropropinalidina	I	I	97,3	99,2
Etoprofos	I	I	98,2	90,2
Piraclostrobin	I	94,4	97,4	92,3
Trifloxtricina	I	I	100,3	98,3
Lufenuron	I	94,0	103,4	92,7
Tiociclam	I	I	I	I
Atrazina	I	I	100,1	91,2
Clorfenapyrd	I	I	96,8	92,9
Azinfos metil	I	I	I	I

I: Compuesto con interferencia que no permitió determinar el porcentaje de recuperación.

Por otra parte, se encuentra que el uso de CNG no contribuye de manera significativa a la mejora de la selectividad del método, pues los resultados indican que permite la reducción de interferentes para sólo tres compuestos. Asimismo, al observar el último sistema que incluye C18 y PSA, se encuentra que el carbón no aporta de manera significativa, sino que al contrario, para algunos compuestos los porcentajes de recuperación son inferiores, lo cual se debe posiblemente a la adsorción de los analitos generada por la mayor área superficial que se tiene.

El acetonitrilo, es un solvente conocido por no extraer demasiados compuestos de naturaleza lipídica así como compuestos de elevada polaridad como el caso de los azúcares, sin embargo el aumento de la fuerza iónica en el sistema de extracción, a través del  $MgSO_4$  y del  $NaCl$ , inducen a que se extraigan este tipo de compuestos junto con los analitos. En este sentido, se cree el empleo de C18 reduce notablemente la cantidad de interferentes, debido a la adsorción de este tipo de compuestos que tienen baja solubilidad en acetonitrilo. Adicionalmente, es posible que exista un efecto sinérgico al hacer uso de PSA y C18, pues las señales producidas por los interferentes químicos, se redujeron a lo largo de todo el cromatograma. Finalmente, la Figura 2-4, describe el esquema general del método desarrollado.

Finalmente y una vez estandarizadas las variables en consideración, se establece que el método de extracción se modifica de acuerdo con las condiciones que se describen en la figura 2-4.



**Figura 2-4.** Esquema general del método desarrollado para el análisis de residuos de plaguicidas en miel a través de UFLC-MS.

### 2.6.6 Validación del sistema de medición

Con el fin de demostrar que el sistema de medición funciona adecuadamente para el propósito, se realizó una validación de nivel 2.

La selectividad del método, se evaluó a través del uso de cuatro diferentes tipos de miel, las cuales se diferenciaban por su origen. Los resultados obtenidos en esta evaluación mostraron resultados idénticos a los reportados en la Tabla 2-5 (sistema PSA+C18), es decir el método es selectivo para todos los analitos de interés excepto para metil azinfos y tiociclam.

Por otro lado, para la evaluación de la exactitud del método, como recuperación y precisión en condiciones de repetibilidad y de precisión intermedia, se fortificaron muestras de miel a tres niveles de concentración. El primer nivel (LC) correspondía al límite máximo de residuos, una concentración inferior a este o en su defecto concentraciones cercanas a 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . El segundo y tercer nivel de fortificación correspondieron a 2 y 5 veces el primer nivel (LC).

En las Tablas 2-6 y 2-7 se presentan las concentraciones de fortificación, los resultados de exactitud y los límites de detección del método. Los límites de detección reportados, fueron estimados a partir de diferentes aproximaciones (Ahumada, et al., 2012a) y para todos los casos en el proceso de confirmación se encontró que la relación señal/ruido era superior a 3.

Las Tablas 2-6 y 2-7, muestran que la mayoría de los compuestos presentaron porcentajes de recuperación entre el 70% y 120%, por lo cual se puede concluir que el método presenta un error sistemático aceptable, a excepción de carbendazim, espinosad (A y D), lufenuron, piraclostrobina, cuyos porcentajes de recuperación fueron inferiores al 70%. Por otro lado, en esta tabla se encuentra que el máximo %CV para cada uno de los analitos, en general es inferior al 15%, lo cual cumple con el criterio de la Unión Europea (SANTE/11945, 2015). Para algunos compuestos se observa que este %CV supera el 15%, sin embargo, se cree este es aceptable, pues el criterio de la Unión Europea se tiene establecido para compuestos en condiciones de repetibilidad, y el %CV que se presenta en las tablas 2-66 y 2-77, se obtiene para condiciones de mayor variabilidad como precisión intermedia (interanalistas); por lo tanto, se considera para todos los casos el método es preciso, a excepción de los casos en los que el método no es selectivo o presenta una recuperación inadecuada.

**Tabla 2-6.** Resumen de los resultados obtenidos en la validación del método desarrollado - Grupo de compuestos 1.

Compuesto	Fortificación al LC (µg/kg)	% Recuperación al LC	% Recuperación a 5xLC	% Recuperación del método*	% CV máximo en condiciones de precisión intermedia	LD (µg/kg)
Acefato	13,2	85,1	87,3	86,2	15,5	4,9
Oxamilo	10,0	91,6	88,0	80 a 103,8**	10,4	4,2
Monocrotofos	9,8	103,2	90,5	80,4 a 111	11,6	4,1
Metomil	10,1	87,2	78,6	82,9	6,5	2,8
Carbendazim	8,2	49,8	47,1	18,8 a 70,1	17,6	ND
Tiabendazol	12,6	94,5	84,2	72,3 a 97,9	12,3	6,1
3OH-Carbofuran	11,3	98,7	88,0	85 a 105,2	7,4	3,2
Dimetoato	10,7	97,1	83,2	90,2	8,1	1,4
Cimoxanil	79,8	92,5	88,4	90,4	11,3	23,6
Carbofuran	8,9	97,3	95,9	96,6	9,6	2,5
Tiodicarb	8,3	86,5	83,2	84,9	16,2	2,2
Pirimicarb	5,9	93,2	83,0	72,8 a 94,9	14,0	2,1
Atrazina	6,0	93,9	91,0	92,5	11,8	1,2
Metalaxilo	5,9	99,0	96,9	98	10,2	1,2
Imazalil	8,2	94,0	83,7	73,8 a 100,7	7,0	2,2
Dimetomorf	13,1	100,9	102,3	101,6	11,6	5,7
Pirimetanil	8,7	91,0	78,5	84,8	11,4	3,8
Azosxitrobina	6,0	102,1	104,5	103,3	10,1	1,6
Espinosad A	14,7	51,7	49,6	32,4 a 58,5	6,5	ND
Tebuconazol	16,0	93,5	93,7	81,9 a 102,5	12,8	2,0
Metoxifenozida	13,2	100,6	100,1	93,2 a 104,5	8,5	2,5
Hexaconazol	10,9	95,0	99,3	87,1 a 108,4	13,0	2,8
Espinosad D	14,7	37,1	39,7	38,4	6,9	ND
Difenoconazol	88,4	90,5	88,6	75,4 a 102,4	7,8	14,6
Benalaxilo	6,5	97,1	97,3	97,2	10,9	1,4
Clorfenapir	198,9	95,0	87,5	72,8 a 98	13,6	61,2
Azinfos Metil	7,0	281,1	411,9	80,9 a 1033,4	82,0	ND
Indoxacarb	28,8	91,9	95,7	82,1 a 99,0	8,4	6,2

\* Estimado a partir de los resultados de precisión intermedia. Para los casos en los que se presentó heterocedasticidad entre las diferentes concentraciones evaluadas se presenta el intervalo de porcentajes de recuperación.

ND: No determinado para este compuesto.

**Tabla 2-7.** Resumen de los resultados obtenidos en la validación del método desarrollado  
- Grupo de compuestos 2.

Compuesto	Fortificación al LC (µg/kg)	% Recuperación al LC	% Recuperación a 5xLC	% Recuperación del método	% CV máximo en condiciones de precisión intermedia	LD (µg/kg)
Metamidofos	41,7	88,9	96,5	92,7	13,9	6,2
Propamocarb	12,5	92,4	103,3	97,9	15,5	4,2
Dinotefuran	11,0	89,5	88,7	80 a 106,6	15,1	3,2
Linuron	19,0	91,8	85,1	73,6 a 99,5	15,1	7,2
Nitenpiram	13,5	85,6	102,9	94,3	12,9	3,0
Thiametoxan	16,7	97,3	97,3	97,3	4,4	4,8
Dazomet	52,0	84,4	83,9	70,1 a 111	14,9	18,0
Mevinphos	17,0	92,5	87,8	73,5 a 111	11,7	7,8
Imidacloprid	170,0	93,8	105,8	99,8	16,6	57,0
Acetamiprid	66,5	102,9	95,9	88,7 a 105,8	12,1	11,1
Tiacloprid	16,7	111,0	110,4	110,7	9,2	2,7
Simazina	5,9	98,5	97,3	97,9	12,0	0,85
Carbaryl	39,0	96,2	103,9	87,6 a 112,9	9,3	7,1
Isoprocarb	44,1	93,7	86,2	90	15,0	9,5
Ametrina	13,3	91,6	98,1	94,9	9,4	1,4
3,4-Dicloranilida	9,0	92,6	104,7	77,5 a 115,8	10,4	0,95
Tridemoprh	74,9	99,7	79,9	74,5 a 101,2	19,5	17,2
Epoxiconazole	85,2	97,4	105,8	81,1 a 119,1	14,3	24,3
Fenexhamid	41,5	78,4	94,9	86,7	13,2	9,3
Etoprofos	30,1	86,8	91,3	89,1	12,3	8,7
Flusilazole	14,9	99,7	111,1	96,8 a 115,3	7,5	4,9
Penconazol	12,4	94,6	110,5	102,6	11,1	2,4
Piraclostrobin	11,3	38,6	21,9	12,9 a 68,6	21,1	ND
Trifloxystribina	8,5	89,3	102,8	81,3 a 113,5	10,3	1,5
Lufenuron	8,6	31,5	32,7	32,1	34,6	ND
Benfuracarb	7,8	100,9	102,2	84,1 a 111,9	13,8	2,3
Temefos	65,5	88,8	94,7	75,2 a 112,8	17,0	29,0
Buprofezin	11,4	79,2	94,0	86,6	14,3	4,7

ND: No determinado para este compuesto.

La evaluación de la linealidad del sistema de medición, se realizó a través de diferentes pruebas como: ANOVA, falta de ajuste, significancia de la pendiente y del intercepto, entre otras (Ahumada y Zamudio , 2011). Todos los resultados indicaron que el sistema es lineal en el intervalo de concentraciones que se presentan en la tabla 2-8.

**Tabla 2-8.** Intervalo lineal del método analítico.

<b>Compuesto</b>	<b>Intervalo lineal (ng/mL)</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Intervalo lineal (ng/mL)</b>
Acefato	18,8 a 188,2	Metamidofos	59,6 a 595,7
Oxamil	14,2 a 142,3	Propamocarb	17,8 a 178,2
Monocrotofos	14 a 139,7	Dinotefuran	15,7 a 157
Metomil	14,4 a 143,9	Linuron	27,1 a 270,8
Carbendazin	11,7 a 117,2	Nitenpiram	19,2 a 192,2
Tiabendazol	17,9 a 179,3	Thiametoxan	23,8 a 238,1
3OH-carbofuran	16,2 a 161,9	Dazomet	74,3 a 743,2
Dimetoato	15,3 a 152,9	Mevinphos	24,2 a 242,4
Cymoxanyl	113,9 a 1139,3	Imidaclorpid	242,8 a 2427,8
Carbofuran	12,7 a 127,4	Acetamiprid	94,9 a 949,3
Thiodicarb	11,9 a 118,8	Tiacloprid	23,9 a 238,8
Pirimicarb	8,4 a 83,9	Simazina	8,4 a 83,8
Atrazina	8,5 a 84,9	Carbaril	55,6 a 556,4
Metalaxil	8,5 a 84,9	Isoporcarb	63 a 630,1
Imazalil	11,7 a 117,2	Ametrina	18,9 a 189,5
Dimetomorf	18,8 a 187,6	3,4-dicloropropinalidina	12,9 a 129
Pirimetanil	12,4 a 124,3	Tridemoprh	107 a 1070,1
Azoxistrobin	8,6 a 85,8	Epoxiconazole	121,7 a 1217,5
Spinosad	21 a 209,8	Fenexamid	59,3 a 592,6
Tebuconazol	22,8 a 227,8	Etoprofos	43 a 429,7
Metoxifenoazida	18,9 a 189,2	Flusilazole	21,3 a 212,6
Hexaconazol	15,6 a 156,1	Penconazol	17,7 a 177,4
Spinosad	21 a 209,8	Piraclistrobin	16,2 a 161,5
Difenoconazol	126,2 a 1262,2	Trifloxystribina	12,1 a 120,8
Benalaxil	9,2 a 92,4	Lufenuron	12,2 a 122,4
Clorfenapryd	284,2 a 2841,9	Befuracarb	11,1 a 110,9
Azinfos metil	10 a 99,8	Temefos	93,5 a 935,1
Indoxacarb	41,1 a 410,7	Buprofezin	16,3 a 163,4

### **2.6.7 Evaluación de residuos de plaguicidas en las mieles en estudio**

De acuerdo con publicaciones recientes en la literatura científica, se ha investigado la presencia de plaguicidas en la miel en varios países, entre ellos: China, Serbia, Egipto, Tailandia, Irán, Grecia, Colombia, Malasia, Brasil, Italia, Polonia, España, Bosnia y Herzegovina, Francia, Argentina, Estados Unidos, Turquía y la India (Tette et al., 2016).

Para el caso de la evaluación de residuos de plaguicidas, en este estudio se analizaron cuarenta y cinco muestras de miel, recogidas en apiarios situados en los departamentos de Cundinamarca y Meta, empleando el método multirresiduo previamente validado para los 50 plaguicidas.

La información sobre los niveles de concentración de los residuos de plaguicidas encontrados en las muestras de miel se presenta en las Tablas 2-9 y 2-10 y en las Figuras 2.5 y 2.6 se exponen los cromatogramas obtenidos para cada uno de los compuestos detectados.

