



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

Facultad de Ciencias Agrarias

Escuela de Ingeniería en Alimentos

Residuos de fluvalinato en cera de abejas de colmenares de la Décima Región

Tesis presentada como parte de los
requisitos para optar al grado de
Licenciado en Ingeniería en Alimentos.

Solange Annette Sillard Pérez

Valdivia Chile 2002

PROFESOR PATROCINANTE

Miguel Neira C.

Ing. Agr.

PROFESORES INFORMANTES

Manuel Pinto C.

Prof. Química., M. Sc.

Andrea Báez M.

Estadístico

Dr. © Economía Aplicada

ÍNDICE DE MATERIA

| Capítulo | | Página |
|----------|--|--------|
| 1 | INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2 | REVISION BIBLIOGRÁFICA | 4 |
| 2.1 | Situación apícola en Chile | 4 |
| 2.1.1 | Característica de la apicultura en la X Región | 5 |
| 2.2 | Características generales del <i>Varroa destructor</i> Anderson & Trueman | 6 |
| 2.3 | Control de varroasis | 7 |
| 2.3.1 | Métodos no químicos | 7 |
| 2.3.2 | Métodos químicos | 8 |
| 2.3.2.1 | Uso del fluvalinato en el control de varroasis | 9 |
| 2.3.2.2 | Características físico - químicas del fluvalinato | 10 |
| 2.3.2.3 | Toxicidad del fluvalinato | 11 |
| 2.3.3 | Métodos naturales u orgánicos | 12 |
| 2.4 | Origen y composición físico – química de la cera de abejas | 12 |
| 2.4.1 | Utilización de la cera de abejas | 15 |
| 2.5 | Afinidad del fluvalinato por la cera de abejas | 17 |
| 2.5.1 | Causas de la contaminación de la miel con residuos de fluvalinato | 18 |
| 2.6 | Niveles de residuos de fluvalinato encontrado en cera de abejas en otros países | 19 |
| 2.6.1 | Tolerancia a los residuos de fluvalinato | 21 |
| 2.7 | Persistencia y degradación de los residuos de | |

| | | |
|---------|---|----|
| | fluvalinato en miel y cera | 22 |
| 2.8 | Métodos analíticos para la determinación de residuos de fluvalinato en cera de abejas | 24 |
| 3 | MATERIAL Y MÉTODO | 28 |
| 3.1 | Ubicación del estudio | 28 |
| 3.2 | Material | 28 |
| 3.2.1 | Muestras de cera | 28 |
| 3.2.2 | Equipos de laboratorio | 28 |
| 3.2.3 | Estándar | 29 |
| 3.2.4 | Reactivos químicos | 29 |
| 3.2.5 | Información adicional | 30 |
| 3.2.6 | Financiamiento | 30 |
| 3.3 | Metodología | 30 |
| 3.3.1 | Obtención de la muestra en terreno | 30 |
| 3.3.2 | Procedimientos de laboratorio | 31 |
| 3.3.2.1 | Lavado de la muestra de cera | 31 |
| 3.3.2.2 | Conservación de las muestras | 31 |
| 3.3.2.3 | Extracción del fluvalinato | 31 |
| 3.3.3 | Condiciones operacionales del cromatógrafo | 33 |
| 3.3.4 | Expresión de resultados | 33 |
| 3.3.5 | Análisis estadístico de los datos | 34 |
| 4 | PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 36 |
| 4.1 | Pruebas de significación para la implementación del método en el laboratorio | 36 |
| 4.1.1 | Selectividad y especificidad | 36 |
| 4.1.2 | Linealidad | 36 |
| 4.1.3 | Precisión | 36 |
| 4.1.4 | Exactitud | 37 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.1.5 | Sensibilidad | 37 |
| 4.2 | Niveles de residuos de fluvalinato detectados en cera de abejas de la X Región | 37 |
| 4.2.1 | Causas y consecuencias de la presencia de residuos en las muestras de cera | 39 |
| 4.2.2 | Estudios realizados en otros países en comparación con los residuos detectados | 40 |
| 4.3 | Determinación del porcentaje de muestras que presentan un riesgo de traspaso de residuos a la miel | 42 |
| 4.4 | Efecto de las características evaluadas de los apicultores sobre la magnitud de los residuos detectados | 42 |
| 4.4.1 | Efecto de la zona geográfica sobre los niveles de residuos de fluvalinato detectados | 43 |
| 4.4.2 | Efecto de la importancia económica de la actividad apícola sobre los niveles de residuos de fluvalinato detectados | 43 |
| 4.4.3 | Efecto del tamaño de la explotación apícola sobre los niveles de residuos de fluvalinato detectados | 44 |
| 4.5 | Relación entre el tiempo de permanencia de la cera en la colmena y los residuos detectados | 45 |
| 4.6 | El color de la cera, como indicador de los niveles de residuos de fluvalinato presentes | 48 |
| 5 | CONCLUSIONES | 50 |
| 6 | RESUMEN | 52 |
| | SUMMARY | 53 |
| 7 | BIBLIOGRAFIA | 54 |
| | ANEXOS | 61 |

ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro | | Página |
|--------|---|--------|
| 1 | Propiedades físicas y químicas del fluvalinato | 11 |
| 2 | Composición química y propiedades físicas de la cera de abejas (<i>Apis mellifera</i> L) | 14 |
| 3 | Nivel de contaminación de la cera con residuos de fluvalinato por distintos autores | 20 |
| 4 | Técnicas analíticas para determinar residuos de fluvalinato en cera de abejas | 25 |
| 5 | Curvas de calibración con los patrones de fluvalinato | 34 |
| 6 | Resumen descriptivo por comuna, para residuos de fluvalinato en cera | 38 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|---|--------|
| 1 | Tratamiento con tiras de Apistán en la colmena | 10 |
| 2 | (A) Bloques de cera fundida, (B) Cera reestampada en los marcos de la colmena | 16 |
| 3 | Metabolitos, productos de la degradación del fluvalinato | 24 |
| 4 | Procedimiento analítico de extracción y purificación de fluvalinato en muestras de cera | 33 |
| 5 | Histograma de frecuencia relativa para la concentración de fluvalinato en cera de abejas | 38 |
| 6 | Concentración promedio de fluvalinato en cera de abejas y desviación estándar, agrupadas por comuna | 43 |
| 7 | Concentración promedio de fluvalinato en cera de abejas y desviación estándar, agrupadas por actividad económica | 44 |
| 8 | Concentración promedio de fluvalinato en cera de abejas y desviación estándar, agrupadas por tamaño de la explotación apícola | 45 |
| 9 | Modelo ajustado de regresión exponencial para la concentración de fluvalinato encontrada en cera de abejas | 46 |
| 10 | Niveles de color de cera utilizados para ver el efecto de éste sobre la concentración de fluvalinato, como residuo | 49 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| Anexo | | Página |
|-------|---|--------|
| 1 | Migración de varroacidas desde la cera a la miel | 62 |
| 2 | Extracción líquido – líquido de fluvalinato en cera en embudos de decantación | 62 |
| 3 | Imágenes capturadas durante el estudio | 63 |
| 4 | Condiciones operacionales del cromatógrafo | 64 |
| 5 | Comprobación de la selectividad o especificidad del método | 64 |
| 6 | Comprobación de la linealidad del método. Curvas de calibración | 66 |
| 7 | Determinación de la precisión | 67 |
| 8 | Cálculo del porcentaje de recuperación de fluvalinato en cera de abejas | 68 |
| 9 | Cálculo del límite de detección | 69 |
| 10 | Concentración de residuos de fluvalinato (ppm), observada en cera de abejas de colmenares provenientes de varias comunas de la X Región | 70 |
| 11 | Supuestos del análisis de varianza multifactorial | 72 |
| 12 | Supuestos del análisis de varianza para los datos transformados. (Logaritmo concentración +1) | 73 |
| 13 | Análisis de varianza múltiple | 74 |
| 14 | Análisis de regresión | 75 |
| 15 | Cartilla para la evaluación del color de la cera de abejas | 76 |
| 16 | Supuestos y análisis de varianza simple para color | 77 |
| 17 | Localización geográfica de las muestras de cera | 78 |

1 INTRODUCCION

Todo apicultor sabe que mantener una colonia fuerte es la mejor garantía para evitar y/o contrarrestar los efectos de las múltiples enfermedades y plagas que afectan al colmenar y así obtener una producción óptima en cantidad y calidad.

La diseminación del ácaro ectoparásito *Varroa destructor* Anderson & Trueman en las abejas del mundo entero provocó el inicio de varios programas de investigación, la mayoría de ellos enfocados en aspectos de lucha contra varroa, como la inclusión de sustancias químicas capaces de combatir esta plaga con excelentes resultados siempre y cuando su empleo sea racional. Por el contrario, cuando no se usan las dosis correctas de estos elementos pueden crear con el tiempo resistencia en el agente causal, volviéndolos totalmente ineficaces y a la vez contaminar los productos de la colmena: miel, jalea real, polen, propóleos y cera; esta última no es consumida pero existe riesgo permanente de traspaso de residuos desde la cera a la miel, lo que puede ocasionar graves perjuicios a la salud del consumidor. De lo anterior se desprende que una de las consecuencias poco deseables del uso de productos químicos como agentes de control, es la presencia, en muchos casos, de residuos de la sustancia activa o de sus metabolitos tóxicos en los productos de la colmena.

La actividad apícola actualmente en Chile se está proyectando como una valiosa opción hacia los mercados extranjeros y debido a las exigencias de la Unión Europea es de vital importancia monitorear para que los productos que están destinados a exportación no sean rechazados por el país comprador, con

las consiguientes pérdidas económicas y debilitamiento de imagen en el mercado internacional corriendo el riesgo de perder definitivamente la plaza compradora.

Por este motivo, es que la empresa COOPERATIVA APICOLA VALDIVIA, LTDA. (APICOOP), junto con otras instituciones, entre ellas, la Universidad Austral de Chile, está desarrollando el proyecto denominado **“Acciones sanitarias de prospección, control y vigilancia como bases para un programa de estrategias de manejo integrado de enfermedades de abejas para incrementar la producción de miel en la IX y X Regiones de Chile”**, con el objetivo de optimizar los métodos utilizados en el control sanitario y alimentario de las colmenas y al mismo tiempo mejorar las condiciones socioeconómicas de los apicultores.

En este contexto, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo: Debido a la aplicación de fluvalinato a las colmenas, por parte de los apicultores, la cera presenta residuos de fluvalinato a consecuencia de su alta afinidad con él.

Como objetivo general se plantea determinar cuantitativamente residuos de fluvalinato en muestras de cera provenientes de colmenas de la X Región de Los Lagos.

Objetivos específicos, se proponen los siguientes:

- Implementar un método de extracción y cuantificación de residuos de fluvalinato en cera de abejas mediante cromatografía gaseosa.
- Determinar que porcentaje de las muestras analizadas, tiene riesgo potencial de traspasar sus residuos a la miel de acuerdo a las concentraciones de fluvalinato detectadas.

- Determinar el efecto que presentan las siguientes características de los apicultores: zona geográfica de origen, importancia económica de la actividad apícola y tamaño de la explotación apícola, sobre la magnitud de los residuos detectados.

- Determinar si existe o no una relación entre el tiempo que permanece la cera en contacto con el fluvalinato y la concentración encontrada.

- Establecer si el color de la cera puede constituir un indicador de los niveles de residuos que se encuentran en ella.

2 REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Situación apícola en Chile.

Debido a la variada geografía de nuestro país, existe un enorme potencial de flora melífera, con aportes de néctar y/o polen, que se sustenta en varias especies: ulmo, tineo, arrayán entre otras plantas nativas y una gran diversidad de cultivos y malezas silvestres (NEIRA, 1999).

En general, la apicultura chilena es un rubro de pequeñas explotaciones, con 12 a 15 colmenas promedio y rendimientos de miel no superiores a 15 kg. por colmena; no obstante, existen 10 a 12 apicultores grandes que junto con guiar más de 1000 colmenas cada uno, lo hacen con manejo de alta tecnología y diversificación de la producción, entregando al mercado no solamente miel de alta calidad, sino que también polen y jalea real (NEIRA, 1999).

Según Lesser (1995) citado por RIOS (2001), Chile tiene una capacidad potencial de colocación de colmenas de entre 2,5 y 3 millones de unidades. Además indica que los colmenares se concentran en la zona Centro – Sur, donde extensas praderas de trébol y flora endémica favorecen la obtención de néctar de buena calidad.

A pesar de la enorme potencialidad para el desarrollo del cultivo de abejas melíferas, las estadísticas señalan que Chile sólo cuenta con 331.525 familias apícolas de las cuales 29.621 pertenecen a la X Región (CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICAS (INE), 1997).

2.1.1 Características de la apicultura en la X Región. RIOS (2001), señala que la diversificación dentro de la X Región es muy baja, casi la totalidad de las explotaciones produce exclusivamente miel natural de abejas y su comercialización se realiza en forma asociativa.

En cuanto al rendimiento de miel y cera, la X Región alcanza un promedio de rendimiento de 11,1 y 0,5 kg/colmena, respectivamente (CHILE (INE), 1997).

Por otro lado, un alto porcentaje de los apicultores no pertenece a ninguna agrupación; sin embargo existe una relación directa entre el número de colmenas y la tendencia a agruparse, de tal manera que, un aumento en el número de colmenas por productor indica que una mayor proporción de ellos pertenece a alguna agrupación. Gran parte de los apicultores que se encuentran asociados indican las razones por las cuales es conveniente agruparse, entre las cuales se destacan: la posibilidad de intercambiar ideas con otros apicultores; solucionar problemas de comercialización de sus productos y contar con un organismo representativo, entre otras (NEIRA, 1999).

Según RÍOS (2001), la apicultura en la X Región, así como en el resto del País, es un rubro manejado tradicionalmente por sectores campesinos, que consideran mayoritariamente a la apicultura como una actividad económica secundaria; sin embargo, según su estudio, el 92,3 % de los encuestados, involucrados en la investigación, ha recibido algún tipo de capacitación y cuenta con asistencia técnica, lo que constituye una fortaleza como grupo de apicultores.

López (1980), citado por RIOS (2001), señala que prácticas como orientación geográfica, alimentación artificial, reducción del tamaño de las piqueras en invierno, control de peso de las colmenas, control y cambio de

reinas, fusión de familias débiles, control de enjambrazón, uso de cera estampada y trashumancia, son realizadas con mayor frecuencia en los estratos con mayor número de colmenas.

Desde el punto de vista sanitario, los agentes causales de enfermedades en abejas, pueden ser agentes vivos o bióticos (ácaros, bacterias, hongos, protozoos y virus), y agentes abióticos (insecticidas, acaricidas, plaguicidas en general (CHILE, FUNDACION DE INNOVACIÓN AGRARIA (FIA) (1999)). De esta manera RIOS (2001), indica que en la X Región de Chile se reconocen problemas sanitarios provocados por *Varroa destructor* Anderson & Trueman y *Nosema apis* Zander.

2.2 Características generales de *Varroa destructor* Anderson & Trueman.

El *Varroa destructor* Anderson & Trueman, originario de Asia, es un peligroso ácaro que se alimenta de la hemolinfa de la abeja melífera (*Apis mellifera* L.) y otras especies, hasta producir en ellas la muerte. (SANCHO *et al.* 1991, ANDERSON Y TRUEMAN, 2000). Éste se alimenta y reproduce en la cría de la abeja, principalmente durante los estados de pupa y larva tardío. En las abejas adultas, se encuentra principalmente en el abdomen, donde están protegidos físicamente y penetran las membranas intersegmentales, clavando sus quelíceros para alimentarse de la hemolinfa (MORSE y NOWOGRODZKI, 1990).

En Chile, se ha comprobado la introducción desde hace algún tiempo de este ácaro, el cual por su acción destructiva crea un conjunto de circunstancias negativas para el desarrollo de una familia de abejas (NEIRA, 1999).

En los dos últimos años se ha observado un aumento explosivo de la varroasis, debido principalmente a los inconvenientes en el control

medicamentoso mediante el uso de la tablilla impregnada con fluvalinato, lo cual ha generado resistencia por parte del ácaro. Ello ha determinado la muerte masiva de abejas, situación que ha sido advertida desde 1993 (CAMPANO, 2001).

2.3 Control de la varroasis.

Los acaricidas utilizados en la apicultura pueden subdividirse en tres grandes categorías: sintéticos (amitraz, fluvalinato y coumafos), aceites esenciales (timol, eucaliptol y mentol) y los ácidos orgánicos (fórmico, láctico y oxálico) (PIRO)¹.

Otra clasificación realizada por CALATAYUD (2001) para el control de la varroasis es la siguiente:

2.3.1 Métodos no químicos. Esta modalidad clasificatoria distingue al menos tres métodos:

a) *Los métodos biológicos*, con los cuales no se ha conseguido hasta la fecha combatir exitosamente a la varroa mediante uso de parásitos y depredadores patógenos: bacterias, virus, etc.

b) *Los métodos culturales*, los cuales ofrecen técnicas para frenar la multiplicación del ácaro, siendo su eficacia muy limitada, costosas y laboriosas, con la única ventaja que forman parte de las labores habituales del apicultor.

c) *Los métodos físicos*, principalmente el efecto de la alta temperatura, en el cual se utilizan variados dispositivos que aumentan artificialmente la temperatura de la colmena. Este procedimiento resulta poco eficiente debido a la imposibilidad de distribuir de manera uniforme el calor al interior de la colmena.

¹ PIRO, R. Polen y cera: características físico-químicas y residuos. (On Line) <http://www.beekeeping.com/articles/calidad_colmena.htm> (5 Enero 2001)

2.3.2 Métodos químicos. Fernández *et al.* (1995) citado por CARAVIA (1997), expresa que a la fecha la base del control químico de varroa se ha realizado con acaricidas sintéticos, en los cuales la efectividad en la eliminación e inocuidad a la colonia de abejas son dos requisitos esenciales para su utilización.

Koeniger (1986) citado por MORSE y NOWOGRODZKI (1990) indica que una manera de reducir la contaminación en la colmena es el uso del acaricida impregnado en portadores como maderas o plástico, las que son ubicadas en la colmena y más tarde removidas.

Así mismo, MORSE y NOWOGRODZKI (1990) señalan que las recomendaciones para el control químico han venido siendo cambiadas con una frecuencia proporcional a la aparición de nuevos productos en el mercado. No obstante es sabido que a una ocurrencia sucesiva de plagas de ácaros y el uso repetido de químicos trae como resultado el desarrollo de una notoria resistencia al pesticida utilizado.

