



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

Facultad de Ciencias Agrarias

Escuela de Agronomía

Determinación de residuos de fluvalinato en mieles
de la X Región de Los Lagos, Chile

Tesis presentada como parte de
los requisitos para optar al grado
de Licenciado en Agronomía

Claudia Marcela Dussaubat Arriagada

Valdivia Chile 2002

PROFESOR PATROCINANTE

Miguel Neira C.

Ing. Agr.

PROFESORES INFORMANTES

Roberto Carrillo L.

Ing. Agr., M. Sc., Ph. D.

Manuel Pinto C.

Prof. Química., M. Sc.

Agradecimientos

Quiero agradecer a la Sra. Nimia Manquián y a todas las personas del Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Austral de Chile por su apoyo y excelente disposición durante la realización de este trabajo.

A los profesores Miguel Neira C., Roberto Carrillo LL. y Manuel Pinto C. por sus aportes que permitieron el buen desarrollo de esta tesis.

A la empresa APICOOP Ltda. en la persona de Lily Becerra por atender en todo momento las innumerables preguntas que surgieron durante este estudio.

A la profesora Andrea Báez M. por enseñarme que la estadística no sólo es necesaria sino también entretenida.

A Paola Báez, Claudia Salinas y Solange Sillard por su amistad, y a mi familia por la paciencia y cariño.

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Apicultura en la X Región	3
2.1.1	Aptitud melífera de la X Región	3
2.1.1.1	Características climáticas relevantes en la producción melífera	4
2.1.1.2	Paisajes vegetacionales	5
2.1.1.3	Flora melífera	6
2.1.2	Antecedentes apícolas entregados por el VI Censo Agropecuario y estudios anteriores	7
2.1.3	Descripción de las pequeñas explotaciones apícolas de la X Región	9
2.1.3.1	Productos obtenidos	9
2.1.3.2	Comercialización	9
2.1.3.3	Nivel de manejo y control de las colmenas	10
2.1.3.4	Situación sanitaria de las explotaciones	11
2.2	Antecedentes del fluvalinato	12
2.2.1	Características químicas	12
2.2.2	Mecanismo de acción	13
2.2.3	Antecedentes toxicológicos	13
2.2.4	Tolerancias establecidas para fluvalinato	15
2.2.4.1	Ingesta diaria admisible	15
2.2.4.2	Límite máximo de residuos	16

Capítulo		Página
2.3	Uso de fluvalinato para el control de varroa	16
2.3.1	Antecedentes de <i>Varroa destructor</i> Anderson & Trueman (Acari: Varroidae)	17
2.3.2	Aspectos generales del control de varroa	19
2.3.3	Aplicación de fluvalinato en las colmenas	19
2.4	Consecuencias del uso de fluvalinato para el control de varroa	20
2.4.1	Desarrollo de ácaros resistentes a fluvalinato	21
2.4.2	Efectos sinérgicos	22
2.4.3	Contaminación de los productos apícolas	23
2.5	Residuos de fluvalinato en miel	23
2.5.1	Factores que provocan la presencia de residuos en miel	24
2.5.2	Concentraciones de fluvalinato encontradas en miel	25
2.5.3	Disipación y degradación de los residuos de fluvalinato en miel	26
2.6	Métodos analíticos para la detección de residuos de fluvalinato en miel	27
3	MATERIAL Y MÉTODO	29
3.1	Material utilizado	29
3.1.1	Muestras de miel	29
3.1.2	Equipos e implementos de laboratorio	29
3.1.3	Reactivos	30
3.1.4	Patrón original	30
3.2	Metodología	30
3.2.1	Toma de muestras	30
3.2.2	Conservación de las muestras en laboratorio	31
3.2.3	Método analítico	31
3.2.3.1	Método de extracción del fluvalinato	31

Capítulo		Página
3.2.3.2	Análisis cromatográfico	32
3.2.3.3	Obtención de resultados	32
3.2.4	Análisis estadísticos	33
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	35
4.1	Residuos de fluvalinato encontrados en mieles de la X Región	35
4.1.1	Posibles causas de la presencia de residuos en las muestras de miel	36
4.1.2	Posibles causas de ausencia de residuos en las muestras de miel	39
4.1.3	Comparación de los niveles de residuos detectados con estudios realizados en otros países	40
4.2	Evaluación de los residuos detectados en relación con las tolerancias establecidas	42
4.2.1	Residuos detectados en relación con los LMRs	43
4.2.2	Residuos detectados en relación con la IDA	44
4.3	Efectos de algunas características de los apicultores sobre los residuos detectados, y determinación de dependencia entre estas características y los niveles de fluvalinato	45
4.3.1	Localización geográfica de las colmenas y niveles de residuos detectados	46
4.3.2	Importancia económica de la actividad apícola y niveles de residuos detectados	47
4.3.3	Tamaño de la explotación apícola y niveles de residuos detectados	48
5	CONCLUSIONES	50

Capítulo		Página
6	RESUMEN	52
	SUMMARY	53
7	BIBLIOGRAFÍA	54
	ANEXOS	65

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Unidades de paisajes vegetacionales en la X Región	6
2	Enfermedades que atacan abejas en la X Región	11
3	Niveles de residuos de fluvalinato presentes en miel, según diversos autores	26
4	Número de muestras y concentraciones de fluvalinato por comuna	46

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Existencia de colmenas y producción de miel en la X Región, en el período 1964 – 1997	8
2	Estructura química del fluvalinato	12
3	Aplicación de fluvalinato en la colmena, a) Apistán, b) tablillas artesanales	20
4	Histograma para concentración de fluvalinato y porcentaje de muestras sobre el LD	36
5	Porcentaje de muestras en relación al LMR (10 μ g/kg) según el nivel de importancia económica de la actividad apícola	48

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Unidades de paisajes vegetacionales de la X Región	66
2	Especies de importancia melífera de la X Región	67
3	Evolución de las exportaciones de miel chilena en los últimos años, expresadas en kilos de miel y monto en dólares FOB	68
4	Característica químicas del fluvalinato	68
5	Límite máximo de residuos para fluvalinato establecidos por España y Estados Unidos en productos agrícolas y alimentos	69
6	Comparación de la morfología de hembras adultas de <i>Varroa jacobsoni</i> Oud. y <i>Varroa destructor</i> Anderson & Trueman	70
7	Sincronización de los ciclos de la abeja y de varroa	71
8	Selectividad del método analítico	72
9	Linealidad del método analítico	74
10	Determinación de la precisión del sistema	76
11	Sensibilidad del método analítico	77
12	Exactitud del método analítico	78
13	Muestras por concentración de fluvalinato, localización geográfica de las colmenas, tamaño de la explotación apícola e importancia económica de la actividad apícola	79
14	Muestras según el LD y LMR de 10 µg/kg	82
15	Tabla de frecuencias para concentración de fluvalinato en miel (µg/kg) de todas las muestras analizadas	83
16	Número y porcentaje de muestras sobre y bajo el LD según mes de muestreo	83

Anexo		Página
17	Análisis de varianza y pruebas de comparación múltiple	84
18	Pruebas de X^2	86
19	Localización aproximada de las colmenas (por comunas) y niveles de residuos detectados en las muestras de miel	88

1 INTRODUCCIÓN

Desde la detección en 1992 del ácaro *Varroa destructor* Anderson & Trueman en Chile, el fluvalinato (piretroide) ha sido uno de los plaguicidas más empleados para su control. De éste existen formulaciones especiales para su aplicación en las colmenas, sin embargo, son de alto costo para apicultores que poseen pequeñas explotaciones y que representan el mayor porcentaje en la X Región.

Esto llevó al uso de formulaciones destinadas a cultivos en la elaboración artesanal de tablillas impregnadas del ingrediente activo para el control de varroa. En consecuencia, factores tales como dosis y tiempo de liberación del producto, son escasamente controlados, lo que puede tener relación directa con la presencia de residuos en los productos apícolas. Tales residuos se han detectando en otros países por más de diez años en cera, miel y otros productos de la colmena, debido principalmente a prácticas inadecuadas.

La presencia de residuos en la miel constituye eventualmente un riesgo para la salud del consumidor. Por esta razón, varios países han establecido niveles de tolerancia para los productos químicos que pueden estar presentes en la miel, los que actualmente forman parte de las exigencias de calidad para la importación.

Lo anterior, pone en evidencia la necesidad de estudiar la situación de los residuos de plaguicidas que pueden estar presentes en la miel, con el fin de obtener una base para mejorar el manejo sanitario, y así disminuir y prevenir la presencia de estos.

En este marco se desarrolla el proyecto “*Acciones sanitarias de prospección, control y vigilancia como bases para un programa de estrategias de manejo integrado de enfermedades en abejas para incrementar la producción de miel en la IX y X Regiones de Chile*”. Éste se realiza en conjunto entre el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), la empresa Cooperativa Campesina Apícola Valdivia, Ltda. (APICOOB), la Universidad Austral de Chile y otras instituciones asociadas.

En base a lo expuesto, surge la hipótesis que, mieles de apicultores de la X Región contienen residuos detectables de fluvalinato. En consecuencia, se ha planteado como objetivo general para este trabajo, la determinación de residuos de este plaguicida en mieles provenientes de la X Región, por medio de técnicas analíticas implementadas con ese fin. Como objetivos específicos se han propuesto los siguientes:

- Comparar los niveles de residuos de fluvalinato detectados con estudios similares realizados en otros países.
- Evaluar los niveles de residuos encontrados en relación con las tolerancias establecidas.
- Determinar los efectos de algunas características de los apicultores, tales como, localización geográfica de las colmenas, nivel de importancia económica de la actividad apícola y tamaño de la explotación apícola, sobre los niveles de residuos detectados.
- Establecer si existe dependencia de los niveles de fluvalinato, en relación con los límites máximos de residuos (LMRs), a los factores importancia económica de la actividad apícola y tamaño de la explotación apícola.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Apicultura en la X Región.

El rubro apícola en la X Región corresponde a una actividad económica secundaria desarrollada principalmente por sectores campesinos. Lo señalado por RÍOS (2001), sería según lo indicado por NAHUELHUAL (1997), extensible en general a la apicultura chilena, y específicamente a la producción de miel.

En general, las pequeñas explotaciones apícolas poseen entre 12 a 15 colmenas promedio con rendimientos que no superan los 15 kg por colmena. La excepción a nivel nacional la constituyen 10 a 12 apicultores grandes, que manejan más de 1000 colmenas cada uno, con alta tecnología y diversificación de la producción (NEIRA, 1999).

En Chile, es posible observar tres zonas con diferentes aptitudes naturales según la complementación existente entre la flora melífera y las condiciones agroclimáticas, ubicando a la X Región en una zona típicamente melífera que comprende desde Cautín a Chiloé. Hacia el norte, entre Talca y Malleco, se encuentra una zona de polinización, producción de núcleos, reinas y miel, en tanto, entre Aconcagua y Curicó existe una zona de producción mixta (miel, polinización y abejas) (INACAP 1979, citado por RÍOS, 2001).

2.1.1 Aptitud melífera de la X Región. LESSER (1995), señala que la extensión de regiones como la X (66.997 km²) y IX (31.858 km²) determina una alta variabilidad de factores ecológicos como vegetación, clima y temperatura en particular, lo que condiciona en gran medida la producción apícola.

En la X Región, que se extiende desde el paralelo 39° 30'S al 44°S, y alcanza 550 km en el sentido norte-sur y 250 km en el sentido este-oeste, se distinguen tres áreas ecológicas bien definidas, la Precordillera Andina al este, la Precordillera de la Costa al oeste y entre ambas se encuentra el Llano Central o Depresión Intermedia (CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE DESARROLLO AGROPECUARIO (INDAP), 1994).

2.1.1.1 Características climáticas relevantes en la producción melífera. El área de la X Región comprendida entre el límite con la IX Región por el norte y el seno de Reloncaví por el sur, se caracteriza como una región lluviosa y templada, con precipitaciones anuales entre 1500 a 3000 mm y temperaturas medias anuales entre 11 y 12 °C. En gran parte de esta zona, se produce una sequía relativa de uno o más meses durante el verano, en tanto, durante el otoño e invierno la humedad es excesiva. Esto último no afecta mayormente la producción melífera debido a que en esta área la floración y el trabajo de las abejas se hace efectivo desde septiembre en adelante (CHILE, CORPORACIÓN DE FOMENTO DE LA PRODUCCIÓN (CORFO), 1987).

El monto de precipitación tiene importancia en cuanto a su distribución a través del año, y su intensidad durante el período de floración de las especies melíferas (CORFO, 1987). En tanto, la humedad ambiental tiene un efecto inverso sobre la concentración de azúcares en el néctar porque a medida que es secretado, su concentración va cambiando hasta establecer un equilibrio entre su presión osmótica y la presión relativa atmosférica (Shuel 1975, citado por GALLARDO, 1993).

Respecto a las temperaturas, los días en que se producen períodos con más de 12 °C se suceden a partir de septiembre y octubre. Esta temperatura correspondería, de acuerdo a Crane (1976), citado por CORFO (1987), al límite

térmico inferior para que las abejas desarrollen su actividad fuera de la colmena.

Por lo anterior, es interesante considerar el período térmico vegetativo, calculado en base al período medido en días, durante los cuales la temperatura está por sobre los 10 °C. La mayor parte de la X Región tiene un período térmico vegetativo entre 180 y 200 días al año, destacándose localidades en La Unión y Futrono con períodos de más de 220 días (CORFO, 1987). Más en detalle MONTALDO y MEDEL (1986), señalan que en la Precordillera y Cordillera Andina entre Malleco y Llanquihue, hay sectores con menos de 180 días. En tanto, al oeste de los lagos interiores se observa una isolínea de 180 días que corre de norte a sur, además de una isolínea de 210 días a lo largo de la Depresión Intermedia.

CORFO (1987), se refiere al viento como otro factor relevante en la apicultura citando a Crane (1976), quien indica que vientos superiores a 25 km por hora son un factor limitante, siendo importante considerarlo principalmente en el establecimiento de apiarios en las pendientes occidentales de la Cordillera de la Costa, donde sólo algunos lugares protegidos del viento logran producciones de miel aceptables.

2.1.1.2 Paisajes vegetacionales. CORFO (1987) determinó cinco unidades de paisajes vegetacionales en la X Región, desde el límite regional con la IX Región por el norte y el Seno de Reloncaví por el sur (Cuadro 1).

Cada unidad corresponde aproximadamente a una zona geográfica, de tal manera que, la Unidad I está representada por la Precordillera Andina, la Unidad II por la Depresión Intermedia o Llano Central, la Unidad III por los cordones de la Cordillera de la Costa, la Unidad IV corresponde a la zona de

suelos planos de Llanquihue y la Unidad V se ubica en la zona de la Cordillera Andina (representación gráfica en Anexo 1).

CUADRO 1 Unidades de paisajes vegetacionales en la X Región.

Unidad	Descripción
I	Mosaico de praderas naturalizadas en trumao con inclusiones de comunidades arborescentes y arbóreas.
II	Mosaico de praderas y cultivos con inclusiones de parque roble-laurel y comunidades arborescentes.
III	Mosaico de bosques en lomajes con inclusiones de praderas naturalizadas.
IV	Mosaico de praderas naturalizadas en ñadi con inclusiones arbustivas.
V	Bosques de la cordillera andina con inclusiones de praderas naturalizadas.

FUENTE: modificado a partir de Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Universidad Austral de Chile (1981), citado por CORFO (1987).

2.1.1.3 Flora melífera. La flora melífera está constituida por plantas nativas, naturalizadas, de cultivo y forrajeras que contribuyen con néctar y polen a la producción de miel y cera (CORFO, 1987). Para que una especie sea considerada una planta melífera debe cumplir los siguientes requisitos: tener nectarios, ser productora de polen, morfología floral apropiada para la visita y trabajo de las abejas, estar en floración en días con temperaturas sobre 12 °C, presentar néctar o polen carente de principios tóxicos y tener algún grado de dominancia dentro de las comunidades a las que esté asociada.

A través del estudio realizado por CORFO (1987), se establecieron valores de importancia melífera para las especies estudiadas en cada unidad vegetacional, considerando la dominancia de las especies (de acuerdo a

biomasa o porcentaje de cobertura) y los períodos de floración. De esto se obtuvo que:

- En praderas naturalizadas las especies herbáceas más importantes corresponden a hierba del chancho (*Hypochaeris radicata* L.), hierba mora (*Prunella vulgaris* L.), trébol blanco (*Trifolium repens* L.), alfalfa chilota (*Lotus uliginosus* Schkuhr) y siete venas (*Plantago lanceolata* L.). Siendo la hierba del chancho el común denominador en todas las unidades vegetacionales.
- En praderas artificiales las especies herbáceas más importantes son el trébol rosado (*Trifolium pratense* L.) y trébol blanco, para las unidades I, II y III. En estas mismas unidades, las especies de cultivo con mayor valor de importancia melífera son raps (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*), manzano (*Malus pumila* Mill.), guindo (*Prunus avium* L.), cerezo (*Prunus cerasus* L.) y ciruelo (*Prunus domestica* L.).
- Entre las especies leñosas con mayor valor de importancia melífera se encuentra el canelo (*Drimys winteri* J.R. et Forster), en las unidades II, IV y V. En la unidad I la especie que más se destaca es el chilco (*Fuchsia magellanica* Lam.), y en la unidad III son la murta (*Ugni molinae* Turz.) y el radial (*Lomatia hirsuta* (Lam). Diels. ex Macbr.).

Otras especies de importancia melífera para la región se indican en el Anexo 2.

2.1.2 Antecedentes apícolas entregados por el VI Censo Agropecuario y estudios anteriores. De acuerdo al Censo Agropecuario de 1997, la X Región posee un total de 29.621 colmenas, repartidas entre 1.478 productores. Éstas corresponden al 8,9% de las colmenas del país, de las cuales

aproximadamente un tercio son colmenas rústicas (CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS (INE), 1997). Resulta interesante contrastar esta cifra con la capacidad potencial de sustentación de colmenas señalada por CORFO (1987), que corresponde a 145.000 colmenas para la región.

En relación a la producción de miel, esta región se ubica en cuarto lugar en el ámbito nacional alcanzando 329.232 kilos, con un rendimiento de 11,1 kg por colmena. Es importante destacar que, de acuerdo a Henríquez (1999), citado por RÍOS (2001), es probable que las cifras entregadas por el censo sean menores que las reales tanto a nivel nacional (2.753.300 kg) como en la X Región, considerando un consumo interno por habitante de 0,125 kg de miel al año, y una exportación total de 1.467.510 kg en 1997.

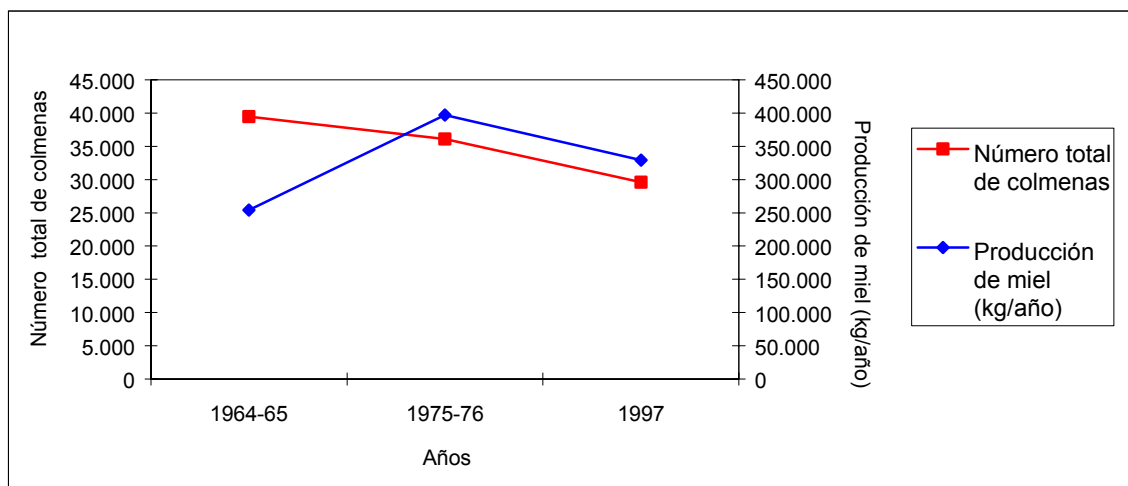


FIGURA 1 Existencia de colmenas y producción de miel en la X Región, en el período 1964 – 1997.

FUENTE: elaborado a partir de NEIRA (1999) e INE (1997).

En cuanto a la evolución del número de colmenas en la X Región (Figura 1), éstas han disminuido desde el período 1964-65, en tanto, la producción de miel se ha incrementado reflejando posiblemente mayor eficiencia en el rubro. De acuerdo a RÍOS (2001), este comportamiento es similar al del resto del país.

