



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

POSTGRADO EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

**DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DE
SULFONAMIDAS
EN MIELES DEL ESTADO DE TABASCO**

DIEGO ARMANDO ALEJO LÓPEZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO.

2022

La presente tesis, titulada “**DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DE SULFONAMIDAS EN MIELES DEL ESTADO DE TABASCO**”, realizado por el alumno: Diego Armando Alejo López, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

POSTGRADO EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. JUAN MANUEL ZALDIVAR CRUZ

ASESOR:



DR. ROBERTO DE LA ROSA SANTAMARÍA

ASESORA:



DRA. EDITH HERNÁNDEZ NATAREN

ASESORA:



DRA. NELLY CRISTINA AGUILAR SÁNCHEZ

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO, JULIO DEL 2022

DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DE SULFONAMIDAS EN MIELES DEL ESTADO DE TABASCO

Diego Armando Alejo López, MC.

Colegio de Postgraduados, 2022

RESUMEN

La producción de miel puede ser mermada por enfermedades bacterianas como loque americana causada por *Bacillus larvae* y loque europea por *Streptococcus pluton*, que representan un riesgo para las colmenas de las abejas, lo que puede ocasionar pérdidas económicas para el apicultor. Por ende, los apicultores optan por usar sustancias químicas para controlar las enfermedades en sus apiarios, como es el uso de antibióticos. La presencia de antibióticos en las mieles afecta su calidad, es un indicativo de prácticas apícolas inadecuadas, y representa un riesgo para la salud mundial, ya que pueden causar toxicidad, reacciones alérgicas y crear resistencia en ciertos microorganismos específicamente bacterias. Por tales motivos, la presente investigación se realizó con el objetivo de monitorear y detectar la presencia de sulfonamidas en mieles provenientes de distintas regiones de Tabasco, empleando la Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (UHPLC). Se analizaron 13 muestras de mieles, de las cuales el 69 % tuvieron residuos de sulfadoxina a niveles trazas, con concentraciones entre 0.03157 y 6.317 $\mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que para sulfadimetoxina todas las muestras dieron positivo con concentraciones entre los rangos 0.0422 y 12.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Aunque la presencia de estos fármacos sea mínima, las normativas mexicanas y europea, tienen un límite de tolerancia cero para fármacos en mieles.

Palabras claves: Miel, Antibióticos, Sulfadoxina, Sulfadimetoxina, UHPLC.

DETECTION OF THE PRESENCE OF SULFONAMIDES IN HONEY FROM THE STATE OF TABASCO

Diego Armando Alejo López, MC.

Colegio de Postgraduados, 2022

ABSTRACT

Honey production can be reduced by bacterial diseases such as American foulbrood caused by *Bacillus larvae* and European foulbrood caused by *Streptococcus pluton*, which pose a risk to bee hives and can cause economic losses to the beekeeper. Therefore, beekeepers opt to use chemical substances to control diseases in their apiaries, such as the use of antibiotics. The presence of antibiotics in honeys affects their quality, is an indication of inadequate beekeeping practices, and represents a risk for world health, since they can cause toxicity, allergic reactions and create resistance in certain microorganisms, specifically in bacteria. For these reasons, the present investigation was carried out to monitor and detect the presence of sulfonamides in honeys from different regions of Tabasco, using the Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) technique. Thirteen samples of honeys were analyzed, of which 69 % had sulfadoxine residues at trace levels, with concentrations between 0.03157 y 6.317 $\mu\text{g mL}^{-1}$, while all samples were positive for sulfadimethoxine with concentrations between 0.0422 y 12.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Although the presence of these drugs is minimal, Mexican and European regulations have a zero-tolerance limit for drugs in honeys.

Keywords: Honey, Antibiotics, Sulfadoxin, Sulfadimethoxine, UHPLC.

DEDICATORIAS

Quiero dedicarle este trabajo a:

Mi madre Noemí López Marín, por ser una excelente madre, por preocuparse por mí, y apoyarme siempre en cada nueva etapa de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al:

Dr. Juan Manuel Zaldívar Cruz, por guiarme, asesorarme aconsejarme en mi estancia durante la maestría y mi investigación.

Al apoyo que me brindaron mis asesores durante la realización de mi investigación.