La Tabla 2-9 relaciona la concentración de los plaguicidas detectados en las 26 muestras de miel de abejas provenientes de 6 apiarios ubicados en cultivos de fresa en el departamento de Cundinamarca. La producción de fresa en Colombia se encuentra dominada por los cultivadores de la sabana de Bogotá, donde están sembradas unas 560 hectáreas, para una producción anual de 10.175 toneladas (Vásquez, et al., 2011), el sector seleccionado para ubicación de los apiarios y recolección de las mieles de este estudio fue por tanto representativo.

Se encontró en el 15,4% de las muestras la presencia de plaguicidas como tebuconazol y dimetomorf, provenientes de 3 apiarios diferentes (F2, F5 y F6) y contaminadas con un único plaguicida. Fueron cosechadas en los meses de noviembre y F6 en julio, lo que pone de presente que el efecto de contaminación de la miel obedece más a factores ambientales de manejo del cultivo que a las épocas de floración.

**Tabla 2-9.** Determinación de residuos de plaguicidas en miel de cultivo de fresa

ID Muestra	Compuesto / resultado	Cantidad (µg/kg)	LD (µg/kg)	LC (µg/kg)	% Recuperación	
F1	R1	ND	-	-	-	
	R2	ND	-	-	-	
	R4	ND	-	-	-	
	R5	ND	-	-	-	
	R6	ND	-	-	-	
F2	R1	ND	-	-	-	
	R2	Dimetomorf	< LC	5,7	13,1	95,5
	R3	ND	-	-	-	
	R4	ND	-	-	-	
	R5	ND	-	-	-	
F3	R2	ND	-	-	-	
	R5	ND	-	-	-	
	R6	ND	-	-	-	
	R7	ND	-	-	-	
F4	R1	ND	-	-	-	
	R2	ND	-	-	-	
	R3	ND	-	-	-	
	R4	ND	-	-	-	
F5	R1	ND	-	-	-	
	R2	Tebuconazol	< LC	2,5	13,2	76,8
	R3	Tebuconazol	< LC	2,5	13,2	76,8
	R4	ND	-	-	-	
F6	R1	ND	-	-	-	
	R2	Dimetomorf	< LC	5,7	13,1	95,5
	R4	ND	-	-	-	
	R6	ND	-	-	-	

La presencia de los compuestos dimetomorf y tebuconazol no fue cuantificada por estar por debajo de límite de cuantificación del método (13,1 µg/kg y 13,2 µg/kg, respectivamente) y su concentración no excedió el LMR establecido por la Unión Europea 0,05 mg/kg (50 µg/kg). Aunque las mieles resultaron contaminadas con estos plaguicidas, las concentraciones en el ambiente no son lo suficientemente altas como para generar toxicidad.

De acuerdo con la bibliografía consultada, aunque se ha hecho monitoreo de dimetomorf en varios estudios, no se encontraron reportes de presencia de este compuesto en miel

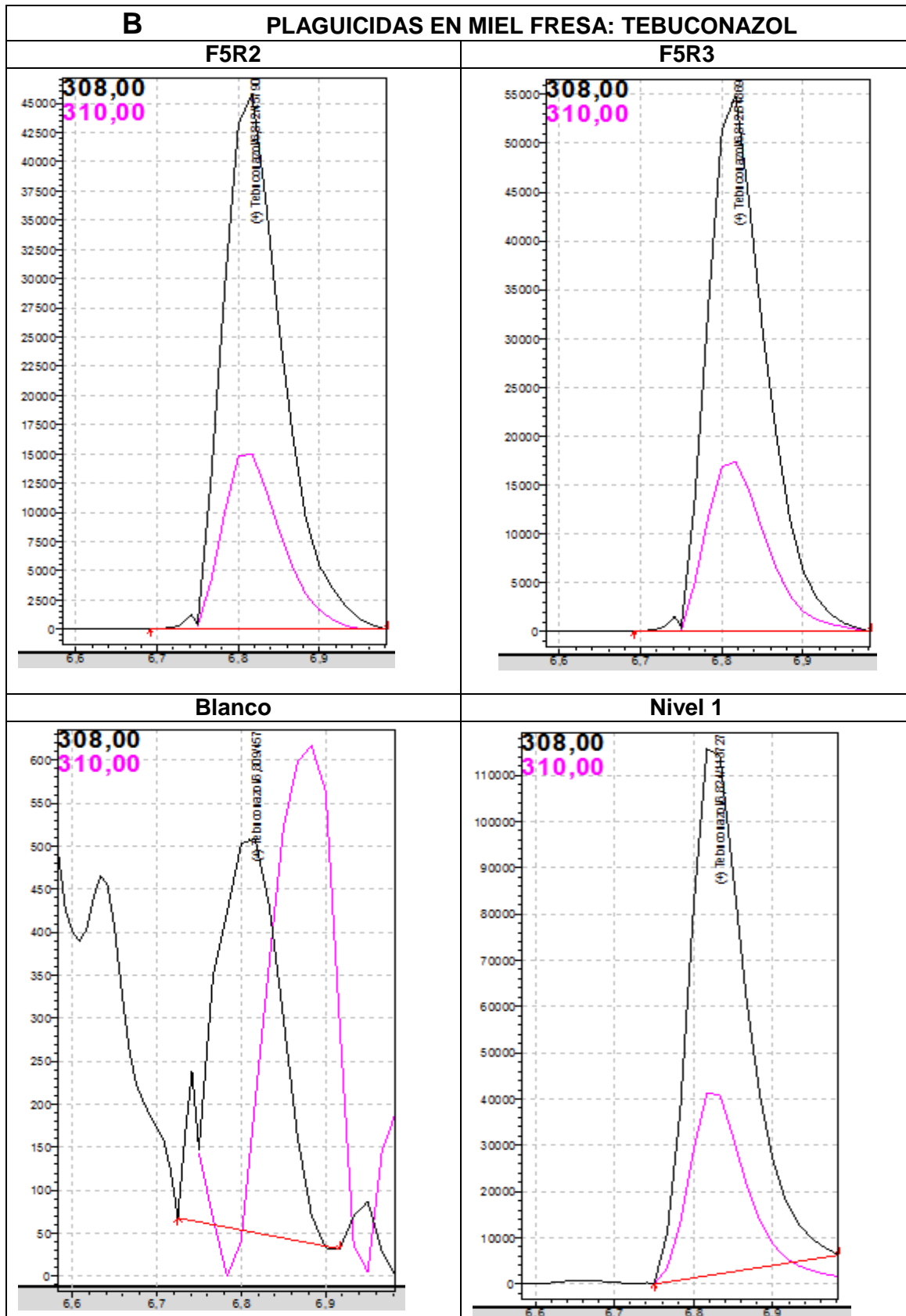
de abejas. Mientras que para el tebuconazol Juan-Borrás et al.,(2016), informan su detección en mieles españolas en concentraciones de 2,0 ug/kg de este compuesto, en el 9,1% de las muestras analizadas, es decir, similares a lo reportado en esta investigación.

Cabe destacar que de los plaguicidas detectados sólo el tebuconazole es un fungicida de uso autorizado (ICA, 2016) para el cultivo de fresa, mientras que el fungicida dimetomorf lo es para el cultivo de cítricos, por ejemplo; lo que pone de presente el escaso control en la aplicación de plaguicidas en Colombia de acuerdo con su uso permitido bajo los criterios de las buenas prácticas de agricultura.

Otros estudios, empleando otras técnicas, como cromatografía de gases con detector de captura electrónica y espectrómetro de masas, señalan que fueron analizados plaguicidas en mieles de cuatro regiones de Colombia (Cundinamarca, Magdalena, Santander y Boyacá), encontrando una incidencia de plaguicidas de 52,4%, donde se encontraron con frecuencia plaguicidas organoclorados y organofosforados. Los principales compuestos detectados fueron clorpirifos (36,1% de incidencia), seguido de profenofos (16,4%) y DDT (6,6%). Sin embargo, las concentraciones encontradas fueron bajas y solo el 4,9% de las muestras positivas superaron la concentración de LMR establecido por el Parlamento Europeo. Las mieles con mayor presencia de plaguicidas, fueron las provenientes del departamento de Cundinamarca. El autor concluye que es muy probable que la contaminación de la miel producida en regiones apícolas de Colombia en estudio, fue causada por las prácticas agrícolas desarrolladas alrededor de las colmenas instaladas (Rodríguez, et al., 2014).

Los fungicidas son de normal aplicación en cultivos de fresa debido a que es necesario el control de hongos que degradan la fruta rápidamente, por la común aparición de enfermedades como moho gris causada por *Botrytis cinérea*, antracnosis o viruela, entre otros (Angulo, 2009) y por tanto la abeja en su proceso de pecoreo absorbe estos compuestos de su entorno y los transfiere a la miel y finalmente al consumidor final.





**Figura 2-5 A y B.** Cromatogramas de plaguicidas detectados en mieles de cultivos de fresa, cromatograma del blanco de matriz y el nivel 1 de la curva de calibración.

**Tabla 2-2.** Determinación de residuos de plaguicidas en miel de abejas proveniente de cultivo de cítricos polinizado con abejas

Muestra		Compuesto / resultado	Cantidad (µg/kg)	LD (µg/kg)	LC (µg/kg)	% Recuperación
C1	R1	ND	-	-	-	-
	R2	ND	-	-	-	-
	R3	Metalaxil	< LC	1,2	5,9	105,1
	R4	Metalaxil	< LC	1,2	5,9	105,1
C2	R1	Pirimicarb	< LC	2,1	5,9	100,6
	R2	ND	-	-	-	-
	R3	Carbofuran	< LC	2,5	8,9	96,8
	R4	ND	-	-	-	-
C3	R1	Pirimicarb	< LC	2,1	5,9	100,6
	R2	ND	-	-	-	-
	R3	ND	-	-	-	-
C4	R1	ND	-	-	-	-
	R2	ND	-	-	-	-
	R3	ND	-	-	-	-
	R4	ND	-	-	-	-
	R5	ND	-	-	-	-
C5	R1	ND	-	-	-	-
	R5	Pirimicarb	< LC	2,1	5,9	100,6

En el caso de los plaguicidas estudiados para las mieles ubicadas en cultivos de cítricos, (ver Tabla 2-10) se establece que el 33% de las muestras evidencian la presencia de plaguicidas. De las 18 muestras de mieles analizadas en este grupo, provenientes de 5 apiarios diferentes, se detectó en cuatro de ellos la presencia de plaguicidas como metalaxil, pirimicarb y carbofuran.

En ninguna muestra se detectó más de un plaguicida, sin embargo si se observa la presencia de dos plaguicidas en el caso del apiario identificado como C2 en Meta. En este sentido, el pirimicarb fue el compuesto con mayor frecuencia, pues fue detectado en los apiarios C5, C3 y C2, seguido por el metalaxil presente en dos muestras del apiario C1 y finalmente el carbofuran con detección positiva en una muestra del apiario C2. Cabe anotar que este último compuesto es un plaguicida de uso prohibido en Colombia.

Al igual que en el grupo anterior, la presencia de los compuestos metalaxil, pirimicarb y carbofuran no se cuantificó por ser su concentración inferior al límite de cuantificación del método (5,9 µg/kg, 5,9 µg/kg y 8,9 µg/kg, respectivamente); siendo su concentración menor al LMR establecido por la Unión Europea (50 µg/kg). Una situación similar fue reportada por Pirard, et al., (2007), quien reportó presencia de pirimicarb en una muestra, en una concentración menor al límite de decisión ( $CC\alpha$ ) (0,071 µg/kg). En esa misma investigación, se detectó la presencia de carbofuran en una muestra a una concentración  $\geq 0,6$  µg/kg.

Utilizando cromatografía de gases, con detector de masas, Shampisur et al.,(2016) analizaron entre otros plaguicidas, metalaxil y pirimicarb en agua, leche, miel y zumos de fruta recolectadas de mercados locales, estos contaminantes no fueron detectados en las muestras de miel, leche ni en agua, pero si fueron detectados en jugo de naranja en concentraciones de 0,17 µg/kg y 1,29 µg/kg para primicarb y metalaxil, respectivamente. Estos plaguicidas son aplicados en cultivos de cítricos, y se comprueba su efecto sistémico, ya que por diferentes mecanismos de transporte terminan siendo componentes de los alimentos, en aquellos lugares donde hay exposición a estos contaminantes.

En Colombia y en las zonas tropicales, los cítricos se producen entre 23°C y 34°C, siendo una de las principales zonas de producción los llanos orientales. Por este motivo las muestras de miel que se cosecharon entre cultivos de cítricos, provienen del departamento del Meta.