2.1.3 Descripción de las pequeñas explotaciones apícolas de la X Región.

En 104 explotaciones estudiadas por RÍOS (2001), en la zona de la Precordillera Andina y Llano Central de la región, las colmenas tipo moderna son mayoritarias, con un predominio de explotaciones pequeñas. Es decir, son más las explotaciones que poseen entre 1 a 10 colmenas y entre 11 a 40 colmenas, que aquellas entre 41 a 100 o más de 100 colmenas.

Además, RÍOS (2001), señala que son muy pocos los apicultores que realizan trashumancia, siendo estos productores de mayor tamaño y desarrollo empresarial. De manera que la mayoría posee colmenas fijas y practica la apicultura como una actividad económica secundaria.

Por otra parte, se destaca que en general los apicultores participan en organizaciones o empresas asociativas y que un alto porcentaje ha recibido capacitación y cuenta con asistencia técnica (RÍOS, 2001).

2.1.3.1 Productos obtenidos. El principal producto de las explotaciones lo constituye la miel que alcanza rendimientos hasta 27 kg/colmena al año en la zona de la Precordillera. La producción de polen, propóleos y jalea real tiene escasa relevancia. En cuanto a la producción de material biológico, un alto porcentaje de apicultores produce sus propias reinas y núcleos (RÍOS, 2001).

El mismo autor señala que en la X Región gran parte de los apicultores entrega cera en bruto a la empresa APICOOP Ltda., recibiendo a cambio cera estampada elaborada a partir de las ceras recibidas.

2.1.3.2 Comercialización. NAHUELHUAL (1997), afirma que el consumo nacional de productos apícolas es bajo, debido a razones como: desconocimiento por parte del consumidor, rechazo de la miel comercializada en bruto y falta de prácticas de higiene en el manejo del producto.

Un cambio positivo se observa con la asociación de apicultores en la X Región. RÍOS (2001), señala que los apicultores estudiados por él, comercializan miel en forma asociativa principalmente a través de la empresa APICOOP Ltda., obteniendo un producto de mayor calidad, destinando la producción al mercado nacional y de exportación.

En relación al mercado externo, se exportaron a nivel nacional 4.360.563 kilos de miel durante el año 2000, lo que corresponde a 4.811.047 dólares FOB. En tanto, hasta noviembre de 2001 la cantidad exportada aumentó en casi un millón y medio de kilos, es decir, 5.858.898 kilos y 6.265.761 dólares FOB de retorno. En la X Región APICOOP Ltda. aporta con poco más del 5% del total de esas exportaciones, lo que equivale a cerca del 8% del monto total en dólares FOB (CHILE, MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, DIRECCIÓN DE PROMOCIÓN DE EXPORTACIONES (PROCHILE), s.f.). La evolución de las exportaciones en los últimos años se puede observar en el Anexo 3.

Cabe destacar, que el principal país importador de mieles chilenas es Alemania, que recibe sobre el 70 % de las exportaciones, seguido por Estados Unidos, Suiza y Holanda (PROCHILE, s.f.).

2.1.3.3 Nivel de manejo y control de las colmenas. LÓPEZ (1980), CORFO (1987) y RÍOS (2001), coinciden en señalar que el nivel tecnológico de la actividad apícola en la X Región es bajo.

Las medidas tecnológicas más utilizadas son el manejo sanitario (prevención y control de enfermedades y plagas que afectan las colmenas) y el manejo alimentario (alimentación artificial especialmente en época invernal). En tanto, el uso de registros y otros tipos de controles (control periódico de colmenas, libreta de campo y enumeración de colmenas) es muy poco

frecuente (RÍOS, 2001). Sin embargo, se puede observar un mejor manejo de los apiarios en las explotaciones con mayor número de colmenas, donde se manifiesta preocupación por la orientación geográfica, la reducción del tamaño de las piqueras en invierno, el control de peso de las colmenas, control y cambio de reinas, fusión de familias débiles, control de enjambrazón, uso de cera estampada y trashumancia (LÓPEZ, 1980).

2.1.3.4 Situación sanitaria de las explotaciones. La enfermedad con mayor presencia en las explotaciones estudiadas por RÍOS (2001), fue la provocada por varroa en un 84,5% de ellas, seguida por nosemosis presente en el 50%. Además, se identificó la avispa chaqueta amarilla (*Vespa germanica* Fab.) como la plaga de mayor incidencia. Algunas de las enfermedades presentes en la X Región se indican en el siguiente cuadro.

CUADRO 2 Enfermedades que atacan abejas en la X Región.

Clasificación	Nombre de la enfermedad	Agente causal
Ácaros	Varroasis	<i>Varroa destructor</i> Anderson & Trueman,
	Acariasis	<i>Acarapis woodi</i> Rennie.
Protozoos	Nosemosis	<i>Nosema apis</i> Zander.
	Amebiasis	<i>Malpighamoeba mellificae</i> Prell.
Bacterias	Loque europea	<i>Melissococcus pluton</i> (White) Bailey & Collins.
Hongos	Ascoferosis o cría yesificada	<i>Ascosphaera apis</i> (Maassen & Claussen) Olive & Spiltoir.
	Cría momificada	<i>Aspergillus flavus</i> Link.

FUENTE: modificado a partir de FIA (1999).

En cuanto a enfermedades causadas por virus, CHILE, FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA (FIA) (1999) señala que a pesar que en

Chile no se han publicado trabajos sobre virus en abejas, existe conocimiento de tres enfermedades, parálisis crónica y parálisis aguda (que atacan abejas adultas) y cría sacciforme (que ataca larvas de preoperculación).

2.2 Antecedentes del fluvalinato.

El fluvalinato pertenece al grupo de los piretroides, que son compuestos orgánicos sintéticos cuya estructura química está basada en las piretrinas de origen botánico (RAMÍREZ, 1992). Éstas son aisladas a partir de las flores del crisantemo, siendo los piretroides básicamente ésteres del ácido crisantémico caracterizados por ser altamente lipofílicos (BLOOMQUIST, 1999).

Este plaguicida se puede encontrar bajo los siguientes nombres comerciales: Apistán, Klartan, Mavrik, Mavrik Aqua Flow, Spur, Taufluvalinato y Yardex (CORNELL UNIVERSITY *et al.*, 1996).

2.2.1 Características químicas. El fluvalinato corresponde a una mezcla racémica de cuatro isómeros, dos de los cuales forman parte del tau-fluvalinato, que es específicamente el ingrediente activo de los productos químicos para el control de varroa, y que también se utiliza para la protección de cultivos (THE EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS (EMA), 1995).

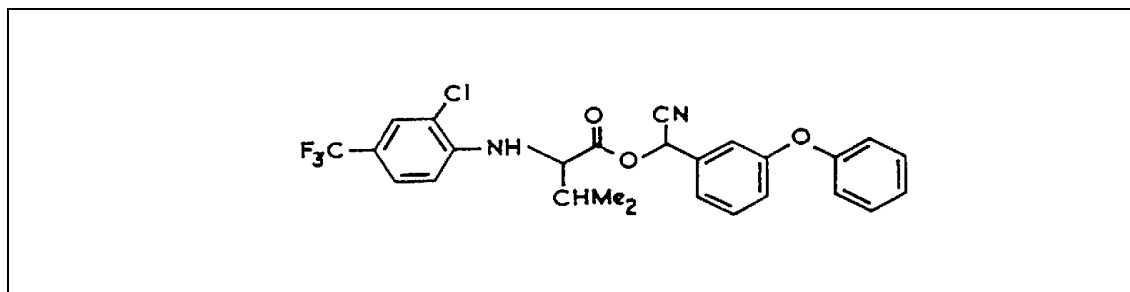


FIGURA 2 Estructura química del fluvalinato.

FUENTE: BRITISH CROP PROTECTION COUNCIL (1987).

De acuerdo a CORNELL UNIVERSITY *et al.* (1996), el nombre químico del fluvalinato dado por la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) es (RS)- α -ciano-3-fenoxibencil-N-(2-cloro- α,α,α -trifluoro-p-tolil)-D-valinato.

De acuerdo a sus características químicas los piretroides se clasifican en Tipo I y Tipo II. El fluvalinato pertenece a este último tipo, ya que posee un grupo α -ciano-3-fenoxibencil alcohol, el cual aumenta diez veces su actividad insecticida comparada con los de Tipo I. En algunos piretroides como el fluvalinato se incluye un anillo fenil por medio de la alteración del fragmento ácido. Los piretroides Tipo I que fueron en un comienzo inestables en el ambiente, son estructuralmente más variados y presentan un grupo desciano-3-fenoxibencil u otros alcoholes, que les proporcionan estabilidad (BLOOMQUIST, 1999). Otras características químicas y propiedades físicas se indican en el Anexo 4.

2.2.2 Mecanismo de acción. Este insecticida/acaricida tiene acción estomacal y por contacto (ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, 1990). Su modo de acción está basado en cambios de permeabilidad de los canales del sodio en las membranas de las células nerviosas causando una despolarización e hiperexcitabilidad prolongada (EMEA, 1995). Es decir, durante la fase de recuperación del potencial de acción de las neuronas se prolonga la permeabilidad al sodio y aumenta su flujo, persistiendo la despolarización de la membrana con descargas repetidas (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS), CENTRO PANAMERICANO DE INGENIERÍA SANITARIA Y CIENCIAS DEL AMBIENTE (CEPIS), 2001).

2.2.3 Antecedentes toxicológicos. Los piretroides se absorben relativamente bien por el tracto gastrointestinal y respiratorio, en tanto, por la piel la absorción es mas bien baja. En general, estos son biotransformados con gran rapidez por las esterasas y oxidasas microsomales hepáticas mediante mecanismos de

hidroxilación, y son eliminados en su mayor parte por los riñones. Esta rápida metabolización, junto con la pobre absorción cutánea, explican la relativamente baja toxicidad para los humanos (OPS, CEPIS, 2001).

El típico signo de intoxicación de los piretroides Tipo II en insectos es ataxia (incoordinación), mientras que en mamíferos se producen movimientos involuntarios y desordenados de contorsión y salivación. En humanos la exposición de la piel puede causar una sensación de picazón o quemadura (BLOOMQUIST, 1999).

Respecto al tau-fluvalinato propiamente tal, la información conocida acerca de los efectos biológicos en mamíferos y particularmente sobre neurotoxicidad aguda es limitada. Sólo se han conducido estudios subcrónicos en perros y estudios de teratogenicidad en ratas con la mezcla racémica de fluvalinato (EMEA, 1995).

El fluvalinato se considera un compuesto de toxicidad moderada en mamíferos. Vía oral presenta una toxicidad media (con una DL_{50} para ratas de 261 a 281 mg/kg). Vía dermal es ligeramente a prácticamente no tóxico (con una DL_{50} para ratas de 20.000 mg/kg y más de 2.000 mg/kg para conejos). Además, es moderadamente irritante a los ojos y piel donde no causa reacciones alérgicas. Algunas formulaciones como Mavrik 2E presentan ciertas diferencias y pueden tener un efecto corrosivo a los ojos. Vía inhalación, algunas formulaciones son prácticamente no tóxicas. No obstante, trabajadores expuestos a fluvalinato han reportado tos, estornudos, irritación de garganta, sensación de picazón o quemaduras en las manos o cara con o sin sarpullido, dolor de cabeza y náuseas. En cuanto a efectos carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos o reproductivos, estos no se presentan o son poco probables bajo circunstancias normales. Sin embargo, puede causar efectos adversos en el sistema nervioso central, hígado y riñones. Además, esta sustancia es

altamente tóxica para peces e invertebrados acuáticos, y escasamente tóxica para aves (CORNELL UNIVERSITY *et al.*, 1996).

2.2.4 Tolerancias establecidas para fluvalinato. Entre los parámetros que existen con el fin de resguardar la salud humana se encuentran la ingesta diaria admisible (IDA) y el límite máximo de residuos (LMR).

La IDA de un producto químico es una estimación de la cantidad de una sustancia presente en un alimento o agua potable, expresada en base al peso corporal, que puede ser ingerida diariamente durante la vida sin riesgo apreciable para el consumidor, basado en todos los hechos conocidos en el momento de la evaluación (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS), 1997).

El LMR del Codex para plaguicidas es la concentración máxima de un residuo de plaguicida recomendada por la Comisión del Codex Alimentarius que es legalmente permitida en productos alimenticios y alimentos para animales. El respaldo de estudios realizados en varios países y la comparación con la IDA, debe indicar que los alimentos que cumplen con los LMRs del Codex son seguros para el consumo humano (OMS, 1997).

2.2.4.1 Ingesta diaria admisible. EMEA (1995), señala un valor tentativo de NOEL (“no observable effect level”, es decir, un nivel al cual no se observan efectos) de 0,5 mg tau-fluvalinato/kg peso corporal derivado de un estudio de dos generaciones de ratas. A partir de éste, se ha determinado una IDA preliminar de 0,5 µg tau-fluvalinato/kg peso corporal, calculada con un factor de seguridad de 1000, con el fin de compensar las insuficiencias de la información farmacológica y toxicológica. Lo anterior equivale a una IDA de 30 µg tau-fluvalinato/persona (60 kg). Por otra parte, ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA) (1997), considera un NOEL de 1mg/kg/día (tras dos años de

estudios en ratas) e indica una IDA de 0,01 mg/kg/día (10 µg tau-fluvalinato/kg/día).

2.2.4.2 Límite máximo de residuos. Hasta el momento el Codex Alimentarius no ha fijado un LMR de fluvalinato para ningún alimento (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO), 1999). En la Unión Europea, el LMR de fluvalinato aparece como no considerado, sin embargo, individualmente Alemania e Italia tienen un límite genérico de 10 µg/kg. En Suiza el límite es de 50 µg/kg, en tanto Holanda estableció no tolerancia, con un límite de detección del método analítico de 50 µg/kg (Piro 1999, citado por WALLNER, 1999). Por su parte, Estados Unidos tiene un límite establecido de 50 µg/kg (EPA, 2001).

La legislación chilena sólo establece a este respecto que la miel no debe contener sustancias extrañas a su composición natural (CHILE, MINISTERIO DE SALUD, 1997).

A modo de comparación el Anexo 5 presenta LMRs para fluvalinato en otros alimentos, fijados por España y Estados Unidos.

2.3 Uso de fluvalinato para el control de varroa. Para el control de varroa se ha utilizado una gran cantidad de productos químicos, los más frecuentes han sido amitraz, bromopropilato, coumafós, cimiazol, fluvalinato y malatión, siendo el fluvalinato uno de los más empleados en la actualidad (WALISZEWSKI *et al.*, 1998).

Se han ensayado varias formas de administración de los productos en las colmenas, tales como: aspersión (ácido fórmico, láctico y oxálico), polvos (malatión), fumigación (bromopropilato, hojas de tabaco y eucalipto), aerosolización térmica (amitraz) y evaporación (ácido fórmico, mentol, timol y aceites esenciales). Estas formas de aplicación pueden presentar

inconvenientes como requerir tratamientos repetidos, intensa manipulación de las colmenas, implementos de alto costo o ser afectados por la temperatura ambiente. Productos como cimiazol y coumafos que actúan en forma sistémica, resultan ser aplicados inicialmente en dosis muy altas ocasionando cierta mortalidad de abejas, y se puede necesitar repetir la aplicación varias veces. El fluvalinato y flumetrina vienen impregnados en soportes como material plástico, los cuales se introducen en la colmena y de ahí son liberados de manera constante y por un periodo prolongado (OTERO, s.f.).

El tau-fluvalinato tiene una eficacia comprobada contra varroa del 99 al 100%, y es 100 a 300 veces menos tóxico para las abejas que otros piretroides, como permetrina y fenvalerato (VITA (EUROPE) LIMITED, 2000).

2.3.1 Antecedentes de *Varroa destructor* Anderson & Trueman (Acari:

Varroidae). Esta especie fue descrita en 1904 como *Varroa jacobsoni* Oud., encontrada parasitando a la abeja asiática *Apis cerana* Fabr. en Java. Luego, cuando la abeja europea *Apis mellifera* L. fue introducida en Asia, este ácaro la habría adoptado como hospedero llegando a diseminarse prácticamente por todo el mundo, convirtiéndose en uno de los enemigos más serios de la abeja europea (ANDERSON y TRUEMAN, 2000).

Actualmente, se ha llegado a determinar con la ayuda de estudios genéticos, la existencia de un complejo de haplotipos que parasitan a *Apis cerana* Fabr. Sólo uno de éstos corresponde a *Varroa jacobsoni* Oud. (haplotipo Java), el cual no es capaz de reproducirse sobre *Apis mellifera* L., en tanto, dos haplotipos sí han llegado a parasitar con éxito a la abeja europea. De éstos, el haplotipo Corea se señala como el más patogénico y de mayor dispersión, habiéndose encontrado en Asia, Oriente medio, Europa, Sud Africa, Norte y Sur América, mientras, el haplotipo Japón es menos patogénico y de menor

dispersión, encontrándose en Japón, Tailandia, Norte y Sur América (ANDERSON y TRUEMAN, 2000).

La nueva clasificación de varroa implicó que los estudios dedicados en el pasado a *Varroa jacobsoni* Oud. son actualmente, en su mayoría, aplicables a *Varroa destructor* Anderson & Trueman (ANDERSON y TRUEMAN, 2000).

El daño producido por varroa a la abeja europea se debe a sus características de parásito externo, que afecta larvas, pupas y abejas adultas, a las que succiona la hemolinfa, y a las cuales además puede transmitir virus (FIA, 1999). Esto ocasiona grandes perjuicios económicos, ya que con la pérdida de colmenas disminuye de forma considerable la polinización y la cosecha de productos apícolas (SANCHO *et al.*, 1991).

El cuerpo de la hembra varroa adulta es netamente adaptado al parasitismo y a la foresia, ya que tiene una forma elipsoidal, es deprimido dorso-ventralmente y las ocho patas terminan en una ventosa (VANDAME *et al.*, 2001). En comparación con *Varroa jacobsoni* Oud., la forma de la hembra de *Varroa destructor* Anderson & Trueman es más alargada y menos esférica, (detalles de la morfología de varroa y sincronización de los ciclos de la abeja y varroa se indican en los Anexos 6 y 7).

Sólo la hembra puede vivir fuera de las celdillas del panal y sobrevivir el invierno, en tanto, los machos y las formas inmaduras viven en las celdillas sobre las crías en desarrollo. Cuando las abejas nacen y abandonan las celdillas, las hembras de varroa se fijan a ellas, localizándose entre las membranas intersegmentales quedando parcialmente cubiertas por las placas que conforman el abdomen. Luego, cuando las abejas alimentan sus larvas, los ácaros las dejan para ubicarse en el interior de las celdillas, alimentándose de

las crías. El macho no vive más allá de cuatro días al interior de celdillas operculadas y tiene por función sólo fecundar a las hembras (NEIRA, 1999).

2.3.2 Aspectos generales del control de varroa. NEIRA (1999), señala que para un efectivo control de varroa, se requiere un diagnóstico que permita su identificación oportuna. Si se emplean productos químicos para su control, deben observarse estrictamente las recomendaciones del laboratorio fabricante, respetando las dosis, época y formas de aplicación, para evitar la aparición de líneas de ácaros resistentes. Además, los productos químicos utilizados tienen que ser inocuos para las abejas, no deben quedar residuos en la miel ni en la cera, o bien estar presentes en cantidades trazas, el producto debería estar autorizado en el país de destino como medicamento veterinario, si la miel va a ser exportada, y debe ser fácilmente utilizable por el apicultor, sin que le provoque trastornos en la salud.

Es importante destacar que es imposible erradicar la varroa, pero sí se puede controlar, bajando los niveles de infestación entre 2 a 5%, evitando la muerte de las colmenas (NEIRA, 1999).

2.3.3 Aplicación de fluvalinato en las colmenas. Apistán (producido por Wellmark International) es el único producto en base a tau-fluvalinato especialmente diseñado para uso apícola. Actualmente está registrado en más de 50 países tanto por autoridades veterinarias como agrícolas (VITA (EUROPE) LIMITED, 2000).

Este producto es una tira de 25 cm de largo por 3 cm de ancho, formado por un polímero de liberación lenta. Su aplicación se recomienda antes del primer flujo de néctar en primavera, o en otoño después de la última cosecha de miel. La tira debe suspenderse en la cámara de cría, entre el 3^{er} y 4^o marco y entre el 7^o y 8^o, para las colmenas de 10 marcos. La duración del tratamiento

óptimo es de seis semanas, con un máximo de ocho. Las abejas al entrar en contacto con las tiras distribuyen el ingrediente activo a través de toda la colmena y lo transfieren a las hembras de varroa mientras están fuera de las celdillas (VITA (EUROPE) LIMITED, 2000).

BACH (1995), señala que el periodo de tratamiento de seis semanas, se debe a que de esa manera cubre un periodo equivalente a dos generaciones de abejas, de tal forma que todos los ácaros adultos y su descendencia ya madura son expuestos al producto.

El uso de fluvalinato artesanal en Chile representa gran parte del control químico de varroa. Para esto, se sumergen tablillas de madera en una solución diluida de Mavrick con agua, logrando una concentración de 2,5 a 3% (SAG, 1994). En la actualidad se ha llegado a una concentración de 5% de ingrediente activo (CARAVIA, 1997).