Otro problema con el uso de acaricidas es la posibilidad de contaminación de los productos de la colmena, principalmente la cera debido a su carácter altamente lipofílico (Neuhauser, 1985; Stoya, 1985; Thrasyvoulou y Pappas, 1988 citado por MORSE y NOWOGRODZKI, 1990).

Actualmente, no existe en Chile una gama de productos para el control de esta enfermedad como debiera esperarse, principalmente debido a razones de rentabilidad por parte de las transnacionales fabricantes de dichos productos. Esto conlleva a que nuestros apicultores, -con el afán de disminuir sus costos de medicación-, opten por el uso de otras alternativas, como por ejemplo, la tablilla con soluciones agrícolas (AGUAYO, 2001).

2.3.2.1 Uso del fluvalinato en el control de varroasis. Tanto el Apistan®, Mavrik® y Klartan® son formulaciones comerciales que existen en el mercado mundial, de los cuales sólo el Apistan® es el único químico aprobado para el uso apícola, mientras que los otros son utilizados en la agricultura (TSIGOURI *et al.*, 2001).

El tau-fluvalinato es uno de los ingredientes activos más interesantes debido a su uso extensivo a escala mundial y a su alto poder acaricida. (SLABEZKI, *et al.*, 1991; WALLNER, 1999; TSIGOURI *et al.*, 2001).

El fluvalinato impregnado en tiras plásticas fue oficialmente aprobado para ser utilizado en Estados Unidos y en varios países desde 1988 (Anonymous, 1988 citado por MORSE y NOWOGRODZKI, 1990; SLABEZKI, *et al.*, 1991 y TSIGOURI *et al.*, 2001), mientras que en Chile, se utilizan tablillas artesanales impregnadas con fluvalinato desde hace aproximadamente 11 años.

TSIGOURI *et al.* (2001), menciona que la cantidad de tau – fluvalinato aplicado en cada colonia varía dependiendo de la técnica de aplicación utilizada. Este autor recomienda la aplicación de dos tiras de Apistán (800 mg de Ingrediente Activo (IA) por tira) por colonia durante 4 a 8 semanas una o dos veces al año. Durante el tratamiento sólo una pequeña cantidad (5 – 10%) del total del acaricida difunde desde las tiras. Sin embargo, la aplicación de formulaciones agrícolas solubles en agua no autorizadas son utilizadas en forma de spray en concentraciones que van desde 1.2 – 7.2 mg IA por colonia dos veces al año o en tiras de madera las cuales se sumergen en la solución, el problema que presentan estos tratamientos, es que pueden terminar siendo tóxicos para la colonia de abejas por la dificultad que presenta su dosificación y el alto riesgo de desencadenar resistencia al acaricida debido a la utilización de

dosis sub-letales (Koeniger (1986) citado por MORSE y NOWOGRODZKI (1990) (Figura 1).



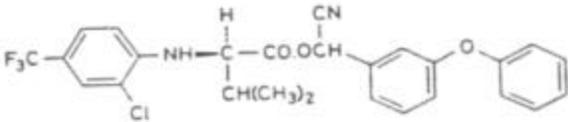
FIGURA 1 Tratamiento con tiras de Apistán en la colmena.

Por su parte, CHILE, SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO (SAG) (1994), sustenta que el uso reiterado de esta metodología, debido a su falta de control y estandarización, ha significado el aumento de las concentraciones y la probable acumulación de fluvalinato en la cera de abeja, creando situaciones de toxicidad para larvas de primeros estadios y contaminación de la miel almacenada en dichas celdillas.

2.3.2.2 Características físico - químicas del fluvalinato. Fitch *et al.* (1984) citado por SANCHO *et al.* (1991) señala que el fluvalinato, piretroide sintético, es una mezcla incolora y aceitosa de dos diestereoisómeros, fácilmente soluble en disolventes orgánicos (hidrocarburos aromáticos, éter etílico, éter de petróleo, diclorometano) y alcoholes. Chaney (1988) citado por LUSBY (2001), indica que la actividad de este compuesto es única debido a que está condicionado por la temperatura: a menor temperatura su actividad es mucho

más fuerte y viceversa. Sus principales características se presentan en el Cuadro 1.

CUADRO 1 Propiedades físicas y químicas del fluvalinato.

| | |
|---------------------|---|
| Fórmula química |  |
| Fórmula molecular | C ₂₆ H ₂₂ ClF ₃ N ₂ O ₃ |
| Nombre químico | (RS)- α -ciano-3-fenoxibenzil N-(2-cloro- α,α,α -trifluoro- <i>p</i> -tolyl)-D-valinato. (IUPAC). Ciano(3- fenoxifenil)metil N-[2-cloro-4-(trifluorometil) fenil]-D-valinato. (C.A.) |
| Familia química | Piretroides, trifluorometilos |
| Peso molecular | 502,23 |
| Estado físico | Aceite viscoso |
| Color | Amarillo |
| Densidad | 1,29 g/cm ³ |
| Presión de vapor | < 1*10 ⁻⁷ torr a 25°C |
| Solubilidad | Insoluble en 0,005 μ /ml de agua (2 ppb). Altamente soluble en solventes orgánicos e hidrocarburos aromáticos |
| Punto de ebullición | > 450° C |

FUENTE: Adaptado de Environmental Protection Agency (1986), Department of Agriculture, Soil Conservation Service (1990) y Meister (1992) citado por CORNELL UNIVERSITY e *tal.* (1996).

2.3.2.3 Toxicidad del fluvalinato. Esta sustancia presenta una toxicidad aguda moderada. Su modo de acción está basado en cambios en la permeabilidad de los canales de sodio del sistema nervioso, causando depolarización prolongada

e hiperexcitabilidad. El metabolismo de los mamíferos es muy eficiente y posee alta tolerancia hacia este compuesto (THE EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS, (EMEA), 1995).

2.3.3 Métodos naturales u orgánicos. Aunque estos métodos constituyen otra alternativa, no por ello están exentos de la problemática que ocasionan los residuos. Entre los productos naturales cuya eficacia está más constatada y avalada por ensayos, se encuentra el *timol*, fenol cristalino que forma parte del aceite esencial de tomillo. Su acción acaricida es ejercida fundamentalmente por la evaporación de éste desde un soporte. Las moléculas del timol alcanzan a los ácaros y las abejas, pero su toxicidad es mucho mayor para las varroas. Para una correcta evaporación, la temperatura ambiente debe situarse entre los 12 y los 25° C, siendo su eficacia de 95%. El *ácido fórmico*, posee el mismo sistema de acción a similares condiciones de temperatura, pero con una eficiencia de 90%. Por otra parte, la acción del *ácido oxálico* y el *ácido láctico* parece ser que reside en la acidificación del medio en el que vive el ácaro, con la diferencia de que no existe evaporación por lo que debe administrarse pulverizado, alcanzando una eficiencia de 85% y 80% respectivamente (CALATAYUD, 2001).

2.4 Origen y composición físico - química de la cera de abejas.

En la *Apis mellifera* L. sólo las obreras pueden segregar cera. Para ello poseen ocho glándulas cereras situadas en la parte interna de las esternitas o placas ventrales del abdomen. La importancia de las glándulas cereras varía según la edad de la obrera y alcanzan su máximo desarrollo hacia el duodécimo día después del nacimiento y empiezan a decrecer después del decimoctavo o decimonoveno día, hasta la muerte de la abeja. Es entonces, durante este período que la abeja está en sus mejores condiciones para realizar los trabajos de construcción (GRAJALES y SCHMIDT, 2001).

Durante las tareas de construcción, las abejas cereras, una vez saciadas de miel, permanecen suspendidas las unas de las otras por las patas, formando largas cadenas, denominadas *cadenas de cera*. La secreción se produce cuando la temperatura alcanza entre los 35° C y 36° C. La cera, fluida durante su secreción, se moldea sobre los espejos de cera. Con la ayuda de una de sus patas posteriores, la obrera arranca una a una las placas y las acerca a sus mandíbulas. Cada escama pesa aproximadamente 0,0008 g. La abeja incorpora a la cera un disolvente de origen salival que facilita su amasado. La escama, triturada de esta manera, interviene en la construcción del panal o bien sirve para opercular celdillas repletas de miel (GRAJALES y SCHMIDT, 2001).

La cera es un cuerpo químicamente muy estable y sus propiedades no se alteran con el tiempo. Resiste perfectamente a la hidrólisis o la oxidación natural y es totalmente insoluble en agua. Los ácidos o los jugos digestivos de los animales no pueden destruirla, con excepción de los secretados por larvas de algunas polillas parásitas de las colmenas o de algunos pájaros (GRAJALES y SCHMIDT, 2001).

Según BIANCHI (1990), la cera de abejas químicamente está formada por ésteres de ácidos grasos, de alto peso molecular y alcoholes también elevados, que tienen ácidos y alcoholes libres, además de hidrocarburos. Los principales componentes ácidos de las ceras son: palmítico, esteárico, cerótico, lignocérico y melísico, se encuentran esterificados con los alcoholes cetílico, cerílico, miricílico y melísico. Estos constituyentes se encuentran en partes libres, así como también los hidrocarburos heptacosano, triacosano y hentriacontano.

BIANCHI (1990), señala que la composición química de la cera de abejas (Cuadro 2) difiere según la especie y destaca que la cera de abejas pura obtenida de *Apis mellifera* tiene 284 compuestos, de los cuales 21 compuestos

son mayores constituyendo más del 1% de la cera pura no fraccionada². En conjunto constituyen el 56% de la cera. El 44% restante corresponde a diversos compuestos menores los cuales son responsables probablemente de las características de plasticidad y bajo punto de fusión de la cera de abejas.

CUADRO 2 Composición química y propiedades físicas de la cera de abejas (*Apis mellifera* L.).

| Composición química | |
|---|-----------------|
| Esteres ácidos | 1% |
| Poliésteres ácidos | 2% |
| Hidrocarburos | 14% |
| Monoésteres | 35% |
| Diésteres | 14% |
| Triésteres | 3% |
| Hidroximonoésteres | 4% |
| Hidroxipoliésteres | 8% |
| Acidos libres | 12% |
| Alcoholes libres | 1% |
| Propóleos, polen y pigmentos | 6% |
| Propiedades Físicas | |
| Punto de solidificación (fusión 61 -64°C) | 60-63°C |
| Valor ácido | 17-22 |
| Valor éster | 70-80 |
| Valor saponificación | 87-102 |
| Valor proporcional | 3.3-4.3 |
| Densidad relativa a 15°C | 0.958 - 0.970 |
| Densidad relativa a 25°C | 0.950 - 0.960 |
| Punto de quema | 242 - 250°C |
| Índice de refracción a 75°C | 1.4398 - 1.4451 |
| Constante dieléctrica | 2.4 |

FUENTE: Adaptado de CRANE (1990); MAZAR (2000)²; PRICE (2000)³; y ROEPER (2000)⁴.

² MAZAR, I. 2000 Composición química de la cera de abejas. Correo personal. <Irela.Mazar@fao.org> (14 de Marzo 2000).

³ PRICE, J. 2000. Composición química de la cera de abejas. Correo personal. <jerryprice@myself.com> (11 de Marzo 2000).

⁴ ROEPER, G. 2000. Composición química de la cera de abejas. Correo personal.<Office@Roeper.de.> (3 de Marzo 2000).

2.4.1 Utilización de la cera de abejas. Debido a sus múltiples características, tanto físicas como químicas, es más ligera que la miel, y por tanto, al combinarse con ella, permanece en la parte superior de la mezcla formando una capa que puede separarse. Debido a su escasa producción en la colmena (1 kg de cera elaborada requiere de 6 a 7 kg de miel), es muy conveniente utilizar cera estampada, ahorrando tiempo y trabajo a las abejas, permitiendo un aprovechamiento óptimo de las floraciones, reduciendo así, la cantidad de miel utilizada (CORNEJO, 1993).

Antiguamente la cera se empleaba para iluminación (velas, cirios), arte plástico (estatuario, moldes diversos), escritura (tablillas de cera), medicina (medicamentos, diversos ungentos), agricultura (injertos, conservas de frutas). En la actualidad es la propia industria apícola la principal consumidora de cera de abejas. Otros usos encuentran su aplicación como ingrediente o soporte en productos específicos para la industria cosmética, farmacéutica, en fabricación de pinturas (GRAJALES y SCHMIDT, 2001).

El mismo autor señala que los bloques o cerones se venden en bruto a las industrias especializadas, que se encargan de elaborar nuevas láminas estampadas y preparadas para colocar en los marcos a introducir en la colmena. Se trabaja con matrices de aproximadamente 800 celdas por decímetro cuadrado, de ambos lados, con un rendimiento que oscila entre las 11 a 12 hojas de cera estampada por kilogramo (Figura 2).

Existen dos tipos de cera, *la de opérculos*, de elevada calidad y precio, y *la cera vieja*, de menor precio que procede de los panales usados por reciclado.

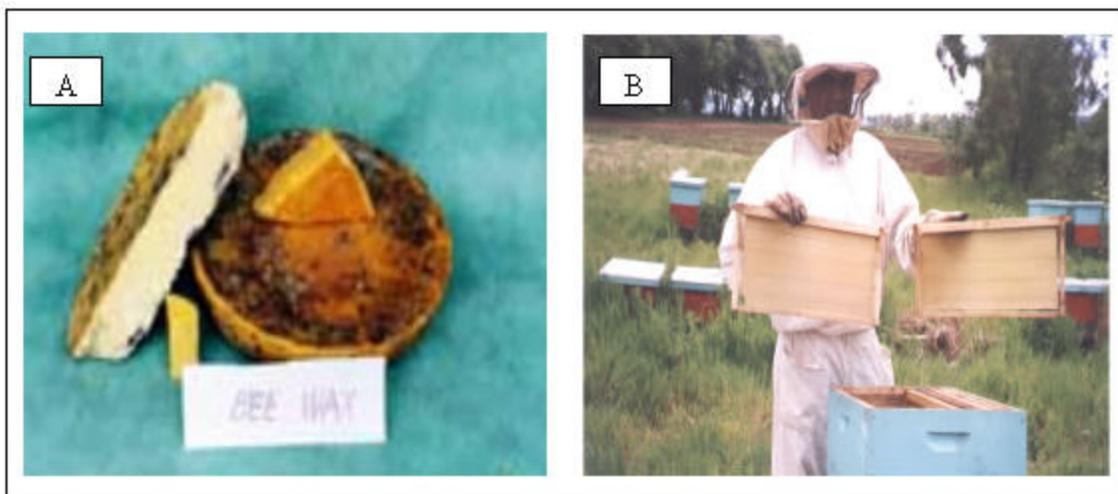


FIGURA 2 (A): Bloques de cera fundida, (B): cera reestampada en bs marcos de la colmena.

En los colmenares, según un estudio realizado por CHILE, CORPORACIÓN DE FOMENTO DE LA PRODUCCIÓN (CORFO). (1987), el uso de cera estampada, está en directa relación con el tipo de colmenas que posee el apicultor, vale decir que el productor que cuenta con colmenas modernas, hace uso de cera estampada. Además, se indica un menor uso de cera estampada (30%) en productores que poseen entre 1 a 10 colmenas y una tendencia de mayor uso de la cera estampada a medida que aumenta el número de colmenas por productor, para llegar al 89% en el caso de productores que cuentan con más de 100 colmenas.

Por otra parte, un estudio realizado por RIOS (2001) entre los apicultores encuestados de la X Región, afirma que el 31,7% de los apicultores utiliza su propia cera para reposición de sus explotaciones, mientras que el 63,5% de ellos compran o recambian su cera. El autor señala que la totalidad de los apicultores, recurre a la empresa APICOOP LTDA., la cual realiza el recambio de la cera en bruto que traen los apicultores por cera estampada que mantienen en reserva.

2.5 Afinidad del fluvalinato por la cera de abejas.

Según VESELY *et al.* (1994), los residuos del ingrediente activo se acumulan en la cera, debido a sus propiedades altamente lipofílicas.

LIU (1992), indica que a diferencia de otros residuos el fluvalinato se presenta en la cera muy fácilmente, no así en la miel. Sin embargo, una vez que el fluvalinato se encuentra en la miel, éste permanece ahí por un largo tiempo. Igualmente agrega que es una molécula muy estable y por cierto uno de los piretroides sintéticos fotoestables modernos más utilizados principalmente en el control de varroasis.

WALLNER (1999), también afirma que ocurre esta situación en el caso de las sustancias liposolubles, ingredientes estables y capaces de migrar dentro de la miel almacenada. Por otro lado, cuando son estables y no volátiles representan un gran riesgo en la apicultura por la acumulación de residuos a largo plazo en la cera.

Asimismo, PIRO⁵, indica que la contaminación debida a estos residuos está estrechamente relacionada con sus características de liposolubilidad; de hecho sólo el primer grupo activo (sintéticos) puede difundirse en la cera. Los aceites esenciales acumulados durante los tratamientos farmacológicos tienden a evaporarse en función de su elevada tensión de vapor. Por el contrario, los compuestos de síntesis persisten y los residuos se acumulan en tratamientos repetidos. Algunas comprobaciones experimentales han demostrado como aún hoy día es difícil eliminar estos compuestos sin comprometer las características físico-químicas de la cera. Señala, que la estabilidad de los residuos en la cera permite hoy verificar y trazar una "historia" de los tratamientos realizados en las

⁵ PIRO, R. Polen y cera: características físico-químicas y residuos. (On Line) <http://www.beekeeping.com/articles/calidad_colmena.htm> (5 Enero 2001)

colmenas. Como consecuencia, la conducción del apiario debe considerar estos aspectos mediante una estrategia de control integrado de la varroasis.

2.5.1 Causas de la contaminación de la miel con residuos de fluvalinato.

FERNANDEZ *et al.* (1995), indica que el uso de pesticidas dentro de la colmena implica un riesgo directo de contaminación de la miel y de sus otros productos. ATKINS (1993), señala que muchos apicultores no tienen el conocimiento necesario acerca del manejo de pesticidas y pocos han adquirido el entrenamiento apropiado para administrar los químicos con seguridad dentro de la colmena. Como consecuencia expone que, además del daño ocasionado a la abeja, existen residuos de químicos en la cera, miel y otros productos de la colmena. A su vez, Jaycox (1987) citado por ATKINS (1993), advierte sobre problemas potenciales que van desde resistencia del ácaro a los químicos hasta cambios en la actitud del consumidor acerca de la posibilidad de contaminación de la miel, polen y jalea real.