Dra. Edith Hernández Nataren

Dra. Nelly Cristina Aguilar Sánchez

Dr. Roberto de la Rosa Santamaría

Gracias por su tiempo, consejos, recomendaciones, enseñanzas y compartir sus conocimientos, para poder culminar esta etapa en mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por brindarme la beca CVU 1011447, para la realización de mi maestría.

Al Colegio de Postgraduados, Campus, Tabasco, Por abrirme sus puertas y darme la oportunidad realizar mis estudios en sus instalaciones.

CONTENIDO	
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
DEDICATORIAS	v
AGRADECIMIENTOS	vi
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	2
2.1 Objetivo general.....	2
2.2 Objetivos específicos	2
2.3 Hipótesis	2
III. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
3.1. La miel	3
3.2. Composición química de la miel	3
3.2.1. Carbohidratos	4
3.2.2. Vitaminas	4
3.2.3. Proteínas	5
3.2.4. Compuestos fenólicos.....	6
3.2.5. Ácidos orgánicos.....	8
3.2.6. Minerales	8
3.3. Importancia de la miel.....	9

3.4. Contaminantes en mieles.....	11
3.5. Antibióticos en mieles	12
3.5.1. Tetraciclinas.....	13
3.5.2. Estreptomicinas	14
3.5.3. Sulfonamidas	15
3.5.4. Cloranfenicol.....	16
3.6. Legislaciones	17
3.7. Clasificación de métodos para la identificación de antibióticos en mieles..	18
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
4.2. Colecta de las muestras de miel	20
4.3. Determinación de sulfonamidas en mieles.....	20
4.4.1 Método de extracción.....	21
4.4.2. Extracción y limpieza de la muestra.....	21
4.4.3. Preparación de estándares.....	21
4.5. Análisis de las muestras	22
4.5.1. Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (UHPLC)	22
4.5.2. Condiciones Cromatográficas	22
4.5.3. Curva de calibración	22
4.5.4. Análisis de muestras de miel en UHPLC	22
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23

5.1. Curva de calibración	23
5.2. Resultados de las muestras analizadas	23
5.3. Discusión	25
5.4. Prueba de hipótesis	27
VI. CONCLUSIONES	28
VII. LITERATURA CITADA	29
VIII. ANEXOS.....	38
8.1. ANEXO 1	38
8.2. ANEXO 2	39
8.3. ANEXO 3	39
8.4. ANEXO 4	41

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Compuestos fenólicos en mieles de diferentes plantas (Olas, 2020).	7
Cuadro 2. Principales elementos minerales presentes en la miel (Álvarez-Sánchez, 2017).	9
Cuadro 3. Principales importadores de miel en el mundo (García, 2018).	10
Cuadro 4. Países exportadores de miel (United States Department of Agriculture, 2020).	11
Cuadro 5. Contaminantes en mieles (Al-Waili, <i>et al.</i> , 2012).	12
Cuadro 6. Datos de las muestras colectadas de mieles.	20
Cuadro 7.- Concentración de sulfonamidas en mieles Tabasqueñas	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Curva de calibración estándar de sulfadoxina y sulfadimetoxina obtenida en un UHPLC.	23
Figura 2.- Cromatograma de los estándares de sulfadoxina y sulfadimetoxina	38
Figura 3.- Cromatograma de la muestra C de miel	39
Figura 4.- Cromatograma de la muestra D de miel	40
Figura 5.- Cromatograma de la muestra K de miel	41

I. INTRODUCCIÓN

La apicultura provee a la sociedad el único edulcorante natural, la miel (Contreras y Magaña, 2018). En México, es de suma importancia a nivel económico y social, pues ayuda a generar empleos, lo cual representa una fuente de ingresos monetarios para los apicultores del país (Ramos y Pacheco, 2016). Actualmente, nuestro país es el noveno productor de miel a nivel mundial y el décimo tercer mayor exportador (SADER, 2022).

La miel posee un gran número de sustancias complejas y variables, las cuales se pueden dividir principalmente en dos grupos: los compuestos principales, como los monosacáridos (glucosa y fructosa), y los compuestos secundarios, que incluyen aminoácidos, enzimas, vitaminas, minerales y polifenoles (Albaridi, 2019). Sin embargo, también se han identificado diversos contaminantes, como metales pesados, trazas de plaguicidas y residuos de antibióticos, como las sulfonamidas. La aparición de estas sustancias químicas se atribuye al uso inadecuado de antibióticos en la apicultura y a la contaminación ambiental (Nolan *et al.*, 2019).