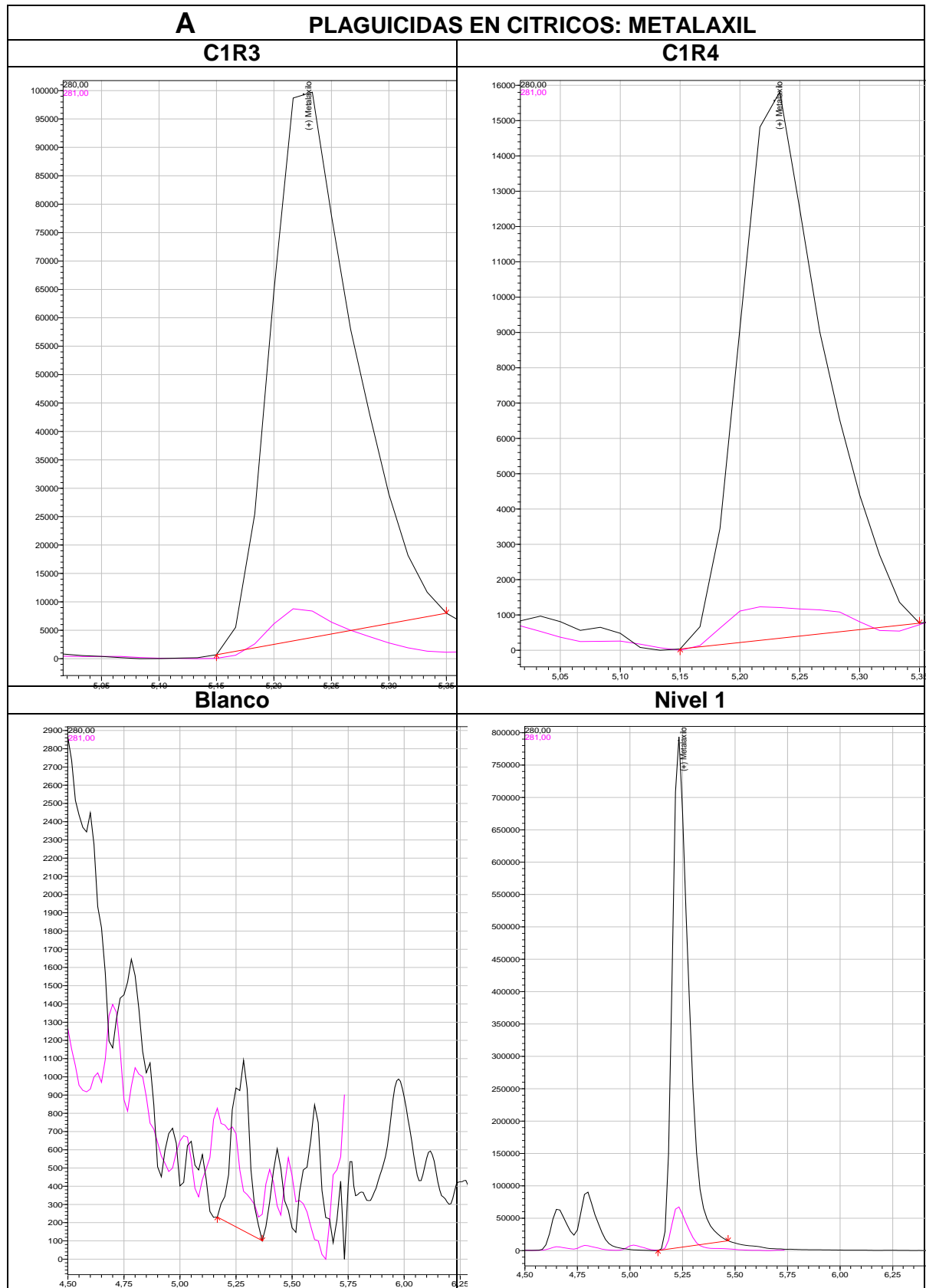
Teniendo en cuenta que el 33% de las mieles de cítricos presentaron residuos de plaguicidas, su incidencia es más alta que la presentada en mieles de fresa. Es decir que para este estudio, el entorno ambiental de los cultivos de cítricos presentó mayor variedad de contaminantes que el área circundante a los cultivos de fresa. En este sentido, para los apiarios del Meta (C1 a C5) se evidencia el efecto del uso de los agroquímicos tipo fungicidas e insecticidas para el control de plagas y enfermedades y la capacidad de la abeja como bioindicador al prestar su servicio ecosistémico en la polinización dirigida (Vasquez, et al, 2011).

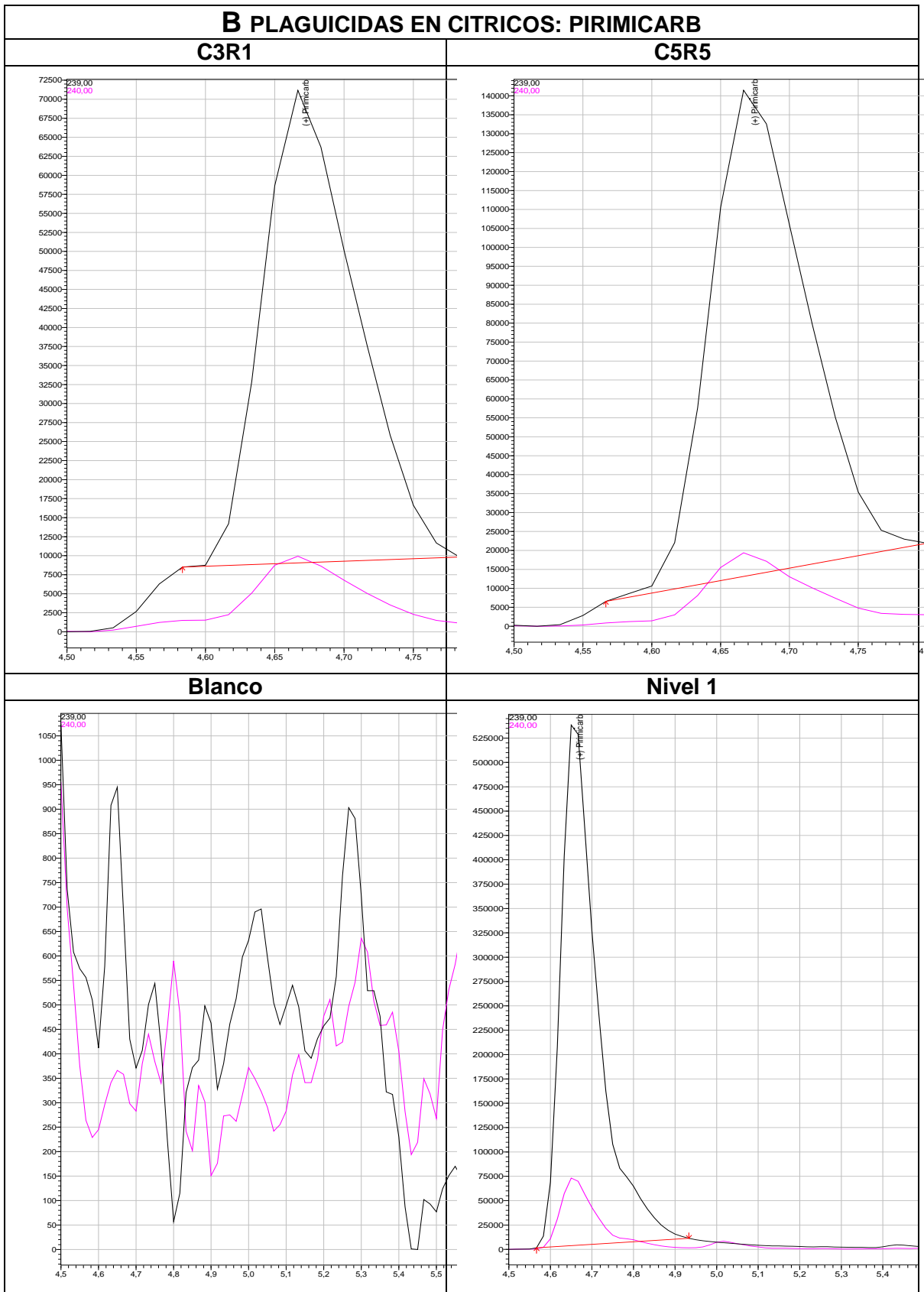
De acuerdo con lo anterior, Porrini (2003), afirma que las abejas son extremadamente sensibles a los plaguicidas, por lo tanto es importante considerar su capacidad y efecto al

acumular estos compuestos en su organismo durante su labor de pecoreo. Igualmente, incide la presencia y extensión de la floración entre las plantas cultivadas o espontáneas, la presencia de abejas en el sitio y en el momento de la aplicación del plaguicida los medios utilizados para distribuirlo, la presencia del viento, etc. De esta manera, dependiendo de la toxicidad del plaguicida en contacto, la abeja puede morir, sufrir otros síntomas o puede acumularlo en su organismo y transmitirlo en sus productos apícolas como la miel.

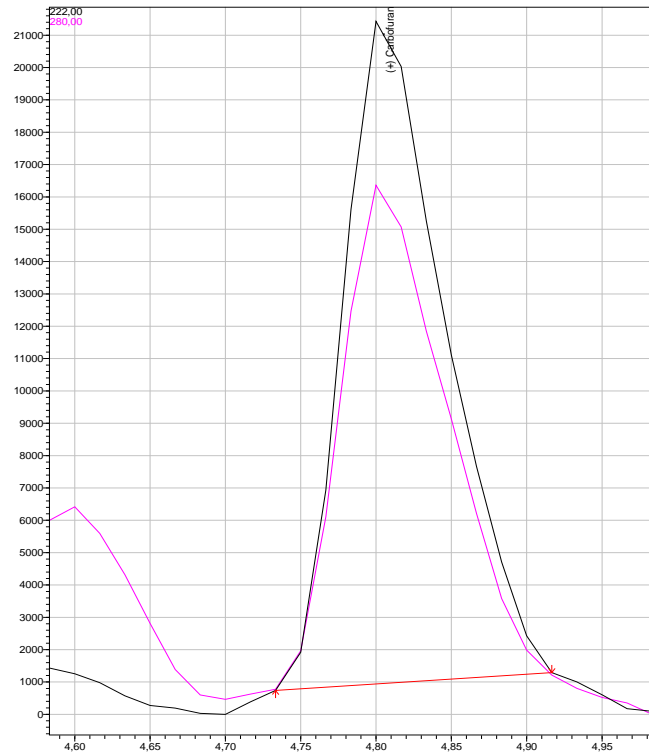
De acuerdo con los resultados encontrados en este estudio es posible afirmar que si bien hay evidencia de la presencia en el entorno de los apiarios de 5 plaguicidas de los 50 estudiados, su efecto conforme a los periodos de muestreo, no indica que haya un riesgo a la salud de quienes consumen la miel como producto apícola, toda vez los residuos de plaguicidas para estos compuestos se encontraron, en todos los casos, por debajo los LMR.

Igualmente, en todos los casos, los compuestos hallados por debajo del LC fueron confirmados de acuerdo con los criterios del documento SANTE/11945(2015). Su presencia se evidencia claramente en los cromatogramas de la Figura 2.5. y Figura 2.6, al comparar la señal de cada compuesto detectado frente al blanco de matriz y el cromatograma correspondiente al menor nivel de la curva de calibración y al LC del método.

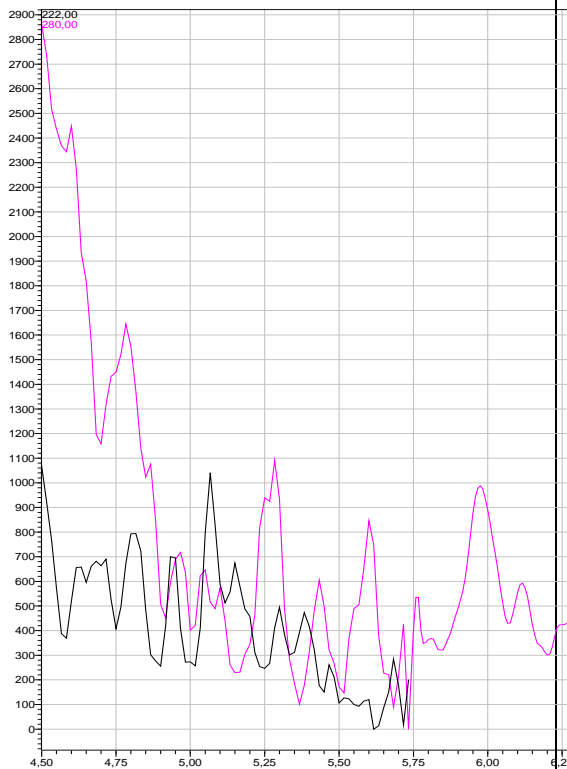




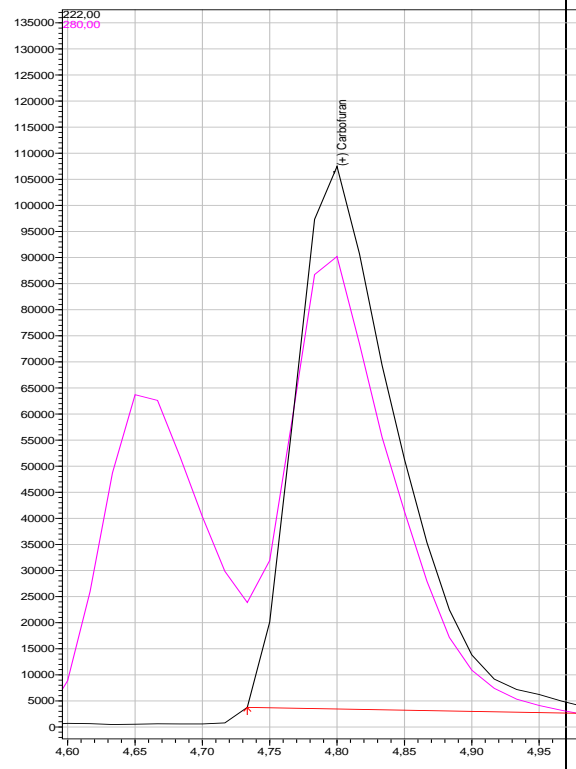
### C PLAGUICIDAS EN CITRICOS: CARBOFURAN C2R3



### Blanco



### Nivel 1



**Figura 2-6. A, B y C.** Cromatogramas de plaguicidas detectados en mieles de cultivos de cítricos polinizados de cítricos, cromatograma del blanco de matriz y el nivel 1 de la curva de calibración.

## 2.7 Conclusiones

### Desarrollo del método

- Se desarrolló y validó un método multiresiduo para el análisis de residuos de 50 plaguicidas en miel, el cual se basa en una extracción líquido-líquido con acetonitrilo y posterior limpieza a través de extracción en fase sólida dispersiva.
- Durante el desarrollo del método se encontró que la homogenización de la miel con una solución amortiguadora a un pH de 5,5 incrementa la exactitud del método.
- Se encontró que las sales de citrato empleadas en la etapa de extracción por el método QuEChERS, versión europea EN 15662, tienen mayor eficiencia y menor CV, que la empleada por el método AOAC 2007.01, que hace uso del acetato de sodio.
- Durante la etapa de limpieza del extracto se determinó que la selectividad del método mejoró notablemente al realizar uso de una mezcla de octadecilsilano (C18) y sílica funcionalizada con aminas (PSA).

### Validación del método

- El proceso de validación indicó que el método es selectivo, preciso, lineal y presenta límites de detección y cuantificación acordes con la regulación, para 50 plaguicidas de un total de 56 seleccionados para el desarrollo del método.
- Se encontró que el método no es selectivo para los compuestos Espinosad A y D y Carbendazim y no es exacto para Azinfos Metil, Piraclostrobin, Tiociclam y Lufenuron.