Así mismo, WALLNER (1995), apunta que mientras más frecuente se utilizan pesticidas en la colmena, es más alto el riesgo que puedan detectarse residuos en los productos de la abeja, como miel, propóleos y cera, argumentando en favor de la existencia de cuatro mecanismos básicos por los cuales se presentan residuos en la miel después del uso de acaricidas: mal uso de medicamentos, por ejemplo cuando se emplean durante el flujo de néctar, como también una dosis perjudicial con la consecuencia que más pesticida penetre en las colonias innecesariamente.

Otro mecanismo de contaminación, es el uso de pesticidas utilizados normalmente durante el período de alimentación, con la consecuencia que los alimentos de invierno son algunas veces contaminados con acaricidas. Así, en primavera las abejas al reponer su alimento sobre restos contaminados del

alimento invernal, los residuos pueden penetrar la miel de primavera (WALLNER, 1995).

Otra forma de contaminación depende del proceso de desorperculación. En este proceso varias partículas que contienen residuos, pueden penetrar la miel durante el proceso de extracción y de esta manera contaminarla (WALLNER, 1995 y WALLNER, 1999).

La última forma de contaminación que señala WALLNER (1995), es la migración de residuos de la cera a la miel. Estudios de laboratorio indican que algunos pesticidas como el bromopropilato, coumafos y en menor cantidad el fluvalinato pueden migrar a la miel; en el Anexo 1, se observa que estos pesticidas presentan enlaces débiles en la cera y sus residuos pueden ser detectados en la miel. Los pesticidas con baja tendencia a migrar como el fluvalinato y la flumetrina se acumulan muy fácilmente en la cera y pueden conducir, en menor grado, sus residuos a la miel.

WALLNER (1999), indica que la cera contaminada es una fuente significativa de residuos en la miel debido a que no ocurre una degradación natural de los acaricidas en la cera. De todo lo anterior se deduce que la calidad de la cera también tiene influencia en la calidad de la miel (WALLNER, 1995).

2.6 Niveles de residuos de fluvalinato encontrado en cera de abejas en otros países.

Estudios de residuos de fluvalinato en cera entre 1989 y 1992 en Bélgica, revelan que los residuos se incrementan exponencialmente cuando la cera es reutilizada todos los años (EMEA, 1995).

En Europa, el uso de Apistán durante los últimos diez años para contrarrestar la varroasis ha traído como consecuencia que cada kilogramo de cera esté contaminado con fluvalinato (LUSBY, 2001).

Así, debido a la continua descarga de tratamientos suplementarios (químicos, aceites esenciales, etc.) aplicados para controlar los ácaros parasitarios en las abejas enfermas, cabe pensar en cuánto tiempo será posible purificar y eliminar estos residuos. En el Cuadro 3 es posible apreciar los niveles encontrados por diferentes autores.

CUADRO 3 Nivel de contaminación de la cera con residuos de fluvalinato por distintos autores.

| Fuente | Nivel de residuos encontrados en mg/kg. (ppm) |
|-----------------------------------|--|
| BOGDANOV <i>et al.</i> ,1990 | De 0,2 a 7,3. Promedio 1,9 |
| BORNECK, 1991 | 1,9 |
| FAUCON, 1991 | 4,94 |
| SLAVEZKI <i>et al.</i> ,1991 | 0,54 ± 0,21 en exposición de 6 a 8 semanas 0,83 ± ,077 en exposición de 6 meses |
| LIU, 1992 | 0,9 a 1,2 en exposición de 4 semanas 0,24 en exposición de 13 meses |
| LODESANI <i>et al.</i> ,1992 | 0,001 a 7,37 en exposición de 4 años |
| DE GREEF <i>et al.</i> ,1994 | > muestras presentan entre 1 y 10. Muestras excepcionales: más de 50 en exposición 5 años. |
| NOWACKA <i>et al.</i> , 1994 | 0,50 a 36,5 |
| WALLNER Y PECHHACKER, 1994 | El 53% de las muestras presenta entre 0,05 y 3,5. |
| MOOSBECKHOFER <i>et al.</i> ,1995 | 1991: 56% de las muestras positivas. En 1993: 100% de las muestras positivas presenta niveles entre 0,17 y 1. |
| WALLNER, 1995 | 0,5 a 100 |
| BOGDANOV <i>et al.</i> , 1996 | Control. 0,20 a 7,3 en promedio 1,90. Cera comercial: 100% muestras entre 1,50 y 3,40. Cera apicultores: 20% muestras entre 0,40 y 1,30. |
| BOGDANOV <i>et al.</i> , 1998 | Cera original: 17. Cera hervida 1H: 26,90. Cera hervida 2H: 26,50. Cera 1H en autoclave (140°C): 27,10. Cera 2H en autoclave (140°C): 24,3 |
| FRISON <i>et al.</i> ,1999 | Entre 0,25-2,12 |
| WALLNER, 1999 | Alemania: 37,2% positivas entre 0,50 y 10 Internacionales: 55,1% positivas entre 0,50 y 15 |

2.6.1 Tolerancia a los residuos de fluvalinato. DE GREEF *et al.* (1994), señala que la ingesta diaria aceptable (ADI) es de 0,01 mg/kg por kilo de peso de la persona. Esto se traduce en que la ingesta máxima permisible (IMP) para una persona de 60 kg es de 0,6 mg/kg/día, cantidad que representa lo que una persona puede consumir sin sufrir daños.

Sin embargo, la OMS citado por CARAVIA (1997) establece un ADI de 0,005 mg/kg/día. Aún más estricto es el criterio de THE EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS (EMEA) (1995), indicando un valor ADI entre 0 y 0,0005 mg/kg.

Los límites máximos de residuos (LMR), son fijados como límites máximos aceptables de residuos tóxicos, expresados en partes por millón, que equivale a la cantidad de residuos en miligramos de producto químico por kilo de alimento, que es toxicológicamente aceptable para que no produzca problemas en la salud del consumidor (López y González, 1989 citado por CARAVIA, 1997).

Oficialmente, los residuos de varroacidas en cera de abejas aún no están regulados en el mundo, la única excepción la posee Estados Unidos que indica un límite no oficial de 6 mg/kg. (WALLNER, 1999).

Según WALLNER (1999), desde que grandes cantidades de cera de abejas son procesadas para fines farmacéuticos o por las industrias de alimentos y cosmetológicas, los residuos de pesticidas se han transformado en un problema. Agrega que varias industrias han creado su propio Límite Máximo Interno (LMI) para considerar que la contaminación de la cera de abejas es aceptable.

Para garantizar que no exista migración de residuos de la cera a la miel, WALLNER (1999) señala que los residuos en la cera deben estar bajo 1ppm.

Para la miel, producto principal de la colmena, no existe un LMR para los pesticidas fijado por la Unión Europea (UE), pero varios países como Alemania, Holanda e Italia tienen sus propios límites. En algunos casos se especifica una sustancia en particular y en otros casos existe un límite general de 10 µg/kg ó 50 µg/kg (MARTIN, 1999).

WALLNER (1999), especifica los siguientes LMR para Italia: 10 µg/kg; Holanda: 50 µg/kg; Alemania: 10ug/kg; Suiza: 50µg/kg; UE: no considera y USA: 50µg/Kg.

La reglamentación sanitaria en Chile indica que la miel debe estar libre de sustancias extrañas (CHILE, MINISTERIO DE SALUD, REGLAMENTO SANITARIO DE LOS ALIMENTOS (RSA), 1997), pero no estipula los residuos de pesticidas de ninguna clase por tanto se adopta para este objeto, los límites máximos establecidos y continuamente revisados por las Reuniones Conjuntas de FAO/OMS (SCHMIDT, 1979).

2.7 Persistencia y degradación de los residuos de fluvalinato en miel y cera.

Son pocas las publicaciones que reportan la persistencia de tau – fluvalinato en la miel, con algunos resultados contradictorios.

BALAYANNIS Y SANTAS (1992), desarrollaron experimentos en terreno, informando que a temperatura de 35° C, la concentración de fluvalinato después de 24 semanas de fortificada la miel con 200 µg/kg fue de 6,9 µg/kg en tanto que a 16° C la degradación fue más lenta, encontrándose concentraciones de 62,3 µg/kg. Sin embargo Jiménez *et al.* (1995), citado por TSIGOURI *et al.*

(2001), en estudios de laboratorio, determinaron una rápida degradación de los niveles de tau – fluvalinato a diferencia de WALLNER (1999), que en estudios a largo plazo (3 meses) no confirma el estudio previo, mencionando la estabilidad de dicho compuesto y su lenta degradación en varios metabolitos. Así mismo TSIGOURI *et al.* (2001), demostró que el fluvalinato permanece estable por más de 8 meses considerando factores como: concentración inicial de residuos, pH, temperatura de almacenamiento y tratamiento térmico simulando los sistemas utilizados en el proceso de fusión de la miel.

JIMENEZ y ATIENZA (1995), realizaron estudios de persistencia en laboratorio de mieles que habían sido contaminadas con acaricida (Mavrick®), mediante HPLC/UV. Sus resultados revelaron que el acaricida, como compuesto, está raramente presente en las muestras e incluso su concentración disminuye 10 veces en veinte días, pero se descubrieron compuestos desconocidos en los extractos que pueden caracterizarse como productos de degradación del fluvalinato, ya que sus tiempos de retención son similares a aquellos metabolitos observados en una solución normal de fluvalinato (metanol - agua).

Los autores agregan además que los principales residuos de fluvalinato son 2-cloro-4-triflurometil-anilina (I), metilo 2-[cloro-4-triflurometil-anilina]-3-metil butanona (II), N(2-cloro-4-triflurometil fenil) valina (III) y 3-fenoxibenzaldehido (IV) y que los tres primeros se encuentran en concentraciones pequeñas pero el último en cantidades muy altas (Figura 3).

En cera, su degradación es aún más lenta debido a su carácter altamente lipofílico y se ha demostrado que la cera de abejas contiene hasta seis veces y más químicos que la miel Jaycox (1987) citado por ATKINS (1993). Es más difícil aún realizar estudios a largo plazo en la cera debido a su continua reutilización y contaminación anual, la que ocasiona que los apicultores ya

comiencen con una carga de residuos cuando realizan recambios de cera estampada.

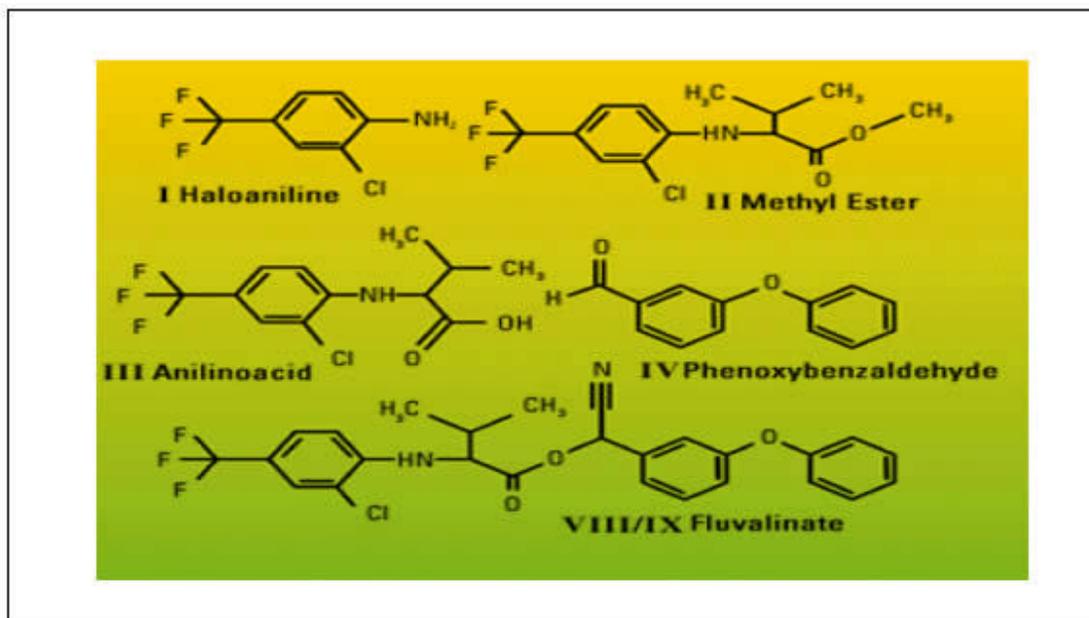


FIGURA 3 Metabolitos, productos de la degradación del fluvalinato.

FUENTE: JIMENEZ y ATIENZA (1995).

2.8 Métodos analíticos para la determinación de residuos de fluvalinato en cera de abejas.

La mayoría de los métodos utilizados para la determinación de residuos en cera son tediosos y largos y requieren una gran cantidad de solventes orgánicos (TSIGOURI *et al.*, 2000).

FRISON *et al.* (1999), señala que debido a la dificultad de separar el fluvalinato de la cera, así como su limpieza de múltiples interferencias, es que existen menos datos analíticos con respecto a la cera de abejas. Han sido poco los investigadores que han determinado residuos de fluvalinato en cera de abejas: Balayannis y Santas, 1992; Bogdanov *et al.* 1997; Kubik, Nowachi, Michalczuk, Pidek y Marcinkowski, 1995; Lodesani *et al.* 1992, entre otros,

citado por FRISON *et al.* (1999). En todos estos casos la técnica analítica utilizada para cera de abejas es la cromatografía gaseosa con detector de captura de electrones (CG-DCE) debido a que proporciona la sensibilidad necesaria para determinar los bajos niveles que generalmente se encuentran.

Los métodos analíticos que han sido desarrollados y publicados para determinar residuos de fluvalinato en cera de abejas, se presentan en el Cuadro 4.

CUADRO 4 Técnicas analíticas para determinar residuos de fluvalinato en cera de abejas.

| Fuente | Técnica Analítica | Extracción | Recuperación (%) | Límite Det. (mg/Kg.) |
|-------------------------------|-------------------|----------------------|------------------|----------------------|
| LENICEK <i>et al.</i> , 1990 | CG/DCE | Líqu-Líqu | 81 ± 10 | 0,2 |
| BORNECK, 1991 | CG | * | * | * |
| SLAVEZKI <i>et al.</i> ,1991 | CG/DCE | Líqu-Líqu | * | 0,1 |
| LODESANI <i>et al.</i> ,1992 | CG/DCE | Líqu-Líqu | * | 0,001 |
| DE GREEF, 1994 | CG/DCE | Líqu-Líqu | 95-100 | 0,1 |
| NOWACKA <i>et al.</i> , 1994 | CG | Fase Sol. | * | 0,005 |
| WALLNER y PECHHACKER, 1994 | CG | * | * | * |
| VESELY <i>et al.</i> , 1994 | CG/DCE | Líqu-Líqu | * | 0,2 |
| BOGDANOV <i>et al.</i> , 1996 | CG/DCE | Fase Sol. | * | 0,4 |
| BOGDANOV <i>et al.</i> , 1998 | CG/DCE | Ult.Son Sol-Líqu. | 80 | 0,003 |
| FRISON <i>et al.</i> , 1999 | CG/MS | Líqu-Líqu | 97-108 | 0,05 |
| TSIGOURI <i>et al.</i> , 2000 | CG/DCE | Sol-Liq | 81,4±3,2 | 0,1 |

*Datos no disponibles en el documento consultado.

CG/DCE: Cromatografía Gaseosa con Detector de Captura de Electrones.

GC/MS: Cromatografía Gaseosa con Espectrómetro de masa.

En resumen, de acuerdo a lo analizado en la bibliografía existente y disponible para este estudio podemos inferir de modo provisional que la apicultura con fines productivos en la X Región es un rubro de pequeñas explotaciones, manejado principalmente por sectores campesinos y de baja diversificación, los cuales ven amenazados sus colmenares por distintas enfermedades, principalmente la producida por el ácaro *Varroa destructor* Anderson & Trueman.

Para evitar la diseminación de éste es que se han probado en el mundo diversos procedimientos de control para la varroasis: desde métodos no químicos, sin mucho éxito por su baja eficacia, hasta métodos químicos de alta eficiencia, pero de alto costo.

En Chile, para paliar esta problemática de costo, se han venido utilizando productos agrícolas y no apícolas para el control de varroa, entre ellos Mavrik® (IA: fluvalinato), a pesar del inconveniente que presenta tanto su preparación como su dosificación y su posible traspaso de residuos a los productos de la colmena. La presencia de residuos de fluvalinato, particularmente en la cera, es el principal problema que se señala para combatir la enfermedad. Debido a sus características altamente lipofílicas no es degradado en los procesos de fusión y purificación, por el contrario, los residuos se incrementan de un año a otro y los apicultores van incorporando cera impregnada con esta sustancia.

Como hemos tenido oportunidad de constar WALLNER ha sido uno de los autores que ha abordado esta problemática con mayor profundidad, destacando que la cera contaminada es una fuente significativa de residuos en la miel debido a la elevada estabilidad que la caracteriza, lo cual no permite una degradación natural del acaricida y, por lo tanto, la calidad de la miel se ve afectada por la condiciones de la cera.

De allí que, la presencia de residuos en la cera, la correspondiente evaluación de riesgos para las abejas y el hombre sea no sólo un tema de actualidad, sino que también una preocupación relevante, como lo atestiguan diversos estudios; mayor aún si se piensa que la cera producida en los colmenares es ampliamente utilizada en cosméticos, fármacos, inclusive en los alimentos.

3 MATERIAL Y METODO

3.1 Ubicación del estudio .

Las muestras de cera fueron recolectadas durante los meses de Febrero y Julio del año 2000 entre apicultores de la X Región que pertenecen a la Cooperativa Apícola APICOOP. Los análisis de residuos se realizaron en el Laboratorio de Fitoquímica, perteneciente al Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile, Valdivia.

3.2 Material.

El material utilizado en este estudio fue el siguiente.

3.2.1 Muestras de cera. Las muestras de cera analizadas fueron 141, provenientes de apiarios de la X Región (Fresia, Futrono, Lago Ranco, Los Lagos, Paillaco, Puerto Montt, Panguipulli, Puerto Varas y Valdivia); los análisis se realizaron en duplicado. Cabe destacar que al momento de presentar los resultados se informó la concentración mayor.