La presencia de antibióticos en la miel o en cualquier otro alimento es una problemática, ya que representa un riesgo para la salud humana. Por ejemplo, pueden provocar reacciones alérgicas, resistencia a los antibióticos en los seres humanos, efectos tóxicos y daños en el sistema nervioso central (Barrasso *et al.*, 2019). Para reducir los efectos adversos y la toxicidad de los patógenos resistentes a los antibióticos, la Unión Europea ha propuesto un modelo en el que se prohíben algunos promotores de crecimiento antimicrobianos específicos, mientras que para los medicamentos veterinarios que no están prohibidos, varias autoridades reguladoras en Estados Unidos y países europeos, han establecido límites máximos de residuos (LMR) para garantizar la seguridad de los consumidores frente a la exposición a residuos de medicamentos nocivos en alimentos de origen animal (Majdinasab *et al.*, 2017).

Respecto a la presencia de antibióticos en mieles mexicanas, la literatura reporta la presencia de sulfonamidas en muestras colectadas en los estados de Chihuahua, Michoacán, Zacatecas, Tamaulipas, Puebla, Veracruz, Morelos, Colima, Guanajuato,

Aguascalientes, San Luis Potosí, Coahuila, Sonora, Jalisco, Durango, las concentraciones estaban por encima de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Álvarez *et al.*, 2017).

Por estas razones es imprescindible realizar estudios de laboratorio con la finalidad de detectar residuos de antibióticos en mieles provenientes de apiarios del estado de Tabasco, ya que la presencia de dichas sustancias farmacológicas representan un riesgo para la salud.

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivo general

- Diagnosticar la presencia de residuos de sulfonamidas en muestras de mieles de diferentes zonas del estado de Tabasco.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar cada una de las sulfonamidas sulfadoxina, y sulfadimetoxina presentes en las mieles.
- Cuantificar la concentración de sulfonamidas en las mieles de diferentes zonas del estado de Tabasco.

2.3 Hipótesis

Las mieles producidas en los diferentes municipios del estado de Tabasco presentan concentraciones de sulfonamidas por encima de los límites máximos de residuos permitidos por las organizaciones encargadas de la inocuidad alimentaria.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. La miel

La miel es una sustancia dulce, viscosa, líquida o semilíquida, de color variable, con tonalidades frecuentemente amarillentas, más o menos intensas, elaborada por las abejas a partir del néctar de las flores, de secreciones de partes vivas de plantas o de excreciones de insectos chupadores de plantas (Fernández, 2011). Su composición es variable, y depende principalmente de su fuente floral, así como también de los factores estacionales y ambientales (Álvarez-Suarez *et al.*, 2014).

3.2. Composición química de la miel

Es un alimento que está compuesto por alrededor de 200 sustancias, principalmente azúcares, agua y otras sustancias como proteínas (enzimas), ácidos orgánicos, vitaminas, especialmente vitamina B₆, tiamina, niacina, riboflavina y ácido pantoténico), minerales incluidos calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, potasio, sodio y zinc, pigmentos, compuestos fenólicos y una gran variedad de compuestos volátiles, así como también partículas sólidas derivadas de la cosecha de la miel (Da Silva *et al.*, 2015). Gracias a estos compuestos, la miel tiene una gran importancia nutricional, los cuales también le confieren propiedades terapéuticas, antibacterianas y antioxidantes, entre otras (Džugan *et al.*, 2018).

3.2.1. Carbohidratos

Los azúcares son carbohidratos simples y son importantes para las funciones biológicas de la vida cotidiana, como proporcionar energía para realizar funciones vitales del cuerpo, la mayoría de los azúcares naturales contienen 6 o 12 átomos de carbono en sus moléculas (Kamal y Klein, 2011). Son los compuestos principales presentes en la miel; de los cuales, los monosacáridos glucosa y fructosa son predominantes, con concentraciones que oscilan entre el 65 % y el 80 % de la miel (De la Fuente *et al.*, 2011). Sin embargo, también se pueden encontrar otros carbohidratos como maltosa, sacarosa, turanosa, isomaltosa, celobiosa, isopanosa, entre otros; en diferentes cantidades (Cianciosi *et al.*, 2018).