### Evaluación de residuos de plaguicidas en muestras de miel de abejas

- A partir del método validado para 50 plaguicidas, se evaluó la posible presencia de estos residuos en 44 muestras de miel de abejas, recogidas en apiarios situados en los departamentos de Cundinamarca y Meta.
- Se encontró en el 15,4% de las muestras de miel de abeja provenientes de cultivos de fresa del departamento de Cundinamarca, la presencia de plaguicidas como Tebuconazol y Dimetomorf en concentraciones menor a LC del método (13,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 13,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente) y su concentración no excedió el LMR establecido por la Unión Europea (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).
- En el caso de los plaguicidas estudiados para las mieles ubicadas en cultivos de cítricos de los departamentos del Meta, se establece que el 33% de las mieles evidencian la presencia de plaguicidas como Metalaxil, Pirimicarb y Carbofuran a niveles menores al LC (5,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 5,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 8,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente) y menores al LMR establecido por la Unión Europea (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).
- De acuerdo con los resultados encontrados en este estudio es posible afirmar que si bien hay evidencia de la presencia en el entorno de los apiarios de 5 plaguicidas de los 50 estudiados, su efecto conforme a los periodos de muestreo, no indica que haya un riesgo a la salud de quienes consumen la miel como producto apícola, toda vez los residuos de plaguicidas para estos compuestos se encontraron, en todos los casos, por debajo los LMR.

## **3. Capítulo 3: Desarrollo, validación y evaluación de metales tóxicos en muestras de miel de abejas procedentes de zonas de cultivos polinizados de fresa y cítricos**

En este capítulo se describe el proceso realizado para el desarrollo de un método analítico para la digestión de mieles vía microondas. Una vez se optimizaron parámetros y con el fin de establecer la veracidad del método desarrollado, se realizó la correspondiente validación.

El paso siguiente fue la evaluación de los metales tóxicos en las mieles de estudio, mediante espectrofotometría de llama para los metales Cd, Pb, Cu y Zn y el acoplamiento con generador de hidruros con vapor frío para el caso del Hg.

### **3.1 Introducción**

Existe una creciente preocupación por los riesgos relacionados con los alimentos para la salud humana causados por contaminantes tóxicos. El impacto antropogénico sobre el medio ambiente, principalmente la contaminación atmosférica, es una preocupación importante en todo el mundo. La inhalación de partículas y el consumo de agua o alimentos contaminados, entre estos la miel, son las rutas más comunes de contaminación directa e indirecta para los seres humanos y los animales (Pandey, Shubhashish, & Pandey, 2012).

La abeja *Apis mellifera* es un polinizador esencial para la agricultura en todo el mundo, y ha sido ampliamente investigada como un bioindicador de contaminantes en el medio ambiente (Van der Steen, de Kraker, & Grotenhuis, 2015), pero estos polinizadores pueden estar expuestos a los contaminantes metálicos a través del aire, agua y otros mecanismos. Una fuente común de exposición es a través de la ingestión de polen y néctar contaminado (Celli & Maccagnani, 2003; Hladun, Parker, & Trumble, 2015). Los

elementos de rastreo en la atmósfera pueden depositarse sobre el vello corporal de las abejas y son transportados a las colonias con polen o pueden ser absorbidos con el néctar de las flores o transportados por agua o melaza (Porrini, 2003). Por lo tanto, las abejas contaminan los productos apícolas, como la miel, afectando su composición y comprometiendo su calidad.

Actualmente se observa una disminución en las poblaciones de abejas en muchas partes del mundo, por lo que son necesarias estrategias activas para la monitorización y diagnóstico de la salud de la población (Badiou-Bénéteau et al., 2013). Es importante determinar las concentraciones de metales tóxicos en la miel con el objetivo de garantizar la calidad del producto y medir el grado de contaminación del medio ambiente entorno a las colmenas, para lo cual es necesario contar con métodos analíticos confiables que permitan su detección a nivel de los LMR disponibles a nivel nacional y/o intencional.

La miel de abejas es una matriz compleja que para su análisis requiere de una etapa previa de digestión que permita destruir los componentes orgánicos y extraer los metales presentes evitando interferentes en la cuantificación. Uno de los métodos que cobra relevancia en la actualidad es la digestión ácida vía microondas, pues reduce considerablemente el tiempo de análisis, presenta menor riesgo de contaminación, requiere menor cantidad de reactivos y muestra, brinda mayor seguridad del operador, y permite obtener resultados más reproducibles respecto a los métodos convencionales. La energía microondas proporciona una tasa de descomposición de los materiales orgánicos de 20 a 60 veces más rápida que los métodos convencionales (Sandroni & Smith, 2002).

El objetivo de esta investigación fue desarrollar un método rápido y confiable para cuantificar metales tóxicos como Cd, Pb, Cu, Zn y Hg en miel de abejas aprovechando las ventajas de la digestión asistida por microondas.

## **3.2. Muestreo**

Se analizaron 57 muestras disponibles de miel para la evaluación de residuos de metales tóxicos, las cuales provienen de de diferentes regiones de Colombia, Esta información de muestreo se encuentra detallada en el capítulo anterior, numeral 2.1.3, tabla 2-1.

## 3.2 Materiales y métodos

### 3.2.1 Material de referencia, reactivos y soluciones

Para la digestión de las mieles se empleó HCl y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrados de la casa comercial J.T. Baker, grado analítico. En la cuantificación se trabajó con estándares certificados de metales de Cu, Zn, Cd, Pb y Hg, de una concentración de 1.000 ±5 mg/L, proveniente de la casa comercial Panreac. Las soluciones de las curvas de calibración fueron preparadas en HCl al 10% v/v, según las concentraciones descritas en la Tabla 3-1.

**Tabla 3-1.** Soluciones de las curvas de calibración empleadas para establecer LD y LC instrumental.

Curva	Pb (mg/L)	Cd (mg/L)	Cu (mg/L)	Zn (mg/L)	Hg (µg/L)
Nivel 1	0,05	0,02	0,02	0,05	1,0
Nivel 2	0,1	0,08	0,08	0,5	5,0
Nivel 3	0,5	0,2	0,3	1,2	10,0
Nivel 4	2,0	0,5	0,9	5,0	15,0
Nivel 5	5,0	1,0	1,8	10,0	20,0
Nivel 6	9,4	3,0	3,7	20,0	25,0

### 3.2.3 Instrumentos y equipos

- **Condiciones de digestión**

El proceso de digestión de las mieles con el cual se busca eliminar la materia orgánica del alimento y sus interferentes, se realizó en un digestor microondas asistido marca TOPWAVE de la casa comercial Analytik Jena, bajo las condiciones descritas en la Tabla 3-2. Este es un sistema cerrado en el que se usaron tubos de polietileno de alta densidad (PTFE), con tapas de seguridad y válvulas de escape que hacen segura su manipulación. El tiempo total de digestión con este programa fue de 50 minutos.

**Tabla 3-2.** Descripción del programa de microondas para digestión de las muestras de miel.

Paso	T (°C)	P (bar)	Rampa (min)	T (min)	Potencia %
1	50	0	0	0	0
2	150	30	5	5	40
3	180	30	5	5	40
4	200	30	10	20	40
5	50	0	0	0	0

Para la posterior concentración de las muestras se utilizó un bloque de calentamiento tipo Kjeldahl, dispuesto dentro de una campana de extracción de vapores.

▪ **Cuantificación espectrofotométrica y ajuste del equipo**

La cuantificación de los metales se realizó en un espectrómetro de absorción atómica marca Unicam, modelo Solaar 960 para la determinación de Cu, Zn, Cd y Pb y se acopló al generador de hidruros modelo VP90 para la determinación de Hg.

Las longitudes de onda ( $\lambda$ ) bajo las cuales se hizo el desarrollo del método y la cuantificación de los metales en las muestras de miel fueron: Cu a 324.8 nm, Zn a 213.9 nm, Cd a 228.8 nm, Pb a 217.0 nm y Hg a 253.7 nm.

El equipo fue ajustado según las condiciones instrumentales indicadas por el fabricante del equipo, con base en la absorbancia de una solución estándar de chequeo para cada elemento a cuantificar.

### 3.3 Desarrollo metodológico y variables estandarizadas

Con el fin de estandarizar las principales variables de control de la digestión de muestras de miel de abejas, se propuso optimizar las variables críticas de la digestión ácida vía microondas, como masa de muestra, relación de la mezcla ácida de digestión y el volumen final, partiendo de las condiciones instrumentales sugeridas por el fabricante y buscando llegar a los LMR en mieles para los metales objeto de este estudio.

- Masa de la muestra de miel: el ajuste de esta variable es de suma importancia, pues se debe asegurar que la cantidad de muestra a utilizar sea la suficiente para asegurar la detección y cuantificación de los metales de interés, en especial teniendo en cuenta que tales analitos corresponden a constituyentes de tipo traza. Se realizaron ensayos de digestión con 0,2, 0,3 y 0,4 g de miel, teniendo en cuenta la recomendación del fabricante para muestras orgánicas (0,3 g), se pesaron las muestras en papel filtro libre de cenizas, para poder disponerlas al fondo de los tubos del microondas.
- Relación  $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$ : la combinación de ácido nítrico y peróxido de hidrógeno concentrado es favorable en este tipo de digestión debido a que el  $\text{HNO}_3$  permite

la degradación de la materia orgánica, acompañado de la acción de un fuerte agente oxidante como lo es el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Muller et al., 2016). De acuerdo con esto, una masa de 0,3 g de blanco se puso en contacto con la mezcla ácida en relaciones  $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$  de 1:1, 2:1 y 3:1, las muestras fueron digeridas según las condiciones del microondas, descritas en la Tabla 3.2. Se determinó la ausencia de precipitados en el digesto y la absorbancia obtenida en curvas de calibración para cada elemento.

- Volumen final de solución: El volumen mínimo de digesto recomendado por el fabricante fue de 7 mL. Se trabajó entonces con un volumen inicial de 12 mL, utilizando la relación 2:1 de  $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$ . Terminada la digestión, se realizó transferencia cuantitativa de cada vial PTFE a tubos de ensayo con HCl al 10% para obtener un volumen final de 15 mL. Este digesto fue concentrado en un bloque de calentamiento y dentro de una campana de extracción, aplicando rampas de temperatura de  $50^\circ\text{C}$  cada dos horas hasta llegar a  $200^\circ\text{C}$ , alcanzando un volumen final de 10 mL.
- Programa de digestión: Dado que en la literatura se reportan condiciones de digestión para matrices con alto contenido de azúcares, asociadas a las especificaciones técnicas de cada equipo empleado, se decidió emplear las condiciones recomendadas por el fabricante a fin de evitar condiciones de inseguridad (ver Tabla 3-2).

### 3.3.1 Validación

Se aplicó la validación de acuerdo con los criterios de validación que recoge la decisión CE No 333/2007 y los requisitos de los métodos para el análisis de metales pesados en alimentos de acuerdo al documento SANCO/2004/2726 rev2, donde se determinaron los siguientes parámetros:

- **Límites de detección y cuantificación (LD y LC):** calculado según la aproximación de la IUPAC se construyeron 5 curvas de calibración con 5 niveles

de concentración para cada elemento y con cada curva se leyó 10 veces la absorbancia del blanco de HCl al 10%.

- **Exactitud:** Se evaluó como porcentaje de recuperación, fortificando muestras blanco a partir de una solución de azúcares con composición y apariencia similar a la miel, en tres niveles de concentración (1, 2 y 5 veces el LC instrumental), dentro de los que en lo posible se incluyó al menos el LMR y un nivel inferior a este. Estas muestras fueron digeridas y concentradas, luego se cuantificó la concentración de los analitos para determinar los % de recuperación del método.
- **Precisión:** se evaluó como precisión intermedia mediante el cálculo del coeficiente de variación CV, de las concentraciones obtenidas para las muestras fortificadas a 1, 2 y 5 veces el LC instrumental, por triplicado.
- **Linealidad:** se realizó el ajuste por regresión lineal de las curvas de calibración que fueron construidas con 6 niveles equidistantes y se empleó la prueba de varianza ANOVA con un nivel de confianza del 95% para determinar la falta de ajuste, significancia de la pendiente, intercepto y coeficiente de ajuste.

## 3.4 Resultados y discusión

### 3.4.1 Muestras de miel de abejas

El mejor resultado dada la capacidad de contener materia orgánica de los tubos de teflón del digestor de microondas es 0,3 g, con cantidades mayores se presentaron problemas de sobrepresión y estallido de tapas de los viales de digestión.

### 3.4.2 Relación de mezcla de digestión

Entre los diferentes compuestos oxidantes, se usó  $\text{HNO}_3$ , ya que permite la oxidación de casi todos los compuestos orgánicos, la alta temperatura y la presión generados en el digestor de microondas potencia su capacidad oxidante (Muller et al., 2016). Adicionalmente, se empleó  $\text{H}_2\text{O}_2$  para facilitar la oxidación, siendo este compatible con los principios de química verde, económico y respetuoso del medio ambiente (Noyori, Aoki, & Sato, 2003).

**Tabla 3-3.** Datos analíticos para establecer la relación  $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$  en plomo y cadmio.