3.2.2 Equipos de laboratorio. Los equipos utilizados se detallan a continuación:

- Cromatógrafo de gases marca VARIAN, Modelo CP 3800, con detector de captura de electrones (DCE), columna capilar DB-5 (metil 5% fenil silicona) de diámetro interno 0,25 mm y 30 m de largo, con una estación de control “Varian Chromatography Workstation, Star System Control, versión 5.31” (Ver Anexo 3).

- Baño ultrasonido marca COLE PALMER. Rango 47khz.
- Refractómetro digital manual marca ATAGO. Rango: 0-32°Brix. Grado de precisión: 1°Brix.
- Baño termostático marca HERAUES
- Balanza analítica marca SARTORIUS. Modelo A200S. Rango: 1 mg a 200 g. Grado de precisión: 0,1mg.
- Estufa MEMMERT, tipo U25. Rango: 1-220°C. Grado de precisión: 1°C.
- Centrífuga marca CHRIST. Tipo UJ. Modelo 3000. Rango: 1800-4200 rpm.
- Evaporador rotatorio digital marca HEIDOLPH. Modelo Laborota 4002 (Ver Anexo 3).
- Bomba de vacío marca VACUBRAND. Tipo ME 2C. Rango: 50-60hz
- Soporte para columnas de separación cromatográfica (Vacuum manifold).
- Materiales de vidrio: vasos precipitados, pipetas, matraces, baguetas, tubos de ensayo, embudos de decantación, frascos, probetas, etc.
- Otros materiales: soportes universales, nueces, papel alusafol, etc.

3.2.3 Estándar. EL estándar externo corresponde a tau-fluvalinato, marca Dr. EHRENSTORFER importado de Alemania. Posee 85% de pureza con una concentración de 100 µg/µL en ciclohexano. Con él se prepararon soluciones patrones mediante las correspondientes diluciones y se confeccionaron curvas de calibración a tres diferentes niveles: Curva 1: 0,5 – 15 µg/kg; Curva 2: 15 – 100 µg/kg y Curva 3: 100 – 800 µg/kg.

3.2.4 Reactivos químicos. Los reactivos químicos utilizados en la extracción y purificación de las muestras se detallan a continuación:

- n-Hexano ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$) Merck , grado para análisis, pureza 99%, con una temperatura de ebullición de 68 ° C.
- N-N Dimetilformamida (DMF) ($\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$) Merck, grado para análisis, pureza 99,5%, con una temperatura de ebullición de 153 ° C.

- Ciclohexano (C₆H₁₂) Merck, grado para análisis, pureza 99,5%, con una temperatura de ebullición de 80,7 ° C.
- Diclorometano (CH₂Cl₂) Merck, división americana Em Science, grado análisis de residuos, pureza 99,98%, con una temperatura de ebullición entre 39,5 – 40,5 ° C.
- Sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄), Fluka, grado para análisis, pureza 99,5%, preparado al 5% (P/V).
- Columnas de extracción en fase sólida (se utilizó en fase normal) de florisil Extra sep™ montadas sobre un equipo al vacío Vacuum Manifold.

3.2.5 Información adicional. Esta información se obtuvo mediante una encuesta aplicada por el equipo de trabajo del proyecto denominada: “*Encuesta apícola de evaluación de los colmenares del Proyecto SAG*”. La información se utilizó para la realización del análisis de varianza para el cual se requería la siguiente información: procedencia de la muestra (comuna), importancia económica de la actividad apícola y tamaño de la explotación apícola. Esta última variable fue modificada a partir de la clasificación realizada por López (1980) citada por NEIRA (1999) y trabajada de la siguiente manera: <10 , entre 10 y 40 y > 40 colmenas. Además, se utilizaron antecedentes proporcionados en la fundamentación del proyecto.

3.2.6 Financiamiento. El estudio fue financiado por el Proyecto Fondo SAG N° 71 (1999 – 2002).

3.3 Metodología.

A continuación se indica la metodología empleada en los análisis.

3.3.1 Obtención de la muestra en terreno. Las muestras de cera proceden de la colmena central, segunda alza o cámara de alimentación; en el caso de observar crías se toma del alza superior. El técnico encargado con la ayuda de

una espátula obtiene la muestra de cera desde uno de los dos marcos centrales. Específicamente, corta el tercio central del marco de cera (por ambos lados), colocando la muestra en una bolsa rotulada y depositada en un contenedor isotérmico de manera de minimizar los cambios entre la recolección y el análisis que puedan ser ocasionados durante el transporte (Ver Anexo 3).

3.3.2 Procedimientos de laboratorio. La cera recepcionada, es separada de la miel por gravedad, y luego pasa a un proceso de sucesivos lavados para extraerle todos los restos de miel.

A continuación se detallan la preparación de las muestras que tiene por objetivo entregar el compuesto de interés en solución, libre de interferencias y a un nivel de concentración apropiado para la detección y cuantificación:

3.3.2.1 Lavado de la muestra de cera. La muestra de cera antes de ser utilizada, necesitó de un lavado previo; el cual se desarrolló de la siguiente manera: se pesan aproximadamente 100 g de cera, se divide en pequeños trozos y se agregan 500 mL de agua desionizada a 45 °C, se coloca en el baño de ultrasonido por 20 minutos, luego con ayuda de un colador se cambia el agua y el procedimiento se repite alrededor de 5 veces y/o hasta que la lectura del refractómetro indique 0 ° Brix.

3.3.2.2 Conservación de las muestras. Luego que el refractómetro indica 0 ° Brix, las muestras fueron secadas en placas con papel aluminio en la estufa a 55 ° C /24-48 h; posteriormente guardadas en frascos de vidrio a -18 ° C.

3.3.2.3 Extracción del fluvalinato. El método a utilizar fue propuesto por DE GREEF *et al.* (1994) para análisis de residuos en cera de abejas, que consiste en una extracción líquido-líquido en embudos de decantación; luego la muestra es eluida en columna de florisil y posteriormente evaporada a sequedad para su

cuantificación final. El método utilizado se adecuó a las condiciones disponibles en el laboratorio de estudio, por lo tanto se debieron realizar las siguientes modificaciones:

- Reducción del tamaño de la muestra y de los reactivos a una quinta parte, utilizando finalmente 1 g de cera, 10 mL de hexano y 40 mL de Sulfato de sodio.
- La extracción del fluvalinato se realizó con todo el sobrenadante resultante después de la centrifugación.
- El lavado del embudo se realizó con 5 mL de DMF.
- El método adaptado utilizó columnas de florisil Extra Sep TM de 3 mL, además para el eluyente se utilizó mezclas de diclorometano - n-hexano en proporciones de (1:1) y (7:3), respectivamente.

La línea de flujo del procedimiento analítico utilizado se ilustra en la Figura 4, consistente en pesar 1 g de cera, la que se disolvió en 10 mL de n-hexano con ayuda de un baño termoregulado a 55 – 60° C. Luego la mezcla se centrifuga a 3100 rpm/20 min, con el fin de separar materias extrañas presentes en la cera (polen, restos de pupa, etc.). El sobrenadante se recibe en embudos de decantación de 50 mL y se procede a su extracción 4 veces con 5 mL DMF. La capa inferior se recibe en un embudo de 125 o 250 mL y se le agrega 40 mL de sulfato de sodio y 4 mL de n-hexano, se procede a agitar vigorosamente la mezcla. La capa superior del embudo se recibe en matraz aforado de 10 mL. El extracto logrado debe ser purificado antes de su ingreso al cromatógrafo, debido a la gran cantidad de interferencias que presenta en los cromatogramas. Se toma 1 mL del extracto y se pasa por la columna de florisil previamente acondicionada para tal efecto, se eluye con una mezcla de 4 mL de diclorometano : n-Hexano (1:1) y 6 mL (7:3), logrando de esta manera que la elución sea del solvente menos polar al más polar. El extracto es purificado sobre un equipo manifold sin vacío, a una velocidad de 0,5 mL por minuto,

finalmente el extracto es evaporado a sequedad y resuspendido en 2 mL de n-hexano, de los que se inyectan 1 μ L en el cromatógrafo.

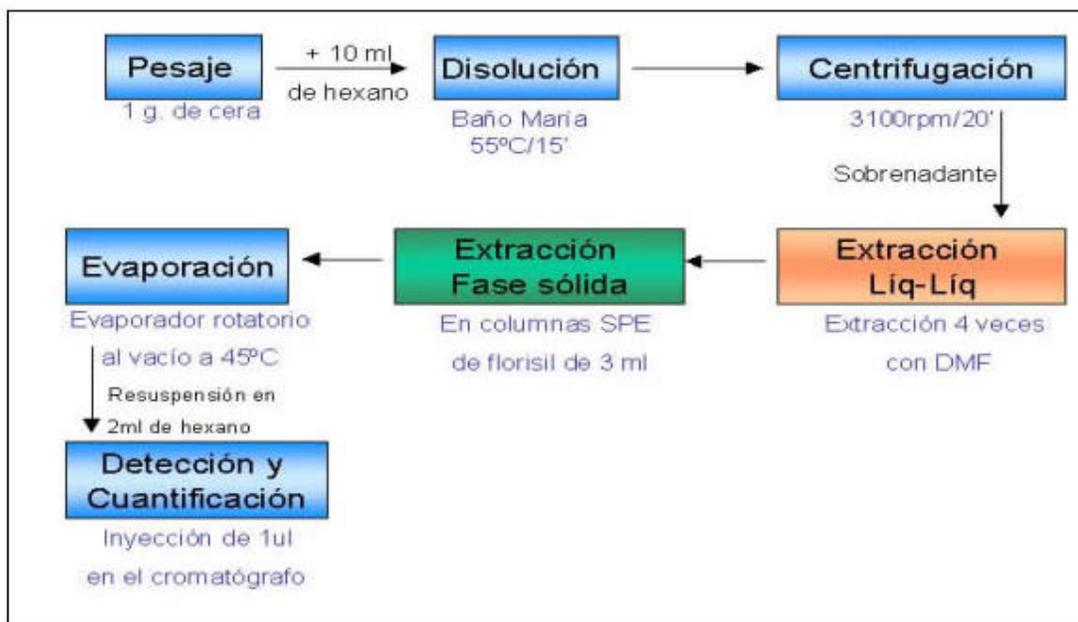


FIGURA 4 Procedimiento analítico de extracción y purificación de fluvalinato en muestras de cera.

3.3.3 Condiciones operacionales del cromatógrafo. El método diseñado en el cromatógrafo incorpora las siguientes condiciones de operación:

- Nitrógeno como gas de arrastre y make up (flujo impulsor).
- Flujo de gas de arrastre: 2,5 mL/min.
- Flujo de make up: 25 mL/min.
- Temperatura del detector: 300 ° C.
- Temperatura del horno de columna (veáse Anexo 4) .
- Temperatura inyector: 250 ° C (veáse Anexo 4).

3.3.4 Expresión de resultados. El contenido de fluvalinato en las muestras de cera se expresó en mg/kg (ppm). La cuantificación se realizó a partir de tres

curvas de calibración (Cuadro 5), que permiten relacionar una determinada concentración de fluvalinato (x) con una determinada área bajo la curva (mv/s ó uv/s) (y). Cabe destacar que se realizaron 3 curvas, debido a que se consiguió un mayor coeficiente de determinación (R^2) por tramos que realizando una sola curva donde el coeficiente disminuye a niveles en que la linealidad de la curva no es confiable (Anexo 6).

CUADRO 5 Curvas de calibración con los patrones de fluvalinato

| Curva 1 | | Curva 2 | | Curva 3 | |
|--|---------------------|--|---------------------|--|---------------------|
| Patrón ($\mu\text{g/kg}$) | Area (mvolt*seg) | Patrón ($\mu\text{g/kg}$) | Area (mvolt*seg) | Patrón ($\mu\text{g/kg}$) | Area (mvolt*seg) |
| 0,5 | 7.779 | 15 | 91.036 | 50 | 325.361 |
| 1 | 12.871 | 20 | 152.437 | 100 | 522.499 |
| 5 | 30.102 | 50 | 325.361 | 400 | 1.615.055 |
| 10 | 68.786 | 100 | 765.263 | 600 | 2.253.399 |
| 15 | 91.036 | - | - | 800 | 3.095.668 |
| R^2 : 0,9902 | | R^2 : 0,9924 | | R^2 : 0,9986 | |
| Ec: $y = 5.252 + 5.851 \cdot x$ | | Ec: $y = -25.914 + 7.771 \cdot x$ | | Ec: $y = 145.863 + 3.632 \cdot x$ | |

Finalmente, el valor de la concentración se multiplica por factor de 20000 (debido a diluciones y expresión de la concentración por kg de cera), dividiéndose finalmente por el peso de la muestra.

3.3.5 Análisis estadístico de los datos. La unidad experimental (muestra de cera) fue determinada en forma aleatoria en los ensayos, aunque previamente se tenía conocimiento del apicultor, la colmena y el marco a muestrear.

Para el análisis de resultados se consideraron las siguientes herramientas estadísticas: estadística descriptiva (media aritmética, desviación estándar, valor mínimo, valor máximo, tablas de frecuencia) y estadística

inferencial (análisis de regresión y análisis de varianza). Se utilizó el software estadístico Statgraphics 2.0 plus.

Para evaluar el efecto que producen algunas características de los apicultores sobre los residuos detectados (concentración) se utilizaron para el diseño de experimentos los siguientes factores: zona geográfica de origen (6 comunas de procedencia), importancia económica de la actividad apícola (principal o secundaria) y el tamaño de la explotación apícola (≤ 10 , entre 11 y 40 y > 40 colmenas).

Así mismo, para evaluar la acumulación de residuos en el tiempo se definieron las siguientes variables: tiempo de permanencia de la cera en la colmena, evaluada como los meses transcurridos desde la aplicación en la colmena de la tablilla artesanal con fluvalinato en el año anterior (abril 1999) hasta la toma de muestra que tuvo lugar durante los primeros siete meses del año 2000.

Para establecer si el color de la cera puede ser utilizado como indicador de los niveles de residuos que posee, se utilizó una carta color para papas fritas adecuada para estos efectos, Anexo 15. Se realizó un diseño de experimentos incompleto al azar con 3 niveles de color de cera compuestos por: (Figura 10).

- Nivel 1: Café Oscuro (L 20 al L 25)
- Nivel 2: Café Claro (L 30 al L 40).
- Nivel 3: Color Crema (L 45 al L 60).

4 PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

4.1 Pruebas de significación para la implementación del método en el laboratorio.

Con el fin de implementar adecuadamente el método de extracción y cuantificación de residuos de fluvalinato en cera de abejas en el Laboratorio de Fitoquímica, se procedió a calcular algunas de las pruebas de significación que se utilizan para la validación de métodos analíticos:

4.1.1 Selectividad o especificidad. Este parámetro se refiere a la propiedad del método de producir una señal medible debida sólo a la presencia de analito, libre de interferencia de otros componentes, en la matriz de la muestra (QUATTROCCHI *et al.*, 1992). La selectividad del método puede apreciarse en el Anexo 5.

4.1.2 Linealidad. La linealidad de un método se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta (QUATTROCCHI *et al.*, 1992). La linealidad del método se demuestra en el Anexo 6.

4.1.3 Precisión. Este término, relaciona la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central, y corresponde al grado de concordancia entre los ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea. Se expresa matemáticamente como la desviación estándar relativa (DER) o coeficiente de variación (CV) (QUATTROCCHI *et al.*, 1992). Para esta técnica la Precisión corresponde a un $26,8 \pm 8,8 \%$ (Anexo 7).

4.1.4 Exactitud. Expresado como recuperación, esta técnica permitió establecer un porcentaje de recuperación de 96,14%, calculado con el método descrito por QUATTROCCHI *et al.* (1992). Se consideran buenas recuperaciones aquellas superiores al 80%. La exactitud del método, también conocida como error sistemático o tendencia, fue evaluada con un 95% de confianza (Anexo 8).

4.1.5 Sensibilidad. Para este ensayo se obtuvo sólo el límite de detección. Según MILLER y MILLER (1993) se define el límite de detección como aquella cantidad de concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco más tres veces la desviación estándar del blanco. Para el estudio se utilizó la señal del blanco más dos veces la desviación estándar del blanco para evitar en lo posible informar sobre la ausencia de analito cuando se encuentra presente. El límite de detección calculado es de 0,001 mg/kg (Anexo 9).

4.2 Niveles de residuos de fluvalinato detectados en cera de abejas de la X Región.

De las 141 muestras analizadas, sólo 18 se informaron como menores al límite de detección, mientras que las demás alcanzaron niveles que van desde 0,008 a 5,164 mg/kg, con una media de $0,510 \pm 0,716$ mg/kg. Los resultados se presentan en el Anexo 10, indicándose el número de muestra, concentración observada, comuna de procedencia y fecha de muestreo.

En la Figura 5 se observa la distribución de frecuencia por intervalos de concentración, en la que claramente se percibe que, aproximadamente el 91,5% de las muestras presentaron una contaminación relativamente baja en un intervalo que va desde 0 (menor al límite de detección) a 1 mg/kg, mientras que el 8,5% presentaron niveles de contaminación superiores.

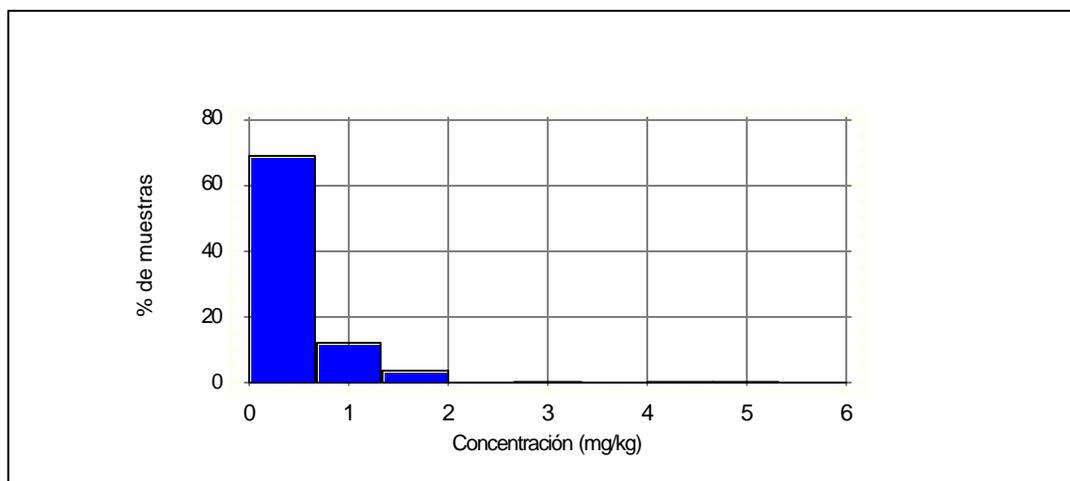


FIGURA 5 Histograma de frecuencia relativa para la concentración de fluvalinato en cera de abejas.