Dependiendo de la fuente del néctar y las condiciones estacionales del ambiente, la composición de la miel va a cambiar, siendo la variedad de planta donde se recolectan los néctares el factor más importante que altera su composición (Özcan y Ölmez, 2014). Un ejemplo de cambio en las concentraciones y tipos de carbohidratos en mieles, se encuentra en el estudio realizado por De la Fuente *et al.*, (2011), donde se analizaron mieles provenientes de néctar colectado de plantas de eucalipto, echium, romero, brezo, cítricos, rosáceas y misceláneos, las cuales contenían diferentes concentraciones de fructosa, glucosa, sacarosa, α -trehalosa, β -trehalosa, celobiosa, laminaribiose, maltulosa, turanosa, maltosa, trehalulosa, palatinosa, gentiobiosa, isomaltosa, melezitoza y maltotriosa entre otros.

3.2.2. Vitaminas

Entre los nutrientes requeridos para muchas funciones fisiológicas esenciales para el organismo, se encuentran las vitaminas, a diferencia de otras clases de nutrientes, las vitaminas no cumplen funciones estructurales, ni su catabolismo proporciona energía significativa (Combs, 2012). Sin embargo, varias vitaminas del grupo B actúan en los procesos metabólicos, principalmente como coenzimas para producir energía, también la vitamina C es una de las vitaminas más importantes, pues es indispensable, ya que participa en muchos procesos fisiológicos importantes, como la absorción de hierro y la respuesta inmunitaria (Zhang *et al.*, 2018).

La miel contiene algunas vitaminas, aunque están presentes en pequeñas cantidades, se pueden encontrar las del grupo B (B1, B2 y B6) y así como vitamina C (ácido ascórbico), vitamina B3 (niacina), vitamina K, vitamina B5 (ácido pantoténico) y vitamina P (flavonoides) (Baglio, 2018; Chen *et al.*, 2020). El ácido ascórbico, es la vitamina predominante y generalmente se encuentra en casi todos los tipos de mieles; se ha indicado que su contenido promedio es de alrededor de 2 mg por cada 100 g (Santos-Buelga y González-Paramás, 2017).

Aunque la miel tenga cantidades insignificantes de vitaminas, se ha demostrado que la filtración comercial reduce su contenido vitamínico, debido a la eliminación casi completa del polen. De igual forma, otro factor que provoca la pérdida de vitaminas en la miel es la oxidación del ácido ascórbico, por el peróxido de hidrógeno producido por la glucosa oxidasa (Ciulu *et al.*, 2011).

3.2.3. Proteínas

Por lo general, las proteínas están presentes en la miel en concentraciones bajas, sin embargo, las proteínas de la miel pueden actuar como marcadores de autenticación (Chua *et al.*, 2015). Las diferencias en la composición proteica de la miel pueden ser el resultado de diferentes orígenes de las abejas y el néctar de flores utilizados por ellas (Bocian *et al.*, 2019), y se han identificado alrededor de 20 proteínas no enzimáticas diferentes en la miel, muchas de las cuales son comunes a todas las mieles, donde se incluyen albúminas, globulinas, proteasas y nucleoproteínas (De-Melo *et al.*, 2018), las cuales poseen una actividad antioxidante significativa como eliminadores de radicales libres (Hasam, *et al.*, 2020).

Se conoce que la miel exhibe actividades de fosfatasa ácida y contiene las siguientes enzimas: α , β -amilasa o diastasa; α -glucosidasa, también conocida como invertasa; y la glucosa oxidasa; estas enzimas son producidas principalmente por las glándulas de las abejas, además, la actividad de la catalasa se produce en la miel (Erban *et al.*, 2019).

3.2.4. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son una clase principal de metabolitos secundarios en las plantas y se dividen en ácidos fenólicos y polifenoles (Minatel *et al.*, 2017); forman parte de las propiedades que poseen las mieles, ya que dependen principalmente de su origen floral, también funcionan como una herramienta de clasificación y autenticación, especialmente en el caso de variedades uniflorales (Cianciosi *et al.*, 2018). Los compuestos fenólicos presentes en la miel tienen una capacidad antioxidante, la cual es benéfica, ya que ayuda a estabilizar las membranas celulares, al reducir la peroxidación de lípidos y al eliminar los radicales libres (Ruiz-Ruiz, *et al.*, 2017).