PLOMO				CADMIO		
Blanco	$\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$			$\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$		
	1:1	2:1	3:1	1:1	2:1	3:1
Absorbancia $\lambda$ 217 mn				Absorbancia $\lambda$ 228,8 nm		
1	0,000	0,001	0,001	0,004	0,004	0,006
2	0,000	0,000	0,001	0,005	0,007	0,007
3	0,000	0,002	0,001	0,004	0,005	0,005
4	0,001	0,001	0,001	0,004	0,005	0,006
5	0,000	0,000	0,001	0,005	0,006	0,006
6	0,000	0,000	0,000	0,004	0,005	0,005
7	0,000	0,000	0,001	0,004	0,005	0,005
8	0,000	0,000	0,000	0,005	0,003	0,005
9	0,000	0,000	0,000	0,005	0,005	0,007
10	0,001	0,001	-0,001	0,004	0,005	0,007
Desvest	0,0004	0,0007	0,0007	0,001	0,001	0,001
pendiente	0,0148	0,0148	0,0148	0,176	0,176	0,176
LD [mg/L]	0,085	0,143	0,143	0,009	0,018	0,015
LC [mg/L]	0,285	0,478	0,478	0,029	0,060	0,050

**Tabla 3-4.** Datos analíticos para establecer la relación  $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$  en Cobre y Cinc

COBRE				CINC		
Blanco	$\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$			$\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$		
	1:1	2:1	3:1	1:1	2:1	3:1
Absorbancia $\lambda$ 324,8 nm				Absorbancia $\lambda$ 213,9 nm		
1	0,001	-0,001	0,000	0,026	0,024	0,002
2	0,002	0,000	0,001	0,026	-0,007	0,002
3	0,002	0,000	0,000	0,026	-0,007	0,002
4	0,001	-0,001	0,001	0,026	-0,008	0,003
5	0,001	-0,001	0,001	0,025	-0,008	0,002
6	0,002	-0,001	0,001	0,025	-0,007	0,002
7	0,002	-0,001	0,000	0,026	-0,007	0,002
8	0,001	0,000	0,001	0,025	-0,008	0,003
9	0,001	-0,001	0,001	0,025	-0,007	0,002
10	0,001	-0,001	0,000	0,025	-0,008	0,003
Desvest	0,001	0,000	0,001	0,001	0,010	0,000
pendiente	0,048	0,048	0,048	0,200	0,200	0,200
LD [mg/L]	0,032	0,030	0,032	0,008	0,150	0,007
LC [mg/L]	0,107	0,100	0,107	0,026	0,499	0,024

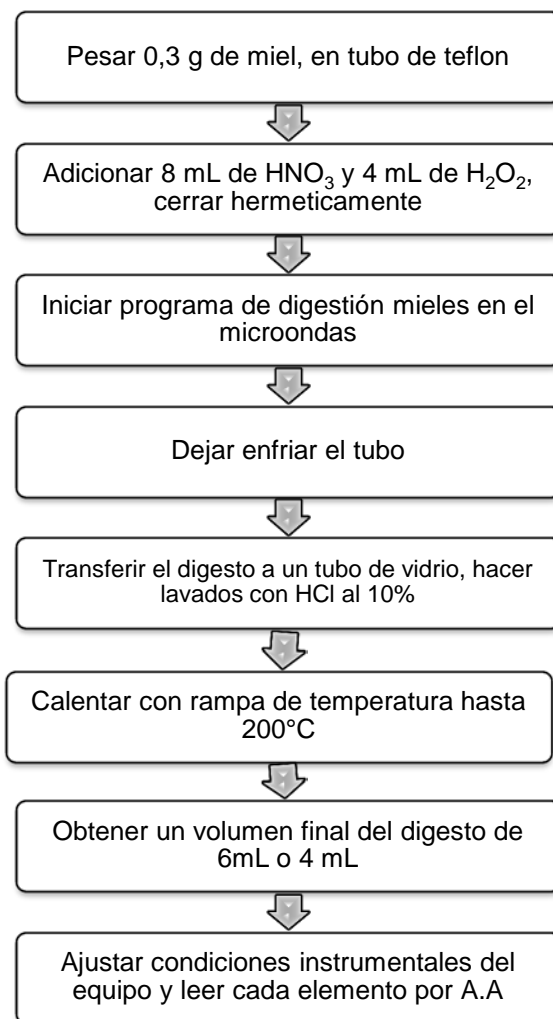
De las proporciones de agentes oxidantes en la mezcla de digestión probadas, la relación  $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$  de 2:1 fue la más apropiada, permitiendo una digestión segura acorde al volumen del tubo de digestión, en la que se obtuvieron soluciones translucidas y sin precipitados, logrando con un gasto total de 12 mL de reactivos y en 50 min la digestión total de las muestras, en un sistema cerrado, controlado y sin riesgos de manipulación.

Con esta proporción de agentes oxidantes, los blancos analizados presentaban una absorbancia baja y estable, que conllevó a bajos valores de desviación estándar. Esta información se presenta en las Tablas 3-3 y 3-4. Para el caso del Hg, se seleccionó esta misma proporción de agentes de digestión, por ser un único digesto para la evaluación de los metales en estudio.

### **3.4.3 Volumen y concentración de la muestra**

Con el aforo de la mezcla resultante de la digestión a 10 mL se obtuvieron LD y LC a concentraciones mayores a los LMR de diferentes legislaciones, lo cual hizo necesario concentrar las muestras hasta alcanzar volúmenes de 6 mL en el caso de Hg y 4 mL para la lectura de Cu, Cd, Pb y Zn. Estos volúmenes se midieron en tubos graduados que fueron previamente calibrados por peso. Una vez concentradas las muestras, se obtuvieron suspensiones claras, homogéneas y estables, con las que fue posible cuantificar los metales tóxicos en concentraciones inferiores a los LMR en la mayoría de los casos.

Finalmente el método de digestión de mieles vía microondas quedó estandarizado como se describe en la Figura 3-1.



**Figura 3-1.** Diagrama de metodología desarrollada para digestión de miel de abejas vía microondas.

### 3.4.4 Validación del método

- **Límites de detección y cuantificación**

Los límites de detección y cuantificación para cada uno de los metales estudiados se presentan en la tabla 3-5. Para el Hg, el método tiene los límites de detección más bajos, y logra cuantificar hasta el orden de  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , mientras que para los otros metales se mantiene en el orden de  $\text{mg}/\text{kg}$ , siendo el Pb el que presenta los límites más altos. Estos límites alcanzados son adecuados ya que permiten determinar la concentración de

metales tóxicos por debajo de los LMR establecidos en diferentes legislaciones para la miel.

▪ **Exactitud y precisión**

Los resultados se presentan en la tabla 3-5. Los porcentajes de recuperación estuvieron entre 70 y 110 % confirmando que el método desarrollado para la digestión, concentración y lectura de metales tóxicos en mieles es cuantitativo y permite determinar con una exactitud adecuada la concentración de estos analitos. Al evaluar la precisión como repetibilidad, se presentaron los mayores índices de dispersión a concentraciones cercanas al límite de cuantificación, no superando valores de CV de 22,5%.

**Tabla 3-5.** Parámetros de validación

	<b>Cd</b>		<b>Cu</b>		<b>Pb</b>		<b>Zn</b>		<b>Hg</b>	
<b>LD mg/kg</b>	0,26		0,54		0,44		0,08		0,02	
<b>LC mg/kg</b>	0,80		1,62		1,32		0,23		0,06	
<b>Fortificación</b>	<b>%R</b>	<b>CV</b>	<b>%R.</b>	<b>CV</b>	<b>%R</b>	<b>CV</b>	<b>%R</b>	<b>CV</b>	<b>%R</b>	<b>CV</b>
LC	6,6	22,3	108,4	18,6	82,9	22,4	99,6	16,1	99,6	18,1
2LC	76,9	3,3	110,3	2,4	93,8	2,5	110,2	10,1	110,2	19,7
5LC	85,0	8,6	88,1	9,2	83,2	11,1	85,3	1,1	85,4	4,2

LD: Límite Detección, LC: Límite Cuantificación, %R: % Recuperación, CV: Coeficiente Variación.

▪ **Linealidad**

**Tabla 3-6.** Evaluación de la linealidad del método.

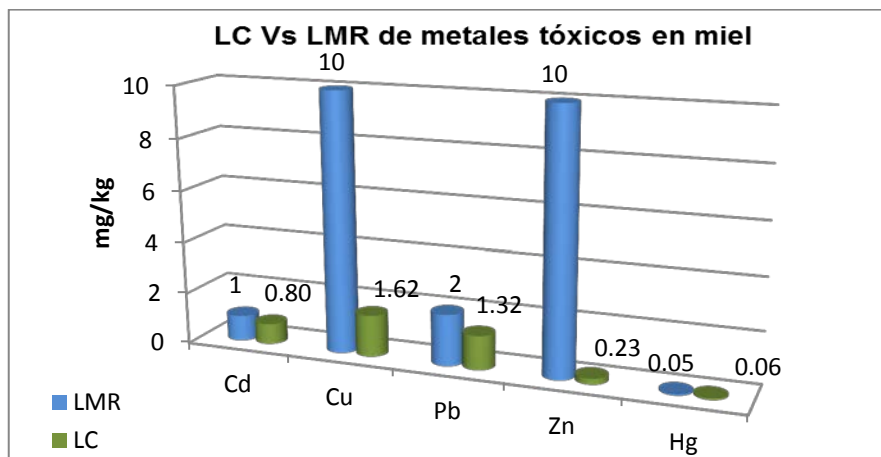
<b>Metal</b>	<b>Rango lineal (mg/L)</b>	<b>Regresión Lineal</b>			<b>Valores P</b>			
		<b>Intercepto</b>	<b>Pendiente</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Intercepto</b>	<b>Pendiente</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Falta ajuste</b>
<b>Cd</b>	0,02- 1,0	-7,3E-05	2,1E-01	1.00	9,7E-01	8,81E-06	2,7E-03	8,8E-06
<b>Cu</b>	0,04 -3,6	-9,1E-04	8,1E-02	1.00	4,2E-01	6.,3E-07	1,6E-03	6,3E-07
<b>Pb</b>	0,05 -9,4	-1,8E-03	3,6E-02	0.99	5,70E-01	6,3E-07	5,4E-03	6,3E-07
<b>Zn</b>	0,05 - 2,0	1,4E-02	2,0E-01	0.99	2,3E-01	1,9E-04	1,4E-02	1,9E-04
<b>Hg</b>	1,0-25*	6,8E-04	4,1E-03	0.99	6,7E-01	1,7E-06	1,9E-03	1,7E-06

\*µg/L

Los resultados se presentan en la tabla 3-6. Para todos los elementos las regresiones y la correlación son significativas ( $p < 0,05$ ), no hay falta de ajuste ( $p > 0,05$ ), y la pendiente en todos los casos es estadísticamente diferente de cero ( $p < 0,05$ ). Todos los resultados indicaron que el sistema es lineal en el intervalo de concentraciones que se presentan, es decir que el método de análisis tiene la capacidad de producir resultados proporcionales a la concentración del analito.

▪ **Límites de Cuantificación en relación a los Límites Máximos de Residuos**

En la Figura 3-2 se presentan los LC del método y los LMR más estrictos establecidos en diferentes legislaciones internacionales para la miel. En el caso de Cd, Pb y Hg, los LMR corresponden a los dictaminados por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos en su informe VM3070 (USDA, 2013), mientras que el LMR para el Cu está regulado por la legislación brasileña. Para el caso del Zn aún no se cuenta con regulación específica para miel, por lo que se considera de manera preliminar que por ser un elemento esencial al igual que el cobre puede tener un comportamiento similar (LMR = 10 mg/kg).



**Figura 3-2.** Relación de LMR y LC para Cd, Cu, Pb, Zn y Hg.

Se observa que el método desarrollado permite la cuantificación de los metales tóxicos: Cd, Cu, Pb y Zn a concentraciones inferiores a los LMR establecidos por la legislación internacional para la miel. Para el caso de Hg, el LC (0,05 mg/kg) es levemente superior a la concentración máxima recomendada en mieles según un informe de la USDA (0,06

mg/kg), sin embargo, es suficientemente baja para detectar contaminación en las mieles de acuerdo con estos LMR provisionales.

### **3.5 Evaluación de metales tóxicos en miel de abejas**

Uno de los objetivos de este estudio, fue evaluar la presencia de metales tóxicos en miel de abejas producida entre cultivos de cítricos y fresas, de diferentes lugares de Colombia. Aplicando el método validado de digestión de mieles por microondas, un total de 57 muestras de miel digeridas y concentradas, fueron cuantificadas. En las Tablas 3-7 a 3-9, se presentan los resultados de la cuantificación de metales tóxicos encontrados en las mieles objeto de este estudio.

En discusión de los resultados se usó como referencia de comparación los LMR legislados en diferentes países, ya que no existe una normatividad oficial del *codex alimentarius* o de la unión europea con respecto a los LMR de metales tóxicos en miel de abejas.

#### **3.5.1 Cadmio**

Todas las muestras analizadas en esta investigación presentaron concentraciones de Cd inferiores al límite de detección (0,26 mg/kg).

De acuerdo con su comportamiento, el cadmio es el elemento más reactivo y móvil en las plantas que la mayoría de otros tipos de metales (Verkleij & Schat, 1990). Una vez en el suelo, el Cd es absorbido activamente por las raíces de las plantas, se transfiere a través del sistema vascular al néctar y el polen, y, posteriormente, se acumula en los polinizadores y los productos de la colmena, incluida la miel, propóleos y cera de abejas (Bogdanov, 2006).

En recientes estudios en Colombia se reportó para mieles colectadas en Boyacá concentraciones entre Cd 0,12 mg/kg a 0,66 mg/kg (Campos 2016), lo cual no sobrepasa el LMR propuesto por la USDA 2013, que es 1 mg de Cd/kg miel. A pesar de la fácil absorción de este elemento, de acuerdo a los resultados presentados en la Tabla 3.7, en esta investigación, este metal tóxico no fue detectable en muestras de miel de cítricos ni de fresa, lo que indica que en el entorno de recolección de estas mieles tampoco se presentan cantidades importantes de este elemento.

### 3.5.2 Cobre

Los resultados muestran que para algunas de las mieles en estudio, no fue posible la detección de cobre, mientras que en otras este elemento presentó un rango de concentraciones entre 1,6 a 12,7 mg/kg (ver tabla 3.7). La presencia de cobre fue constante en todos los apiarios, en al menos una colmena, observándose su detección positiva en el 51,8% de las mieles en cítricos y en el 20,0% de las mieles en fresa.

**Tabla 3-7.** Cuantificación de Cu en muestras de miel de abejas provenientes de cultivos polinizados de fresa y cítricos (mg/kg).