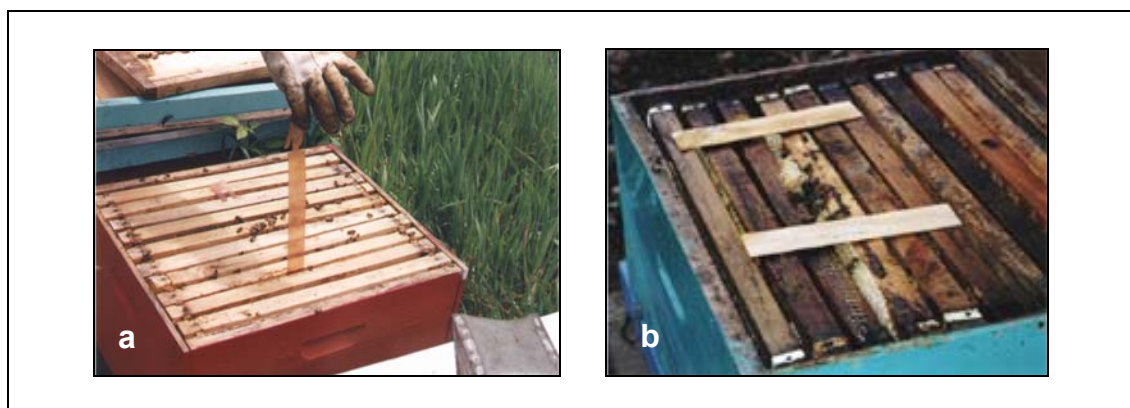


FIGURA 3 Aplicación de fluvalinato en la colmena, a) Apistán, b) tablillas artesanales.

2.4 Consecuencias del uso de fluvalinato para el control de varroa.

El uso de sustancias químicas para el control de varroa, trae como consecuencia problemas tales como la contaminación de los productos de la

colmena, riesgos de toxicidad sobre las abejas y el desarrollo de resistencia por parte del ácaro. La miel, como otros productos apícolas, es considerada un alimento natural, por lo que su contaminación con plaguicidas es una merma importante en su calidad y precio (OTERO, s.f.).

2.4.1 Desarrollo de ácaros resistentes a fluvalinato. La resistencia es conocida como un fenómeno de evolución, siendo el resultado de la selección ocasionada por cambios en el ambiente. En este caso la resistencia de varroa a tau-fluvalinato puede explicarse en parte por un aumento en la detoxificación debido a una mayor actividad de la enzima monooxigenasa en el sistema citocromo P450. Además, es probable que otros mecanismos, como una reducción en la penetración del ingrediente activo o la modificación del sitio de acción, estén involucrados (HILLESHEIM *et al.*, 1996).

Los primeros reportes de resistencia a fluvalinato comenzaron en 1991 en Italia, problema que posteriormente se informó en varios países, ocasionado principalmente por el uso continuo de Apistán en las colmenas (DELAPLANE, 1997; BOGDANOV *et al.*, 1998 y WALLNER, 1999). ANDERSON y TRUEMAN (2000), indican que es el haplotipo Corea el que ha desarrollado esta resistencia, ya que es el único presente en Europa. Cabe destacar, que ese mismo haplotipo ha sido encontrado en Argentina y Uruguay, en tanto, en Brasil se determinaron ambos haplotipos.

SANFORD (1996) y WATKINS (1996), señalan que la causa de resistencia no es el uso de Apistán sino, el abuso por parte de apicultores de otras formulaciones de fluvalinato, Mavrick o Klartan, con el riesgo de aplicar dosis incorrectas. Esto se debe en la mayoría de los casos a diluciones del producto agrícola en forma subjetiva y personal, a las grandes diferencias en la capacidad de absorción entre distintas maderas y los variados tamaños en que

se fabrican las tablillas, además del tiempo de permanencia en las colmenas y el número en que se aplican (HIGES *et al.*, 1998).

HIGES *et al.* (1998) indica también, que el fenómeno de resistencia se agrava en zonas donde se tienen que repetir tratamientos varias veces al año, ya sea por reinfestación o por la presencia de cría prácticamente constante la que facilita la reproducción del parásito. Además, este fenómeno es favorecido por la presencia de plaguicidas en la cera, ya que la mayoría de ellos son de carácter lipofílico, manteniendo a los ácaros en contacto permanente con dosis subletales (OTERO, s.f.).

Considerando lo anterior, son necesarios nuevos métodos de control, los cuales bien pueden venir de la identificación y comprensión de aquellos factores que previenen la explotación de *Apis mellifera* L. como un hospedero alternativo a *Apis cerana* Fabr. por parte de la mayoría de los haplotipos de varroa. Factores dentro de los cuales se pueden encontrar el comportamiento higiénico y de “grooming” (limpieza del propio cuerpo o el de otras abejas), la interacción química entre abeja y ácaro, principalmente aquella que influye sobre la reproducción de éste último, y factores del ambiente (ANDERSON y TRUEMAN, 2000 y COBEY, 2001).

Otras líneas de acción recomiendan el uso de tratamientos alternativos con sustancias químicas que tengan distintos modos de acción, ya sean productos sintéticos, ácidos orgánicos o aceites esenciales, además de métodos culturales (WATKINS, 1996 y DELAPLANE, 1997),

2.4.2 Efectos sinérgicos. Existe la posibilidad que el efecto sinérgico entre distintos acaricidas utilizados en los tratamientos pueda provocar un efecto tóxico en las abejas (BOGDANOV *et al.*, 1998).

Benzunces *et al.* (1993), citado por RUIJTER (1994), señalan que los piretroides en bajas cantidades pueden incrementar la toxicidad de otros plaguicidas, agregando que algunos fungicidas que normalmente no son tóxicos a las abejas, llegan a serlo luego de la administración de pequeñas cantidades de piretroides. Pilling (1993), citado por RUIJTER (1994), comenta que esto se debe a que los piretroides bloquean los sistemas de detoxificación de la abeja.

2.4.3 Contaminación de los productos apícolas. La aplicación de sustancias químicas puede ocasionar presencia de distintos niveles de residuos de varroacidas en miel, cera y propóleo, lo que perjudica tanto a apicultores como a industrias relacionadas con la apicultura (WALLNER, 1999).

Diversos factores participan en la cantidad de residuos que se pueden acumular y en su localización en la colmena. Estos incluyen la dosis y forma de administración, la estabilidad del ingrediente activo y su relación con el pH y la humedad del producto apícola, la composición química del plaguicida, particularmente concerniente a su afinidad con los lípidos, el tiempo en que se realiza la aplicación y la forma de extracción de los productos (OTERO, s.f.).

2.5 Residuos de fluvalinato en miel.

Se considera un residuo de plaguicida, a cualquier sustancia presente en alimentos, productos agrícolas o alimento animal, como resultado del uso de un plaguicida. Esto incluye cualquier derivado, como productos de degradación, metabolitos, productos de reacción, e impurezas consideradas de importancia toxicológica (OMS, 1997).

Se han encontrado residuos de fluvalinato en miel a niveles de partes por billón, además de residuos de bromopropilato, coumafos, malatión, dianizon, clordimeform y cimiazol (WALLNER, 1999).

2.5.1 Factores que provocan la presencia de residuos en miel. Varios autores como GARCÍA *et al.* (1996), WALLNER (1999), y Rosenkranz (2000), citado por RÍOS (2001), concuerdan en que son las prácticas de manejo incorrectas las que llevan a la acumulación de residuos, tales como, dosis inexactas, principalmente más altas de lo recomendado, un número excesivo de aplicaciones al año, y por mayor tiempo, incluso dejando las tablillas permanentemente al interior de las colmenas y épocas de aplicación del tratamiento incorrectas, cercanas al flujo de néctar o de la cosecha.

WALLNER (1995), agrega otros factores como, el uso de tratamiento profiláctico sin la estimación previa del grado de infestación, la contaminación del alimento invernal debido al uso de plaguicidas durante el periodo de alimentación suplementaria, la penetración de residuos desde la cera hacia la miel y la presencia de partículas de cera contaminada en la miel. Esto último se considera de mayor importancia, debido a que el fluvalinato tendría poca tendencia a migrar, de tal manera que, de colmenas con altas concentraciones del ingrediente activo se puede obtener miel no contaminada.

Lo anterior debe ser considerado en las prácticas de extracción, durante la cual la miel tiene que ser adecuadamente sedimentada y liberada de cualquier resto de cera, sobre todo, de la cera de los opérculos debido a su mayor contacto con los varroacidas (OTERO, s.f.).

La principal vía de paso del ingrediente activo hacia la cera, es por contacto con las abejas que acumulan el producto sobre sus cuerpos. Una vez en la cera, éste pasa hacia otros productos apícolas, de tal manera que en condiciones de alta concentración de residuos en la cera luego de varios años de aplicación, el ingrediente activo pasaría a la miel por difusión (WALLNER, 1999). Por otra parte, KUBIK *et al.*, (1996), determinaron que el vapor del fluvalinato no constituye a nivel de campo una vía importante de diseminación

del ingrediente activo hacia la cera, a pesar que en condiciones de laboratorio el vapor del fluvalinato (que posee una presión de vapor muy baja) es eficientemente absorbido por la cera, pero en las condiciones de la colmena este proceso es mucho menor debido probablemente a la intensa ventilación.

Además, KUBIK *et al.* (1995) destacan que son las tablillas artesanales, que liberan más rápidamente el fluvalinato que las tiras disponibles en el comercio, las que producen una mayor y más rápida contaminación de ese producto.

2.5.2 Concentraciones de fluvalinato encontradas en miel. WALLNER (1995), observó que la cantidad de varroacidas en la miel aumenta con una mayor concentración en la cera. En el caso del fluvalinato (Apistán) se determinó que con una concentración de 400 ppm (mg/kg) en la cera, es posible esperar 10 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en la miel.

Cabe señalar, que los estudios de evaluación de los niveles de residuos presentes en la miel, son más escasos que las investigaciones conducidas para determinar efectos de algún tratamiento con fluvalinato. Además, la mayoría de los estudios utilizan Apistán, siendo muy pocos los que indican la aplicación de fluvalinato en forma artesanal.

En general, se han detectado residuos en miel a niveles de partes por billón ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en una baja proporción de las muestras que se han analizado (Cuadro 3). Existen también casos excepcionales con residuos hasta 1070 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en miel, que corresponden a ensayos en condiciones que favorecen la presencia de estos residuos (SANCHO *et al.*, 1991). Además, se observa un aumento de las concentraciones de residuos con tratamientos de mayor duración y en años consecutivos (DE GREEF *et al.*, 1994).

Es importante señalar que otros autores como LIU (1992), no han detectado residuos en miel en tratamientos de más de un año, pero si han observado residuos en la cera. Estos son, en general, más frecuentes y se manifiestan en mayores concentraciones que en la miel (DE GREEF *et al.*, 1994).

CUADRO 3 Niveles de residuos de fluvalinato presentes en miel, según diversos autores.

País	Autor	Resultados en miel ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Alemania	WALLNER, 1999	1% de las mieles producidas presentaron entre 2 a 7.
Austria	WALLNER y PECHHACKER, 1994	7 de 17 muestras presentaron menos de 2 hasta 3.
	MOOSBECKHOFER <i>et al.</i> , 1995	3% de las muestras presentaron residuos a nivel de $\mu\text{g}/\text{kg}$.
Bélgica	DE GREEF <i>et al.</i> , 1994	1 de 215 muestras presentó 4.
Egipto	ZIDAN <i>et al.</i> , 1996	18 de 80 muestras presentaron entre 15 y 188.
España	GARCÍA <i>et al.</i> , 1995	De 144 muestras, la mayoría no presentó residuos.
	GARCÍA <i>et al.</i> , 1996	39 de 221 muestras presentaron entre 1 y 15.
	FERNÁNDEZ-MUIÑO <i>et al.</i> , 1997	11 de 101 muestras presentaron entre 10 y 40, 1 muestra con 100.
EE.UU	FOOD AND DRUG AMINISTRATION (FDA), 2000	De 26 muestras no se encontró fluvalinato en ninguna (período entre 1991 y 1999).
Italia	SAITTA <i>et al.</i> , 1993	4 de 35 muestras presentaron entre 0,47 a 92.
Jordania	AL-RIFAI y AKEEL, 1997	3 de 25 muestras presentaron entre 20 y 130.

2.5.3 Disipación y degradación de los residuos de fluvalinato en miel. Los resultados de investigaciones sobre disipación de fluvalinato en miel son contradictorios. EMEA (1995), WALLNER (1999) y TSIGOURI *et al.* (2001), han reportado escasa o ninguna disipación de tau-fluvalinato en la miel. Ya sea en tratamientos con duraciones de un día a cuatro y hasta ocho meses, con

incubación a temperatura ambiente y hasta 35°C, o pruebas con mieles de pH extremos.

Por el contrario, ensayos realizados por BALAYANNIS y SANTAS (1992), ATIENZA *et al.* (1993) y Jiménez *et al.* (1995) citado por TSIGOURI *et al.* (2001), han observado degradación moderada (5 meses y medio) y rápida (20 días) del fluvalinato. El principal metabolito encontrado producto de la degradación fue 3-fenoxi-benzaldehído.

A diferencia de los otros ensayos, estos emplearon soluciones acuosas preparadas con Mavrick para su incorporación en las muestras, en tanto los otros, usaban soluciones de patrón de tau-fluvalinato suspendido en solventes orgánicos como hexano. Lo anterior concuerda con observaciones que indican que el tau-fluvalinato sufre una rápida reducción en solución metanólica de Mavrick. Además, este ingrediente activo es hidrolizado rápidamente en medios ligeramente alcalinos y también durante extracción con metanol (TSIGOURI *et al.*, 2001).

Finalmente TSIGOURI *et al.* (2001) concluye que son necesarios más estudios para lograr esclarecer este aspecto, considerando otros factores al interior de la colmena que pueden tener efectos sobre la degradación o disipación del fluvalinato, como el ambiente altamente lipofílico y la actividad de las abejas.

2.6 Métodos analíticos para la detección de residuos de fluvalinato en miel.

La detección de varroacidas depende de varios factores, que incluyen la cantidad aplicada del ingrediente activo, su comportamiento químico, y la capacidad analítica disponible en el laboratorio (WALLNER, 1999).

De acuerdo a FERNÁNDEZ-MUIÑO *et al.* (1995), los métodos establecidos para detectar residuos en miel incluyen los siguientes pasos:

1. Extracción de la miel disuelta en agua o algún tipo de solvente polar junto con un solvente apolar. Este paso puede hacerse por extracción líquido-líquido, extracción por vapor o por fase sólida.
2. Purificación. Este es un paso opcional, generalmente se realiza por cromatografía en columnas de florisil o sílica gel.
3. Análisis cuantitativo y cualitativo. Las técnicas de separación seleccionadas son la cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), y la cromatografía de gases (GC). La detección y cuantificación son realizadas a través de densitometría, fluorimetría, detección de electrones, detección de nitrógeno-fósforo, y espectrometría de masa.

JIMÉNEZ *et al.* (1996), destaca que para la detección de acaricidas la técnica más usada es la cromatografía de gases (GC) con columnas de mediana o baja polaridad en combinación con el detector de captura de electrones (ECD) o el detector de nitrógeno-fósforo (NPD).

En miel, los límites de detección más bajos alcanzados por medio de GC/ECD son de 1 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$), LODESANI *et al.* (1992) y NERI *et al.* (1992) y 0,1 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$) (SAITTA *et al.*, 1993).

3 MATERIAL Y MÉTODO

3.1 Material utilizado.

A continuación se detalla el material empleado en el presente estudio.

3.1.1 Muestras de miel. Se realizaron análisis de fluvalinato a 133 muestras de mieles provenientes de colmenas de apicultores de la X Región, los cuales participan en este proyecto. La mayoría de ellos pertenece o entrega su producción a la empresa APICOOP Ltda., y la menor parte fue contactada a través de la Red Apícola X Región.

Las muestras correspondieron a 9 comunas y 34 localidades rurales, éstas son: Panguipulli (*Coihueco*), Los Lagos (*Flor del Lago*), Paillaco (*El Arbolito, Yervas Buenas, Pichirropulli, Cerrillos, La Luma, Unión Chilena, Huichahue Bajo*), Lago Ranco (*Calcurrupe, Rupumeica, El Arenal, Ensenada, Purriñe, Illa-Huapi, Riñinahue, Iculpe*), Futrono (*Caunahue, Hueinahue, Maihue, Los Cerrillos, Chabranco, Curriñe, Quimán Alto, Las Quemadas, Llifén, Chollinco*), La Unión (*Puerto Nuevo*), Fresia (*El Canario, El Traiguén, Llico Alto*), Puerto Varas (*Ralún*) y Puerto Montt (*Quillaipe*).

3.1.2 Equipos e implementos de laboratorio. El desarrollo de la parte experimental se realizó en el Laboratorio de Fitoquímica, de la Universidad Austral, donde se dispuso de la siguiente implementación:

- Cromatógrafo de gases marca Varian, modelo CP 3800. Equipado con detector de captura de electrones y columna capilar DB-5 (metil 5% fenil

silicona, 30 m de largo y 0,25 mm de diámetro interno). Sistema de control Varian Chromatography Workstation, Star System control, versión 5.31.

- Evaporador rotatorio marca Heidolph, modelo Laborota Digital 4002.
- Bomba de vacío marca Vacubrand, modelo ME 2 C.
- Centrífuga marca Christ, tipo UJ, modelo 3000.
- Balanza analítica marca Sartorius, modelo A 200 s.
- Jeringa 1 μ L marca Hamilton.

El material de vidrio empleado correspondió a pipetas aforadas de 3 mL, tubos para centrífuga, matraces de 100 mL para evaporador rotatorio, vasos precipitados y frascos de vidrio. Además fueron necesarias micro y macro pipetas, soporte universal, colador y bolsas plásticas.

3.1.3 Reactivos. Se utilizó agua desionizada, éter etílico ($C_2H_5)_2O$) MERCK, n-hexano ($CH_3(CH_2)_4CH_3$) grado analítico pro-análisis MERCK, ciclohexano (C_6H_{12}) grado analítico pro-análisis MERCK y solución de sulfocrómica para el lavado del material de vidrio.

3.1.4 Patrón original. Éste correspondió a un estándar de tau-fluvalinato con un 95 % de pureza, marca Dr. Ehrenstorfer de Alemania.

3.2 Metodología.

La metodología utilizada para los análisis se indica a continuación.

3.2.1 Toma de muestras. Las muestras de miel fueron tomadas entre los meses de febrero y julio de 2000, tiempo necesitado para cubrir las localidades mencionadas.

La muestra de laboratorio fue obtenida a través de un muestreo aleatorio simple, tomando en cuenta ciertos factores predeterminados como: el apicultor, la colmena, el alza y el tercio del marco del cual se extrajo.

De tal manera que las muestras correspondían a la colmena central del colmenar, segunda alza o cámara de alimentación; en caso de observarse crías, las muestras se tomaban del alza superior. De uno de los dos marcos centrales se extrajo el tercio central (por ambos lados) y se colocó en una bolsa plástica rotulada. Finalmente, se depositó la muestra en una caja isotérmica hasta su llegada a laboratorio en un plazo de uno a cinco días, dependiendo la lejanía del lugar de muestreo.

3.2.2 Conservación de las muestras en laboratorio. Las muestras de miel se separaron de la cera por gravedad y se guardaron en frascos de vidrio para su almacenaje a 18 °C bajo cero.

3.2.3 Método analítico. El análisis de fluvalinato en miel se desarrolló en dos etapas. La primera fue la extracción del ingrediente activo presente en la miel, en tanto, la segunda etapa correspondió al análisis cromatográfico de ese extracto. Cada muestra de miel se analizó por duplicado.

Se determinó selectividad, linealidad, precisión, sensibilidad y exactitud del método analítico para las condiciones de laboratorio existentes, siendo el límite de detección 1 µg/kg, la recuperación $105,5 \pm 13$ % y el coeficiente de variación $26,8 \pm 8,8$ % (Anexos 8, 9, 10, 11 y 12).

3.2.3.1 Método de extracción del fluvalinato. Se utilizó un método de extracción líquido-líquido en columnas de tierra de diatomeas, adaptado de DE GREEF *et al.* (1994). Éste fue seleccionado por ser un método de análisis de rutina rápido, sensible y adecuado para las disponibilidades del laboratorio.

El procedimiento considera la disolución de 1 gramo de miel en 5 mL de agua desionizada, por medio de agitación y ultrasonido. Seguido por centrifugación durante 10 minutos a 3100 rpm para la separación de impurezas. A continuación, el traslado de 3 mL a la columna de tierra de diatomeas (Extrelut 3) y reposo por 10 minutos antes de la elusión, a fin de lograr una buena distribución en la columna. Enseguida corresponde eluir con 60 mL de éter etílico, evaporar a sequedad y resuspender en 1 mL de n-hexano.