Varían en las mieles dependiendo del origen floral (Cuadro 1); curiosamente la miel de acacia, la de manuka y la de eucalipto son mejores fuentes de flavonoides en comparación con la de girasol, mientras que la miel de lavanda y la de naranja son las únicas fuentes de ciertos ácidos fenólicos, por ejemplo, ácido benzoico, cafeico, ferúlico, gálico, sirírgico y vaílico, que normalmente constituyen aproximadamente 56-500 mg kg⁻¹ de miel, con una concentración que varía de 60 a 460 mg por cada 100 g de miel (Olas, 2020).

Cuadro 1. Compuestos fenólicos en mieles de diferentes plantas (Olas, 2020).

Mieles	Flavonoides	Ácidos fenólicos
Miel de Eucalipto	Crisina (C ₁₅ H ₁₀ O ₄)	Ácido benzoico (C ₇ H ₆ O ₂)
	Isorhamnetina (C ₁₆ H ₁₂ O ₇)	Ácido cafeico (C ₉ H ₈ O ₄)
	Kaempferol (C ₁₅ H ₁₀ O ₆)	Ácido clorogénico (C ₁₆ H ₁₈ O ₉)
	Luteolina (C ₁₅ H ₁₀ O ₆)	Ácido elágico (C ₁₄ H ₆ O ₈)
	Miricetina (C ₁₅ H ₁₀ O ₈)	Ácido ferúlico (C ₁₀ H ₁₀ O ₄)
	Pinobanksin (C ₁₅ H ₁₂ O ₅)	Ácido gálico (C ₇ H ₆ O ₅)
	Pinocembrin (C ₁₅ H ₁₂ O ₄)	ácido p-cumárico (C ₉ H ₈ O ₃)
	Tricetina (C ₁₅ H ₁₀ O ₇)	Ácido protocatechico (C ₇ H ₆ O ₄)
	Quercetina (C ₁₅ H ₁₀ O ₇)	Ácido siríngico (C ₉ H ₁₀ O ₅)
		Ácido vainílico (C ₈ H ₈ O ₄)
Miel Manuka	Crisina (C ₁₅ H ₁₀ O ₄)	
	Respeto (C ₁₅ H ₁₀ O ₅)	
	Isorhamnetina (C ₁₆ H ₁₂ O ₇)	Ácido cafeico (C ₉ H ₈ O ₄)
	Kaempferol (C ₁₅ H ₁₀ O ₆)	Ácido ferúlico (C ₁₀ H ₁₀ O ₄)
	Luteolina (C ₁₅ H ₁₀ O ₆)	Ácido gálico (C ₇ H ₆ O ₅)
	Pinobanksin (C ₁₅ H ₁₂ O ₅)	Ácido siríngico (C ₉ H ₁₀ O ₅)
	Pinocembrin (C ₁₅ H ₁₂ O ₄)	
Quercetina (C ₁₅ H ₁₀ O ₇)		
Miel de acacia	Apigenina (C ₁₅ H ₁₀ O ₅)	
	Crisina (C ₁₅ H ₁₀ O ₄)	
	Respeto (C ₁₅ H ₁₀ O ₅)	Ácido cafeico (C ₉ H ₈ O ₄)
	Genisteína (C ₁₅ H ₁₀ O ₅)	Ácido clorogénico (C ₁₆ H ₁₈ O ₉)
	Kaempferol (C ₁₅ H ₁₀ O ₆)	Ácido ferúlico (C ₁₀ H ₁₀ O ₄)
	Luteolina (C ₁₅ H ₁₀ O ₆)	Ácido gálico (C ₇ H ₆ O ₅)
	Miricetina (C ₁₅ H ₁₀ O ₈)	Ácido siríngico (C ₉ H ₁₀ O ₅)
	Pinobanksin (C ₁₅ H ₁₂ O ₅)	Ácido vainílico (C ₈ H ₈ O ₄)
	Pinocembrin (C ₁₅ H ₁₂ O ₄)	
Quercetina (C ₁₅ H ₁₀ O ₇)		
Miel de girasol		Ácido benzoico (C ₇ H ₆ O ₂)
		Ácido cafeico (C ₉ H ₈ O ₄)
	Respeto (C ₁₅ H ₁₀ O ₅)	Ácido ferúlico (C ₁₀ H ₁₀ O ₄)
	Pinobanksin (C ₁₅ H ₁₂ O ₅)	Ácido gálico (C ₇ H ₆ O ₅)
	Pinocembrin (C ₁₅ H ₁₂ O ₄)	Ácido p-cumárico (C ₉ H ₈ O ₃)
		Ácido protocatechico (C ₇ H ₆ O ₄)
		Ácido protocatechico (C ₇ H ₆ O ₄)
	Ácido vainílico (C ₈ H ₈ O ₄)	