Id muestra		Cu (mg/kg)	Id muestra		Cu (mg/kg)
C1	R1	3,1	F1	R1	11,3
	R2	4,2		R2	ND
	R3	12,7		R4	ND
	R4	ND		R5	ND
	R5	ND		R6	ND
C2	R1	1,7	R10	ND	
	R2	ND	F2	R1	ND
	R3	ND		R2	4,6
	R4	ND		R3	3,4
	R5	ND		R4	ND
C3	R1	3,5		R5	ND
	R2	2,9	R6	ND	
	R3	1,8	R7	ND	
	R4	ND	F3	R2	9,0
	R7	4,9		R5	ND
	R8	2,0		R6	ND
C4	R1	1,6	R7	ND	
	R2	2,0	F4	R2	1,8
	R3	ND		R3	ND
	R4	7,0	F5	R1	ND
	R5	4,56		R2	ND
	R7	ND		R3	11,4
	R9	ND		R4	ND
C5	R1	ND		R7	ND
	R5	ND	R8	ND	
	R6	1,6	F6	R1	ND
	R7	ND		R2	ND
ND = no detectado		R4		ND	
		R6		ND	
		R10		1,6	

Las diferencias encontradas dentro de los apiarios puede obedecer a la variabilidad en su ubicación y el grado de contacto que tienen las abejas con la fuente de contaminación; no presentan diferenciación con respecto al periodo de muestreo.

El límite de detección para este elemento fue 0,54 mg/kg. La concentración promedio de este elemento fue inferior en las mieles de cítricos ( $3,8 \pm 3,0$  mg/kg), no hubo diferencias significativas con respecto a las muestras de miel de fresa ( $6,2 \pm 4,3$  mg/kg).

La NTC 1273 recomienda una concentración máxima de 0,05 mg de Cu/kg miel. La legislación italiana establece un límite de 0,22 mg/kg y la brasileña de 10 mg/kg, para la presencia de cobre metálico en la miel. En cambio, los reglamentos de Nigeria han establecido un límite de 35 mg/kg para la presencia de contenido de cobre y otros metales en muestras de miel. Como se observa, este es uno de los casos en los que no hay consenso acerca de los LMR, lo cual es reiterativo para la mayoría de los metales en estudio.

En otros estudios se encontró que el contenido medio de Cu en las muestras de mieles de Hungría fue 0,19 mg/kg (Czipa, András, & Kovács, 2015), para mieles de Bangladesh se han reportado concentraciones de 0,01 a 0,40 mg/kg (Sarker et al., 2015). En mieles de Libia se obtuvieron concentraciones que van desde 0,80 mg/kg a 10,4 mg/kg (Ahmida, Elwerfali, Agha, Elagori, & Ahmida, 2013) y en mieles de Boyacá (Campos, 2016) se detectaron rangos entre 1,1 mg/kg y 8,7 mg/kg.; estos últimos resultados son similares a los encontrados en esta investigación de las mieles colombianas. La contaminación de cobre en las mieles puede provenir de plaguicidas o de agua que se mantiene en recipientes hechos de metal de cobre

El Cu actúa como un elemento traza esencial en las plantas, y es capaz de acumularse en diferentes tejidos de la planta (Hladun et al., 2015). Es un constituyente de compuestos bioactivos junto con otros metales como el Fe, Zn, Cr, Co, Mo y Mn. El Cu actúa conjuntamente con varias proteínas esenciales para un mayor crecimiento y desarrollo, pero también puede ser tóxico para las plantas y las abejas si la acumulación supera las necesidades celulares (Perna et al., 2014). Por tanto no es de extrañar la presencia de Cu en la miel.

El Cu es uno de los metales esenciales para los seres humanos, el aporte diario recomendado, RDA, es de 900  $\mu$ g/día para adultos, según la resolución 3803 de 2016 de Ministerio de Salud y Protección Social. Sin embargo, puede causar enfermedades cuando se consume en exceso. De acuerdo a la legislación colombiana e italiana, algunas de las mieles analizadas en esta investigación deben ser consumidas con

precaución de acuerdo con el RDA, debido a que pueden llegar a tener efecto acumulativo y superar el nivel de ingesta máximo tolerable (UL) de 10.000 µg/día.

### 3.5.3 Plomo

En esta investigación, partiendo de un LC de 1,3 mg/kg, tan solo en una muestra recolectada en el año 2013 fue posible cuantificar plomo, en un cultivo de fresa en Cundinamarca. La concentración de plomo en la muestra F5R1 fue de 1,51 mg/kg. De acuerdo a la USDA en su informe VM3070, es recomendable un nivel máximo de plomo en mieles de 2,0 mg/kg. Las mieles analizadas cumplieron con dicho parámetro, lo que las hace aptas para consumo humano sin riesgo de toxicidad en este elemento.

Un estudio reportado por Campos (2016), en mieles de Boyacá encontró concentraciones de Pb de 0,61 a 1,1 mg/kg, con esto es posible afirmar que en distintos departamentos de Colombia: Boyacá, Meta y Cundinamarca, existe contaminación ambiental con Pb y que posiblemente proviene de alguna fuente antropogénica, pero por ahora estas concentraciones de contaminación no alcanzan niveles de toxicidad humana.

Las cantidades relativamente pequeñas de Pb se transportan dentro de las plantas y se pueden acumular en las flores, dando lugar a un aumento de la concentración de este metal en las abejas (Hladun et al., 2015). Un estudio realizado por Bogdanov (2006) sugirió que las colmenas deben mantenerse al menos a 3 km de tráfico, debido a los altos niveles de plomo encontrados en los propóleos.

Los contaminantes también se acumulan dentro de la colmena. Un estudio realizado por Formicki et al. (2013) en Polonia mostró que el Cd se acumula en mayor cantidad en la cera de abejas, y el contenido de Pb fue alto tanto en la miel y la cera cuando los apiarios están expuestos en zonas industriales o agrícolas. Leita et al. (1996) probaron la acumulación de metales en colmenas de abejas cerca de cruce de caminos urbanos en Italia y encontraron que la cantidad de Pb, Zn y Cd en los cuerpos de las abejas recolectoras aumentó con el tiempo, y dentro de las colmenas, la jalea real acumula las mayores concentraciones de estos metales. Debido a que la jalea real es el alimento inicial para todas las larvas (no sólo las reinas), la presencia de metales puede afectar potencialmente a todos los miembros de la colonia directamente.

### 3.5.4 Cinc

Este mineral es un componente natural de las mieles. El Zn fue cuantificable en el 100% de las muestras analizadas (LC= 0,23 mg/kg). Presentó una concentración promedio de  $3,9 \pm 2,2$  mg/kg para las mieles de cítricos y  $2,3 \pm 0,94$  mg/kg para las mieles de fresa. No se presentaron diferencias significativas entre las concentraciones de Zn de las muestras recolectadas en el departamento del Meta y las mieles de Cundinamarca, ver Tabla 3-8.

**Tabla 3-7.** Cuantificación de Zn en muestras de miel de abejas provenientes de cultivos polinizados de de fresa y cítricos (mg/kg)

Id muestra		Zn (mg/kg)	Id muestra		Zn (mg/kg)
C1	R1	2,91	F1	R1	1,79
	R2	3,87		R2	2,99
	R3	3,72		R4	2,62
	R4	1,32		R5	1,99
	R5	6,08		R6	0,74
				R10	1,23
C2	R1	3,20	F2	R1	4,17
	R2	2,60		R2	2,78
	R3	1,66		R3	3,30
	R4	2,92		R4	0,87
	R5	2,33		R5	4,16
C3	R1	4,94		R6	2,21
	R2	4,23		R7	2,23
	R3	5,21	F3	R2	0,68
	R4	2,36		R5	2,06
	R7	3,76		R6	2,90
	R8	3,20		R7	1,87
C4	R1	9,32	F4	R2	2,29
	R2	8,15		R3	1,64
	R3	8,92		F5	R1
	R4	3,18	R2		3,80
	R5	3,37	R3		2,65
	R7	3,80	R4		1,49
	R9	5,80	R7		3,17
	C5	R1	3,83	R8	2,45
R5		0,98	F6	R1	3,19
R6		1,82		R2	1,48
R7		0,65		R4	1,93
		R6		1,98	
				R10	1,95

El contenido promedio de Zn en mieles de Hungría fue 2,3 mg/Kg, que es similar a lo reportado por Batista et al. (2012) y Jevtić, et al. (2012). La normatividad de la unión europea y de la USDA para mieles, no tiene establecido la recomendación máxima de

este elemento. Por tanto como al analizar su presencia como elemento esencial se considera que el RDA de 6,5 mg/día para adultos, según la resolución 3803 de 2016 de Ministerio de Salud y Protección Social; los altos niveles de Zn en la dieta pueden causar anemia y disminución de la absorción de cobre y hierro (Czipa et al., 2015).

### 3.5.5 Mercurio

El límite de cuantificación de este elemento para esta investigación fue 0,06 mg/kg. En algunas de las muestras analizadas se detectó Hg, en rangos de concentración de 0,06–0,44 mg/kg (ver tabla 3-9).

Campos (2016), en un estudio similar reportó para mieles de varios municipios de Boyacá, concentraciones de Hg entre 0,04 y 0,016 mg/kg. En esta investigación en promedio las mieles provenientes de cítricos presentaron una concentración más baja de mercurio que las provenientes de fresa con  $0,23 \pm 0,12$  y  $0,25 \pm 0,10$  mg/kg respectivamente

Con respecto a otros países, la concentración promedio de Hg en mieles croatas fue de 0.00047 a 0.0025 mg/kg (Bilandžić, et al., 2014), en Siena, Italia, los niveles de Hg fueron inferiores de 0.0020 mg/kg (Pisani et al., 2008), en Eslovaquia los niveles de mercurio variaron de 0.001-0.0030 mg/kg en zonas no contaminadas industrialmente, con respecto a concentraciones entre 0.050-0.21 mg/kg en muestras recolectadas en regiones con una carga industrial importante de este metal (Toporcák, Legáth, & Kul'ková, 1992).

Las cantidades de mercurio de las mieles de Eslovaquia y las reportadas en esta investigación de diferentes regiones colombianas, son similares a las concentraciones reportadas por Carrero, et al., (2013), quienes evaluaron mieles de países latinoamericanos con un manejo agrónomico similar como Venezuela, Argentina, Brasil y además Australia, obtuvieron rangos de 0,013 a 0,15 µg/kg de Hg. Estas altas concentraciones de Hg en la miel son una alerta que existen fuentes de contaminación de este metal a nivel tóxico en el ambiente.

De acuerdo a las recomendaciones de la USDA en su informe VM3070, el máximo contenido recomendable de Hg en mieles para consumo humano debe ser 0,05 mg/kg. Varias de las mieles provenientes de Meta y Cundinamarca analizadas en esta investigación superaron el LMR recomendado por la USDA. No se presentaron

diferencias significativas entre las concentraciones de Hg para las muestras recolectadas en estos departamentos. Es importante identificar las posibles fuentes de contaminación de este metal tóxico y su persistencia de acuerdo con un muestreo en el tiempo y con una mayor población de muestras.

**Tabla 3-9.** Cuantificación de Hg en muestras de miel de abejas provenientes de cultivos polinizados de fresa y cítricos mg/kg.

Id muestra		Hg (mg/kg)	Id muestra		Hg (mg/kg)
C1	R1	0,07	F1	R1	ND
	R2	0,08		R2	0,32
	R3	0,44		R4	0,080
	R4	0,21		R5	ND
	R5	ND		R6	ND
R10	ND	R10		ND	
C2	R1	0,45	F2	R1	0,25
	R2	0,28		R2	0,37
	R3	0,080		R3	0,24
	R4	0,060		R4	0,10
	R5	0,21		R5	0,11
C3	R1	0,25		R6	ND
	R2	0,22		R7	ND
	R3	0,17	F3	R2	0,32
	R4	ND		R5	0,32
	R7	ND		R6	ND
	R8	ND		R7	ND
C4	R1	0,33	F4	R2	0,32
	R2	0,35		R3	0,33
	R3	0,25	F5	R1	0,14
	R4	ND		R2	0,33
	R5	ND		R3	0,21
	R7	ND		R4	0,40
	R9	ND		R7	ND
C5	R1	0,28	R8	ND	
	R5	0,27	F6	R1	0,35
	R6	ND		R2	ND
	R7	ND		R4	0,19
ND = no detectado		R6		ND	
		R10		ND	

Uno de las mayores fuentes antropogénicas de contaminación de aguas y suelos con Hg, es la explotación de oro. Según Ingeominas, para los años 2012 y 2013, se produjeron respectivamente en el país 66.178 kg y 55.745 kg de oro. Los departamentos de Cundinamarca y Meta, que es de donde proceden la mayoría de las muestras de miel

tienen una actividad minera importante. Es probable que esta sea una de las fuentes de contaminación por Hg en las muestras de miel.

La miel y otros productos de la apicultura que contienen elementos traza tóxicos a niveles por encima de los límites establecidos por la legislación suponen una amenaza para la salud humana debido a los efectos negativos y acumulativos en el cuerpo. La exposición al mercurio (incluso a pequeñas cantidades) debido a su acumulación en el cuerpo puede causar graves problemas de salud, y es peligrosa para el desarrollo intrauterino y en las primeras etapas de vida. El mercurio puede ser tóxico para los sistemas nervioso e inmunitario, el aparato digestivo, la piel y los pulmones riñones y ojos (López, 2014).

En general los metales tóxicos pueden provenir de fuentes externas como la contaminación industrial, fundición, emisiones de las fábricas, la metalurgia no ferrosa, la gasolina con plomo en las carreteras transitadas, procedimientos incorrectos durante las fases de procesamiento y conservación de la miel, así como productos agroquímicos como los fertilizantes que contienen Cd, Hg orgánico y pesticidas a base de As que todavía se utilizan en algunos países (Wang, Kliks, Jun, & Li, 2010).

De acuerdo con los contenidos encontrados en este estudio, es posible afirmar que la miel es un muy buen indicador del medio ambiente, ya que refleja la variación de el contenido de elementos tóxicos de acuerdo con las características del entorno según su persistencia en agua, suelo y aire (Zhang & Wong, 2007).