Las modificaciones hechas al método original fueron: reducción del tamaño de la muestra, y por consiguiente, empleo de menor volumen de reactivos, además del reemplazo de n-hexano por éter etílico como eluyente. Ambos solventes son recomendados por el fabricante de las columnas y permiten una extracción satisfactoria, siendo el éter etílico de menor costo.

3.2.3.2 Análisis cromatográfico. Se inyectó 1 μ L del extracto, bajo condiciones que se detallan a continuación.

Se utilizó nitrógeno como gas de arrastre e impulsor, con un flujo de columna constante de 3,0 mL/min y un flujo de gas impulsor de 25 mL/min. Las temperaturas establecidas fueron las siguientes:

- Inyector: 220 °C modo splitless
- Horno columna: 70 °C (1 min), 200 °C (35 °C/min), 300 °C (20 °C/min, 6 min)
- Detector: 300 °C

3.2.3.3 Obtención de resultados. La concentración de fluvalinato en las muestras de miel fue calculada a partir de tres curvas de calibración elaboradas usando estándar externo. El rango de concentraciones fue de 0,5 a 800 ppb, con un tiempo de retención específico para el fluvalinato de 13,9 minutos.

Se calculó el contenido de fluvalinato por kg de miel, expresado en $\mu\text{g}/\text{kg}$ o ppb, teniendo en cuenta el peso de la muestra y el volumen inyectado. El proceso de integración de los datos se llevó a cabo en el software Star 5.31.

3.2.4 Análisis estadísticos. Se aplicó estadística descriptiva a todas las muestras, obteniendo tabla de frecuencia, y se calculó media aritmética y desviación estándar para las muestras con concentraciones sobre el límite de detección. Se estimó la proporción de muestras sobre los LMRs, para esto se consideraron dos concentraciones que se han establecido hasta la fecha, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Los antecedentes entregados por la Encuesta Apícola aplicada a apicultores que participan del proyecto, junto con datos proporcionados por APICOOP Ltda. (Anexo 13), permitieron determinar factores que posiblemente poseen un efecto sobre la variable en estudio que corresponde a la concentración de fluvalinato. Estos son los siguientes:

- Localización geográfica de las colmenas, considerando como niveles de este factor a la división política por comunas.
- Importancia económica de la actividad apícola clasificada en dos niveles: 1) actividad principal (aquellos apicultores que obtienen la mayor parte de sus ingresos de la apicultura) y 2) actividad secundaria (aquellos apicultores para quienes la apicultura representa un ingreso complementario al de otra actividad).
- Tamaño de la explotación apícola según número de colmenas que posee el apicultor, medida en tres niveles o estratos (clasificación adaptada a partir de LÓPEZ (1980)): 1) 1 a 10 colmenas, 2) 11 a 40 colmenas y 3) más de 40 colmenas.

El efecto de los factores definidos anteriormente sobre los niveles de fluvalinato se examinó a través de Análisis de varianza y pruebas de comparación múltiple, considerando las muestras sobre el límite de detección.

Se aplicó la Prueba de χ^2 (Prueba de Independencia) para determinar si existe dependencia de los niveles de fluvalinato en relación a los LMRs, (frecuencia de muestras sobre o bajo los LMRs), a los factores importancia económica de la actividad apícola y tamaño de la explotación apícola.

Todos los análisis estadísticos se efectuaron en el programa Statgraphics Plus 2.0.

4 PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados divididos en tres partes. La primera corresponde a la cuantificación de los residuos de fluvalinato y las posibles causas de estos resultados, además de su comparación con estudios realizados en otros países. La segunda parte confronta los niveles de residuos detectados en las mieles con las tolerancias toxicológicas existentes, y finalmente, el tercer punto busca examinar los efectos de algunas características de los apicultores sobre los residuos detectados, así como, establecer si existe dependencia entre dichas características y los niveles de fluvalinato en relación a los LMRs.

4.1 Residuos de fluvalinato encontrados en mieles de la X Región.

De acuerdo al método de análisis y a las condiciones de laboratorio empleados, no se detectaron residuos en 96 muestras de un total de 133, lo que corresponde al 72%. En tanto, 37 muestras (28%) se encontraron sobre el límite de detección (LD: $1\mu\text{g}/\text{kg}$). (Porcentajes y tabla de frecuencias en Anexos 14 y 15).

Las muestras con residuos sobre el LD presentaron un valor mínimo y máximo de 1 y $28,9\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivamente, con una media de $8,6 \pm 5,7\mu\text{g}/\text{kg}$. La mayor parte, 68%, mostró concentraciones en un rango de 1 hasta $10,3\mu\text{g}/\text{kg}$, lo que se detalla en la siguiente figura.

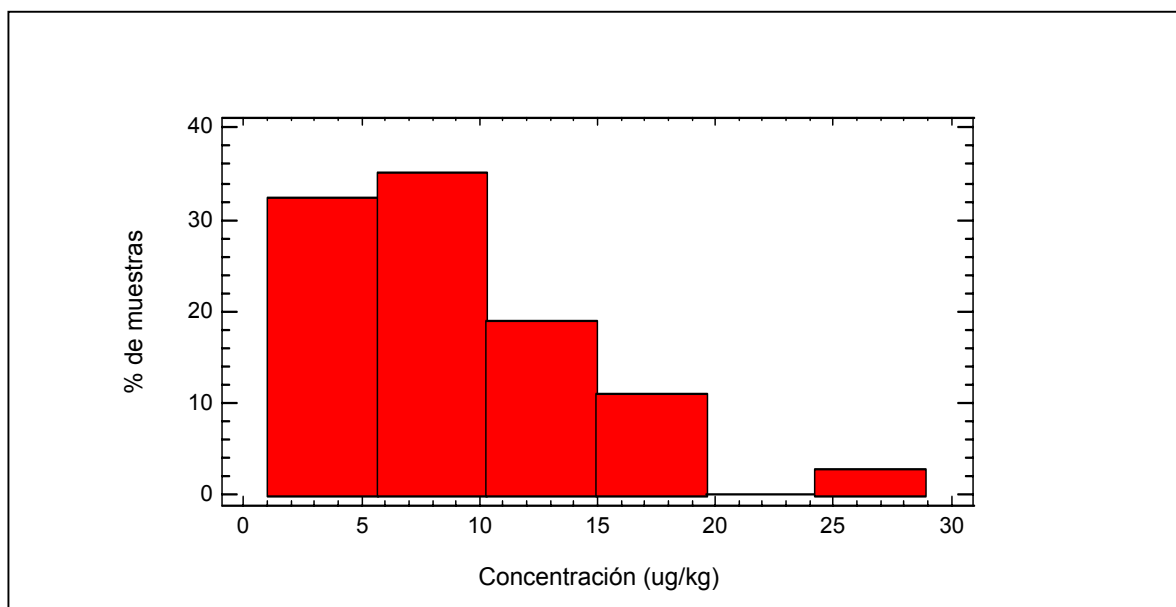


FIGURA 4 Histograma para concentración de fluvalinato y porcentaje de muestras sobre el LD.

4.1.1 Posibles causas de la presencia de residuos en las muestras de

miel. La presencia de residuos en parte de las mieles analizadas puede deberse a varias razones, entre las cuales se encuentran: extracción por prensado, que deja partículas de cera contaminada entre la miel, tratamientos aplicados en presencia de miel en la colmena, muestreo muy cercano a la última aplicación de fluvalinato, y un tiempo de exposición mayor a seis semanas (SANCHO *et al.*, 1991 y FERNÁNDEZ-MUIÑO *et al.*, 1997).

Como señala SANCHO *et al.* (1991), el sistema de extracción por prensado no es recomendable y ha sido desechado con el fin de obtener mieles de calidad, pasando a ser el centrifugado y posterior decantación, el método más utilizado en la actualidad.

En el presente estudio la extracción fue hecha por gravedad, dejando escurrir la miel una vez desoperculado el trozo de panal. Además, durante el

procesamiento de las muestras se consideró el centrifugado de éstas, evitando en lo posible partículas de cera en la miel.

En cuanto a tratamientos en presencia de miel, de acuerdo a la Encuesta Apícola, es posible decir que, en general, los apicultores se ajustan a las recomendaciones, aplicando antes del primer flujo de néctar o después de la última cosecha de miel. Además, la gran mayoría realiza dos tratamientos, uno a principios de primavera, desde julio hasta como máximo octubre, y otro en otoño, desde marzo hasta mayo.

Por otra parte, un alto porcentaje de muestras recolectadas en febrero y marzo tenían residuos, observándose una disminución en abril y la ausencia total en mayo y junio, para terminar en julio con sólo una muestra contaminada. Los residuos en febrero y principios de marzo es posible que se originen en el tratamiento de primavera, al menos tres meses antes del muestreo, o por la incorporación de cera contaminada en las colmenas, en tanto, las muestras tomadas a fines de marzo, abril y mayo pudieron coincidir con la aplicación de otoño. Sin embargo, desde abril la proporción de muestras con residuos disminuye cada mes, lo que podría deberse entre otros factores, a una baja concentración remanente de fluvalinato en tablillas de aplicaciones anteriores, a una menor cantidad de tratamientos o tal vez a degradación (Anexo 16).

Las aplicaciones de fluvalinato con tiempos de exposición mayores a lo recomendado son frecuentes, ya que muchos apicultores tienden a no retirar las tablillas de las colmenas al finalizar los tratamientos principalmente de otoño ¹. Esto no sólo favorece la presencia de residuos en todos los productos de la colmenas, sino también, facilita la aparición de resistencia debido a la

¹ BECERRA, L. (2001). Ing. Agr. empresa APICOOP Ltda. Comunicación personal.

exposición de varroa a dosis subletales del producto (HIGES *et al.*, 1998 y OTERO, s.f.).

Otros factores a considerar en la presencia de residuos son: el uso de fluvalinato en forma artesanal y las dificultades para la preparación de tablillas con dosis homogéneas del producto, el uso de alimentación suplementaria a fines de invierno con miel que no ha sido analizada para determinación de residuos, y la ausencia de tratamientos alternativos, como ácidos orgánicos o aceites esenciales, probados para esta zona, que puedan integrarse al manejo en forma eficiente ².

Cabe destacar que, en general, las técnicas de análisis de residuos son de alto costo, debido a la implementación que se requiere para ponerlas en marcha, por lo que todavía no constituyen una práctica común entre los apicultores.

Otra causa de contaminación importante, es la acumulación de residuos en la cera, los que son traspasados hacia la miel por difusión cuando han alcanzado condiciones de alta concentración, después de varios años de aplicaciones (WALLNER, 1999). El fluvalinato se fija preferentemente en la cera, debido a su alta liposolubilidad, y sus residuos no son degradados en los procesos de manufactura de cera estampada, incrementándose de un año a otro (NEIRA, 2001).

En general, la presencia de residuos en cera es más frecuente que en miel, y presenta mayores niveles de contaminación. En muestras de Bélgica se han alcanzado 100 mg/kg, donde además, se presentó un aumento desde el 25% de muestras con residuos en 1989, hasta el 95% en 1993 (DE GREEF *et al.*, 1994). Con esos niveles de fluvalinato en la cera ya existiría migración hacia

la miel, dado que con 1 mg/kg del ingrediente activo en la cera se esperan 0,4 µg/kg en la miel (WALLNER, 1995).

Es fundamental tener en cuenta lo anterior, ya que como señala RÍOS (2001), la cera empleada por la mayoría de los apicultores encuestados es procesada en la empresa APICOOP Ltda., donde normalmente se mezclan todas las ceras recibidas para estampar. Por lo tanto, sería posible esperar a futuro un aumento de residuos en las mieles de los apicultores analizados.

4.1.2 Posibles causas de ausencia de residuos en las muestras de miel.

Independiente del manejo de la colmena, existen dos causas que pueden explicar la ausencia de muestras con residuos, que corresponde al 72% de las mieles analizadas. Una de ellas, es la mayor afinidad del fluvalinato por la cera más que por la miel, dado sus características lipofílicas. Por esto, además de su poca tendencia a migrar, sería posible que colmenas con altas concentraciones de residuos en la cera, presenten miel no contaminada (WALLNER, 1995).

Otra explicación es la degradación del fluvalinato en la miel y en consecuencia la formación de metabolitos, ya sea durante el tratamiento como durante el almacenamiento (SAITTA *et al.*, 1993 y BOGDANOV *et al.*, 1998).

No obstante, hay datos contradictorios al respecto, observándose en distintos ensayos tanto degradación rápida como nula. Es posible que exista un comportamiento diferente del fluvalinato de acuerdo a la presentación del producto que se utilice, siendo las soluciones acuosas como Mavrik las que presentan una degradación más rápida, en tanto, las soluciones preparadas en solventes orgánicos serían más estables (TSIGOURI *et al.*, 2001). El mismo autor destaca que, en general, falta tomar en cuenta factores como la actividad

² BECERRA, L. (2001). Ing. Agr. empresa APICOOP Ltda. Comunicación personal.

de las abejas y el ambiente altamente lipofílico que hay al interior de las colmenas.

Por su parte, CARAVIA (1997), observó una limitada persistencia del acaricida en la miel debida a la hidrólisis del fluvalinato, tanto en ensayos con aplicación de Apistán, como de tablillas impregnadas con solución de Mavrik. Aún cuando el metabolito más abundante identificado, 3-fenoxi benzaldehído, se señala como de menor riesgo toxicológico que el compuesto original, Dreisbach y Robertson (1988) y Dölz (1997), citados por CARAVIA (1997), se indicó como necesaria la evaluación de los metabolitos en general, para ensayos posteriores.

4.1.3 Comparación de los niveles de residuos detectados con estudios

realizados en otros países. En general, se ha detectado contaminación de miel con fluvalinato a niveles de partes por billón ($\mu\text{g}/\text{kg}$). Ésta proviene principalmente del uso de Apistán desde su registro entre 1988 y 1989, según el país. Sin embargo, tal como señala SAG (1994), en Chile se emplean tablillas de madera impregnadas de una solución diluida de Mavrik, lo que es practicado por todos los apicultores muestreados.

Las diferencias entre la aplicación de tablillas artesanales y Apistán radican principalmente en la forma de liberación del ingrediente activo y las dosis aplicadas. Por una parte, Apistán se libera lentamente alcanzando una mortalidad del 9% la primera semana de aplicación, sin llegar a saturar el medio y contaminando en menor grado la cera, a pesar de tener cinco veces más concentración que las tablillas, en tanto éstas, eliminan un 53% de las población en ese mismo período y contaminan la cera en forma inmediata, llegando a estabilizarse a los quince días de aplicación (KUBIK *et al.*, 1995 y KUBIK *et al.*, 1996).

Uno de los pocos países que señala el uso de fluvalinato (Mavrik) en forma artesanal es Israel. A partir de 1987 (previo a la aparición de Apistán) y luego de tres años y medio de aplicaciones no se encontraron residuos en mieles comerciales. No obstante, en ensayos con tratamientos extensos de seis a ocho meses ocurrió contaminación de miel y cera (SLABESKI *et al.*, 1991). Por otra parte, en Polonia KUBIK *et al.* (1995), detectaron residuos en miel al utilizar tablillas de fluvalinato (producto comercial Klartan) en tratamientos de siete semanas, aunque los niveles encontrados fueron similares a los obtenidos cuando se utilizó Apistán, en un rango 10 a 69 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en miel.

En los estudios que señalan el uso de Apistán y aquellos que no especifican el producto en base a fluvalinato aplicado en las colmenas, los resultados de las evaluaciones (que consideran sólo la toma de muestras), indican que los valores promedios y desviaciones estándar más altos pertenecen a mieles de Italia (SAITTA *et al.*, 1993), Egipto (ZIDAN *et al.*, 1996) y Jordania (AL-RIFAI y AKEEL, 1997). En estos casos la media varía entre 59 y 69 $\mu\text{g}/\text{kg}$, no obstante, esta contaminación se presentó sólo entre el 11 y 23% de las muestras (ver Cuadro 3 para número de muestras y rangos de concentración).

Menos contaminadas aparecen las mieles de Bélgica (DE GREEF *et al.*, 1994), Austria (WALLNER y PECHHACKER, 1994 y MOOSBECKHOFER *et al.*, 1995), España (FERNÁNDEZ-MUIÑO *et al.*, 1997; GARCÍA *et al.*, 1995 y GARCÍA *et al.*, 1996), Alemania (WALLNER, 1999) y Estados Unidos (FDA, 2000). Las concentraciones promedio encontradas no superan los 22 $\mu\text{g}/\text{kg}$, y siempre los porcentajes de muestras con residuos detectables son bajos, hasta un 18%. Sólo es excepción un muestreo realizado en Austria con el 41% de las muestras con residuos, pero siempre en poca concentración. Cabe destacar, el caso de Estados Unidos que no presenta mieles comerciales con residuos entre los años 1991 y 1999, en un total de 26 muestras.

En el presente estudio, los resultados obtenidos se encierran dentro de los valores descritos para los otros países, tanto a nivel de residuos, como en cantidad de muestras contaminadas. Siendo positivo el hecho que no se presentaron valores altos, como son los casos de niveles entre 92 y 188 $\mu\text{g}/\text{kg}$, presentes en muestras de Italia (SAITTA *et al.*, 1993), Egipto (ZIDAN *et al.*, 1996), España (FERNÁNDEZ-MUIÑO *et al.*, 1997) y Jordania (AL-RIFAI y AKEEL, 1997).

Sin embargo, es necesario destacar que la mayor parte de los apicultores muestreados, ligados a APICOOP Ltda., comenzaron el uso de fluvalinato en forma artesanal en 1999³. Por lo tanto, al momento del muestreo existían, al menos, entre una a tres aplicaciones de fluvalinato en las colmenas, cifra que es baja, comparada con diez años de aplicaciones en otros países.

4.2 Evaluación de los residuos detectados en relación con las tolerancias establecidas.

La evaluación que se presenta a continuación considera los límites máximos de residuos (LMRs) e ingesta diaria admisible (IDA) establecidos para fluvalinato.

Al considerar las tolerancias establecidas como una referencia para evaluar la calidad de la miel respecto a los residuos de fluvalinato, es necesario tener en cuenta que no existe un consenso internacional respecto a esta reglamentación. Encontrándose situaciones opuestas, como el caso de España (FERNÁNDEZ-MUIÑO *et al.*, 1997) y Chile (CHILE, MINISTERIO DE SALUD, 1997), que no toleran la presencia de sustancias extrañas en la miel, mientras por otro lado, la Unión Europea (EMEA, 1995), basada en sus investigaciones

³ BECERRA, L. (2001). Ing. Agr. empresa APICOOP Ltda. Comunicación personal.

no considera necesario el establecimiento de un LMR para fluvalinato en este producto.

4.2.1 Residuos detectados en relación con los LMRs. El LMR que señala Piro (1999), citado por WALLNER (1999), de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ adoptado por Alemania e Italia, sólo es superado por 13 muestras (9,8%), las que presentaron una media de $14,5 \pm 5,2 \mu\text{g}/\text{kg}$ (Anexo 14).

En tanto, ninguna muestra sobrepasó los 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ que es el LMR establecido por Estados Unidos, Suiza y Holanda (este último país posee tolerancia cero y su LD es de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$), (Piro 1999, citado por WALLNER, 1999).

Respecto a la mieles chilenas en general, CAMPANO (2001), señala que el monitoreo de partidas de miel analizadas en laboratorios del SAG, no ha detectado niveles de residuos sobre los permitidos en muestras oficiales. Sin embargo, en otras partidas si se han encontrado residuos de fluvalinato que sobrepasan los límites permitidos. El mismo autor citado por SANFORD (1996), agrega específicamente que las autoridades de agricultura no recomiendan el uso de tablillas artesanales debido a que en mieles chilenas exportadas a Alemania se han detectado residuos sobre el límite tolerado.

Los estudios llevados a cabo en Francia (BORNECK y MERLE, 1989), Suiza (BOGDANOV *et al.*, 1990), España (GARCÍA *et al.*, 1995; GARCÍA *et al.* 1996 y FERNÁNDEZ-MUIÑO *et al.*, 1997), Egipto (ZIDAN *et al.*, 1996) y Jordania (AL-RIFAI y AKEEL, 1997), coinciden en que las concentraciones detectadas por ellos se encuentran bajo los LMRs. Sólo una muestra de Jordania y tres de España sobrepasaron el LMR de 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. De estas últimas, una de ellas fue obtenida inmediatamente después del tratamiento, en

tanto, las otras dos fueron sometidas a un mayor tiempo de exposición al producto en la colmena.

4.2.2 Residuos detectados en relación con la IDA. EPA (1997) ha establecido una IDA de fluvalinato de 0,01 mg fluvalinato/ kg peso corporal/ día. Un valor menor al anterior es el indicado por EMEA (1995), que corresponde a una IDA de 0,5 µg fluvalinato/ kg peso corporal/ día. Según éste, si una miel presenta una concentración de 8,6 µg/kg (como es el promedio de las mieles analizadas), se requeriría un consumo mayor a 58,1 g miel/ kg peso corporal/ día para sobrepasar la norma. Es decir, una persona de 60 kg podría consumir 3,5 kg de miel al día sin que su salud esté en riesgo debido a los residuos de este plaguicida.