En la mayoría de las comunas se obtuvieron promedios en un rango de 0,426 a 0,467 mg/kg, con excepciones como, la comuna de Los Lagos con 0,164 mg/kg y Panguipulli presentando una sola muestra, con una concentración de 0,745 mg/kg. El Cuadro 6 muestra el resumen estadístico clasificado por comuna.

CUADRO 6 Resumen descriptivo por comuna, para residuos de fluvalinato en cera.

| Comuna | Nº muestras | Promedio (mg/kg) | Desviación Estándar (mg/kg) | Valor Mínimo (mg/kg) | Valor Máximo (mg/kg) |
|-------------|-------------|------------------|-----------------------------|----------------------|----------------------|
| Fresia | 3 | 0,426 | 0,389 | 0,151 | 0,871 |
| Futrono | 58 | 0,458 | 0,583 | <LD | 3,060 |
| L. Ranco | 51 | 0,467 | 0,942 | <LD | 5,164 |
| Los Lagos | 8 | 0,164 | 0,129 | 0,008 | 0,392 |
| Paillaco | 10 | 0,456 | 0,322 | <LD | 1,105 |
| Pto. Montt | 3 | 0,446 | 0,320 | 0,123 | 0,762 |
| Panguipulli | 1 | 0,745 | 0 | 0,745 | 0,745 |
| Pto. Varas | 1 | 0,363 | 0 | 0,363 | 0,363 |
| Valdivia | 6 | 0,451 | 0,319 | 0,135 | 0,827 |

4.2.1 Causas y consecuencias de la presencia de residuos en las muestras de cera.

Se puede destacar las siguientes causas y consecuencias que podrían tener relación con los niveles de residuos detectados:

- *Dosificación:* en Chile se utilizan tablillas de madera impregnadas con una solución diluída de Mavrik (CHILE (SAG), 1994), lo que es una práctica habitual, para todos los apicultores muestreados. Este tipo de preparación artesanal, que usa productos formulados con fines agrícolas, se caracterizan por una deficiente e irregular dosificación, que puede ser sobre o subdosificada. (CATALAYUD, 2001); este último caso crea condiciones para la generación de tolerancia o resistencia al plaguicida. (LODESANI *et al.* 1992).
- *Modo de empleo de los productos:* es común que los tiempos de exposición sean mayores a lo recomendado ya que muchos apicultores tienden a no retirar las tablillas de fluvalinato al finalizar los tratamientos principalmente en otoño, lo que crea también resistencia por parte de los ácaros⁶.
- *Frecuencia de los tratamientos:* la aplicación de los productos sin haber realizado una evaluación de la presencia de la enfermedad puede llevar a aplicaciones innecesarias aumentando la exposición de la colmena al plaguicida.
- *Fecha de muestreo:* los muestreos cercanos a la fecha de aplicación del tratamiento de otoño es un punto importante para explicar los valores superiores mostrados en este estudio. Lo que se tratará con detalle más adelante.

⁶ BECERRA,L. (2001). Ing. Agr. Empresa APICOOP LTDA. Comunicación personal.

- *Costo y confiabilidad del acaricida:* dado el costo de las tablillas y la dificultad para su preparación, varios apicultores las adquieren en puntos de distribución de poca confiabilidad. Además está la dificultad de encontrar otro producto acaricida eficaz, fácil de administrar y económicamente rentable a los apicultores.

- *Solubilidad del acaricida:* la liposolubilidad del fluvalinato en la cera es otra de las principales causas de la presencia de residuos. Debido a la alta solubilidad y por sus características físico – químicas éste no es degradado en los procesos de fusión y purificación implicados en la manufactura de la cera estampada, de este modo los residuos se incrementan de un año a otro y los apicultores al renovar panales están incorporando a sus colmenas cera impregnada con esta sustancia.

- *Estabilidad:* la alta estabilidad y duración que presenta el fluvalinato en la cera provoca que esta perdure en ella, ocasionando efectos letales sobre los estados de desarrollo de la abeja, los cuales pueden producir la muerte de estados larvarios (NEIRA, 2001).

Finalmente y sumado a lo anterior, RIOS (2001) describe que en la X Región existe un bajo nivel de uso de registros y de otros métodos para llevar el control de las colmenas, lo que explicaría en cierta forma su ineficiente manejo, que se traduce en la aparición de residuos en los productos apícolas.

4.2.2 Estudios realizados en otros países en comparación con los residuos detectados. Estudios como los realizados por DE GREEF *et al.* (1994), WALLNER (1999) y TSIGOURI *et al.* (2000), resumen que en varios países los tratamientos se han efectuado prácticamente en base a Apistán (desde 1988) y han demostrado que el número de muestras positivas con residuos de fluvalinato aumentan de un año a otro.

Del mismo modo, en trabajos realizados en Grecia en el año 1989, la cera no reporta la presencia de residuos mientras que en el año 2000 se determinó que la totalidad de las muestras (66) eran positivas para fluvalinato en rangos entre 0,44 y 30,1 mg/kg (TSIGOURI *et al.*, 2000).

También BOGDANOV *et al.* (1998), en muestras provenientes de Suiza, las que fueron sometidas a distintos tratamientos térmicos, presentaron rangos entre 17 mg/kg y 27,1 mg/kg.

WALLNER (1999), señala que en el año 1995 sólo el 13,2% de las muestras fueron positivas y se incrementó al año siguiente a un 23,6%. Además en el año 1999 determinó que el 37,2% de las ceras en Alemania estaban contaminadas, cuantificando niveles entre 0,5 y 10 mg/kg y en ceras internacionales el 55,1 % de las muestras fueron positivas en niveles entre 0,5 y 15 mg/kg.

Menores niveles de contaminación presentaron FRISON *et al.* (1999), quienes en un estudio a largo plazo realizado en Canadá con tiras de Apistán, muestrearon cada centímetro del marco de cera obteniendo valores que van desde 0,25 mg/kg hasta 2,12 mg/kg, encontrándose que toda la colmena estaba impregnada con fluvalinato.

Al comparar estos valores de contaminación en estudios realizados por otros países, podemos decir que los niveles detectados en esta investigación se encuentran a niveles similares e incluso menores a los autores mencionados. Si bien, la aplicación de fluvalinato en forma artesanal por los apicultores muestreados comenzó en 1999, el número de tratamientos no es comparable con países que llevan usando el producto por más de 10 años.

4.3 Determinación del porcentaje de muestras que presentan riesgo de traspaso de residuos a la miel.

Al realizar un análisis descriptivo de los datos podemos determinar que el 8,5% de las muestras de cera presentó riesgo de traspaso de residuos desde la cera a la miel. WALLNER (1999), lo destaca como riesgo potencial, dado que con 1mg/kg del ingrediente activo en la cera se espera una contaminación en la miel de 0,4 µg/kg (Anexo 1).

Cabe destacar que, el 8,5% de muestras con valores superiores a este nivel corresponden a aquellas en la que su fecha de muestreo coincide con la aplicación de tablillas, para esta investigación, el tratamiento otoñal. Esto coincide con lo obtenido por LODESANI *et al*, 1992, en muestras de Italia, tomadas en marzo (0,415 mg/kg), mayo (0,842 mg/kg), julio (0,767 mg/kg) y agosto (0,001 mg/kg), indicando que la presencia en mayo de altos niveles de residuo puede ser interpretada como una consecuencia del tratamiento, que en el caso de Italia correspondería al tratamiento de primavera.

4.4 Efecto de las características evaluadas de los apicultores sobre la magnitud de los residuos detectados.

Al someter los resultados a una comparación de medias y analizar los factores: zona geográfica de origen (Comuna), importancia económica de la actividad apícola y tamaño de la explotación apícola, se obtuvo como resultado que no existen diferencias significativas para ninguno de los factores evaluados, por lo tanto, el promedio de residuos de fluvalinato en cera de abejas no se vería afectado por las características evaluadas de los apicultores. Para este análisis se consideraron sólo aquellas muestras en las que se poseía toda la información requerida (130 muestras). Los análisis se detallan en los Anexos 11, 12 y 13.

4.4.1 Efecto de la zona geográfica sobre los niveles de residuos de fluvalinato detectados. La mayoría de las muestras evaluadas en este diseño provienen de Futrono y Lago Ranco (83%), siendo beneficiarios directo de este proyecto los apicultores que entregaron cerca del 95% de las muestras analizadas. Sobre la base anterior es posible discutir que el que no se presenten diferencias entre las comunas es debido principalmente a la homogeneidad en el manejo de los apiarios, entregada ésta, por técnicos de la empresa APICOOP Ltda (Figura 6).

Los promedios obtenidos en este diseño se detallaron en el Cuadro 6. La localización geográfica de las colmenas se presenta en el Anexo 17.

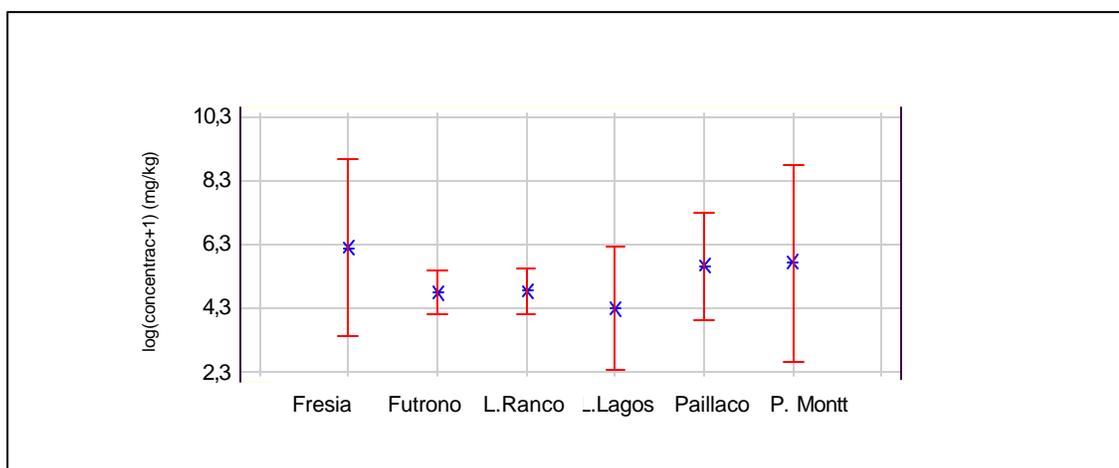


FIGURA 6 Concentración promedio de fluvalinato en cera de abejas y desviación estándar, agrupadas por comuna.

4.4.2 Efecto de la importancia económica de la actividad apícola sobre los niveles de residuos de fluvalinato detectados. Las ceras de los apicultores que pertenecen al grupo de actividad económica principal representan el 24% del total de muestras y presentan un promedio de $0,373 \pm 0,622$ mg/kg, mientras que el de actividad secundaria (76%) presenta un promedio que no es significativamente mayor de $0,456 \pm 0,739$ mg/kg. Esto se explicaría

nuevamente por las similares características de manejo que poseen los apicultores muestreados en la X Región (Figura 7).

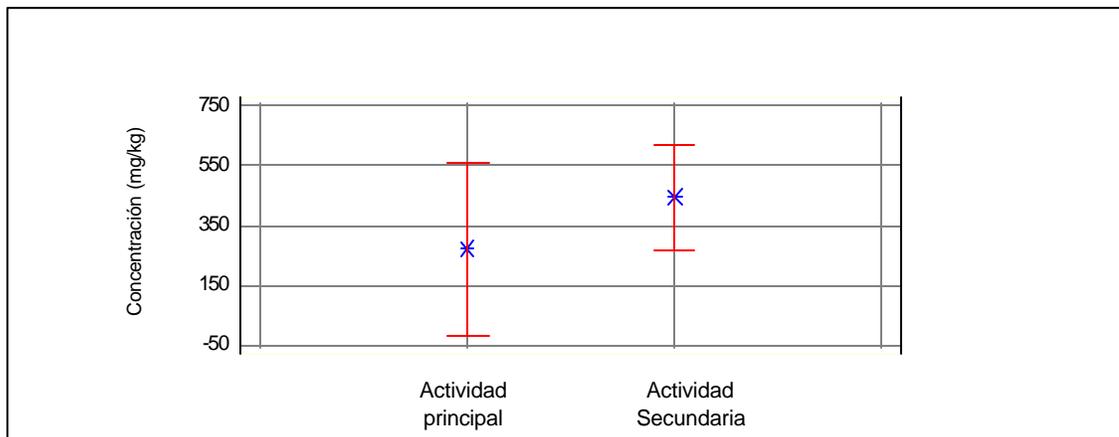


FIGURA 7 Concentración promedio de fluvalinato en cera de abejas y desviación estándar, agrupadas por actividad económica.

Es importante destacar que, contrariamente a lo observado en este estudio, en el centro de nuestro País, los apicultores cuyos principales utilidades provienen de la actividad apícola, refuerzan los tratamientos, usando mayores dosis o prolongando los tiempos de exposición, tratando de prevenir menores producciones y pérdidas de familias ⁷.

4.4.3 Efecto del tamaño de la explotación apícola sobre los niveles de residuos de fluvalinato detectados. El promedio de residuos que presentan las ceras para los tres distintos estratos no presentaron diferencias significativas, siendo éstos: $0,533 \pm 0,973$ mg/kg; $0,332 \pm 0,367$ mg/kg y $0,474 \pm 0,681$ mg/kg, para los estratos 1, 2 y 3, respectivamente (Figura 8).

La mayoría de la muestras para el estrato 3, con más de 40 colmenas, corresponde a los apicultores que pertenecen al grupo de actividad principal,

⁷ HENRIQUEZ, J. (2001). Gerente empresa APICOOP Ltda. Comunicación personal.

mientras que el grupo de actividad secundaria no presenta explotaciones con más de 40 colmenas.

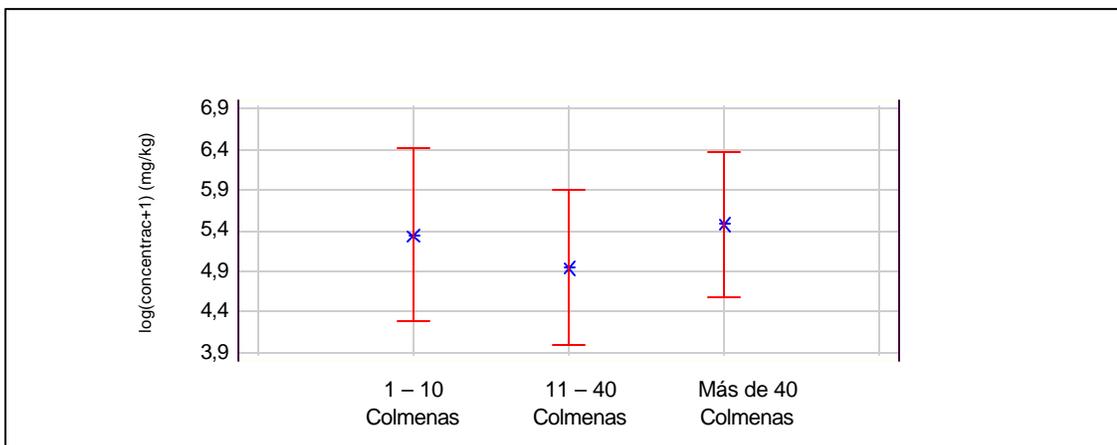


FIGURA 8 Concentración promedio de fluvalinato en cera de abejas y desviación estándar, agrupadas por tamaño de la explotación apícola.

Es importante destacar que según RIOS (2001), la apicultura en la X Región es tomada como un rubro secundario, de bajo nivel tecnológico, además, los apicultores encuestados son pequeños productores de tipo familiar campesino, para los cuales la apicultura representa una actividad complementaria y de bajos ingresos.

4.5 Relación entre el tiempo de permanencia de la cera en la colmena y los residuos detectados.

Según el análisis realizado, la contaminación con residuos de fluvalinato en cera no se vió mayormente influenciada por el tiempo. En la Figura 9 se observa el modelo de regresión ajustado a los datos con un coeficiente de determinación muy bajo (R^2) de 3,86% lo que indica que no existe influencia del tiempo sobre la concentración encontrada de fluvalinato en la cera de abejas (Anexo 14)

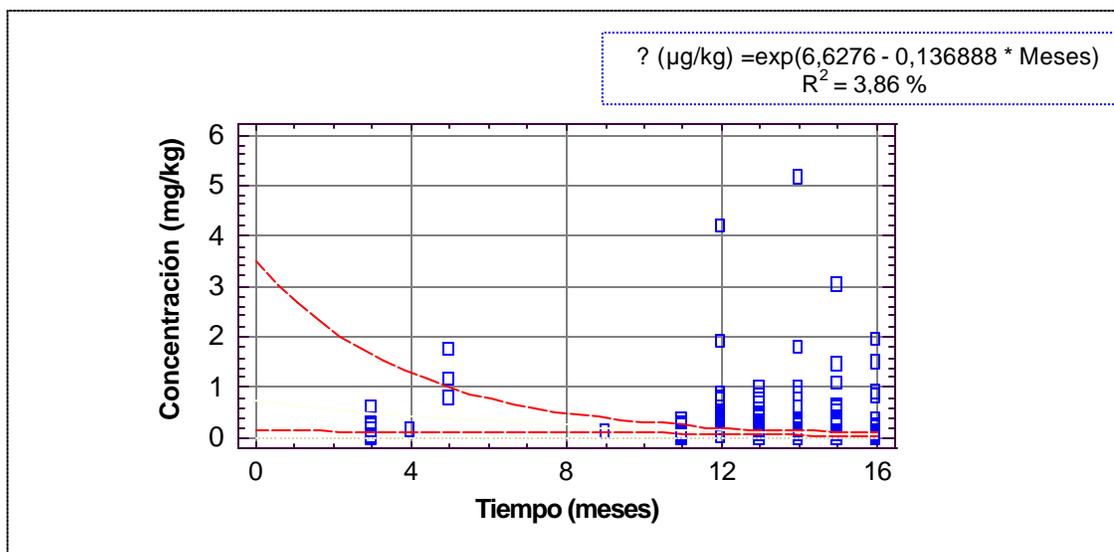


FIGURA 9 Modelo ajustado de regresión exponencial para la concentración de fluvalinato encontrada en cera de abejas.