### **3.6 Conclusiones**

El uso de la digestión vía microondas presentó ventajas sobre los métodos tradicionales en cuanto a cantidad de muestra, tiempo, manipulación y gasto de reactivos necesarios para la destrucción de la materia orgánica presente en la miel. La metodología desarrollada y validada es confiable y sensible para la determinación de Cd, Cu, Pb, Zn y Hg en mieles, y acorde con los niveles de detección internacional requeridos.

La concentración de Hg en las muestras de miel superó el LMR recomendado para mieles de consumo humano, lo cual alerta de la contaminación ambiental que existe de este elemento en el país, por tanto se deben generar medidas ambientales, que mitiguen los efectos tóxicos de este elemento en la población colombiana.

Las abejas son un bioindicador, que con las actividades de recolección de néctar y polen, recogen contaminantes de diferentes fuentes, en este caso indican que el aire, agua y/o suelos de algunos sectores de los departamentos de Meta y Cundinamarca se encuentran altamente contaminados con Hg.

La presencia de Cu, Pb y Zn, fue determinada en concentraciones aptas para consumo humano, el Cd no fue detectado en las mieles analizadas.

De acuerdo con los resultados encontrados, es evidente que las abejas tienen una mayor sensibilidad frente a la presencia de los metales tóxicos en el entorno, que frente a los plaguicidas, lo que permite inferir que el entorno ambiental de las zonas de muestreo está más contaminado con estos metales tóxicos que con plaguicidas, a pesar de la cercanía a las actividades agrícolas en las que fueron recolectadas las muestras, esto puede explicarse por el hecho que mientras los plaguicidas son compuestos que se degradan con el tiempo, difieren de los metales tóxicos, cuya dinámica en el ambiente se basa en el efecto de acumulación.

## 4. Conclusiones y recomendaciones

### 4.1 Conclusiones

Se desarrollaron y validaron las metodologías analíticas que permiten evaluar la inocuidad química de miel de abejas mediante el análisis de residuos de 50 plaguicidas de amplio uso en Colombia, por el método QuEChERS modificado y su detección por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas y la determinación de 5 metales tóxicos (Cd, Pb, Cu, Zn y Hg) en mieles mediante digestión vía microondas y su cuantificación por absorción atómica de llama para Cd, Pb, Cu, Zn y con acoplamiento a generador de hidruros para la medición de Hg. Los niveles de detección desarrollados permitieron cuantificar estos contaminantes por debajo de los LMR establecidos en diferentes normativas.

Se evaluaron un total de 50 plaguicidas en muestras de mieles colectadas en cultivos de cítricos y fresas, en los departamentos de Cundinamarca y Meta. Como resultado, se encontraron dimetomorf, tebuconazol, pirimicarb, metalaxilo y carbofuran, en el 22,7% de las muestras de miel en concentraciones inferiores al LC, lo que indica que a pesar del uso de insumos agrícolas en la zona de muestreo, la presencia de estos plaguicidas en el ambiente es baja.

Se demostró la presencia de, Pb, Cu y Zn en miel de abejas por debajo de los LMR disponibles, no se detectó Cd en ninguna de las muestras. No obstante, se detectó un contenido promedio de Hg (0,22 mg/kg para cítricos y 0,25 mg/kg en fresa) en niveles superiores a los LMR (0,05 mg/kg), lo que genera una alerta sobre el peligro de contaminación ambiental en la zona de estudio por los riesgos a la salud de los consumidores de esta mieles y el efecto negativo que esto puede tener sobre la supervivencia de las abejas y sus actividades de pecoreo.

De acuerdo con los resultados encontrados, se evidencia que las abejas tienen una mayor sensibilidad frente a la presencia de los metales tóxicos en el entorno que frente a los plaguicidas, lo cual se explica por el hecho que mientras los plaguicidas son compuestos que se degradan con el tiempo, difieren de la dinámica de los metales tóxicos en el ambiente, por su efecto de acumulación.

## 4.2 Recomendaciones

Ampliar la evaluación de las mieles a plaguicidas con mayor tiempo de residencia en el ambiente, como son los organoclorados y a otros plaguicidas de uso comercial en Colombia, mediante técnicas complementarias como cromatografía de gases acoplado a masas y/o otros detectores.

Profundizar el estudio de las fuentes de contaminación de la miel por mercurio en las zonas de muestreo de Cundinamarca y Meta, a través de la formulación de un plan de gestión de riesgos.

Con el fin de fortalecer la capacidad analítica en Colombia y brindar las herramientas adecuadas para el control de la inocuidad química de los productos apícolas en Colombia para consumo interno y para exportación, es necesario avanzar en el desarrollo de metodologías analíticas complementarias tales como evaluación de medicamentos veterinarios (antibióticos) de acuerdo con los requerimientos internacionales para su exportación.

## Bibliografía

- Ahmida, Mohamed HS, Elwerfali, Saleh, Agha, Ali, Elagori, Mohamed, & Ahmida, Nagwa HS. (2013). Physicochemical, heavy metals and phenolic compounds analysis of Libyan honey samples collected from Benghazi during 2009-2010. *Food and Nutrition Sciences*, 4(1), 33.
- Ahmida, Mohamed HS, Elwerfali, Saleh, Agha, Ali, Elagori, Mohamed, & Ahmida, Nagwa HS. (2013). Physicochemical, heavy metals and phenolic compounds analysis of Libyan honey samples collected from Benghazi during 2009-2010. *Food and Nutrition Sciences*, 4(1), 33.
- Ahumada, D. A., Arias, L. A., & Bojacá, C. R. (2013). Multiresidue determination and uncertainty analysis of pesticides in soil by ultrafast liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24(7), 1188-1197.
- Ahumada, D., & Guerrero, J. (2010). Estudio del efecto matriz en el análisis de plaguicidas por cromatografía de gases. *Vitae*, 17(1), 51-58.
- Ahumada, Diego A, & Zamudio, Adriana M. (2011). Análisis de residuos de plaguicidas en tomate mediante el uso de QuEChERS y cromatografía líquida ultrarrápida acoplada a espectrometría de masas. *Revista Colombiana de Química*, 40(2), 227.
- Ahumada, Diego A, Rodríguez, Danny, Zamudio, Adriana, & Mojica, Andrea. (2012). Comparison of different approaches to estimate limits of detection for pesticide residues analysis in food. *Revista Colombiana de Química*, 41(2), 227-242.
- Ahumada, Diego A, Zamudio, Adriana M, & España, Julio C. (2012). Matrix effect in pesticide analysis by ultra fast liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(4), 661-669.
- Aliferis, K. A., Tarantilis, P. A., Harizanis, P. C., & Alissandrakis, E. (2010). Botanical discrimination and classification of honey samples applying gas chromatography/mass spectrometry fingerprinting of headspace volatile compounds. *Food Chemistry*, 121(3), 856-862.
- Al-Waili, Noori, Salom, Khelod, Al-Ghamdi, Ahmed, & Ansari, Mohammad Javed. (2012). Antibiotic, Pesticide, and Microbial Contaminants of Honey: Human

- Health Hazards. *The Scientific World Journal*, 2012, 9. doi: 10.1100/2012/930849
- Anastassiades, M., Tasdelen, B., Scherbaum, E., & Stajnbaher, D. (2007). Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. Wiley-VCH: Weinheim.
- Anastassiades, Michelangelo, Lehotay, Steven J, Štajnbaher, Darinka, & Schenck, Frank 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), 412-431.
- Angulo, R. (2009). Fresa *Fragaria Ananassa*. Obtenido de Bayer CropScience: [http://www.cropscience.bayer.co/~media/Bayer%20CropScience/Peruvia n/Country-Colombia-Internet/Pdf/Cartilla-FRESA\\_baja.ashx](http://www.cropscience.bayer.co/~media/Bayer%20CropScience/Peruvia n/Country-Colombia-Internet/Pdf/Cartilla-FRESA_baja.ashx) . Consultado: mayo 2016.
- Avellaneda Barbosa, Kimberly Zuleima. (2009). Estudio del potencial de *apis mellifera*, como polinizador para la formación de fruto en un cultivo de naranja (*citrus sinensis*) tipo exportación.
- Badiou-Bénéteau, A, Benneveau, Aurore, Géret, F, Delatte, Hélène, Becker, Nathalie, Brunet, JL, . . . Belzunces, LP. (2013). Honeybee biomarkers as promising tools to monitor environmental quality. *Environment international*, 60, 31-41.
- Bilandžić, Nina, Gačić, Milica, Đokić, Maja, Sedak, Marija, Šipušić, Đurđica Ivanec, Končurat, Ana, & Gajger, Ivana Tlak. (2014). Major and trace elements levels in multifloral and unifloral honeys in Croatia. *Journal of food composition and analysis*, 33(2), 132-138.
- Bogdanov S., Haldimann M., Luginbühl W., & Gallmann P. (2007). Minerals in honey: environmental, geographical and botanical aspects. *Journal of Apicultural Research*, 46(4), 269-275.
- Bogdanov. (2006). Contaminants of bee products. *Apidologie*, 37(1), 1-18.
- Cajka, Tomas, Hajslova, Jana, Lacina, Ondrej, Mastovska, Katerina, & Lehotay, Steven J. (2008). Rapid analysis of multiple pesticide residues in fruit-based baby food using programmed temperature vaporiser injection–low-pressure gas chromatography–high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1186(1), 281-294.
- Campos, E. (2016). Caracterización palinológica y análisis de contaminantes de mieles y polen apícola, provenientes del departamento de Boyacá. Trabajo de grado para optar el título de Maestría en Ciencias Ambientales. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.

- Celli, Giorgio, & Maccagnani, Bettina. (2003). Honey bees as bioindicators of environmental pollution. *Bulletin of Insectology*, 56(1), 137-139.
- Chautá-Mellizo, Alexander, Campbell, Stuart A, Bonilla, Maria Argenis, Thaler, Jennifer S, & Poveda, Katja. (2012). Effects of natural and artificial pollination on fruit and offspring quality. *Basic and Applied Ecology*, 13(6), 524-532.
- Citak, Demirhan, Silici, Sibel, Tuzen, Mustafa, & Soylak, Mustafa. (2012). Determination of toxic and essential elements in sunflower honey from Thrace Region, Turkey. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(1), 107-113.
- Czipa, Nikolett, Andrási, Dávid, & Kovács, Béla. (2015). Determination of essential and toxic elements in Hungarian honeys. *Food Chemistry*, 175, 536-542.
- Devillers, J, Dore, JC, Marenco, M, Poirier-Duchene, F, Galand, N, & Viel, C. (2002). Chemometrical analysis of 18 metallic and nonmetallic elements found in honeys sold in France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5998-6007.
- Díaz Moreno, Amanda Consuelo. (2009). Influencia de las condiciones de almacenamiento sobre la calidad físico-química y biológica de la miel. Universidad de Zaragoza. Facultad de Veterinaria.
- European Commission. (2017). EU Pesticides database. <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN>
- Fernandez. (2007). Chromatographic-Mass Spectrometric Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues. Almeria (España).
- Golob, Terezija, Doberšek, Urška, Kump, Peter, & Nečemer, Marijan. (2005). Determination of trace and minor elements in Slovenian honey by total reflection X-ray fluorescence spectroscopy. *Food Chemistry*, 91(4), 593-600.
- Greenpeace. (2013). El declive de las abejas. Peligros para los polinizadores y la agricultura de Europa Nota técnica de los Laboratorios de Greenpeace. Revisión 1/2013.
- Herrera-Herrera, Antonio V, Hernández-Borges, Javier, Rodríguez-Delgado, Miguel A, Herrero, Miguel, & Cifuentes, Alejandro. (2011). Determination of quinolone residues in infant and young children powdered milk combining solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(42), 7608-7614.

- Hladun, Kristen R, Parker, David R, & Trumble, John T. (2015). Cadmium, copper, and lead accumulation and bioconcentration in the vegetative and reproductive organs of *Raphanus sativus*: Implications for plant performance and pollination. *Journal of chemical ecology*, 41(4), 386-395.
- Hoehn, Patrick, Tschardtke, Teja, Tylianakis, Jason M, & Steffan-Dewenter, Ingolf. (2008). Functional group diversity of bee pollinators increases crop yield. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 275(1648), 2283-2291.
- ICA. (2016). Registros de venta de plaguicidas químicos de uso agrícola. [http://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Regulacion-y-Control-de-Plaguicidas-Quimicos/REGISTROS-DE-VENTA-diciembre de 2016.aspx](http://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Regulacion-y-Control-de-Plaguicidas-Quimicos/REGISTROS-DE-VENTA-diciembre%20de%202016.aspx) Consultado Diciembre 2016
- ICONTEC. (2007). NTC 1273. miel de abejas. Instituto Colombiano de normas técnicas y certificación. Bogotá, 10 p.
- Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)). (2014). Residuos en cultivos de cítricos. <http://www.ivia.es/sdta/pdf/revista/citricos/25tema01.pdf>
- Juan-Borrás, M., Domenech, E., & Escriche, I. (2016). Mixture-risk-assessment of pesticide residues in retail polyfloral honey. *Food Control*, 67, 127-134.
- Kantiani, Lina, Farré, Marinella, & Barceló, Damiá. (2009). Analytical methodologies for the detection of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk and feed samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(6), 729-744.
- Kishida, Kunihiro. (2007). Quantitation and confirmation of six sulphonamides in meat by liquid chromatography–mass spectrometry with photodiode array detection. *Food Control*, 18(4), 301-305.
- Klatt, Björn K, Holzschuh, Andrea, Westphal, Catrin, Clough, Yann, Smit, Inga, Pawelzik, Elke, & Tschardtke, Teja. (2014). Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value. Paper presented at the Proc. R. Soc. B.
- Klein, Alexandra-Maria, Vaissiere, Bernard E, Cane, James H, Steffan-Dewenter, Ingolf, Cunningham, Saul A, Kremen, Claire, & Tschardtke, Teja. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 274(1608), 303-313.
- Koesukwiwat, Urairat, Jayanta, Siripastr, & Leepipatpiboon, Natchanun. (2007). Validation of a liquid chromatography–mass spectrometry multi-residue method for the simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines,