De acuerdo a OMS (2001) el consumo de miel en Europa y Latino América es de 1,3 y 0,3 g por persona al día respectivamente, por lo tanto, dado ese consumo los riesgos para la salud humana serían mínimos.

En Francia (BORNECK y MERLE, 1989), Suiza (BOGDANOV *et al.*, 1990), España (GARCÍA *et al.*, 1995 y GARCÍA *et al.*, 1996) y Egipto (ZIDAN *et al.*, 1996), las investigaciones realizadas concluyen que los niveles de residuos encontrados no serían perjudiciales para la salud humana, ya que se mantienen bajo las tolerancias máximas establecidas para IDA.

Debido a lo anterior, FERNÁNDEZ-MUIÑO *et al.* (1995), proponen que es necesario cambiar el concepto de la miel como un producto libre de residuos, dando a conocer al público que residuos bajo los niveles estimados para la IDA no son un peligro para la salud humana. Esto es interesante contrastarlo con lo expuesto por DE GREEF *et al.* (1994), quien considera necesario que los productos apícolas se mantengan libres de contaminación, especialmente dado

que la miel se destina a consumo humano, ya que así, es posible defender la calidad de productos naturales como estos.

4.3 Efectos de algunas características de los apicultores sobre los residuos detectados, y determinación de dependencia entre estas características y los niveles de fluvalinato en relación a los LMRs.

El resultado del análisis de varianza (Anexo 17) entre la concentración de fluvalinato y los factores, localización geográfica de las colmenas (comuna), importancia económica de la actividad apícola y tamaño de la explotación apícola, permitió determinar el efecto de dichos factores sobre la variable estudiada, en base a las siguientes diferencias estadísticas:

- Existen diferencias significativas entre el promedio de residuos según la comuna donde se localizan la colmenas.
- Existen diferencias altamente significativas entre el promedio de residuos en mieles que pertenecen a apicultores que trabajan el rubro como actividad económica principal y aquellos que lo practican como una actividad económica secundaria.
- No se presentaron diferencias significativas entre el promedio de residuos en mieles de apicultores de los estratos 1) de 1 a 10 colmenas, 2) de 11 a 40 colmenas y 3) más de 40 colmenas.

Por otra parte, los resultados de la Prueba de X^2 (Anexo 18) aplicada a los factores importancia económica de la actividad apícola y tamaño de la explotación apícola, indicó la dependencia existente entre los niveles de residuos en relación al LMR de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (frecuencia de muestras que respetan o sobrepasan la norma toxicológica) y el primer factor, no así, en el caso del segundo factor estudiado.

4.3.1 Localización geográfica de las colmenas y niveles de residuos detectados.

En relación a la localización geográfica de las colmenas, es necesario tener en consideración que sólo seis de nueve comunas presentaron muestras sobre el LD, y que tres de ellas aportaron sólo una muestra cada una (Cuadro 4). Por lo tanto, se consideraron para este análisis estadístico aquellas comunas con más de una muestra con residuos, las que correspondieron a Paillaco, Lago Ranco y Futrono. Éstas concentraron el 88% de las muestras analizadas.

La localización geográfica de las colmenas y los niveles de residuos encontrados en cada una se presentan en el Anexo 19.

Cuadro 4 Número de muestras y concentraciones de fluvalinato por comuna.

Comuna	Número total de muestras	Número de muestras sobre LD	Promedio y desviación estándar de muestras sobre LD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1) Los Lagos	5	1	28,9
2) Paillaco	11	4	9,1 \pm 6,9
3) Futrono	54	15	6,4 \pm 4
4) La Unión	2	1	1,1
5) Lago Ranco	52	15	9,9 \pm 4,2
6) Fresia	4	0	-
7) Puerto Montt	3	0	-
8) Panguipulli	1	1	7,4
9) Puerto Varas	1	0	-
Total	133	37	8,6 \pm 5,7

El análisis de comparación múltiple (Anexo 17) indicó que las comunas de Lago Ranco y Paillaco presentaron mayor concentración de residuos de fluvalinato que la comuna de Futrono.

Esta diferencia en los niveles de residuos según la localización geográfica de las colmenas, se observó aún cuando las tres comunas presentan similitudes en cuanto al manejo, ya que la mayoría de los apicultores recibe asistencia técnica de la empresa APICOOP Ltda., en cuanto al nivel de actividad económica que desarrolla el apicultor, siendo más común la apicultura como actividad secundaria, y en cuanto al tamaño de las explotaciones, siendo el estrato de 1 a 10 colmenas el más frecuente seguido por el estrato de 11 a 40 colmenas.

Es necesario tener en consideración que, dado el costo de las tablillas y la falta de conciencia respecto a la importancia en su preparación, algunos apicultores las adquieren en forma independiente, lo que podría ocasionar problemas en los tratamientos ⁴.

4.3.2 Importancia económica de la actividad apícola y niveles de residuos detectados. Las mieles de apicultores que pertenecen al grupo de actividad principal, poseen un promedio de residuos de $11 \pm 4,4 \mu\text{g}/\text{kg}$, significativamente mayor que el grupo de actividad secundaria, el cual presentó una media de $7,2 \pm 4,3 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Este efecto se vió respaldado por la dependencia observada de los niveles de residuos, en relación al LMR de $10 \mu\text{g}/\text{kg}$, al nivel de importancia económica de la actividad apícola. De hecho, el grupo actividad secundaria concentró el mayor porcentaje de muestras bajo este límite (Figura 5).

Esto concuerda con lo observado en la zona central del país, donde algunos apicultores cuyos principales ingresos dependen de esta actividad, refuerzan los tratamientos para el control de varroa, independiente del nivel de

⁴ BECERRA, L. (2001). Ing. Agr. empresa APICOOP Ltda. Comunicación personal.

población de existente, utilizando mayores dosis o prolongando los tiempos de exposición, con el fin de evitar pérdidas de familias y menores producciones, a pesar de los aspectos negativos de esa práctica ⁵.

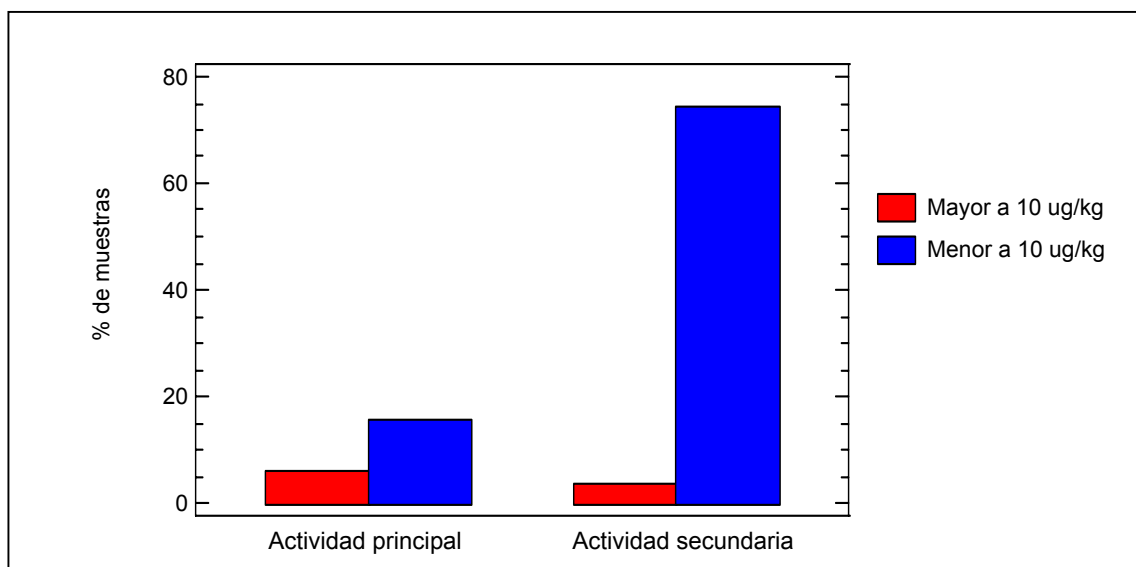


FIGURA 5 Porcentaje de muestras en relación al LMR (10 µg/kg) según el nivel de importancia económica de la actividad apícola.

Cabe destacar, que dentro del grupo de actividad principal, la mayoría de las muestras proviene de explotaciones con más de 40 colmenas. En contraste, el grupo de actividad secundaria se caracteriza por tener explotaciones más pequeñas con apiarios que no sobrepasan las 40 colmenas.

4.3.3 Tamaño de la explotación apícola y niveles de residuos detectados.

De acuerdo a lo señalado por LÓPEZ (1980), en los estratos con mayor número de colmenas, en general, se observa un mejor manejo de los apiarios. No obstante, no se observó un efecto del tamaño de la explotación apícola sobre

⁵ HENRÍQUEZ, J. (2001). Gerente empresa APICOOP Ltda. Comunicación personal.

los niveles de residuos de fluvalinato, ya que los estratos no alcanzan a presentar diferencias significativas, siendo sus promedios $9 \pm 5,2 \mu\text{g/kg}$, $7,1 \pm 4,1 \mu\text{g/kg}$ y $9,1 \pm 4,4 \mu\text{g/kg}$, para los estratos 1, 2 y 3 respectivamente.

Esto coincide con los resultados de la Prueba de X^2 , la que indicó que no hay dependencia de los niveles de residuos, en relación con el LMR de $10 \mu\text{g/kg}$, al tamaño de la explotación apícola.

Es importante recordar lo señalado por LÓPEZ (1980) y RÍOS (2001), en relación a que en la X Región la apicultura es desarrollada principalmente por sectores campesinos, que corresponde al caso de la mayoría de los apicultores muestreados, donde en general, el nivel tecnológico de la actividad apícola aún es bajo. De tal manera, sería posible suponer en este caso, que un aumento en el número de colmenas no conllevaría un desarrollo tecnológico suficiente como para reflejarse en un manejo sanitario que reduzca en forma significativa la presencia de residuos presentes en la miel.

5 CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados y la metodología empleada en la presente investigación, es posible concluir lo siguiente:

Existe presencia de residuos de fluvalinato en mieles de la X Región, debido al uso de tratamientos artesanales para el control de varroa, siendo necesario mayor preocupación en el uso de productos químicos y la implementación de formas de control alternativas.

La situación de residuos encontrada es similar a lo informado por otros países, los que en su mayoría han utilizado fluvalinato en forma de Apistán por más de una década, y que actualmente están adoptando otras formas de control sanitario, no sólo debido a los residuos sino también por problemas de resistencia.

En general, los niveles de fluvalinato detectados fueron inferiores a las tolerancias establecidas, por lo que se considera que los riesgos para la salud humana al consumir estas mieles serían mínimos.

En cuanto a los niveles de fluvalinato y las características de los apicultores estudiadas, se determinó que:

- Mieles provenientes de colmenas localizadas en las comunas de Lago Ranco y Paillaco presentaron mayores concentraciones que las localizadas en Futrono, a pesar que los apicultores muestreados en estas comunas poseen características similares.

- El factor importancia económica de la actividad apícola presentó un efecto sobre los niveles de residuos, de tal manera que, las concentraciones de fluvalinato más altas correspondieron a mieles de apicultores cuyos principales ingresos dependen de esta actividad. Además, se observó dependencia entre los niveles de fluvalinato, en relación con el LMR, y este factor, siendo la mayor parte de las mieles que respetaron la norma toxicológica (LMR) producidas por una apicultura de carácter económico secundario.

- El tamaño de la explotación apícola, a pesar de señalarse como un factor que influye sobre la calidad en el manejo de las colmenas, no ejerció un efecto sobre los niveles de residuos, como tampoco se encontró dependencia de los niveles de fluvalinato a este factor. Esta falta de diferenciación entre estratos podría deberse al bajo nivel tecnológico que existe en apicultores de sectores campesinos.

6 RESUMEN

Se analizaron 133 muestras de mieles de la X Región, Chile, para determinar la presencia de residuos de fluvalinato, el cual es aplicado en tablillas artesanales dentro de las colmenas para el control de *Varroa destructor* Anderson & Trueman. Los niveles encontrados fueron comparados con situaciones descritas en otros países, evaluados de acuerdo a las tolerancias establecidas y estudiados en relación a algunas características de los apicultores. El método analítico contempló extracción líquido-líquido y cromatografía de gases (ECD), con un límite de detección de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y una recuperación promedio de $106 \pm 13\%$. Se detectaron residuos en el 28% de las muestras, en un rango de 1 a 28,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$, con una media de $8,6 \pm 5,7 \mu\text{g}/\text{kg}$. Bajo el límite de detección estuvo el 72% de las muestras. Los niveles de residuos encontrados fueron similares a los informados en otros países. El LMR de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ fue sobrepasado por el 9,8% de las muestras. Por lo anterior, y considerando la IDA, el promedio de residuos detectados y el bajo consumo generalizado de miel, el riesgo para la salud humana debería ser mínimo al consumir estas mieles. En cuanto a las características de los apicultores, se determinó que, muestras de mieles provenientes de colmenas localizadas en las comunas de Lago Ranco y Paillaco tenían concentraciones más altas que las provenientes de Futrono. Además, el nivel de importancia económica de la actividad apícola mostró un efecto sobre los niveles de residuos, obteniendo la apicultura como actividad económica principal mieles con mayores concentraciones que la actividad secundaria. Más aún, se observó dependencia de los niveles de residuos, en relación al LMR, a este factor. En contraste, el tamaño de la explotación apícola no ejerció efecto sobre los residuos de fluvalinato, y no se observó dependencia entre este factor y los niveles de residuos en relación al LMR.

SUMMARY

One hundred and thirty three honey samples from Chile's tenth region were analyzed for the presence of fluvalinate residues, used in controlling *Varroa destructor* Anderson & Trueman infestations, by placing plywood inserts inside the colonies. The levels found were compared to those reported in other countries, evaluated according to the current standard limits, and studied in relation to some of the characteristics of beekeepers. The analytical procedure involved a liquid-liquid extraction and gas chromatography (ECD). The detection limit was 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, with an average recovery of $106 \pm 13\%$. Fluvalinate was detected in 28% of the samples in amounts ranging from 1 to 28.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$, with an $8.6 \pm 5.7 \mu\text{g}/\text{kg}$ average. Seventy-two percent were below the detection limit. The residue levels found were similar to those reported in studies from other countries. Nine point eight percent of the samples were found to contain residues higher than 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ MRL. Because of that, and taking into account the ADI, the mean amount of residues detected and the small general consumption of honey, the risk to human health should be minimal from the honeys analyzed. Concerning the characteristics of beekeepers, it was proved that honey samples from beehives located on the Lago Ranco and Paillaco districts had higher concentrations than those from Futrono. Also, the economic significance of the beekeeping activity effected residue levels, so samples from an apicultural activity of high economic significance, showed more residues than those from a less economic significance activity. Moreover, it was seen that residue levels in relation to 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ MRL depend on this factor. Contrasting to this, the size of the beekeeping exploitation did not effect fluvalinate residues, and no dependance was observed between this factor and residue levels in relation to 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ MRL.

7 BIBLIOGRAFÍA

- AL-RIFAI, J. y AKEEL, N. 1997. Determination of pesticide residues in imported and locally produced honey in Jordan. *Journal of Apicultural Research* 36(3/4): 155-161.
- ANDERSON, D. y TRUEMAN, J. 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology* (Holanda) 24: 165-189.
- ATIENZA, J.; JIMÉNEZ, J.; BERNAL, J. y MARTÍN, M. 1993. Supercritical fluid extraction of fluvalinate residues in honey. Determination by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* (Holanda) 655: 95-99.
- BACH, J. 1995. For best mite control results follow Apistan label directions. *American Bee Journal* 135(10): 685-687.
- BALAYANNIS, P. y SANTAS, L. 1992. Dissipation of malathion and fluvalinate residues from honey. *Journal of Apicultural Research* 3(2): 70-76.
- BIBLIOTECA DEL CONGRESO NACIONAL DE CHILE. 2000. Mapa de la Región de Los Lagos. (On Line). <<http://www.bcn.cl/index2.html>> (6 de nov. 2001).
- BLOOMQUIST, J. 1999. Insecticides: chemistries and characteristics. (On Line). <<http://ipmworld.umn.edu/chapters/bloomq.htm>> (25 de nov. 2001).

- BOGDANOV, S.; IMDORF, A.; KILCHENMANN, V. y GERIG, I. 1990. Residues in beewax, winter sugar stores and honey after treatment with Apistan and Folvex VA. In: Proceedings of the fourth international symposium on the harmonization of methods for testing the toxicity of pesticides to bees. (ed.) The Research Institute of Apiculture at Dol, Checoslovaquia. pp. 104-109.
- BOGDANOV, S.; KILCHENMANN, V. e IMDORF, A. 1998. Acaricide residues in some bee products. *Journal of Apicultural Research* 37(2): 57-67.
- BORNECK, R. y MERLE, B. 1989. La varroatose a l'Institut Technique de l'Apiculture. Essais sur Apistan en 1988. *L'Abeille de France* N° 736.
- BRITISH CROP PROTECTION COUNCIL. 1987. The pesticide manual a world compendium. (ed.) Charles R. Worthing. England. U.K. 1080 p.
- CAMPANO, S. 2001. Reseña de la situación sanitaria apícola nacional y su relación con presencia de residuos en mieles. In: Seminario Internacional Sanidad Apícola. Mejor prevenir que curar. 4 de octubre de 2001, Temuco. pp. 1-8.
- CARAVIA, L. 1997. Determinación de residuos de fluvalinato en miel, producto del control estival de *Varroa jacobsoni* Oud. (Mesostigmata: Varroidae), con acaricidas aplicados en el alza mielaria. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultas de Ciencias Agrarias. 82 p.
- CHILE, CORPORACIÓN DE FOMENTO DE LA PRODUCCIÓN (CORFO). 1987. Producción, procesamiento y comercialización de la miel y sus derivados en la X Región. 195 p.

- CHILE, FUNDACIÓN PARA LA INNOVACION AGRARIA (FIA). 1999. Tecnologías aplicadas en la cadena de producción de miel orgánica y diversificación de la producción apícola para pequeños y medianos productores de la Novena y Décima Regiones. 22 p.
- CHILE, INSTITUTO DE DESARROLLO AGROPECUARIO (INDAP). 1994. Estrategias de Desarrollo Agrícola del Área (EDAA). Puerto Montt, Chile. 76 p.
- CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS (INE). 1997. VI Censo Nacional Agropecuario. (On Line). <http://www.ine.cl/censo_agrop/f_censo_agrop.htm> (26 de jul. 2000).
- CHILE, MINISTERIO DE SALUD. 1997. Reglamento Sanitario de los Alimentos. Diario Oficial N° 35.764. Título XVII, De los azúcares y de la Miel, Párrafo III, Artículo 394. 32 p.
- CHILE, MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, DIRECCIÓN DE PROMOCIÓN DE EXPORTACIONES (PROCHILE). s.f. Estadísticas de exportaciones. (On Line). <http://www.prochile.cl/estadidticas_exp.htm> (15 de nov. 2001).
- CHILE, SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO (SAG), SUB DEPARTAMENTO DE DIVULGACION TECNICA. 1994. Control de la Varroasis en abejas. Santiago, Chile. 20 p.
- COBEY, S. 2001. The varroa species complex: identifying *Varroa destructor* and new strategies of control. American Bee Journal 141(3): 194-196.

CORNELL UNIVERSITY; OREGON STATE UNIVERSITY; UNIVERSITY OF IDAHO; UNIVERSITY OF CALIFORNIA AT DAVIS y MICHIGAN STATE UNIVERSITY. 1996. Fluvalinate. In: Extension toxicology network. Pesticide Information Profile. (On Line). <<http://ace.ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/fluvalin.htm>> (20 de dic. 1999).

DE GREEF, M; DE WAEL, L. y VAN LAERE, O. 1994. The determination of the fluvalinate residues in the belgian honey and beeswax. *Apiacta* 29: 83-87.

DELAPLANE, K. 1997. Practical science-research helping beekeepers 3. *Varroa*. *Bee World* 78(2): 155-164.

DONOSO, C. y RAMÍREZ, C. 1994. *Arbustos Nativos de Chile*. 2ª ed. Valdivia, Chile. Marisa Cuneo. 119 p.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). 1997. Office of Pesticides Programs Reference Dose Traking Report. (On Line). <<http://ace.orst.edu/info/nptn/tracking/TR60-61-62.html>> (26 de oct. 2001).

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). 2001. Search results for commodities with tolerances for fluvalinate. Office of Pesticide Programms. (On Line). <<http://www.epa.gov/cgi-bin/oppsrch>> (6 de ene. 2001).

ESPAÑA, SECRETARÍA GENERAL DE INSPECCIÓN, CERTIFICACIÓN Y ASISTENCIA TÉCNICA DE COMERCIO EXTERIOR. s.f. Plaguicida: fluvalinato tau. (On Line). <<http://www.mcx.es/plaguicidas/plagas.htm>> (8 de ene. 2001).