Cabría suponer en este punto que se debería haber encontrado algún tipo de relación entre las variables. Autores como BOGDANOV *et al.* (1996 y 1998), señalan que los niveles de residuos de fluvalinato se incrementan a medida que aumenta el número y tiempo de tratamientos.

Este resultado, no es reproducible porque varios apicultores que se iniciaron en enero del año 2000, con cera recién estampada, comenzaron con una carga de residuos que no es favorable en sus colmenas, en concentraciones de 0,026 hasta 0,619 mg/kg; este último valor es bastante alto si se estima que corresponde a más de la mitad de lo que se considera peligroso para que exista traspasos de residuos a la miel (Anexo 10). Considerando este punto, difícil de controlar en el estudio, y los muestreos cercanos a la fecha del tratamiento de otoño, es que no fue posible hacer una estimación real del problema que conlleva la acumulación de residuos en la cera de abejas.

En estudios realizados por BOGDANOV *et al.* (1996), comparan dos tratamientos, uno dejando las tiras de Apistán durante 4 semanas y otro por un período de 13 meses. En el primer caso los residuos variaron entre 0,200 y 7,300 mg/kg mientras que en el segundo los niveles se incrementaron hasta alcanzar residuos constantes entre 40 y 60 mg/kg al final del experimento.

Otro estudio a largo plazo realizado por los mismos autores en el año 1998 en ceras comerciales, mostraron que los residuos de fluvalinato ascendieron rápidamente durante los siguientes dos años de uso para alcanzar una constante entre 2,6 a 2,9 mg/kg entre 1994 y 1996 (BOGDANOV, 1998).

LUSBY (2001) indica, que el reciclado de cera contaminada es el principal responsable en el aumento de los niveles de residuo y que una de las formas de estabilizar la situación sería el cese del uso de acaricidas. Los estudios pronostican que será posible un retorno a la cera no contaminada dentro de 50 años aproximadamente, siempre y cuando se dejen de utilizar ahora los productos químicos. Otra forma que señala, es algún proceso de limpieza físico o químico que podría resolver este problema. Sin embargo, pruebas de laboratorio indican que la cera sometida a 100° C y a presión alta destruyen los residuos pero también la cera. Así mismo, la exposición a luz UV, demostró que sólo los residuos de la superficie fueron destruidos por esta radiación.

Así, la experiencia demuestra que el fluvalinato es eficaz contra los ácaros, pero su limpieza es ineficaz en la cera y que no es posible controlar todas las fases que involucra mantener un apiario en buenas debido a que no se puede controlar la distribución del pesticida dentro de la colmena y de esta manera los residuos se van agregando no sólo en la cera sino también en la miel, propóleos, marcos, paredes, tapa, etc.

La descontaminación total de la cera de los residuos de fluvalinato no puede tener lugar sin la cesación del uso de tratamientos químicos o aceites esenciales; pero como de alguna forma se han de controlar las múltiples enfermedades que afectan a la colmena, el procedimiento más adecuado sería a través de un monitoreo de las ceras para reducir el nivel de residuos contaminantes, a través de la adición de cera no contaminada, hasta alcanzar un nivel de residuos que no sea perceptible en la miel.

Finalmente, la persistencia de los residuos en la cera de abejas favorece la aparición de resistencia en los ácaros de varroa, lo que conlleva a aumentar las concentraciones en su aplicación y por ende una mayor contaminación de los productos de la colmena.

4.6 El color de la cera, como indicador de los niveles de residuos de fluvalinato presentes.

La presunción que se tenía para esta investigación era que las ceras que presentaban colores más oscuros poseían una mayor concentración de fluvalinato debido a su prolongada utilización y que las ceras más claras deberían tener las mínimas concentraciones. Los niveles de color utilizados para este estudio se presentan en la Figura 10.

El resultado del diseño se presenta en el Anexo 16, donde puede observarse que no se presentan diferencias significativas entre los tres niveles de color, por lo tanto, no existe ningún efecto del color de la cera sobre la concentración de fluvalinato encontrada.

De lo anterior se desprende que una cera oscura (café oscuro o negra) puede tener la misma concentración e incluso menos que una cera de color claro, por lo que el color no podría ser un índice de medición para futuras evaluaciones.



FIGURA 10 Niveles de color de cera utilizados para ver el efecto de éste sobre la concentración de fluvalinato, como residuo.

Uno de los inconvenientes principales para poder analizar las variables en este trabajo es el amplio período de muestreo, que incluye muestreos durante la aplicación del tratamiento, por lo que, muestreos de cera nueva posteriores al tratamiento otoñal presentan niveles considerables de residuos de fluvalinato.

5 CONCLUSIONES

De acuerdo a los análisis realizados se puede concluir lo siguiente:

Se implementó un método de extracción líquido – líquido y de cuantificación de residuos de fluvalinato en cera de abejas mediante cromatografía gaseosa, con detector de captura de electrones (ECD), con una recuperación de 96,14% y límite de detección de 0,001mg/kg.

Se determinó la presencia de residuos de fluvalinato en el 87,2% de las ceras de abejas analizadas. En la X Región, en general, los niveles detectados fueron inferiores a los informados para otros países.

Sólo el 8,5% de las muestras de ceras analizadas presenta riesgo de traspaso de residuos a la miel, por la magnitud de los residuos. Debido a la alta afinidad y estabilidad del fluvalinato en la cera de abejas podría verse incrementado en el futuro, si continuara el uso de tablillas artesanales como método de control de varroa, lo cual pondría en riesgo la salud del consumidor y dañaría la inocuidad y condición natural de este producto.

Debido posiblemente a la similitud de manejo técnico de los colmenares analizados, no se observó ningún efecto atribuible a la zona geográfica de origen de las muestras de cera, a la importancia económica de la actividad apícola y al tamaño de las explotaciones, sobre la magnitud de los residuos detectados.

El tiempo de permanencia de las ceras en las colmenas y los residuos detectados, no mostró una correlación entre estas variables, de tal manera que, ceras usadas poco tiempo en la colmena podrían tener altos niveles de residuos, mientras que, ceras empleadas por períodos prolongados, pueden poseer bajos niveles de fluvalinato.

Finalmente, el color de la cera no se relaciona con los residuos de fluvalinato presentes, por lo que, este parámetro no podría ser empleado como un indicador indirecto del contenido de residuos de fluvalinato en cera de abejas.

6 RESUMEN

Debido a la aplicación de tablillas artesanales en base a fluvalinato para el control de *Varroa destructor* Anderson & Trueman se planteó determinar la presencia de residuos de este acaricida en 141 muestras de cera de abejas de colmenares de la X Región de Los Lagos. A partir de los niveles detectados se determinó el porcentaje de muestras que reviste peligro potencial de traspaso de residuos a la miel, según el límite máximo propuesto por Wallner en 1999 de 1ppm; además, los resultados obtenidos se relacionaron con el tiempo que permanece la cera en la colmena; se estudiaron en relación a algunas características de los apicultores y, finalmente, se determinó si el color de la cera, podría constituir un indicador de dichos niveles. La metodología utilizada contempló extracción líquido – líquido, purificación y cromatografía de gases (DCE), con un límite de detección de 0,001 mg/kg y una recuperación media de $96,14 \pm 13,7\%$. Se determinó la presencia de residuos de fluvalinato en el 87,2% de muestras, en un rango de 0,008 a 5,164 mg/kg, con un promedio de $0,510 \pm 0,716$ mg/kg. El 8,5% de las muestras posee riesgo de traspaso de residuos a la miel, este porcentaje podría verse incrementado en el futuro si continuara el uso de tablillas artesanales, debido a la alta estabilidad y afinidad que presenta el fluvalinato en la cera de abejas. No se observó ningún efecto significativo de las características de los apicultores evaluadas sobre los niveles encontrados, éstas correspondieron a la zona geográfica de origen de las colmenas, la importancia económica de la actividad apícola y al tamaño de las colmenas. Así mismo, los análisis no mostraron una correlación entre el tiempo de permanencia de la cera en la colmena y los residuos detectados. Finalmente, se estableció que el color no constituiría un indicador del contenido de residuos presentes en la cera de abejas.

SUMMARY

Due to the application of plywood inserts with fluvalinate used for the Varroa destructor Anderson & Trueman control, thought about determining the presence of acaricide residues in 141 samples of beeswax from beehives in the X Region of Los Lagos. The detected levels determined the percentage of the samples that had a potential risk of transferring residues to the honey, according to the maximum limit of 1ppm, given by WALLNER in 1999. In addition, the obtained results were related to the time that the beeswax remained in the beehive. They were also studied in relation to some characteristics of their beekeepers. In the end, it was determined the color of the beeswax could be an indicator of the said levels. The methodology used in this experiment consisted of liquid-liquid extraction, purification, and gas chromatography (DCE) with a detection limit of 0.001 mg/kg and an average recovery of 96.14 ± 13.7 %. It was determined that the presence of fluvalinate residues existed in 87.2% of the samples. They were in a range from 0.008 to 5.164 mg/kg. Only 8.5% of the samples ran the risk of transferring residues to the honey. This percentage could increase in the future if the use of craft plywood continues due to the high stability and affinity that the fluvalinte shows in the beeswax. A significant response was not observed on the beekeepers' characteristics which were evaluated over the found levels. These characteristics are: the geographic zone that beehives are from, the economic importance of the beekeeping activity, and the size of the beehives. The analysis showed no correlation between the permanent time of the beeswax in the beehive and the detected residues. In the end, it was set up that the color would not be an indicator of the residues that contained the beeswax of bees.

7 BIBLIOGRAFIA

- AGUAYO, O. 2001. Enfermedades. In: Apicultura Chilena : Sector Emergente. (On Line) Proapis Ltda. <<http://www.proapis.cl/chile/enferm.htm>> (28 Dic. 2001)
- ANDERSON, D. y TRUEMAN, J. 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology* 24: 165-189.
- ATKINS, L. 1993. Injury to honey bees by poisoning. In: The hive and the honey bee. Dadant, Hamilton, Illinois, USA p.1150-1208.
- BALAYANNIS, P.y SANTAS, L. 1992. Dissipation of malathion and fluvalinate residues from honey. *Journal of Apicultural Research* 31(2):70-76.
- BIANCHI, E. 1990. Control de calidad de la miel y la cera. Boletín de servicios agrícolas de la FAO. Centro de investigaciones apícolas Cedia. Universidad Nacional de Santiago del Estero. República Argentina. p.53.
- BOGDANOV, S.; IMDORF, A.; KILCHENMANN, V. y GERIG, L. 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. 1996. Acaricide residues in beewax and honey. *Bee Products* 29: 239-246.

----- ; ----- e ----- 1998. Acaricide residues in some bee products. *Journal of Apicultural Research* 37(2):57-67.

BORNECK, R. 1991. Les residues des produits de traitement antivarroa dans les miels et les cires. *La sante de l'abeille N° Special Varroase*. pp. 36-38.

CAMPANO, S. 2001. Reseña de la situación sanitaria apícola nacional y su relación con presencia de residuos en mieles. *In: Seminario Internacional de Sanidad Apícola*. 4 de Octubre de 2001, Temuco, Chile. pp: 1-8.

CALATAYUD, F. 2001. Nuevos conocimientos y su aplicación práctica. *In: La varroasis de las abejas (On line)*. <www.apiunio.com/pdf/varroasis.pdf> (28 Dic. 2001)

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, Facultad de Ciencias Agrarias. 82p.

CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS (INE). 1997. VI Censo Nacional Agropecuario; Resultados preliminares. Instituto Nacional de Estadísticas, Santiago, Chile. 443 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, FUNDACION DE INNOVACIÓN 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, 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. 32p.
- CHILE, SERVICIO AGRICOLA Y GANDERO (SAG), SUB DEPARTAMENTO DE DIVULGACIÓN TECNICA. 1994. Control de la Varroasis en abejas, Santiago, Chile. 20 p.
- CORNEJO, L. 1993. Apicultura práctica para América Latina, la producción de cera. Boletín de servicios agrícolas de la FAO. pp.119-121.
- CORNELL UNIVERSITY; OREGON STATE UNIVERSITY; UNIVERSITY OF IDAHO; UNIVERSITY OF CALIFORNIA AT DAVIS AND 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 Dic. 2000).
- CRANE, E. 1990. Bees and beekeeping; science, practice and world resources. Cornell University, New York, USA. 614p
- DE GREEF, M.; DE WAEL, L. y VAN LAERE, O. 1994. The determination of the fluvalinate residues in the Belgian honey and beeswax. *Apiacta* 31:83-87.

- FAUCON, J. 1991. La Varroase: Bientot dix ans. La sante de l'abeille N° Special Varroase. pp: 2-6.
- FERNANDEZ-MUIÑO, M.; SANCHO, M.; MUNIATEGUI, S.; HUIDOBRO, F. y SIMAL-LOZANO, J. 1995. Acaricide residues in honey: analytical methods and levels found. *Journal of Food Protection* 58(4): 449-454.
- FRISON, S.; BREITKREITZ, W.; CURRIE, R.; NELSON, D., y SPORNS, P. 1999. The analysis of fluvalinate in beeswax using GC/MS. *Food Research International* 32: 35-41.
- GRAJALES, M. y SCHMIDT, J. 2001. Origen de la cera. (On Line). Apícola Integral las Piedras. Uruguay. <<http://webs.demasiado.com/apicultura/cera.htm>>. (28 Dic. 2001).
- JIMENEZ, J. Y ATIENZA, J. 1995. Características de la degradación de los productos pesticidas. (On Line). Servicio de investigación agraria. Valladolid. España. <www.chem.agicent.com/cag/peak_2-95/acaricide.htm> (21 de Oct. 2001).
- LENICEK, J.; SEKYRA, M. y CITKOVA, M. 1990. Determination of fluvalinate in honey and wax. *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. 119-124.
- LIU, T. 1992. Fluvalinate and its after-effects. *American Bee Journal* 132(6): 398.

- LODESANI, M.; PELLACAMI, A.; BERGOMI, S.; CARPANA, E.; RABITTI, T. y LASAGNI, P. 1992. Residues determination for some products used against *Varroa* infestation in bees. *Apidologie* 23(3):257-272.
- LUSBY, D. 2001. Recycling beeswax: Part 3. Recommended decontamination procedures. (On Line). Part 12. <<http://www.beesource.com/pov/lusby/part12.htm>> (4 de Noviembre 2001).
- MARTIN, P. 1999. Imports into the EU from third countries: veterinary and other requirements. *Bee World*. 80(1): 24-32.
- MILLER, J. y MILLER, J. 1993. Estadística para química analítica. 2ª ed. Wilmington, USA, Addison-Wesley Iberoamericana. 211p.
- MOOSBECKHOFER, R.; WALLNER, K.; LUH, M.; WOMASTEK, R. y PECHHACKER, H. 1995. Situación de los residuos de la miel, la cera y el propóleo al cabo de 10 años de tratamiento antivarroasis en Austria. XXXIV Congreso internacional de apicultores, programa y resumen de los informes, APIMONDIA, 15-19 Agosto 1995.
- MORSE, R. y NOWOGRODZKI, R. 1990. Mites: *Varroa* and Other Parasites of brood. In: Honey Bee Pest, Predators, and Diseases. Comstock. Cornell University Press. USA. pp:201-300.
- 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. 4 de octubre de 2001, Temuco, Chile. pp 46– 56.
- NOWACKA-KRUKOWSKA, H.; CZAJKA, M.; y SLEDZINSKI, B. 1994. Determination of fluvalinate residues in honey and wax after using of some mite infestation control products. *Pestycydy*. 1: 31-37.
- QUATTROCCHI, O; DE ANDRIZZI, S. y LABA, R. 1992. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Buenos Aires, Argentina, Artes Gráficas Farro. 407p.
- RIOS, L . 2001. Caracterización de explotaciones apícolas de la IX y X Región. Tesis Lic. Agr. Valdivia, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 100p.
- SANCHO, M.; MUNIATEGUI, S.; HUIDOBRO, F. y SIMAL, J. 1991. Análisis de residuos de fluvalinato en miel mediante GC/ECD. *Revista Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (España)* 31(3): 417-422.
- SCHMIDT, H. 1979. Aditivos y contaminantes de alimentos. Fundación Chile. Universitaria. Santiago, Chile. 143p.
- 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 Sciencie* 1(4): 189-195.
- THE EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF THE MEDICINAL PRODUCTS (EMEA). 1995. Committee for the veterinary medicinal

products. Tau fluvalinate. Revised summary report. (On Line).
<<http://www.fao.org.search>> (6 Ene. 2001).

TSIGOURI, A. ; MENKISSOGLU - SPIROUDI, U.; THRASYVOULOU, A. y
DIAMANTIDIS, G. 2000. Determination of fluvalinate residues in beeswax
by gas chromatography with electron-capture detection. Journal of AOAC
International. 83 (5): 1225-1228.

TSIGOURI, A.; MENKISSOGLU - SPIROUDI, U.y THRASYVOULOU, A. 2001.
Study of tau-fluvalinate persistence in honey. Pest Management Science
57: 467 – 471.

VESELY, V.; MACHOVA, M.; HESSLER, J.; HOSTOMSKA, V., y LENICEK, J.
1994. Reduction of fluvalinate residues in beeswax by chemical means.
Journal of Apicultural Research 33(3): 185-187.

WALLNER , K., y PECHHACKER, H. 1994. Residuals in honey and wax
caused by Varroa treatment. Apidologie 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
30: 235-248.