- and pyrimethamine in milk. *Journal of Chromatography A*, 1140(1), 147-156.
- Kujawski, MW, & Namieśnik, J. (2008). Challenges in preparing honey samples for chromatographic determination of contaminants and trace residues. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(9), 785-793.
- Laverde, Jairo, Egea, Laura, Rodríguez, David, & Peña, Jorge. (2010). Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de las abejas y la apicultura en Colombia con énfasis en miel de abejas.
- Law, Karen A, & Higson, Séamus PJ. (2005). Sonochemically fabricated acetylcholinesterase micro-electrode arrays within a flow injection analyser for the determination of organophosphate pesticides. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(10), 1914-1924.
- Le Bizec, Bruno, Pinel, Gaud, & Antignac, Jean-Philippe. (2009). Options for veterinary drug analysis using mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(46), 8016-8034.
- León Ruiz, Yolian. (2010). Evaluación del efecto de la polinización dirigida a cultivos de naranja (*Citrus Sinensis*) "valencia" y "ombligona" con el uso de la abeja *Apis mellifera* en el municipio de Sasaima, Cundinamarca.
- Li, Baoxin, He, Yuezhen, & Xu, Chunli. (2007). Simultaneous determination of three organophosphorus pesticides residues in vegetables using continuous-flow chemiluminescence with artificial neural network calibration. *Talanta*, 72(1), 223-230.
- Lombardo-Agüí, Manuel, García-Campaña, Ana M, Gámiz-Gracia, Laura, & Cruces-Blanco, Carmen. (2012). Determination of quinolones of veterinary use in bee products by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a QuEChERS extraction procedure. *Talanta*, 93, 193-199.
- López, A., Barragán, R. . (2014). ¿Peces con metales tóxicos en nuestra mesa? La timotera - Universidad Sergio Arboleda, 22, 56-59. Retrieved from [http://www.usergioarboleda.edu.co/wp-content/uploads/2015/07/articulo\\_peces\\_con\\_metales\\_toxicos\\_en\\_nuestra\\_mesa.pdf](http://www.usergioarboleda.edu.co/wp-content/uploads/2015/07/articulo_peces_con_metales_toxicos_en_nuestra_mesa.pdf) website: <http://www.usergioarboleda.edu.co>
- Mallinger, Rachel E, & Gratton, Claudio. (2015). Species richness of wild bees, but not the use of managed honeybees, increases fruit set of a pollinator-dependent crop. *Journal of Applied Ecology*, 52(2), 323-330.
- Mantilla Cortés, C. (1997). Principios de apicultura africanizada: Bogotá (Colombia):. UNAL.

- Marazuela, MD, & Bogialli, S. (2009). A review of novel strategies of sample preparation for the determination of antibacterial residues in foodstuffs using liquid chromatography-based analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 645(1), 5-17.
- Ministerio de agricultura alimentación y medio ambiente (España). (2014). La lucha contra las plagas y las enfermedades de la fresa. [http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf\\_Hort/Hort\\_1982\\_2\\_23\\_31.pdf](http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Hort/Hort_1982_2_23_31.pdf)
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2011). Plan estrategico de accion 2011-2015 Cadena Productiva de las Abejas y la Apicultura.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2015). Informe Sectorial 2015. Cadena Productiva de las Abejas y la Apicultura - CPAA.
- Molina, A, Molina, MP, Althaus, RL, & Gallego, L. (2003). Residue persistence in sheep milk following antibiotic therapy. *The Veterinary Journal*, 165(1), 84-89.
- Mukherjee, Irani. (2009). Determination of pesticide residues in honey samples. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 83(6), 818.
- Muller, Edson I, Souza, Juliana P, Muller, Cristiano C, Muller, Aline LH, Mello, Paola A, & Bizzi, Cezar A. (2016). Microwave-assisted wet digestion with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at high temperature and pressure using single reaction chamber for elemental determination in milk powder by ICP-OES and ICP-MS. *Talanta*, 156, 232-238.
- Nates Parra, Guiomar. (2005). Abejas silvestres y polinización.
- Noyori, Ryoji, Aoki, Masao, & Sato, Kazuhiko. (2003). Green oxidation with aqueous hydrogen peroxide. *Chemical Communications*(16), 1977-1986.
- Orso, D., Martins, M. L., Donato, F. F., Rizzetti, T. M., Kemmerich, M., Adaime, M. B., & Zanella, R. (2014). Multiresidue determination of pesticide residues in honey by modified QuEChERS method and gas chromatography with electron capture detection. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25(8), 1355-1364.
- Pandey, Richa, Shubhashish, Kumar, & Pandey, Jitendra. (2012). Dietary intake of pollutant aerosols via vegetables influenced by atmospheric deposition and wastewater irrigation. *Ecotoxicology and environmental safety*, 76, 200-208.
- Pantoja, A, Smith-Pardo, A, García, A, Sáenz, A, & Rojas, F. (2014). Principios y avances sobre polinización como servicio ambiental para la agricultura sostenible en países de Latinoamérica y El Caribe. Organización de las

- Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura-FAO. Santiago, Chile.[Links].
- Pérez-Burgos, R, Grzelak, EM, Gokce, G, Saurina, J, Barbosa, J, & Barrón, D. (2012). Quechers methodologies as an alternative to solid phase extraction (SPE) for the determination and characterization of residues of cephalosporins in beef muscle using LC–MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 899, 57-65.
- Perna, A., Intaglietta, I., Simonetti, A., & Gambacorta, E. (2014). Metals in honeys from different areas of Southern Italy. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 92(3), 253-258.
- Peters, Frank T, Drummer, Olaf H, & Musshoff, Frank. (2007). Validation of new methods. *Forensic science international*, 165(2), 216-224.
- Pirard, C., Widart, J., Nguyen, B. K., Deleuze, C., Heudt, L., Haubruge, E., ... & Focant, J. F. (2007). Development and validation of a multi-residue method for pesticide determination in honey using on-column liquid–liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1152(1), 116-123.
- Pisani, Anastasia, Protano, Giuseppe, & Riccobono, Francesco. (2008). Minor and trace elements in different honey types produced in Siena County (Italy). *Food Chemistry*, 107(4), 1553-1560.
- Pohl, Pawel. (2009). Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(1), 117-128.
- Porrini, C., Sabatini, A. G., Girotti, S., Ghini, S., Medrzycki, P., Grillenzoni, F., ... & Celli, G. . (2003). Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination. *Apiacta*, 38(1), 63-70.
- Przybyłowski, Piotr, & Wilczyńska, Aleksandra. (2001). Honey as an environmental marker. *Food Chemistry*, 74(3), 289-291.
- Ricou, Charles, Schneller, Chloé, Amiaud, Bernard, Plantureux, Sylvain, & Bockstaller, Christian. (2014). A vegetation-based indicator to assess the pollination value of field margin flora. *Ecological Indicators*, 45, 320-331.
- Rissato, S. R., Galhiane, M. S., do RN. Knoll, F., de Andrade, R. M. B., & de Almeida, M. V. . (2006). Método multirresíduo para monitoramento de contaminação ambiental de pesticidas na região de Bauru (SP) usando mel como bio-indicador. *Química Nova*, 29(5), 950.
- Rodríguez, D., Ahumada, D. A., Díaz, A. C., & Guerrero, J. A. (2014). Evaluation of pesticide residues in honey from different geographic regions of Colombia. *Food Control*, 37, 33-40.

- Rodríguez, D. (2011). Evaluación de la presencia de residuos de plaguicidas en miel de abejas provenientes de los departamentos de Boyacá, Cundinamarca, Magdalena y Santander (Tesis de Maestría en Ciencias Químicas). (Maestría en Ciencias Químicas), Universidad Nacional de Colombia.
- Rodríguez, D. R., Ahumada, D. A., Díaz, A. C., & Guerrero, J. A. (2014). Evaluation of pesticide residues in honey from different geographic regions of Colombia. *Food Control*, 37, 33-40.
- Romero-González, R, Aguilera-Luiz, MM, Plaza-Bolaños, P, Frenich, A Garrido, & Vidal, JL Martínez. (2011). Food contaminant analysis at high resolution mass spectrometry: Application for the determination of veterinary drugs in milk. *Journal of Chromatography A*, 1218(52), 9353-9365.
- Ru, Qiao-Mei, Feng, Qiang, & He, Jin-Zhe. (2012). Risk assessment of heavy metals in honey consumed in Zhejiang province, southeastern China. *Food and Chemical Toxicology*.
- Salvia, Marie-Virginie, Vulliet, Emmanuelle, Wiest, Laure, Baudot, Robert, & Cren-Olivé, Cécile. (2012). Development of a multi-residue method using acetonitrile-based extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of steroids and veterinary and human drugs at trace levels in soil. *Journal of Chromatography A*, 1245, 122-133.
- Sánchez, O, Castañeda, P, Muños, G, & Tellez, G. (2013). Aportes para el análisis del sector apícola Colombiano. *Journal of Agricultural science and Technology*, 2(4), 469-483.
- Sandroni, Valérie, & Smith, Clare MM. (2002). Microwave digestion of sludge, soil and sediment samples for metal analysis by inductively coupled plasma–atomic emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 468(2), 335-344.
- Sanford, M. T. . (2011). Pollination of citrus by honey bees. Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Publicación No. RFAA092.
- SANTE. (2015). Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. European commission health and consumer protection directorate-general.
- Sarker, Nandita, Chowdhury, Muhammed Alamgir Zaman, Fakhruddin, Abu Naieum Muhammad, Fardous, Zeenath, Moniruzzaman, Mohammed, & Gan, Siew Hua. (2015). Heavy metal contents and physical parameters of *Aegiceras corniculatum*, *Brassica juncea*, and *Litchi chinensis* honeys from Bangladesh. *BioMed research international*, 2015.

- Shamsipur, M., Yazdanfar, N., & Ghambarian, M. (2016). Combination of solid-phase extraction with dispersive liquid–liquid microextraction followed by GC–MS for determination of pesticide residues from water, milk, honey and fruit juice. *Food chemistry*, 204, 289-297.
- Silici, Sibel, Uluozlu, Ozgur Dogan, Tuzen, Mustafa, & Soylak, M. (2008). Assessment of trace element levels in Rhododendron honeys of Black Sea Region, Turkey. *Journal of hazardous materials*, 156(1), 612-618.
- Silva, D, Arcos, A, & Gómez, J (2005). Guía ambiental apícola. Instituto de Investigación en Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Tette, Patrícia Amaral Souza, Guidi, Letícia Rocha, de Abreu Glória, Maria Beatriz, & Fernandes, Christian. (2016). Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods. *Talanta*, 149, 124-141.
- Toporcák, J, Legáth, J, & Kul'ková, J. (1992). Levels of mercury in samples of bees and honey from areas with and without industrial contamination. *Veterinarni medicina*, 37(7), 405-412.
- Tuzen, M, Silici, S, Mendil, D, & Soylak, M. (2007). Trace element levels in honeys from different regions of Turkey. *Food Chemistry*, 103(2), 325-330.
- Tuzen, Mustafa, Soylak, Mustafa, & Elci, Latif. (2005). Multi-element pre-concentration of heavy metal ions by solid phase extraction on Chromosorb 108. *Analytica Chimica Acta*, 548(1), 101-108.
- USDA.( 2013). Report number VM3070. Global Agricultural Information Network. US Department of Agriculture, Washington DC.
- Van der Steen, Jozef JM, de Kraker, Joop, & Grotenhuis, Tim. (2015). Assessment of the potential of honeybees (*Apis mellifera* L.) in biomonitoring of air pollution by cadmium, lead and vanadium. *Journal of Environmental Protection*, 6(02), 96.
- Vanengelsdorp, Dennis Meixner, Marina Doris. (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103.
- Vásquez Romero, Rodrigo Efrén, Chavarro, Ballesteros, Durán, Hugo Humberto Tello, Carrillo, Jorge Euclides Castañeda, Corredor, Sandra Johanna Calvo, Floréz, Nelson Enrique Ortega, . . . Romero, Ligia Enith Rodrigo Efrén Vásquez. (2011). Polinización dirigida con abejas *Apis mellifera*: tecnología para el mejoramiento de la producción de cultivos con potencial exportador.
- Vásquez, Rodrigo Vásquez, Ballesteros, Hugo, Ortegón, Yair, & Castro, Uriel. (2006). Polinización dirigida con *Apis mellifera* en un cultivo comercial de

- fresa (*Fragaria chiloensis*). *Revista Corpoica: Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 7(1), 50-53.
- Verde, Mayda M. (2014). Apicultura y seguridad alimentaria. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 48(1).
- Verkleij, JAC, & Schat, H. (1990). Mechanisms of metal tolerance in higher plants (Vol. 95): CRC Press, Boca Raton, FL.
- Vilhena, Alice Maria Guimarães Fernandes, Rabelo, Laíce Souza, Bastos, Esther Margarida Alves Ferreira, & Augusto, Solange Cristina. (2012). Acerola pollinators in the savanna of Central Brazil: temporal variations in oil-collecting bee richness and a mutualistic network. *Apidologie*, 43(1), 51-62.
- Villar-Pulido, Marina, Gilbert-López, Bienvenida, García-Reyes, Juan F, Martos, Natividad Ramos, & Molina-Díaz, Antonio. (2011). Multiclass detection and quantitation of antibiotics and veterinary drugs in shrimps by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Talanta*, 85(3), 1419-1427.
- Vincencica-Gae, Zane Klavins, Maris Rudovica, Vita Viksna, Arturs. Potentially Toxic Metals in Honey from Latvia: Is there Connection with Botanical Origin? *Recent Researches in Environment, Energy Systems and Sustainability*.
- Wang, Jun, Kliks, Michael M, Jun, Soojin, & Li, Qing X. (2010). Residues of organochlorine pesticides in honeys from different geographic regions. *Food Research International*, 43(9), 2329-2334.
- Zaitoun, Shahera Talat, Al\_Ghzawi, AA, Shannag, Hail Kamel, & Al-Tawaha, Abdel Rahman M. (2006). Comparative study on the pollination of strawberry by bumble bees and honeybees under plastic house conditions in Jordan valley. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 4(2), 237.
- Zhang, L, & Wong, MH. (2007). Environmental mercury contamination in China: sources and impacts. *Environment international*, 33(1), 108-121.