- ESPINOZA, N. 1996. Malezas presentes en Chile. Concepción, Chile. Aníbal Pinto. 219 p.
- FERNÁNDEZ-MUIÑO, M.; SANCHO, M.; SIMAL-GANDARA, J.; CREUS-VIDAL, J.; HUIDOBRO, J. y SIMAL-LOZANO, J. 1997. Acaricides residues in honeys from Galicia (N.W.Spain). Journal of Food Protection (USA) 60(1): 78-80.
- FERNÁNDEZ-MUIÑO, M.; SANCHO, M.; MUNIATEGUI, S.; HUIDOBRO, J. y SIMAL-LOZANO, J. 1995. Acaricide residues in honey: analytical methods and levels found. Journal of Food Protection (USA) 58(4): 449-454.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). 1999. FAOSTAT Database collections. Codex Alimentarius: Pesticide Residues in Food. (On Line). <[http:// apps.fao.org/cgi-bin/nph-db.pl?subset=FoodQuality](http://apps.fao.org/cgi-bin/nph-db.pl?subset=FoodQuality)> (11 de oct. 2000).
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). 2000. Total diet study. Summary of residues found ordered by food. Market baskets 91-3 – 99-1. 60 p.
- GALLARDO, M. 1993. Proposición de un modelo y evaluación de variables para estimar el potencial melífero y polinífero de la vegetación, para la apicultura. Tesis Ing. Agr. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. 87 p.
- GARCÍA, M.; LATORRE, M.; GARCÍA, S. y MELGAR, M. 1995. Revisión de residuos de fluvalinato usado contra la *Varroa jacobsoni* Oudemans en mieles. Programa y resumen de los informes, XXXIV Congreso

internacional de apicultores, Apimondia, Lausana, Suiza, 15-19 agosto 1995. pp: 95.

GARCÍA, M.; FERNÁNDEZ, M.; HERRERO, C. y MELGAR, M. 1996. Acaricide residue determination in honey. Bulletin Environmental Contamination and Toxicology (USA) 56: 881-887.

HIGES, M.; LLORENTE, J. y SANZ, A. 1998. Varroa. Sensibilidad al fluvalinato. (On Line) <<http://www.ctv.es/USERS/beeepress/revistas.htm>> (29 de nov. 2001).

HILLESHEIM, E.; RITTER, W. y BASSAND, D. 1996. First data on resistance mechanisms of *Varroa jacobsoni* OUD. against tau-fluvalinate. Experimental and Applied Acarology (Holanda) 20: 283-296.

JIMÉNEZ, J.; BERNAL, J. y ATIENZA, J. 1996. CGC/AED and CGC/NPD comparison for the determination of acaricides in honey after hexane/acetone extraction. Chromatographia (Dinamarca) 42(3/4): 130-134.

KUBIK, M.; NOWACKI, J.; MICHALCZUK, L.; PIDEK, A. y MARCINKOWSKI, J. 1995. Penetration of fluvalinate into bee-products. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research (Polonia) 3(1):13-22.

KUBIK, M.; NOWACKI, J.; MARCINKOWSKI, J.; PIDEK, A.; y MICHALCZUK, L. 1996. Penetration of fluvalinate into bee-products II. The role of fluvalinate vapour. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research (Polonia) 4(2):55-68.

LESSER, R. 1995. Apicultura moderna. Universitaria. Santiago, Chile. 189 p.

- LIU, T. 1992. Fluvalinate and its after effects. *American Bee Journal* 132(6): 398.
- LODESANI, M.; PELLACANI, A.; BERGOMI, S.; CARPANA, E.; RABITTI, T. y LASAGNI, P. 1992. Residue determination for some products used against *Varroa* infestation in bees. *Apidologie* (Francia) 23(3): 257-272.
- LÓPEZ, F. 1980. Caracterización de la apicultura de la X Región. Tesis Lic. Agr. Valdivia, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 78 p.
- MILLER, JC. y MILLER, JN. 1993. Estadística para química analítica. 2ª ed. Wilmington, USA, Addison-Wesley Iberoamericana. 211p.
- MONTALDO, P. 1981. Aplicación de un método ecológico para cuantificar flora melífera. *Agro Sur* (Chile) 9(2): 101-111.
- MONTALDO, P. y MEDEL, F. 1986. Características agroclimáticas del sector Malleco a Llanquihue, Chile. *Agro Sur* (Chile) 14(2): 114-126.
- MONTENEGRO, G. 2000. Chile nuestra flora útil. Editado por Gloria Montenegro y Bárbara Timmermann. Santiago, Chile. 267 p.
- MOOSBECKHOFER, R.; WALLNER, K.; LUH, M.; WOMASTEK, R. y PECHHACKER, H. 1995. Situación de los residuos de la miel, la cera y el propóleos al cabo de 10 años de tratamiento antivarroasis en Austria. XXXIV Congreso internacional de apicultores, Programa y resumen de los informes, APIMONDIA, Lausana, Suiza, 15-19 Agosto 1995.

- NAHUELHUAL, L. 1997. Importancia de la agroindustria rural en la economía campesina de la provincia, un estudio de caso. Tesis Mag. Des. Rural. Valdivia, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 187 p.
- NEIRA, M. 1999. Apicultura. In: Amtmann, A.; Mujica, F. y Vera, B. (eds). Pequeña agricultura en la región de los Lagos, Chile. Universidad Austral de Chile. pp: 261-295.
- NEIRA, M. 2001. Residuos que contaminan la miel, origen, detección y formas de evitar su presencia. In: Seminario Internacional Sanidad Apícola. Mejor prevenir que curar. 4 de octubre de 2001, Temuco, Chile. pp. 45-56.
- NERI, B.; UBALDI, A.; BARCHI, D.; DI LULLO, A. y COZZANI, R. 1992. Ricerca di residui di fluvalinate nel miele. *Industrie Alimentari (Italia)* 31(307): 748-750.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). 1997. Guidelines for predicting dietary intake of pesticides residues (revised). 41p.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). 2001. Global Environmental Monitoring System. GEMS/Food Regional Diets. (On Line). <<http://www.who.int/fsf/GEMS/diets2.pdf>> (12 de oct. 2001).
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS), CENTRO PANAMERICANO DE INGENIERÍA SANITARIA Y CIENCIAS DEL AMBIENTE (CEPIS). 2001. Curso de autoaprendizaje en diagnóstico, tratamiento y prevención de intoxicaciones agudas causadas por plaguicidas. Unidad VI. Piretrinas y piretroides. (On Line).

<<http://www.cepis.ops-oms.org/tutorial2/e/unidade6/index.html>> (1 de dic. 2001).

OTERO, G. s.f. Contaminación de la miel consecutiva a la aplicación de tratamientos varroicidas. (On Line). <<http://www.sagar.gob.mx/Conasag/contmiel.htm>> (26 de nov. 2001).

QUATTROCCHI, O; DE ANDRIZZI, S. y LABA, R. 1992. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Buenos Aires, Argentina, Artes Gráficas Farro. 407p.

RAMIREZ, P. 1992. Principales grupos insecticidas y sus características. In: Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Producción y Sanidad Vegetal (ed.) Curso de uso y manejo de plaguicidas. Valdivia, Chile. pp: 7–13.

RIEDEMANN, P. y ALDUNATE, G. 2001. Flora nativa de valor ornamental. Zona Centro. Identificación y propagación. Santiago, Chile. Andrés Bello. 566 p.

RÍOS, L. 2001. Caracterización de explotaciones apícolas de la IX y X Región. Tesis Lic. Agr. Valdivia, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 100 p.

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. 1990. The Agrochemicals Handbook. (eds.) Graham, T. England. 1500 p.

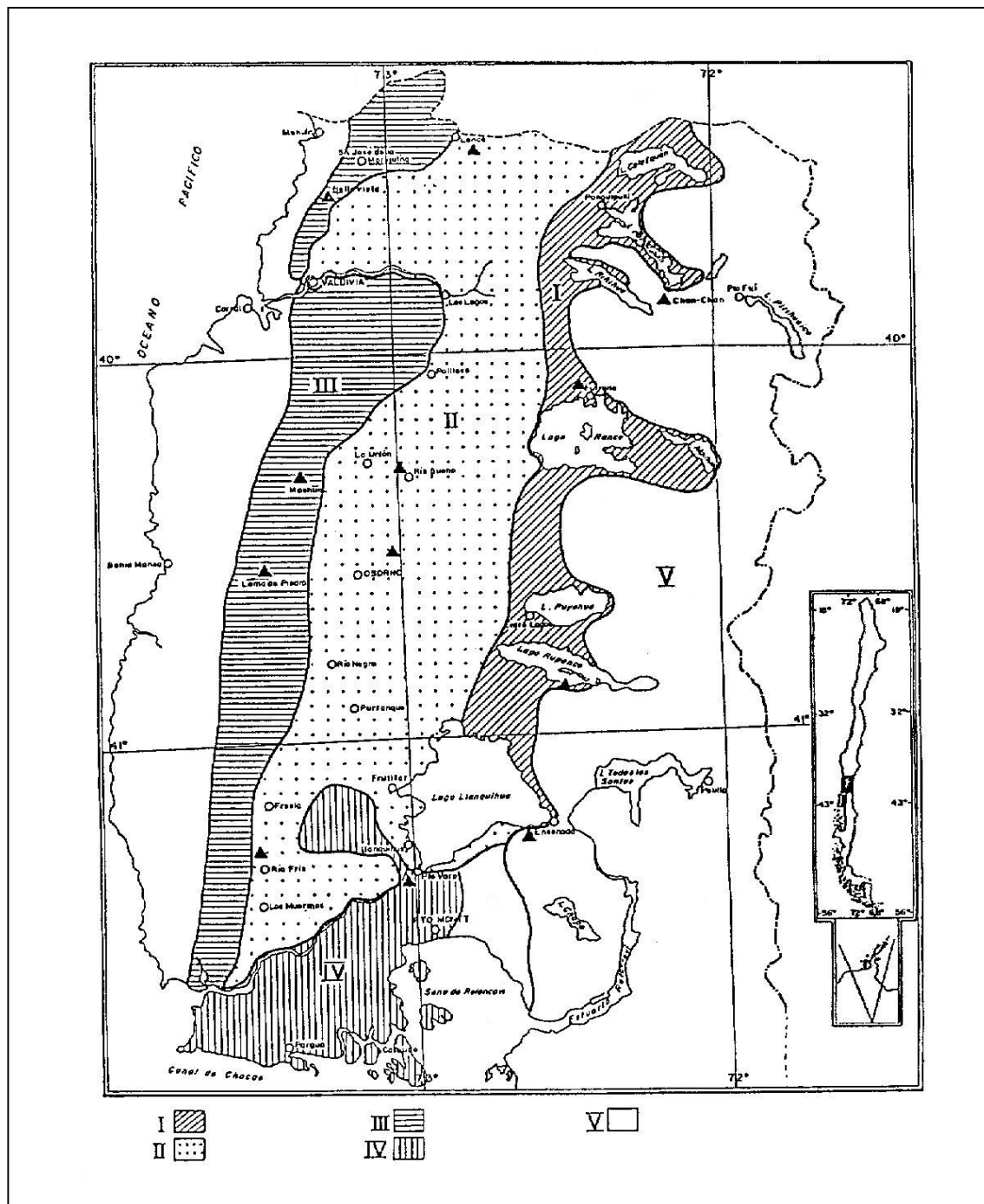
RUIJTER, A. 1994. Issues in the control of varroa infestation. In: Matheson, A. (ed.) New perspectives on varroa. London, England, IBRA. pp. 24-25.

- SAITTA, M.; DUGO, G.; DI BELLA, G.; LEUZZI, U. y VISCO, A. 1993. Determinazione rapida di alcuni contaminanti del miele. *La Rivista di Scienza dell'Alimentazione (Italia)* 22(1): 83-89.
- SANCHO, M.; MUNIATEGUI, S.; HUIDOBRO, J. y SIMAL, J. 1991. Nota. Análisis de residuos de fluvalinato en la miel mediante GC/ECD. *Revista Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (España)* 31(3): 417-422.
- SANDFORD, T. 1996. Fifth Ibero-Latin American Apicultural Congress meets in Mercedes, Uruguay, June 1996. (On Line). <<http://www.ifas.edu/~mts/apishtm/papers/fifth.htm>> (2 de mar. 2002).
- SLABEZKI, Y.; GAL, H. y LENSKY, Y. 1991. The effect of fluvalinate application in bee colonies on population levels of *Varroa jacobsoni* and honey bees (*Apis mellifera* L.) and on residues in honey and wax. *Bee Science (USA)* 1(4): 189-195.
- THE EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS, (EMA). 1995. Committee for Veterinary Medicinal Products. Tau fluvalinate. Revised summary report. (On Line). <<http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/002195r1.pdf>> (6 de ene. 2001).
- TSIGOURI, A.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. y THRASYVOULOU, A. 2001. Study of tau-fluvalinate persistence in honey. *Pest Management Science* 57: 467-471.
- VANDAME, R.; COLIN, M. y OTERO, G. 2001. Abejas europeas y abejas africanizadas en México: la tolerancia a *Varroa Jacobsoni*. Primera parte: biología de *Varroa*. (On Line). <http://apicultura.com/articulos/vandame/vandame1_sp.htm> (30 de ago. 2001).

- VITA (EUROPE) LIMITED – PRODUCTS. 2000. Products: Apistan, Apitol, Folbex, Apiguard and Pherovar. (On Line). <<http://www.apiculture.com/vita/products.htm>> (25 de nov. 2001).
- WALISZEWSKI, S.; PARDIO, V. y WALISZEWSKI, K. 1998. A rapid and low cost monitoring method for fluvalinate determination in honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77: 149-152.
- WALLNER, K. y PECHHACKER, H. 1994. Residuals in honey and wax caused by Varroa treatment. *Apidologie (Francia)* 25(5): 505-506.
- WALLNER, K. 1995. The use of varroacides and their influence on the quality of bee products. *American Bee Journal* 135(12): 817-821.
- 1999. Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie (Francia)* 30: 235-248.
- WATKINS. M. 1996. Resistance and its relevance to beekeeping. *Bee World* 77(4): 15-22.
- ZIDAN, Z.; SELIM, A.; AFIFI, F. y MOHAMED, K. 1996. Detection of insecticides residues in market basket survey of milk, cheese and honey at Kalubia governorate, Egypt. *Annals of Agricultural Science Cairo* 41(2): 1021-1040.

ANEXOS

ANEXO 1 Unidades de paisajes vegetacionales de la X Región.



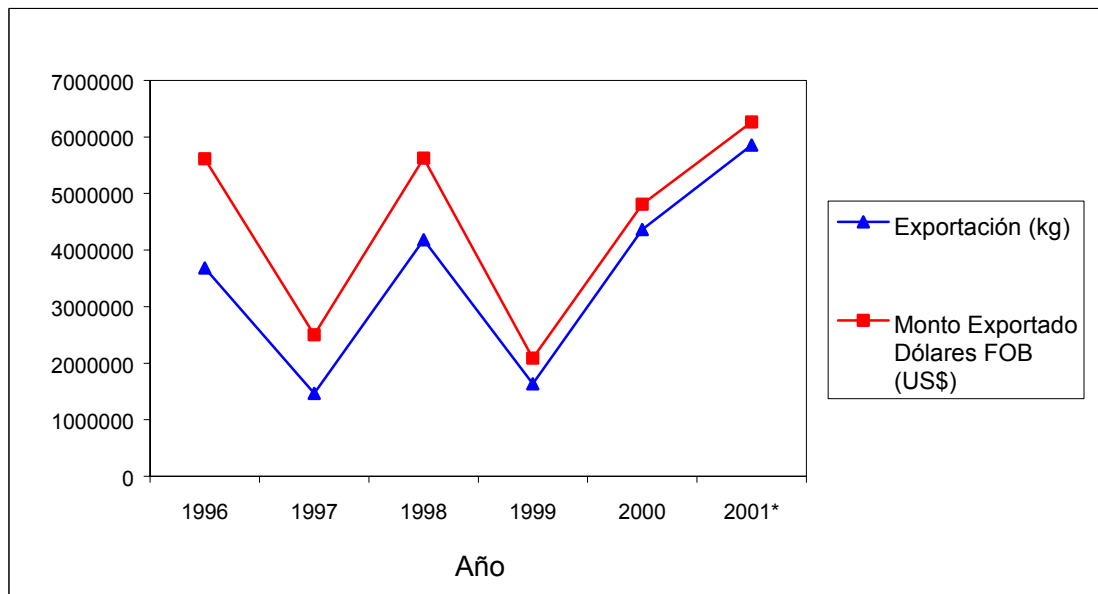
FUENTE: modificado a partir de CORFO (1987).

ANEXO 2 Especies de importancia melífera de la X Región.

CLASIFICACIÓN	NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMÚN
Especies herbáceas componentes de praderas naturalizadas	<i>Hypochaeris radicata</i> L.	Hierba del chancho
	<i>Leontodon saxatilis</i> Lam.	Chinilla
	<i>Taraxacum officinale</i> G. Weber ex Wigg	Diente de león
	<i>Prunella vulgaris</i> L.	Hierba mora
	<i>Lotus uliginosus</i> Schkuhr	Alfalfa chilota
	<i>Trifolium repens</i> L.	Trébol blanco
	<i>Plantago lanceolata</i> L.	Siete venas
Especies herbáceas componentes de praderas artificiales	<i>Trifolium pratense</i> L.	Trébol rosado
	<i>Trifolium repens</i> L.	Trébol blanco
Comunidades arbustivas y arbóreas	<i>Amomyrtus luma</i> (Mol.) Legr. et Kaus.	Luma
	<i>Aristotelia chilensis</i> (Mol.) Stuntz	Maqui
	<i>Azara</i> spp	Corcolenes
	<i>Berberis buxifolia</i> Lam.	Calafate
	<i>Berberis darwinii</i> Hook.	Michai
	<i>Buddleja globosa</i> Hope	Matico
	<i>Caldcluvia paniculata</i> (Cav.) D. Don	Tiaca
	<i>Corynabutilon vitifolium</i> (Cav.) Kearney	Huella
	<i>Desfontainea spinosa</i> Ruiz et Pav.	Taique
	<i>Drimys winteri</i> J.R. et G. Forster	Canelo
	<i>Embothrium coccineum</i> J.R. et G. Forster	Notro
	<i>Escallonia</i> spp	Siete camisas
	<i>Eucryphia cordifolia</i> Cav.	Ulmo
	<i>Eucalyptus</i> spp	Eucalipto
	<i>Fuchsia magellanica</i> Lam.	Chilco
	<i>Gevuina avellana</i> Mol.	Avellano
	<i>Lomatia hirsuta</i> (Lam.) Diels. ex Macbr.	Radal
	<i>Luma apiculata</i> (D.C.) Burret	Arrayán
	<i>Myrceugenia</i> spp	Petra, Pitra, Patagua
	<i>Pernettya mucronata</i> (L.F.) Gaud. ex Spreng	Chaura
	<i>Pinus radiata</i> D. Don	Pino insigne
	<i>Raphithamnus spinosus</i> (H.L.Juss.)Mold.	Arrayán macho
	<i>Rubus constrictus</i> Mueller et Lef.	Murra
	<i>Tepualia stipularis</i> (Hook. et Arn.) Griseb.	Tepú
	<i>Ugni molinae</i> Turcz.	Murta
	<i>Ulex europaeus</i> L.	Espinillo
<i>Weinmannia trichosperma</i> Cav.	Tineo	
Especies de cultivo	<i>Brassica napus</i> L. ssp <i>oleifera</i>	Raps
	<i>Malus pumila</i> Mill.	Manzano
	<i>Prunus avium</i> L.	Guindo
	<i>Prunus cerasus</i> L.	Cerezo
	<i>Prunus domestica</i> L.	ciruelo

FUENTE: elaborado a partir de MONTALDO (1981), CORFO (1987), DONOSO y RAMÍREZ (1994), ESPINOZA (1996), MONTENEGRO (2000) y RIEDEMANN y ALDUNATE (2001).

ANEXO 3 Evolución de las exportaciones de miel chilena en los últimos años, expresadas en kilos de miel y monto en dólares FOB.



FUENTE: elaborado a partir de PROCHILE (s.f.).

* Cifras hasta noviembre de 2001.

ANEXO 4 Características químicas del fluvalinato.