ANEXOS

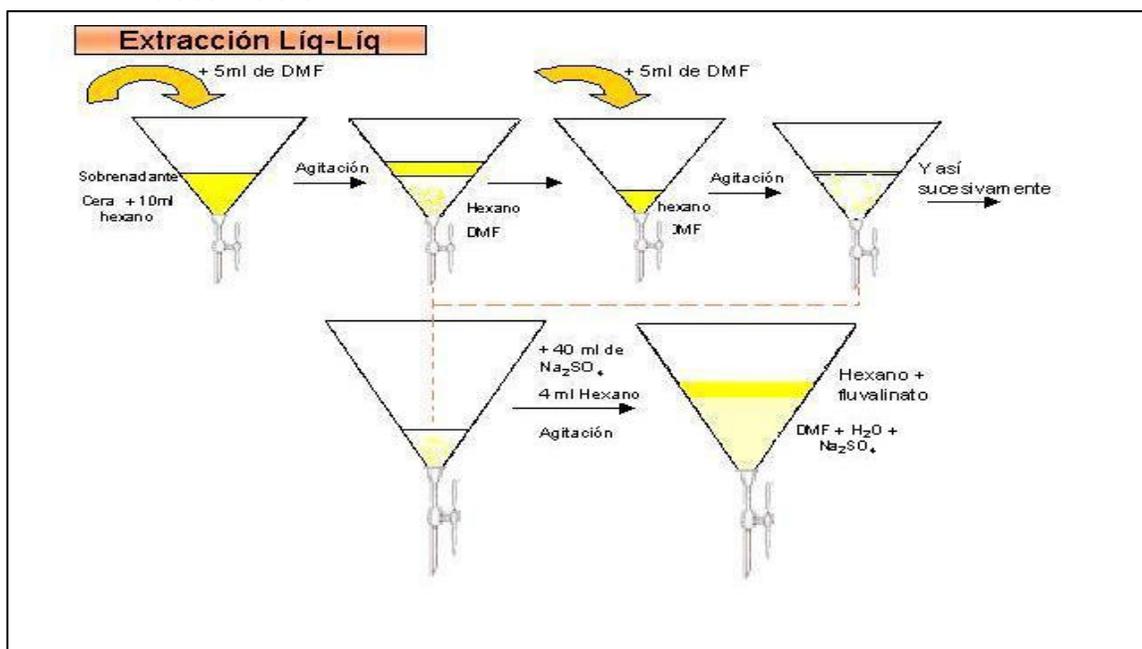
Anexo 1 Migración de varroacidas desde la cera a la miel.

| Nivel de residuos en la cera | Análisis de los niveles de residuos en miel (ug/kg) | | | | |
|------------------------------|---|-----------------|----------|-------------|-----------|
| | Folvex VA Neu | | Perizin | Apistan | Bayvarol |
| | Dibrom-benzofenon | Bromopropi-lato | Coumafos | Fluvalinato | Flumetrin |
| 1 ppm | 0,9 | 0,6 | 0,7 | 0,4 | n.d |
| 10ppm | 7 | 4 | 5 | 0,6 | n.d |
| 20ppm | 12 | 6 | 7 | 0,8 | n.d |
| 50ppm | 16 | 12 | 18 | 1,5 | n.d |
| 60ppm | 20 | 16 | 21 | 2,1 | n.d |
| 100ppm | 24 | 19 | 31 | 4,5 | n.d |
| 400ppm | 33 | 29 | 94 | 10 | n.d |

n.d: no detectable.

Fuente: WALLNER, (1995).

Anexo 2 Extracción líquido – líquido de fluvalinato en cera en embudos de decantación.



Anexo 3 Imágenes capturadas durante el estudio.**Equipo de Cromatografía de Gases****Evaporador Rotatorio****Marco a muestrear****Corte de cera****Marco muestreado****Muestra de cera**

Anexo 4 Condiciones operacionales del cromatógrafo.

- Programa de temperatura del Inyector.

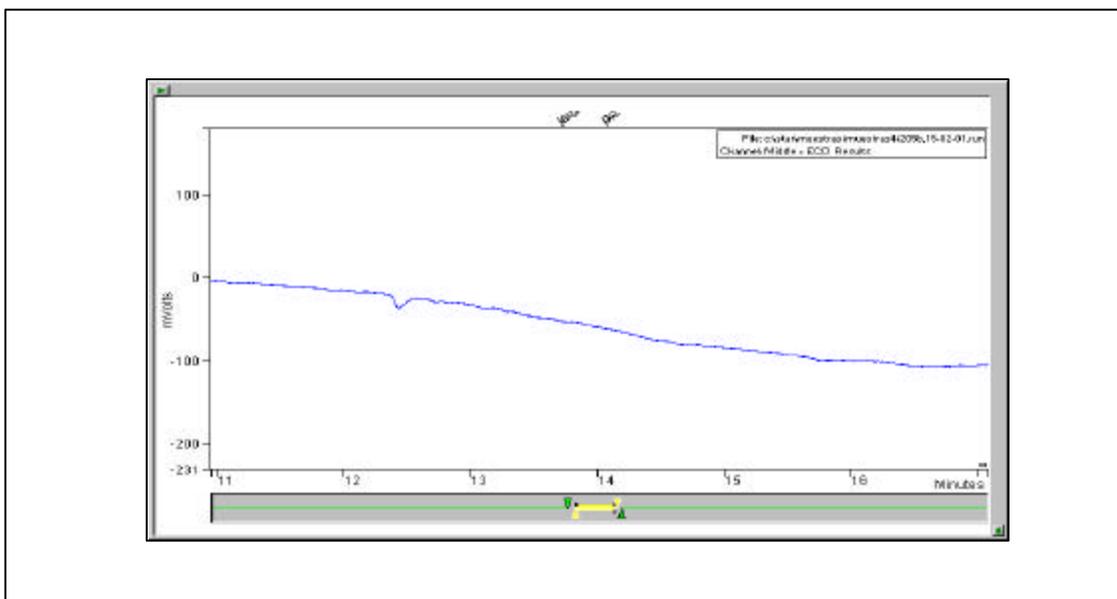
| Tiempo | Split-state | Split-Ratio |
|---------|-------------|-------------|
| Inicial | Off | |
| 0,1 | On | 1:100 |
| 0,5 | Off | |

- Programa de temperatura horno de columna.

| Temperatura (°C) | Rate(°C/min) | Hold (min) | Total (min) |
|------------------|--------------|------------|-------------|
| 70 | | 1 | 1 |
| 200 | 35 | 0 | 4,71 |
| 290 | 10 | 5 | 18,71 |

Anexo 5 Comprobación de la selectividad o especificidad del método.

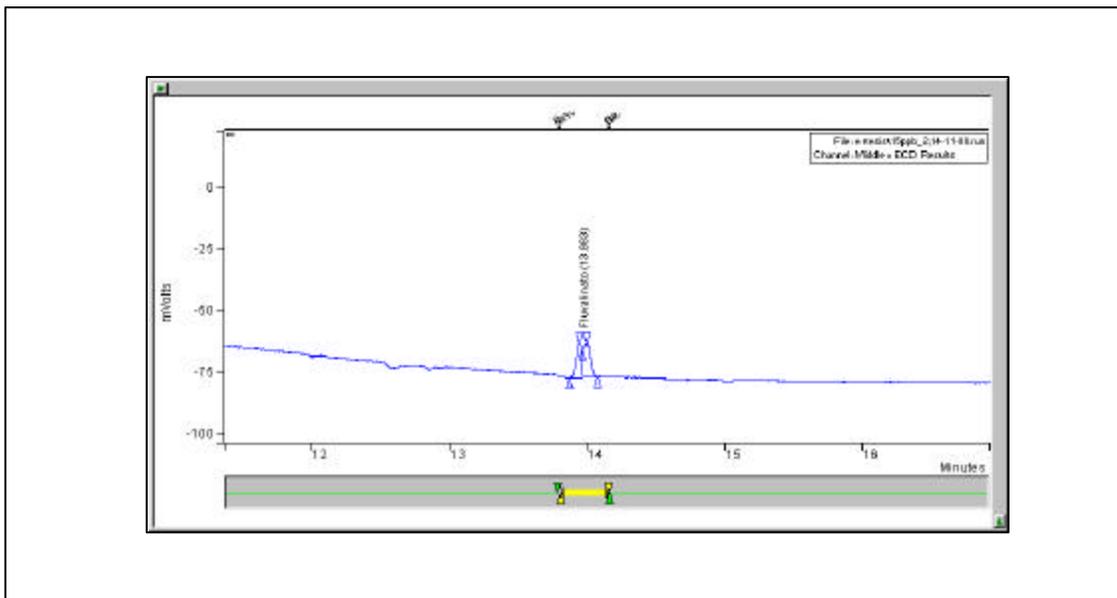
- Cromatograma de una muestra de cera sin residuos de fluvalinato.



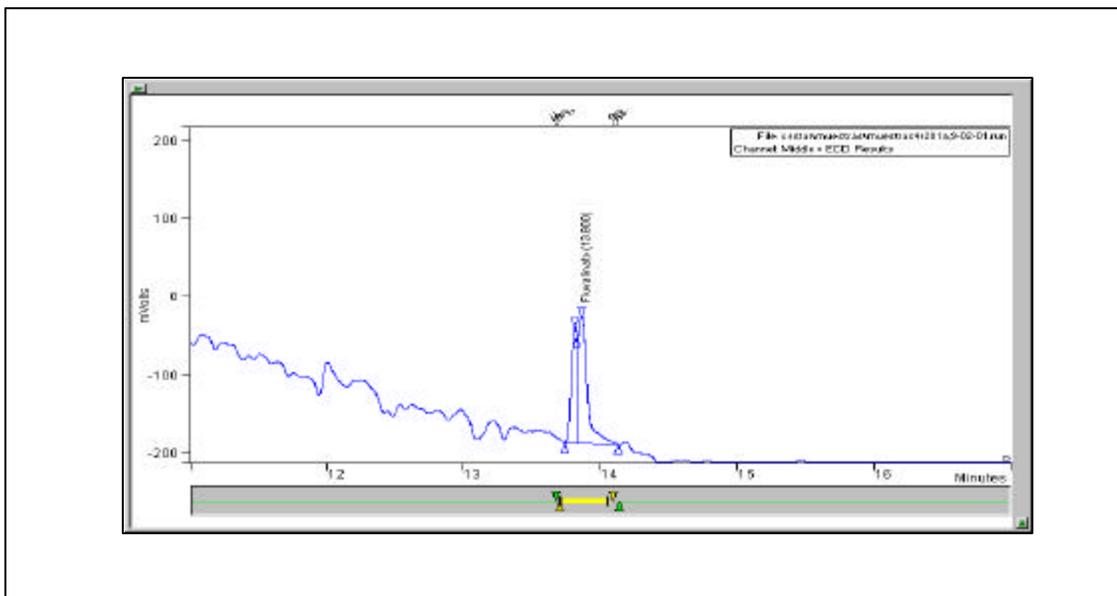
Continúa

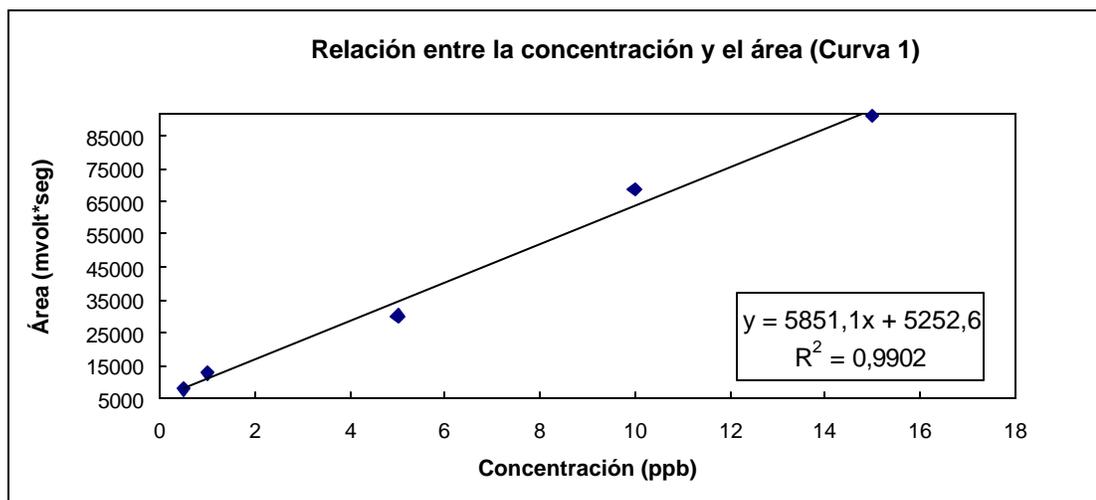
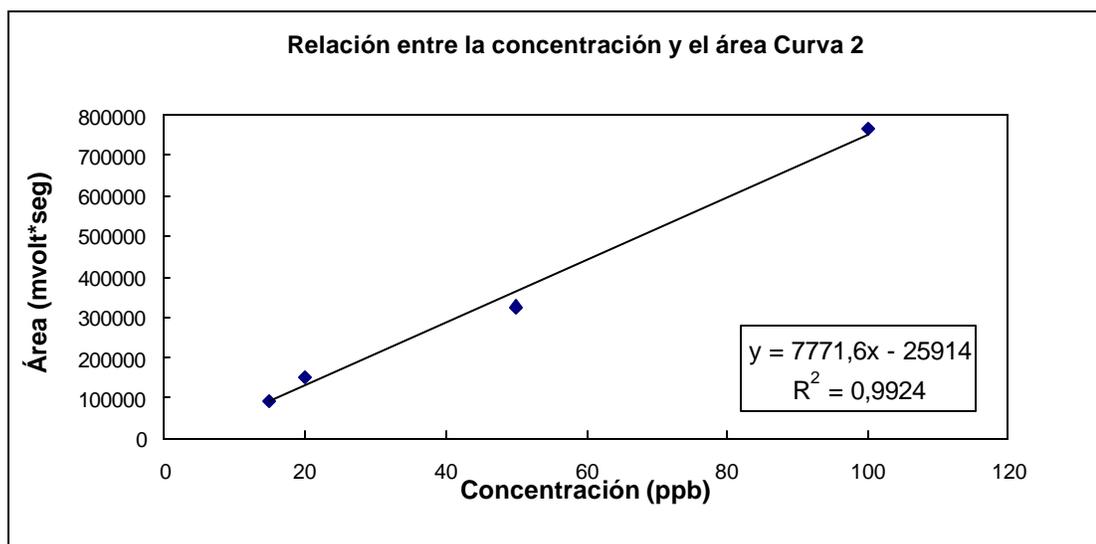
Anexo 5 Continuación.

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



- **Cromatograma de una muestra de cera que presenta una concentración de fluvalinato de 5,164 ppm.**

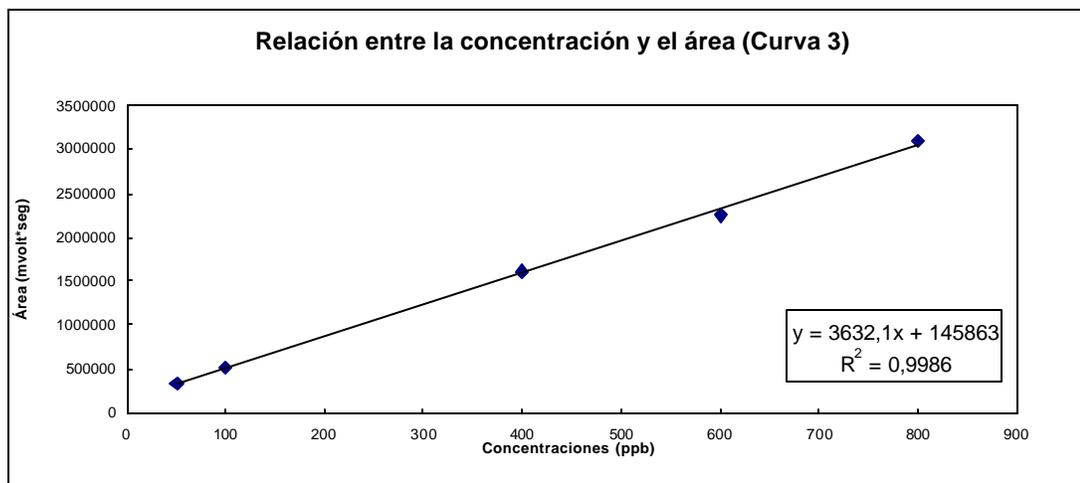


Anexo 6 Comprobación de la linealidad del método. Curvas de calibración.**Curva de calibración 1 para la determinación de la concentración de Fluvalinato (0,5 a 15 µg/kg)****Curva de calibración 2 para la determinación de la concentración de Fluvalinato (15 a 100 µg/kg)**

Continúa

Anexo 6 Continuación.

Curva de calibración 3 para la determinación de la concentración de Fluvalinato (50 a 800 µg/kg)



Anexo 7 Determinación de la Precisión.

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

| Concentración (µg/kg) | 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 medio para las siete concentraciones fue de $26,8 \pm 8,8$ %.

Anexo 8 Cálculo del porcentaje de Recuperación de fluvalinato en cera de abejas.

| Repeticiones | Concentración encontrada (µg/kg) | | |
|-------------------------|----------------------------------|---------------|---------------|
| | 55 | 101 | 214 |
| 1 | 58,3897 | 80,4964 | 165,7369 |
| 2 | 61,0534 | 74,8942 | 183,2430 |
| 3 | 65,2348 | 109,5289 | 222,7808 |
| Promedio (µg/kg) | 61,5593 | 88,3065 | 190,5879 |
| DE (µg/kg) | 3,4505 | 18,5914 | 29,2212 |
| Recuperación | 111,93% | 87,43% | 89,06% |
| R. Media (n = 9) | 96,14% | | |
| DE (µg/kg) | 13,70 | | |
| DER o CV | 14,25% | | |

- Para el método establecido la recuperación media para un $n = 9$ es de 96,14%. Para probar si la exactitud es apropiada, o sea que la recuperación media no difiere de 100, se realizó la prueba de t de "student":
- Se prueba la siguiente hipótesis:

$$H_0: \mu_o = 100 \quad \text{versus} \quad H_1: \mu_o \neq 100$$

$$t_{\text{obs}} = \frac{100 - R}{\text{DER} \cdot \sqrt{n}} = \frac{100 - 96,14}{14,25 \cdot \sqrt{3}} = 0,813$$

$$t_{\text{tabla}} = t_{n-2; 1-a/2} = t_{8; 0,975} = 2,31$$

Como $t_{\text{obs}} < t_{\text{tabla}}$ ($0,813 < 2,31$) se acepta H_0 por lo tanto no existen diferencias significativas entre la recuperación media y 100.

Anexo 9 Cálculo del límite de detección.

El límite de detección se calculó a partir de la Curva 1 ya que es la curva de calibración con la menor cantidad de concentración de analito.(ver Anexo 6, curva 1). (QUATTROCCHI *et al.*, 1992).