Fórmula molecular	: $C_{26}H_{22}ClF_3N_2O_3$
Peso molecular	: 502.93
Estado físico	: Aceite viscoso
Punto de fusión	: > 450 °C
Presión de vapor	: $<1 \cdot 10^{-7}$ torr a 25 °C (<0,013 mPa).
Densidad	: 1.29 g/cm ³
Solubilidad	: 2 ppb en agua. Muy soluble en solventes orgánicos e hidrocarburos aromáticos.
Coefficiente de partición	: 3,8451
Coefficiente de adsorción	: 1.000.000

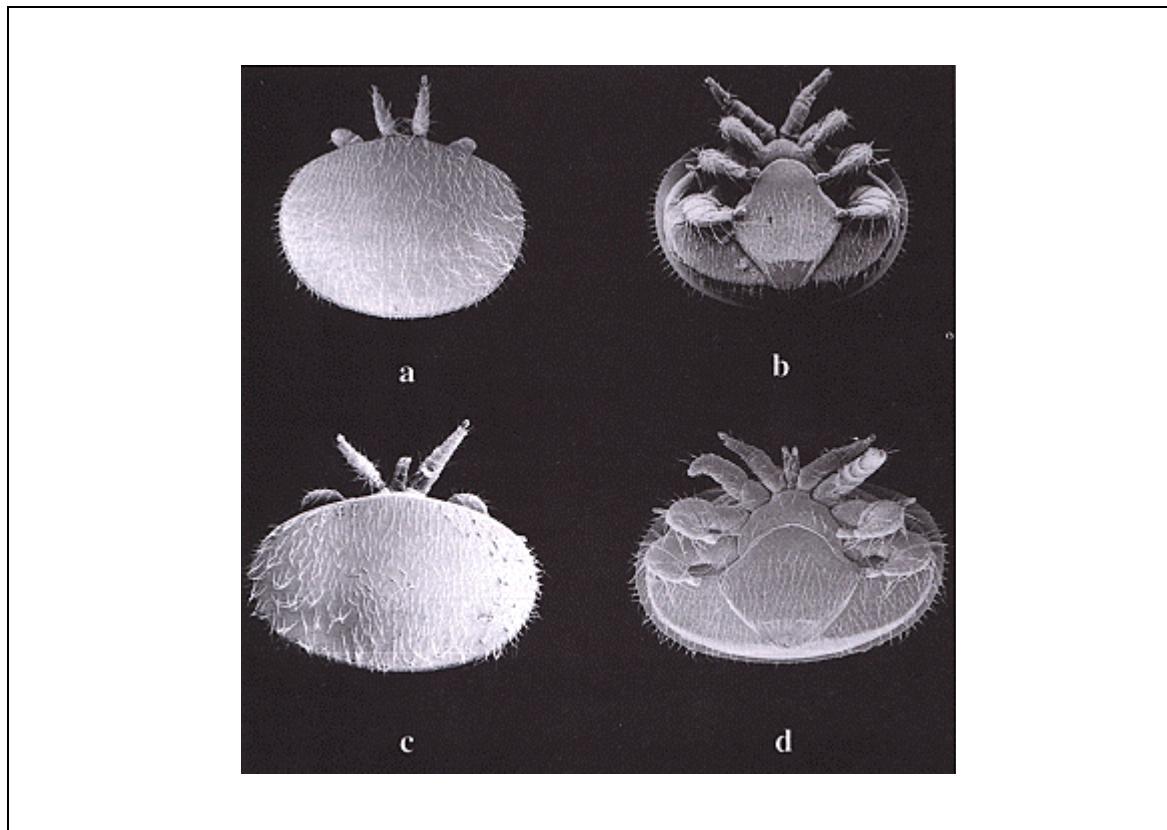
FUENTE: adaptado a partir de ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY (1990) y CORNELL UNIVERSITY *et al.* (1996).

ANEXO 5 Límite máximo de residuos para fluvalinato establecidos por España y Estados Unidos en productos agrícolas y alimentos.

Producto	LMR (ppb)	País
Huevos de gallina	0,01	Estados Unidos
Leche de vaca	0,01	Estados Unidos
Carne de vacuno, ave, caprino, oveja, caballo y cerdo.	0,01	Estados Unidos
Semilla de algodón	0,1	Estados Unidos
Aceite de semilla de algodón (crudo y refinado)	1	Estados Unidos
Semillas de algodón	0,05	España
Cítricos, frutos de pepita y de carozo, bayas y frutas pequeñas, otras	1	España
Raíces y tubérculos, bulbos, papas, especias, cucurbitáceas de piel comestible y no comestible, maíz dulce, hongos y setas	0,01	España
Tomates, pimientos y hortalizas del género Brassica	0,5	España
Alfalfa y otras leguminosas	5	España
Maíz y sorgo forrajero	3	España

FUENTE: elaborado a partir de EPA (2001) y ESPAÑA, SECRETARÍA GENERAL DE INSPECCIÓN, CERTIFICACIÓN Y ASISTENCIA TÉCNICA DE COMERCIO EXTERIOR (s.f.).

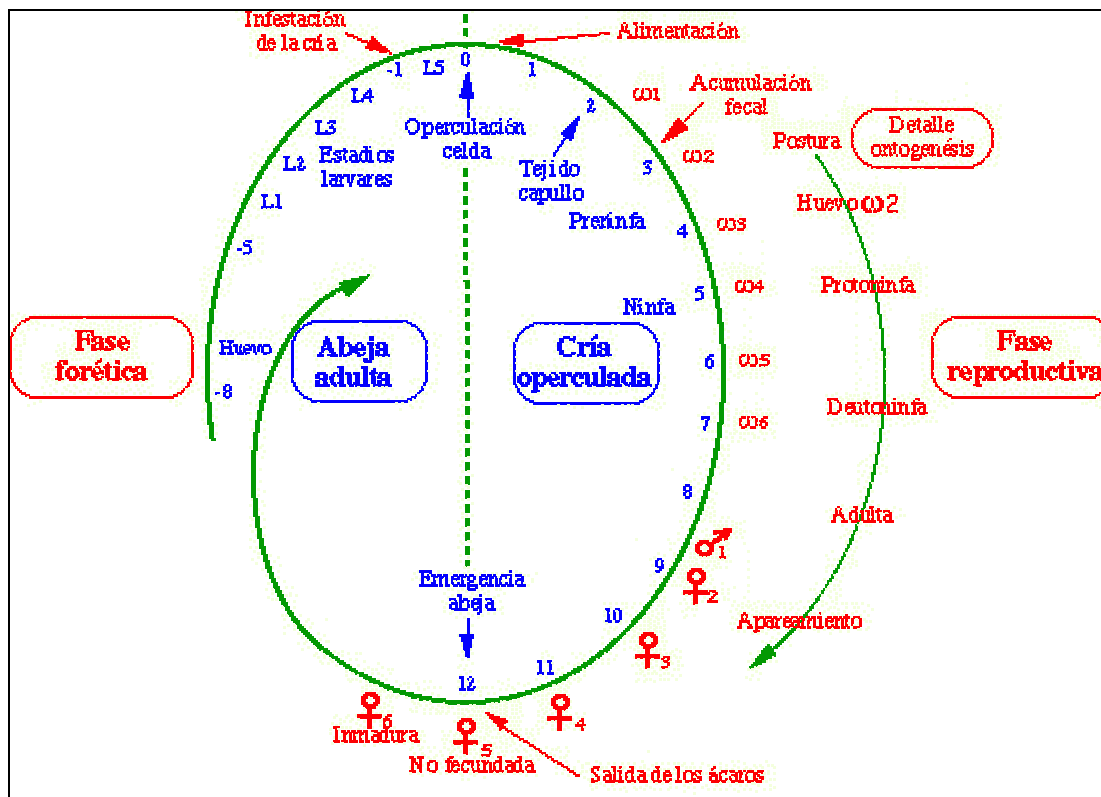
ANEXO 6 Comparación de la morfología de hembras adultas de *Varroa jacobsoni* Oud. y *Varroa destructor* Anderson & Trueman.



a) y b) corresponden a *Varroa jacobsoni* Oud., haplotipo Java, c) y d) corresponden a *Varroa destructor* Anderson & Trueman, haplotipo Corea.

FUENTE: ANDERSON y TRUEMAN (2000).

ANEXO 7 Sincronización de los ciclos de la abeja y de varroa.



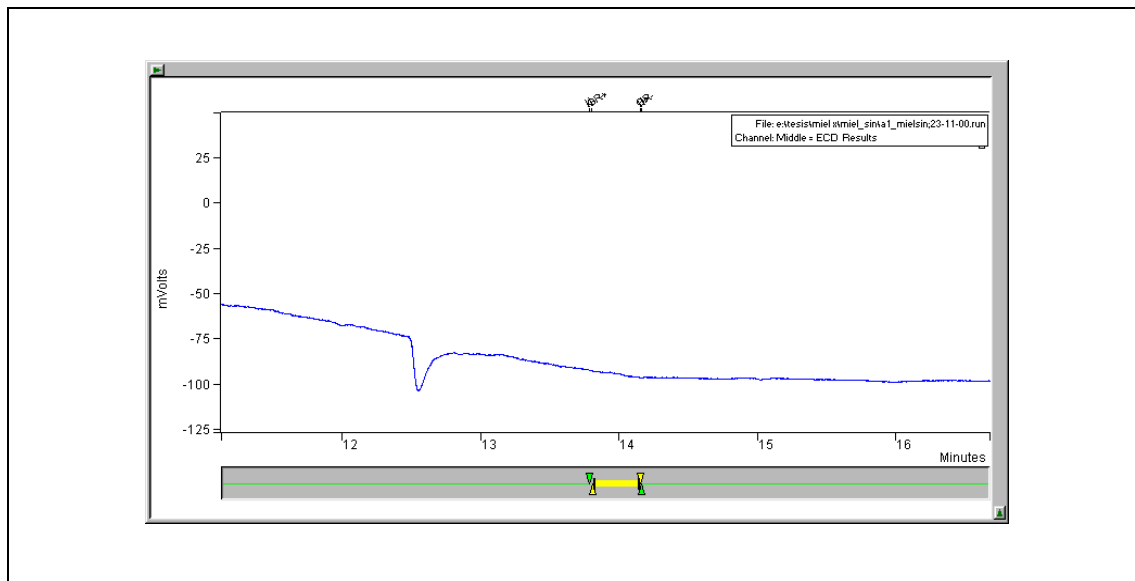
En azul: desarrollo de la abeja (los números indican el número de días separando de la operculación). En rojo: desarrollo de la familia varroa. La letra ω indica la postura de un huevo.

FUENTE: VANDAME *et al.* (2001).

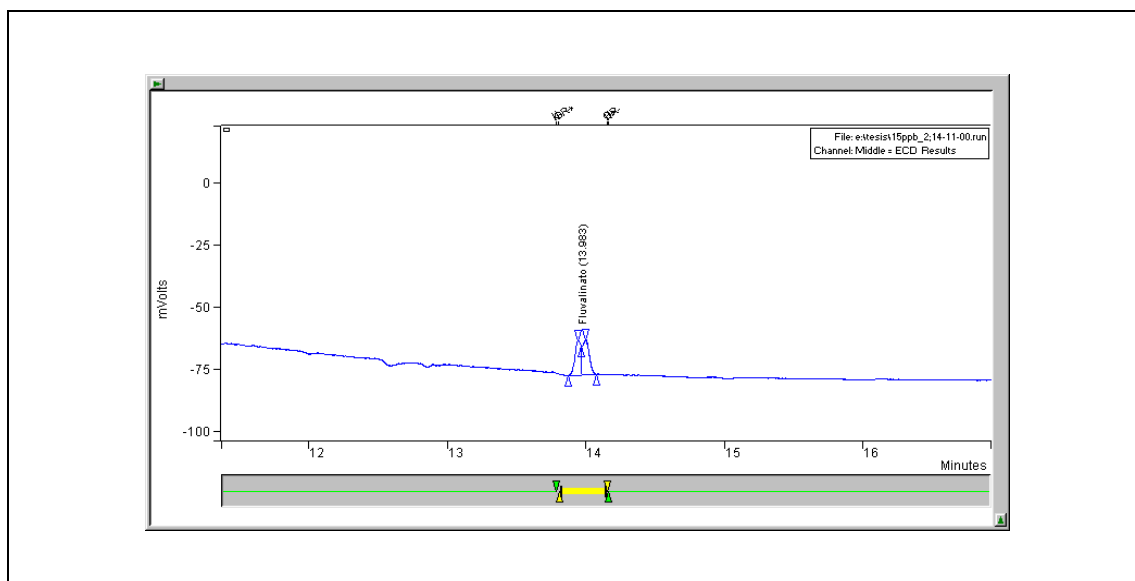
ANEXO 8 Selectividad del método analítico.

Selectividad o especificidad se refiere a la propiedad del método de producir una señal medible debida sólo a la presencia del analito, libre de interferencia de otros componentes en la matriz de la muestra (QUATTROCCHI *et al.*, 1992).

Cromatograma de una muestra de miel sin residuos de fluvalinato.



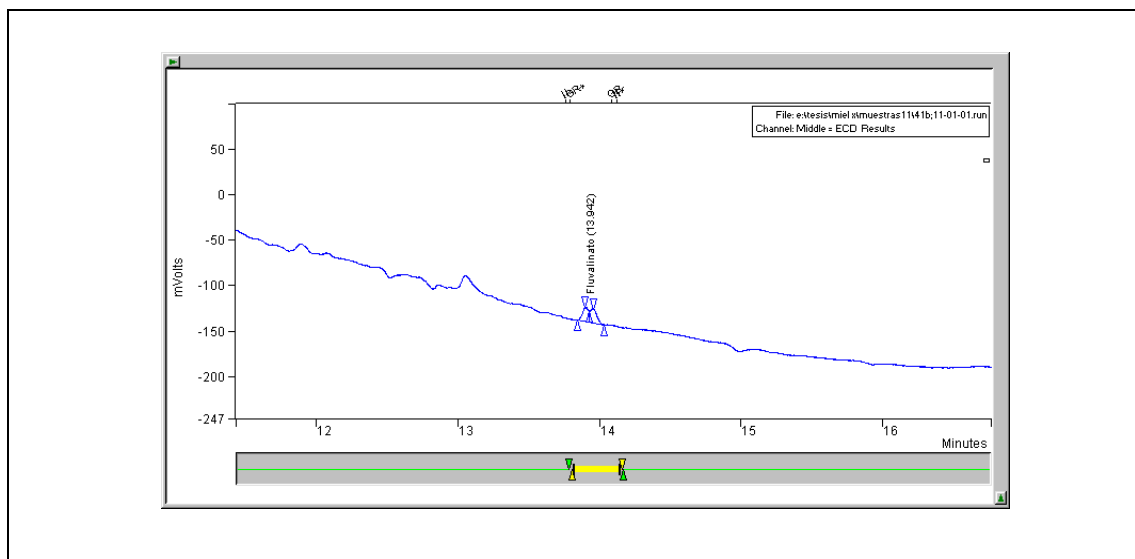
Cromatograma de una solución patrón de fluvalinato con una concentración de 15 ppb. Tiempo de retención: 13,98 minutos.



(Continúa)

Anexo 8 Continuación.

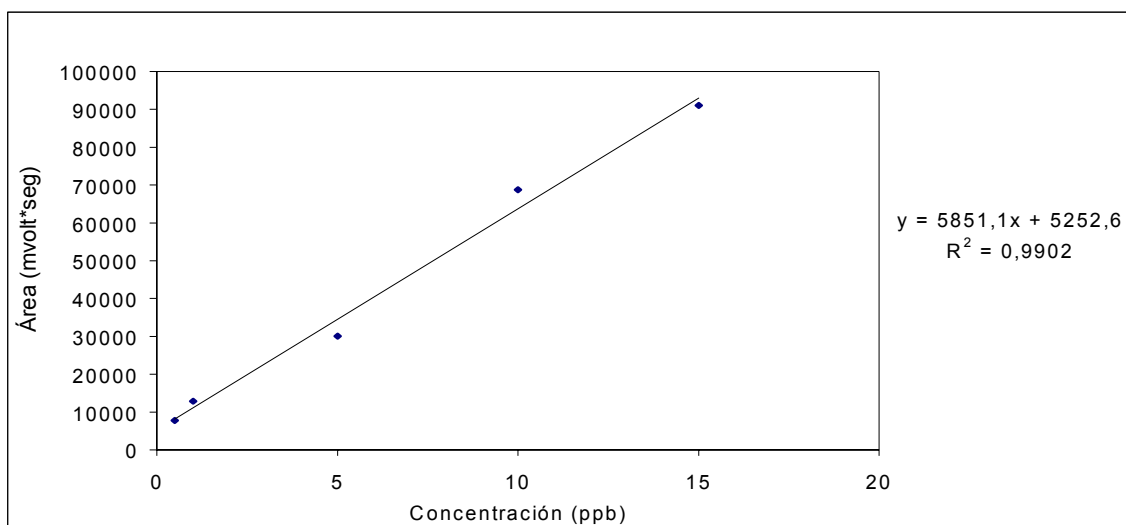
Cromatograma de una muestra de miel que presenta una concentración de fluvalinato de 19,2 ppb.



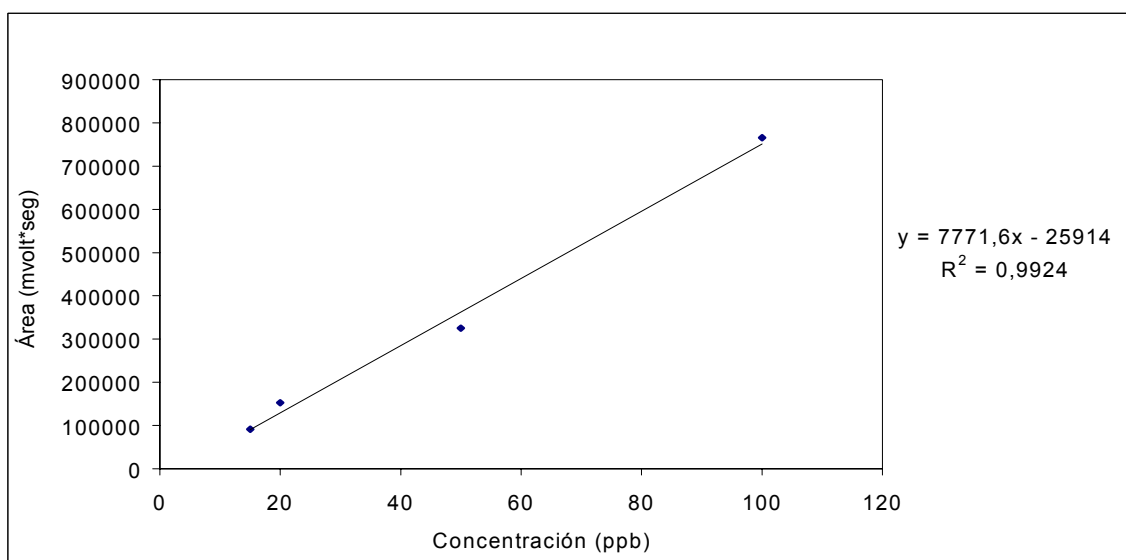
ANEXO 9 Linealidad del método analítico.

La linealidad de un método se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta (QUATTROCCHI *et al.*, 1992).

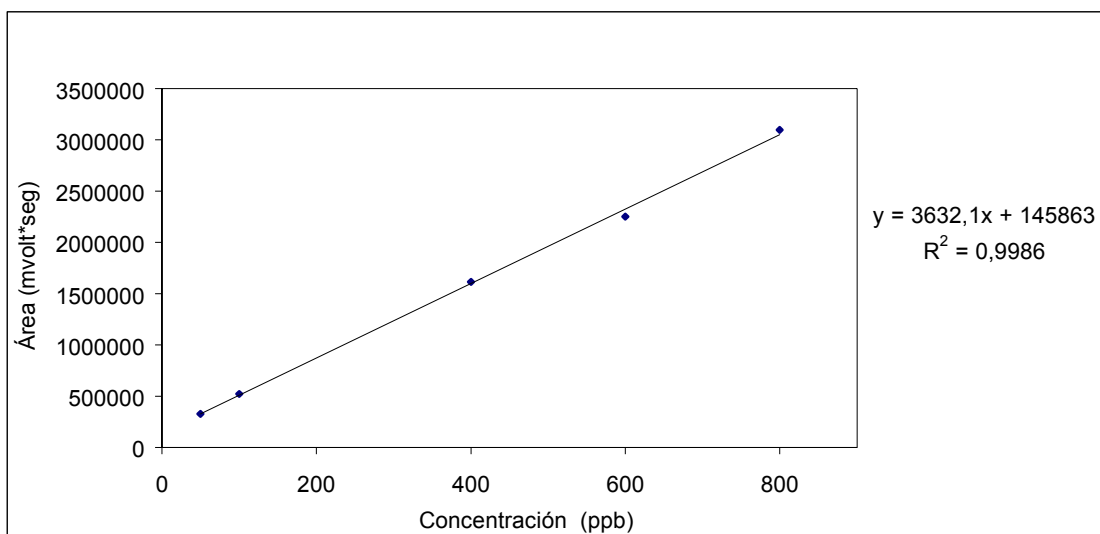
Curva de calibración 1. Entre 0,5 y 15 ppb de fluvalinato.



Curva de calibración 2. Entre 15 y 100 ppb de fluvalinato.



(Continúa)

Anexo 9 Continuación.**Curva de calibración 3. Entre 50 y 800 ppb de fluvalinato.**

ANEXO 10 Determinación de la precisión del sistema.

La precisión está relacionada con la dispersión de las medias alrededor de su valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alicuotas de una muestra homogénea. Se expresa matemáticamente como la desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (CV) (QUATTROCCHI *et al.*, 1992).

Se evaluó, por triplicado, siete concentraciones de solución patrón dentro del rango de las curvas de calibración.

Concentración (ppb)	Área promedio y desviación estándar (mvolt*seg)	Coefficiente de variación (%)
0,5	10940 ± 2738	25,03
1	14528 ± 1625	11,19
10	84409 ± 22205	26,31
20	200852 ± 68468	34,09
100	360784 ± 141238	39,15
400	2390968 ± 684774	28,64
800	2738723 ± 635656	23,21

El coeficiente de variación promedio para las siete concentraciones fue de 26,8 ± 8,8 %.

ANEXO 11 Sensibilidad del método analítico.

La sensibilidad de una técnica se define como la pendiente de una línea de calibración y, siempre que la representación sea lineal, puede ser medida en cualquier punto de ella. Un parámetro a definir al evaluar la sensibilidad es el límite de detección, que corresponde a la concentración del analito que proporciona una señal significativamente diferente de la señal de una muestra en “blanco” o “señal de fondo”. Éste se calcula con ayuda de la zona de representación cercana al origen, y utiliza tanto la pendiente como la ordenada al origen (MILLER y MILLER, 1993).

Cálculo del Límite de Detección (LD).

El cálculo del LD se realizó según MILLER y MILLER (1993), para concentraciones de fluvalinato entre 0,5 y 15 ppb.

Concentración de solución patrón (ppb)	Área (mvolt*seg)
0,5	7779
1	12871
5	30102
10	68786
15	91036

Ecuación de regresión: $y = 5851,1x + 5252,6$

Coefficiente de determinación: $R^2 = 0,9902$

Error estándar: $S_{yx} = 4157,5$

Límite de detección: $LD = (2 * S_{yx})/b$

$LD = (2 * 4157,5)/5851,1$

$LD = 1\text{ppb}$

ANEXO 12 Exactitud del método analítico.

La exactitud corresponde a la diferencia entre el valor obtenido y el valor verdadero. Ésta debe ser tan pequeña como sea posible, es decir, la recuperación del analito debe acercarse al 100% (QUATTROCCHI *et al.*, 1992).

Determinación de la exactitud para el método de extracción.

Se analizaron por duplicado tres concentraciones de solución patrón, incorporadas al principio del método a una miel libre de fluvalinato. Basado en MILLER y MILLER (1993).

Concentración agregada (ppb)	Concentración hallada (ppb)	Recuperación (%)
74	92,57	125,10
	85,24	115,19
238	255,23	107,24
	240,30	100,97
374	348,74	93,25
	342,30	91,52

Recuperación media = $105,5 \pm 13 \%$ (n= 6)

$t_{\text{tabulado1}} = -2,57 \quad \Delta \quad t_{\text{tabulado2}} = 2,57 \quad (\alpha=0,05)$

$t_{\text{calculado}} = 1,04$

Por lo tanto, no existen diferencias significativas entre la recuperación media del método y 100%.

ANEXO 13 Muestras por concentración de fluvalinato, localización geográfica de las colmenas, tamaño de la explotación apícola e importancia económica de la actividad apícola.

Código muestra	Concentración (ug/kg)	Localización de las colmenas (comuna)	Tamaño de la explotación (nº colmenas)	Importancia de la actividad
30	3,5068	Paillaco	11 a 40	Secundaria
31-1	1,0589	La Unión	11 a 40	Secundaria
31-2	< LD	La Unión	11 a 40	Secundaria
32	6,3423	Paillaco	Más de 40	Secundaria
33	4,5736	Futrono	11 a 40	Secundaria
34	6,9454	Futrono	11 a 40	Secundaria
35	2,0433	Futrono	11 a 40	Secundaria
36	7,9728	Lago Ranco	Más de 40	Principal
37	10,6588	Lago Ranco	Más de 40	Principal
38	< LD	Futrono	11 a 40	Secundaria
39	16,1589	Lago Ranco	Más de 40	Principal
40	10,0600	Lago Ranco	Más de 40	Principal
41	19,2032	Paillaco	1 a 10	Secundaria
42	15,9492	Lago Ranco	11 a 40	Secundaria
43	3,6798	Lago Ranco	11 a 40	Secundaria
44	9,4146	Lago Ranco	11 a 40	Secundaria
45	14,0157	Lago Ranco	1 a 10	Principal
46	16,3102	Lago Ranco	1 a 10	Principal
47	9,6112	Lago Ranco	1 a 10	Secundaria
48	< LD	Lago Ranco	1 a 10	Secundaria
49	< LD	Futrono	11 a 40	Principal
50	14,0776	Futrono	11 a 40	Principal
51	7,7937	Futrono	11 a 40	Principal
52	2,4032	Futrono	1 a 10	Secundaria
53	10,9569	Lago Ranco	Más de 40	Principal
54	< LD	Lago Ranco	1 a 10	Secundaria
55	< LD	Lago Ranco	1 a 10	Secundaria
56	6,0370	Lago Ranco	1 a 10	Secundaria
59	< LD	Paillaco	11 a 40	Secundaria
60	28,8726	Los Lagos	Más de 40	Principal
61	< LD	Futrono	1 a 10	Principal
62	< LD	Futrono	1 a 10	Principal
63	< LD	Futrono	11 a 40	Secundaria
64	10,7423	Futrono	1 a 10	Secundaria
74	7,4263	Panguipulli	Más de 40	Secundaria
75	< LD	Futrono	Más de 40	Principal
76	1,8809	Futrono	Más de 40	Principal
84	< LD	Lago Ranco	1 a 10	Secundaria
85	< LD	Lago Ranco	1 a 10	Secundaria

(Continúa)

Anexo 13 Continuación.

Código muestra	Concentración (ug/kg)	Localización de las colmenas (comuna)	Tamaño de la explotación (n° colmenas)	Importancia de la actividad
86	5,7593	Lago Ranco	1 a 10	Secundaria
87	< LD	Lago Ranco	11 a 40	Secundaria
88	5,6278	Futrono	1 a 10	Secundaria
89	11,1501	Futrono	1 a 10	Secundaria
93	< LD	Paillaco	11 a 40	Secundaria
94	7,2698	Paillaco	11 a 40	Secundaria
99	< LD	Futrono	1 a 10	Secundaria
100	1,0151	Futrono	1 a 10	Secundaria
104	< LD	Lago Ranco	1 a 10	Secundaria
105	< LD	Lago Ranco	1 a 10	Secundaria
106	4,2419	Lago Ranco	11 a 40	Secundaria
107	< LD	Lago Ranco	11 a 40	Secundaria
108	< LD	Futrono	1 a 10	Secundaria
109	4,7487	Futrono	1 a 10	Secundaria
112	10,8725	Futrono	1 a 10	Secundaria
113	8,3502	Futrono	1 a 10	Secundaria
114	< LD	Lago Ranco	11 a 40	Secundaria
115	7,9506	Lago Ranco	11 a 40	Secundaria
116	< LD	Lago Ranco	11 a 40	Secundaria
117	< LD	Lago Ranco	1 a 10	Secundaria
118	< LD	Lago Ranco	11 a 40	Secundaria
120	< LD	Futrono	11 a 40	Secundaria
121	< LD	Lago Ranco	11 a 40	Secundaria
136	< LD	Futrono	1 a 10	Secundaria
137	< LD	Futrono	1 a 10	Secundaria
138	< LD	Futrono	1 a 10	Secundaria
139	< LD	Futrono	1 a 10	Secundaria
160	< LD	Puerto Varas	11 a 40	Secundaria
167	< LD	Fresia	1 a 10	Secundaria
173	< LD	Fresia	1 a 10	Secundaria
175	< LD	Futrono	1 a 10	Secundaria
176	< LD	Futrono	1 a 10	Secundaria
177	< LD	Futrono	11 a 40	Secundaria
178	< LD	Lago Ranco	1 a 10	Secundaria
185	< LD	Puerto Montt	11 a 40	Secundaria
186	< LD	Puerto Montt	11 a 40	Secundaria
187	< LD	Puerto Montt	11 a 40	Secundaria
189	< LD	Lago Ranco	1 a 10	Secundaria
190	< LD	Lago Ranco	11 a 40	Secundaria
191	< LD	Lago Ranco	11 a 40	Secundaria
192	< LD	Fresia	1 a 10	Secundaria
193	< LD	Fresia	1 a 10	Secundaria
196	< LD	Lago Ranco	11 a 40	Secundaria

(Continúa)

Anexo 13 Continuación.

Código muestra	Concentración (ug/kg)	Localización de las colmenas (comuna)	Tamaño de la explotación (n° colmenas)	Importancia de la actividad
197	< LD	Lago Ranco	11 a 40	Principal
198	< LD	Lago Ranco	11 a 40	Principal
199	< LD	Lago Ranco	11 a 40	Principal
200	< LD	Lago Ranco	11 a 40	Secundaria
201	< LD	Lago Ranco	1 a 10	Secundaria
202	< LD	Lago Ranco	11 a 40	Secundaria
205	< LD	Futrono	1 a 10	Secundaria
206	< LD	Futrono	Más de 40	Principal
207	< LD	Futrono	Más de 40	Principal
208	< LD	Lago Ranco	1 a 10	Secundaria
209	< LD	Lago Ranco	11 a 40	Secundaria
210	< LD	Lago Ranco	1 a 10	Secundaria
211	< LD	Futrono	11 a 40	Secundaria
212	< LD	Futrono	11 a 40	Secundaria
213	< LD	Futrono	Más de 40	Secundaria
214	< LD	Futrono	Más de 40	Secundaria
215	< LD	Futrono	Más de 40	Secundaria
216	< LD	Futrono	Más de 40	Secundaria
217	< LD	Futrono	Más de 40	Principal
218	< LD	Futrono	Más de 40	Principal
233	< LD	Futrono	Más de 40	Principal
234	< LD	Futrono	Más de 40	Principal
235	< LD	Futrono	11 a 40	Secundaria
236	< LD	Futrono	11 a 40	Secundaria
237	< LD	Futrono	1 a 10	Secundaria
238	< LD	Futrono	11 a 40	Secundaria
239	< LD	Lago Ranco	1 a 10	Secundaria
240	< LD	Futrono	11 a 40	Secundaria
242	< LD	Lago Ranco	1 a 10	Secundaria
243	< LD	Lago Ranco	1 a 10	Secundaria
244	< LD	Lago Ranco	1 a 10	Secundaria
245	< LD	Futrono	1 a 10	Secundaria
246	< LD	Futrono	1 a 10	Secundaria
247	< LD	Lago Ranco	1 a 10	Secundaria
248	< LD	Futrono	11 a 40	Secundaria
250	< LD	Lago Ranco	11 a 40	Secundaria
251	< LD	Lago Ranco	11 a 40	Secundaria
253	4,3387	Futrono	11 a 40	Secundaria
254	< LD	Lago Ranco	11 a 40	Secundaria
255	< LD	Lago Ranco	1 a 10	Secundaria
256	< LD	Los Lagos	Más de 40	Principal
257	< LD	Los Lagos	Más de 40	Principal
258	< LD	Los Lagos	Más de 40	Principal

(Continúa)

Anexo 13 Continuación.

Código muestra	Concentración (ug/kg)	Localización de las colmenas (comuna)	Tamaño de la explotación (n° colmenas)	Importancia de la actividad
259	< LD	Los Lagos	Más de 40	Principal
272	< LD	Paillaco	11 a 40	Secundaria
273	< LD	Paillaco	11 a 40	Secundaria
274	< LD	Paillaco	11 a 40	Secundaria
276	< LD	Paillaco	11 a 40	Secundaria
277	< LD	Paillaco	11 a 40	Secundaria
279	< LD	Futroneo	11 a 40	Secundaria
280	< LD	Futroneo	Más de 40	Principal

ANEXO 14 Muestras según el LD y LMR de 10 µg/kg.

Muestras	Número de muestras	Porcentaje del total de muestras (133)	Promedio y desviación estándar de residuos
Menores al LD	96	72	-
Mayores al LD	37	28	8,6 ± 5,7 µg/kg
Menores al LMR	120	90,2	-
Mayores al LMR	13	9,8	14,5 ± 5,2 µg/kg

**ANEXO 15 Tabla de frecuencias para concentración de fluvalinato en miel
($\mu\text{g}/\text{kg}$) de todas las muestras analizadas.**

Clase	Límite inferior	Límite superior	Marca de clase	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa	Frecuencia absoluta acumulada	Frecuencia relativa acumulada
menor o igual a		1,0		96	0,722	96	0,722
1	1,0	4,5	2,7	9	0,068	105	0,789
2	4,5	7,9	6,2	11	0,083	116	0,872
3	7,9	11,5	9,7	10	0,075	126	0,947
4	11,5	14,9	13,2	2	0,015	128	0,962
5	14,9	18,4	16,7	3	0,002	131	0,985
6	18,4	21,9	20,2	1	0,008	132	0,993
7	21,9	25,4	23,7	0	0,000	132	0,993
8	25,4	28,9	27,1	1	0,008	133	1,000
mayor a	28,9			0	0,000	133	1,000

ANEXO 16 Número y porcentaje de muestras sobre y bajo el LD según mes de muestreo.

Mes de muestreo	Número de muestras bajo LD	Número de muestras sobre LD	Total de muestras	Porcentaje sobre el LD
Febrero	4	12	16	75,0
Marzo	12	19	31	61,3
Abril	15	5	20	25,0
Mayo	14	0	14	0,0
Junio	29	0	29	0,0
Julio	22	1	23	4,3

ANEXO 17 Análisis de varianza y pruebas de comparación múltiple.

Análisis de varianza para concentración de fluvalinato y localización de las colmenas, importancia de la actividad apícola y tamaño de la explotación apícola.

Fuente de variación	SC	GL	CM	F-calculado	P-valor
Factores:					
Localización	108,9990	2	54,4995	3,45	0,0457 *
Actividad	135,0310	1	135,0310	8,55	0,0068 **
Tamaño	97,0267	2	48,5133	3,07	0,0622 NS
Error	442,1850	28	15,7923		
Total	705,8520	33			

Prueba de Tukey (DHS) para actividad (99%).

Actividad	Nº observaciones	Promedio **	Grupo
Principal	10	12,69420	a
Secundaria	24	6,67669	b
Contraste	Diferencia		+/- Límite
Principal-Secundaria	*6,01754		4,11538

* Indica diferencias estadísticamente significativas.

** Medias marginales.

(Continúa)

Anexo 17 Continuación.

Prueba Tukey (DHS) para comunas (95%).

Comuna	Nº observaciones	Promedio **	Grupo
Paillaco	4	12,03570	a
Futrono	15	6,90166	a
Lago Ranco	15	10,11900	a
Contraste	Diferencia		+/- Límite
Paillaco-Futrono	*5,13402		5,53474
Paillaco-Lago Ranco	1,91663		5,53474
Futrono-Lago Ranco	*-3,21739		3,59141

* Indica diferencias estadísticamente significativas.

** Medias marginales.

Prueba LSD para comunas (95%).

Para el factor comunas se aplicó la prueba LSD, ya que Tukey no presentó la sensibilidad suficiente para mostrar las diferencias señaladas por el Andeva.

Comuna	Nº observaciones	Promedio **	Grupo
Paillaco	4	12,03570	a
Futrono	15	6,90166	b
Lago Ranco	15	10,11900	a
Contraste	Diferencia		+/- Límite
Paillaco-Futrono	*5,13402		4,58080
Paillaco-Lago Ranco	1,91663		4,58080
Futrono-Lago Ranco	*-3,21739		2,97241

* Indica diferencias estadísticamente significativas.

** Medias marginales ponderadas.

ANEXO 18 Pruebas de χ^2 .

Prueba de χ^2 para frecuencia de muestras sobre y bajo el LMR de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e importancia económica de la actividad apícola.

Tabla de frecuencia.

	Mayor a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Menor a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Total fila
Actividad principal	8 6,02%	21 15,79%	29 21,80%
Actividad secundaria	5 3,76%	99 74,44%	104 78,20%
Total columna	13 9,77%	120 90,23%	133 100,00%

Prueba de χ^2 .

χ^2	GL	P-Valor
13,34	1	0,0003
10,88	1	0,0010 (con corrección de Yates)

Por lo tanto existe dependencia entre la frecuencia de muestras sobre o bajo el LMR y la importancia económica de la actividad apícola (99% de confianza).

(Continúa)

Anexo 18 Continuación.

Prueba de χ^2 para frecuencia de muestras sobre o bajo el LMR de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y el tamaño de la explotación apícola.

Tabla de frecuencia.

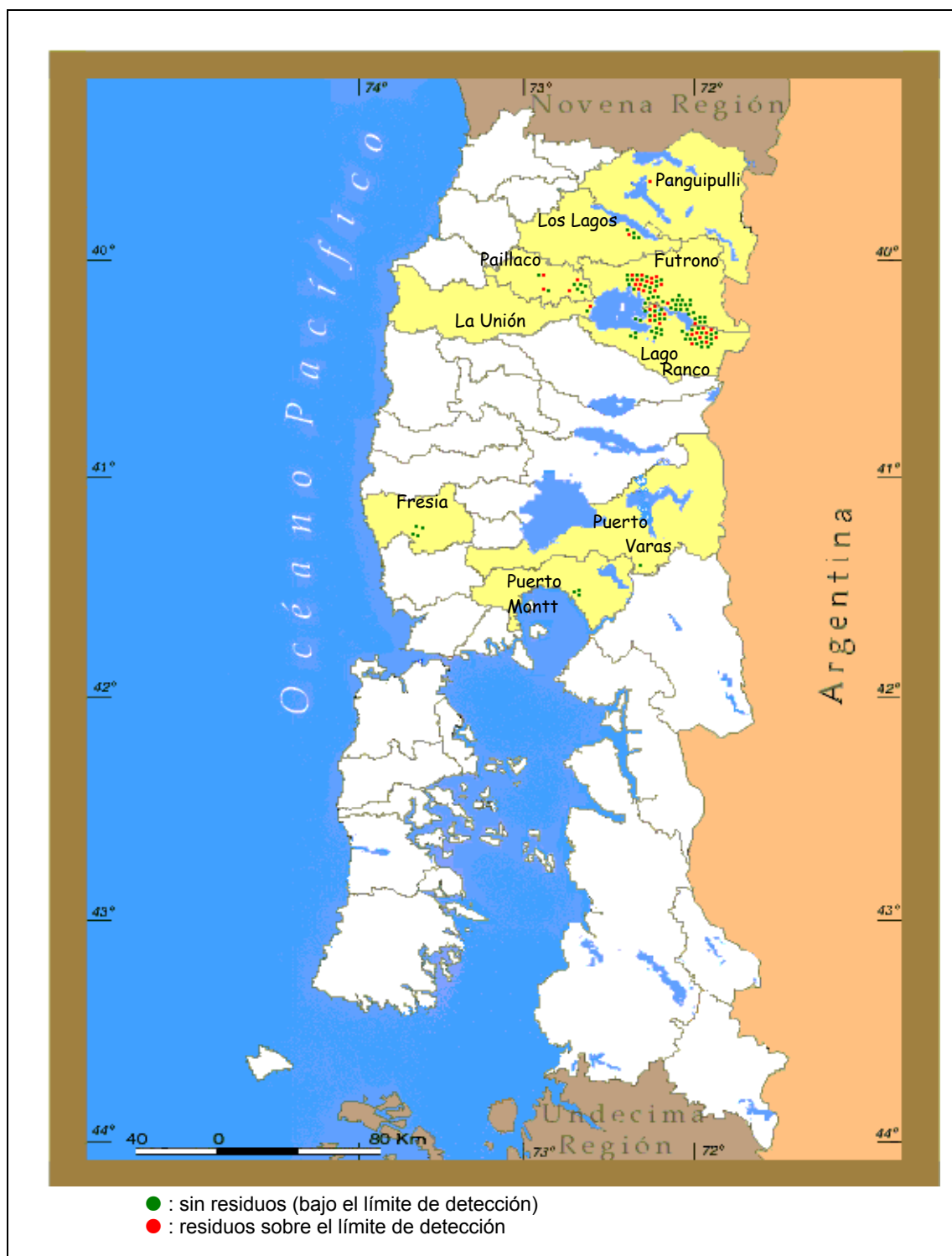
	Mayor a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Menor a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Total fila
1 a 10 colmenas	6 4,51%	45 33,83%	51 38,35%
11 a 40 colmenas	2 1,50%	55 41,35%	57 42,86%
Más de 40 colmenas	5 3,76%	20 15,04%	25 18,80%
Total columna	13 9,77%	120 90,23%	133 100,00%

Prueba de χ^2 .

χ^2	GL	P-Valor
5,73	2	0,0570

Por lo tanto no existe dependencia entre la frecuencia de muestras sobre o bajo el LMR y el tamaño de la explotación apícola (95% de confianza).

ANEXO 19 Localización aproximada de las colmenas (por comunas) y niveles de residuos detectados en las muestras de miel.



FUENTE: Elaborado a partir de BIBLIOTECA DEL CONGRESO NACIONAL DE CHILE (2000).