- Ecuación de la recta: $y = 5252,6 + 5851,1 \cdot x$
- Coeficientes de regresión: $a = 5252,6 \text{ ppb}$ $b = 5851,1 \text{ ppb}$
- Error estándar de estimación: $S_{yx}: 4157,5 \text{ ppb}$
- Límite de detección (LD): $(2 \cdot S_{yx}) / b$ $LD = 1,4 \text{ ppb}$
 $LD = 0,001 \text{ ppm}$

Anexo 10 Concentración de residuos de fluvalinato (ppm), observada en cera de abejas de colmenares provenientes de varias comunas de la X Región.

| Nº Muestra | Conc (mg/kg) | Comuna | Fecha de muestreo | Nº Muestra | Conc (mg/kg) | Comuna | Fecha de muestreo |
|------------|--------------|---------|-------------------|------------|--------------|------------|-------------------|
| 167 | 0,151 | Fresia | mayo | 47 | 4,190 | Lago Ranco | marzo |
| 192 | 0,256 | Fresia | mayo | 48 | 0,298 | Lago Ranco | marzo |
| 193 | 0,871 | Fresia | abril | 53 | 0,031 | Lago Ranco | marzo |
| 33 | 0,085 | Futrono | febrero | 54 | 0,026 | Lago Ranco | febrero |
| 34 | 0,395 | Futrono | febrero | 55 | 0,070 | Lago Ranco | febrero |
| 35 | 0,018 | Futrono | febrero | 56 | 0,073 | Lago Ranco | febrero |
| 38 | < LD | Futrono | febrero | 84 | 0,263 | Lago Ranco | marzo |
| 49 | 0,417 | Futrono | marzo | 85 | 0,304 | Lago Ranco | marzo |
| 50 | 0,046 | Futrono | marzo | 86 | 0,353 | Lago Ranco | marzo |
| 51 | 0,158 | Futrono | marzo | 104 | 0,299 | Lago Ranco | abril |
| 52 | 0,619 | Futrono | marzo | 105 | 0,343 | Lago Ranco | abril |
| 61 | 0,219 | Futrono | marzo | 106 | 0,261 | Lago Ranco | abril |
| 62 | 0,272 | Futrono | marzo | 107 | 0,472 | Lago Ranco | abril |
| 63 | 0,371 | Futrono | marzo | 115 | 0,522 | Lago Ranco | abril |
| 64 | 0,792 | Futrono | marzo | 116 | 0,721 | Lago Ranco | abril |
| 75 | 0,417 | Futrono | marzo | 117 | 0,391 | Lago Ranco | abril |
| 76 | 0,414 | Futrono | marzo | 118 | 0,424 | Lago Ranco | abril |
| 87 | 0,252 | Futrono | marzo | 119 | 0,110 | Lago Ranco | abril |
| 88 | 1,926 | Futrono | marzo | 121 | 0,118 | Lago Ranco | abril |
| 89 | 0,635 | Futrono | marzo | 178 | 1,758 | Lago Ranco | mayo |
| 99 | 0,407 | Futrono | marzo | 189 | <LD | Lago Ranco | mayo |
| 100 | 0,377 | Futrono | marzo | 190 | 0,313 | Lago Ranco | mayo |
| 108 | 0,178 | Futrono | abril | 191 | 0,161 | Lago Ranco | mayo |
| 109 | 0,186 | Futrono | abril | 196 | 0,103 | Lago Ranco | junio |
| 112 | 0,995 | Futrono | abril | 197 | 0,139 | Lago Ranco | junio |
| 113 | 0,435 | Futrono | abril | 198 | 0,278 | Lago Ranco | junio |
| 114 | 0,288 | Futrono | abril | 199 | 0,356 | Lago Ranco | Junio |
| 120 | 0,080 | Futrono | abril | 200 | 1,005 | Lago Ranco | junio |
| 136 | 0,191 | Futrono | abril | 201 | 5,164 | Lago Ranco | junio |
| 137 | 0,323 | Futrono | abril | 202 | 1,793 | Lago Ranco | junio |
| 138 | 0,849 | Futrono | abril | 208 | 0,266 | Lago Ranco | junio |
| 139 | 0,094 | Futrono | abril | 209 | 0,137 | Lago Ranco | junio |
| 175 | 0,788 | Futrono | mayo | 210 | 0,104 | Lago Ranco | junio |
| 176 | 1,183 | Futrono | mayo | 239 | 0,077 | Lago Ranco | junio |

Continúa

Anexo 10 Continuación

| Nº Muestra | Conc (mg/kg) | Comuna | Fecha de muestreo | Nº Muestra | Conc (mg/kg) | Comuna | Fecha de muestreo |
|------------|--------------|------------|-------------------|------------|--------------|-------------|-------------------|
| 211 | <LD | Futrono | junio | 250 | <LD | Lago Ranco | julio |
| 212 | <LD | Futrono | junio | 251 | 0,854 | Lago Ranco | julio |
| 213 | 0,340 | Futrono | junio | 254 | <LD | Lago Ranco | julio |
| 214 | 0,670 | Futrono | junio | 255 | 0,136 | Lago Ranco | julio |
| 215 | 1,473 | Futrono | junio | 60 | 0,205 | Los Lagos | marzo |
| 216 | 0,278 | Futrono | junio | 249 | 0,142 | Los Lagos | julio |
| 217 | 3,060 | Futrono | junio | 256 | 0,269 | Los Lagos | julio |
| 218 | 0,304 | Futrono | junio | 257 | 0,008 | Los Lagos | julio |
| 233 | 0,619 | Futrono | junio | 258 | 0,050 | Los Lagos | julio |
| 234 | 0,899 | Futrono | junio | 259 | 0,052 | Los Lagos | julio |
| 235 | 0,593 | Futrono | junio | 260 | 0,392 | Los Lagos | julio |
| 236 | <LD | Futrono | junio | 261 | 0,196 | Los Lagos | julio |
| 237 | 0,076 | Futrono | junio | 41 | 0,274 | Paillaco | febrero |
| 238 | <LD | Futrono | junio | 59 | 0,145 | Paillaco | marzo |
| 240 | <LD | Futrono | junio | 93 | 0,314 | Paillaco | marzo |
| 245 | 0,043 | Futrono | julio | 94 | 0,623 | Paillaco | marzo |
| 246 | <LD | Futrono | julio | 272 | 0,539 | Paillaco | julio |
| 248 | 0,064 | Futrono | julio | 273 | <LD | Paillaco | julio |
| 252 | 0,116 | Futrono | julio | 274 | 0,646 | Paillaco | julio |
| 253 | 0,098 | Futrono | julio | 275 | 1,105 | Paillaco | julio |
| 278 | 0,911 | Futrono | julio | 276 | 0,660 | Paillaco | julio |
| 279 | 1,519 | Futrono | julio | 277 | 0,251 | Paillaco | julio |
| 280 | 1,967 | Futrono | julio | 74 | 0,745 | Panguipilli | marzo |
| 36 | 0,132 | Lago Ranco | febrero | 185 | 0,762 | Pto. Montt | mayo |
| 37 | 0,050 | Lago Ranco | febrero | 186 | 0,123 | Pto. Montt | mayo |
| 39 | 0,035 | Lago Ranco | febrero | 187 | 0,452 | Pto. Montt | mayo |
| 40 | 0,062 | Lago Ranco | febrero | 160 | 0,363 | Pto. Varas | mayo |
| 42 | 0,117 | Lago Ranco | marzo | 262 | 0,827 | Valdivia | julio |
| 43 | 0,453 | Lago Ranco | marzo | 263 | 0,231 | Valdivia | julio |
| 44 | 0,561 | Lago Ranco | marzo | 264 | 0,135 | Valdivia | julio |
| 45 | 0,379 | Lago Ranco | marzo | 265 | 0,521 | Valdivia | julio |
| 46 | 0,130 | Lago Ranco | marzo | 266 | 0,173 | Valdivia | julio |
| | | | | 267 | 0,821 | Valdivia | julio |

Con rojo: Muestras con riesgo de traspaso de residuos a la miel.

Con azul: Muestras que se inician en el año 2000.

Anexo 11 Supuestos del análisis de varianza multifactorial

Prueba de Homogeneidad de varianza:

Variable Dependiente: Concentración

❖ **Factor: comuna**

$$H_0: s^2_1 = s^2_2 = s^2_3 = s^2_4 = s^2_5 = s^2_6 \quad v/s \quad H_1: s^2_1 \neq s^2_2 \neq s^2_3 \neq s^2_4 \neq s^2_5 \neq s^2_6$$

Chequeo de Varianza para Comuna

Bartlett's test: 1,38061 P-Value = 6,70667E-7

Se rechaza H_0 , por lo tanto las varianzas entre las comunas son heterogéneas. Se debe realizar transformación de los datos.

❖ **Factor: actividad**

$$H_0: s^2_1 = s^2_2 \quad v/s \quad H_1: s^2_1 \neq s^2_2$$

Chequeo de Varianza para Actividad

Bartlett's test: 1,01003 P-Value = 0,261211

Se acepta H_0 , por lo tanto las varianzas entre las actividades son homogéneas.

❖ **Factor: número de colmenas**

$$H_0: s^2_1 = s^2_2 = s^2_3 \quad v/s \quad H_1: s^2_1 \neq s^2_2 \neq s^2_3$$

Chequeo de Varianza para Número de colmenas

Bartlett's test: 1,40188 P-Value = 6,16913E-10

Se rechaza H_0 , por lo tanto las varianzas entre el número de colmenas son heterogéneas. Se debe realizar transformación de los datos.

Anexo 12 Supuestos del análisis de varianza para los datos transformados. (Logaritmo concentración + 1).

Prueba de Homogeneidad de varianza:

Variable Dependiente: Concentración

❖ **Factor: comuna**

$$H_0: s^2_1 = s^2_2 = s^2_3 = s^2_4 = s^2_5 = s^2_6 \quad v/s \quad H_1: s^2_1 ? s^2_2 ? s^2_3 ? s^2_4 ? s^2_5 ? s^2_6$$

Chequeo de Varianza para Comuna

Bartlett's test: 1,0595 P-Value = 0,253278

Se acepta H_0 , por lo tanto las varianzas entre las comunas son homogéneas.

❖ **Factor: actividad**

$$H_0: s^2_1 = s^2_2 \quad v/s \quad H_1: s^2_1 ? s^2_2$$

Chequeo de Varianza para Actividad

Bartlett's test: 1,02284 P-Value = 0,0910187

Se acepta H_0 , por lo tanto las varianzas entre las actividades son homogéneas.

❖ **Factor: número de colmenas**

$$H_0: s^2_1 = s^2_2 = s^2_3 \quad v/s \quad H_1: s^2_1 ? s^2_2 ? s^2_3$$

Chequeo de Varianza para Número de colmenas

Bartlett's test: 1,00738 P-Value = 0,630427

Se acepta H_0 , por lo tanto las varianzas entre el número de colmenas son homogéneas.

Anexo 13 Análisis de varianza múltiple.

$$\begin{array}{lll}
 \mathbf{H}_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6 & \text{v/s} & \mathbf{H}_1: \mu_1 ? \mu_2 ? \mu_3 ? \mu_4 ? \mu_5 ? \mu_6 \\
 & & \mathbf{H}_0: \mu_1 = \mu_2 \quad \text{v/s} \quad \mathbf{H}_1: \mu_1 ? \mu_2 \\
 & & \mathbf{H}_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 \quad \text{v/s} \quad \mathbf{H}_1: \mu_1 ? \mu_2 ? \mu_3
 \end{array}$$

Analysis of Variance for log(concentrac+1) - Type III Sums of Squares

| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|-------------------|----------------|-----|-------------|---------|-----------|
| MAIN EFFECTS | | | | | |
| A: comuna | 11,8317 | 5 | 2,36635 | 0,47 | 0,8013 NS |
| B: actividad | 0,30765 | 1 | 0,30765 | 0,06 | 0,8061 NS |
| C: N_colmenas | 4,71646 | 2 | 2,35823 | 0,46 | 0,6300 NS |
| RESIDUAL | 615,146 | 121 | 5,08385 | | |
| TOTAL (CORRECTED) | 630,234 | 129 | | | |

Los tres factores evaluados no presentaron diferencias significativas (p valor > 0,05).

Anexo 14 Análisis de regresión.

Concentración versus tiempo

❖ Comparación de los modelos:

| Modelos | Correlación | R-Cuadrado |
|-----------------|-------------|------------|
| Exponencial | -0,1972 | 3,89% |
| Doble recíproco | -0,1539 | 2,37% |
| Potencia | -0,1432 | 2,05% |

Análisis de regresión Exponencial modelo $Y = \exp(a + b \cdot X)$

Variable dependiente: Concentración (ppb)

Variable Independiente : Tiempo (Meses)

| Parameter | Estimate | Standard Error | T Statistic | P-Value |
|-----------|-----------|----------------|-------------|---------|
| Intercept | 6,6276 | 0,775129 | 8,55032 | 0,0000 |
| Slope | -0,136888 | 0,058999 | -2,32018 | 0,0219 |

Análisis de varianza

| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|---------------|----------------|-----|-------------|---------|---------|
| Modelo | 25,052 | 1 | 25,052 | 5,38 | 0,0219 |
| Error | 618,943 | 133 | 4,6537 | | |
| Total (Corr.) | 643,995 | 134 | | | |

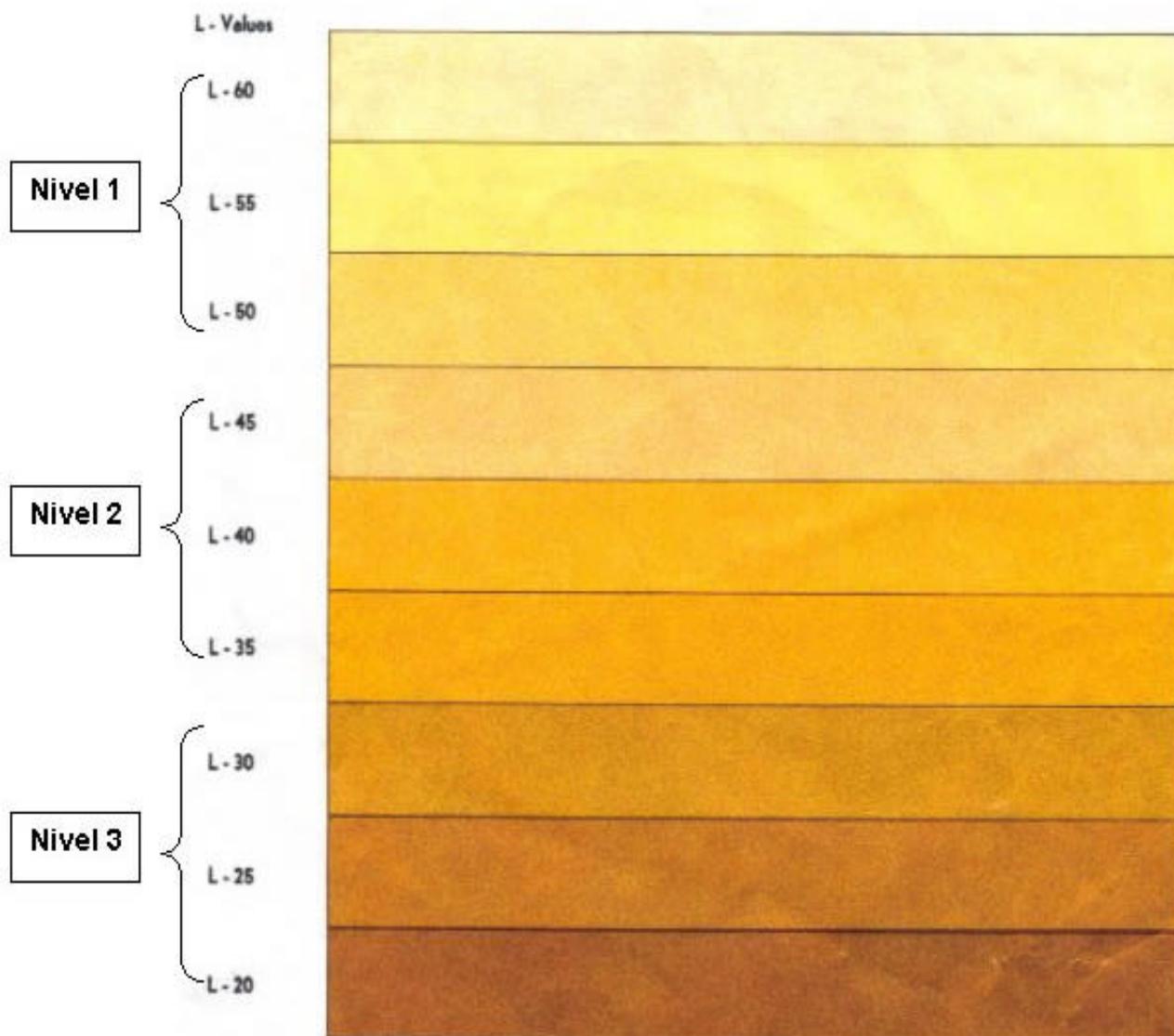
Correlation Coefficient = -0,197233

R-squared = 3,89009 percent

Standard Error of Est. = 2,15724

Ecuación del modelo ajustado:

$$\text{Concentración ppb} = \exp(6,6276 - 0,136888 * \text{Meses})$$

Anexo 15 Cartilla para la evaluación del color de la cera de abejas.

Anexo 16 Supuestos y análisis de varianza simple para color.

Prueba de Homogeneidad de varianza:

Variable Dependiente: Concentración

❖ Factor: color

$$H_0: s^2_1 = s^2_2 = s^2_3 \quad v/s \quad H_1: s^2_1 \neq s^2_2 \neq s^2_3$$

Chequeo de Varianza para Comuna

Bartlett's test: 1,07466 P-Value = 0,00770685

Se rechaza H_0 , por lo tanto las varianzas entre el factor color son heterogéneas. Se debe realizar transformación de los datos.

Supuestos del análisis de varianza para los datos transformados.(Raíz concentración)

Prueba de Homogeneidad de varianza:

Variable Dependiente: Concentración

❖ Factor: color

Bartlett's test: 1,00156 P-Value = 0,899852

Análisis de varianza simple Concentración de Fluvalinato.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 \quad v/s \quad H_1: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$$

ANOVA Table for sqrt(Conc ppm) by color

| Analysis of Variance | | | | | | |
|----------------------|----------------|-----|-------------|---------|-----------|--|
| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value | |
| COLOR | 430,777 | 2 | 215,389 | 1,39 | 0,2517 NS | |
| ERROR | 21330,1 | 138 | 154,566 | | | |
| Total (Corr.) | 21760,9 | 140 | | | | |

No existen diferencias significativas entre las medias del factor evaluado. (p valor > 0,05)

Anexo 17 Localización geográfica de las muestras de cera.