3.2.5. Ácidos orgánicos

Un ácido orgánico es un compuesto con propiedades ácidas que contiene carbono. Los más comunes son los ácidos carboxílicos, cuya acidez está asociada a su grupo carboxilo -COOH (Theron y Rykers, 2010), se encuentran ampliamente distribuidos en los alimentos y juegan un papel importante en las bebidas y alimentos, porque afectan sus propiedades organolépticas (sabor, color y aroma), asimismo la estabilidad y el control microbiológico de los productos alimenticios, de igual forma están bien establecidos como marcadores químicos, de calidad, madurez, autenticidad y como características distinguibles del origen geográfico de los alimentos (Nollet y Toldrá, 2012).

Representan solo una pequeña proporción (<0.5 %) de los componentes de la miel, pero juegan un papel importante en la definición del color, el sabor, pH y las actividades antimicrobianas y antioxidantes de la miel; además, treinta ácidos orgánicos no aromáticos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido succínico) están presentes en la miel, donde el principal ácido orgánico no aromático, es el ácido glucónico, que se deriva de dos fuentes principales: por la acción de la glucosa oxidasa de abeja sobre la glucosa del néctar y por la actividad metabólica de ciertas bacterias del género *Gluconobacter spp.* (Suto *et al.*, 2020).

3.2.6. Minerales

La miel contiene minerales esenciales para el buen funcionamiento del cuerpo humano, por ejemplo, forman parte de compuestos que influyen en el metabolismo, participan en el equilibrio agua-electrolitos y tienen un efecto regulador; su contenido en la miel está significativamente influenciado por el origen botánico y oscilan entre el 0.04 % y el 0.2 % en la miel floral, mientras que el de la miel de mielada oscila entre el 0.40 % y el 0.63 % y su cantidad como la variedad de minerales presentes dependen del nivel de nutrientes en las plantas, su disponibilidad en el suelo, las contaminaciones ambientales y del suelo (Kedzierska-Matysek *et al.*, 2018).

Los minerales presentes en el suelo, se transportan a las plantas a través de las raíces y llegan a la miel a través del néctar o la melaza, aunque también pueden provenir de fuentes antropogénicas, como las prácticas apícolas y en el procesamiento de la miel. En el cuadro 2, se recopilan los principales elementos minerales presentes en la miel, la mayoría de ellos son metales, algunos de los cuales están presentes solo en cantidades mínimas (es decir, oligoelementos) (Álvarez-Sánchez, 2017).

Cuadro 2. Principales elementos minerales presentes en la miel (Álvarez-Sánchez, 2017).

Principales minerales	Contenido promedio en miel clara u oscura $\mu\text{g kg}^{-1}$
Potasio	40-1350
Cloro	52-427
Azufre	15-100
Sodio	3-237
Calcio	5-218
Fosforo	29-119
Magnesio	2-564
Silicio	9-41
Hierro	0.4-224
Zinc	0.2-74
Manganeso	0.3-4

3.3. Importancia de la miel

Los alimentos funcionales se pueden definir como elementos dietéticos: qué, además de proporcionar nutrientes y energía, modulan de manera beneficiosa una o más funciones específicas en el cuerpo, mejorando una determinada respuesta fisiológica o reduciendo el riesgo de alguna enfermedad (Donato-Capel *et al.*, 2014). Por tal razón, en los últimos años ha incrementado el uso de productos apícolas, tanto en la medicina tradicional, como en la moderna. Actualmente muchos de estos estudios están dirigidos hacia la investigación de los beneficios que tiene la miel para la salud y las propiedades farmacológicas de los productos de las abejas, razones del creciente desarrollo de productos nutracéuticos y alimentos funcionales provenientes de las mieles (Pasupuleti *et al.*, 2017).

Gracias a que la miel es un alimento rico en nutrientes y que ofrece varios beneficios, su consumo mundial ha aumentado de manera constante durante las últimas décadas por

dos principales razones: el aumento de la población mundial y el aumento de consumidores que tienen preferencia por los alimentos naturales, incluidos los jóvenes, y a medida que aumenta la población mundial y la demanda de productos naturales saludables, muchos países no pueden satisfacer su demanda de miel con producción nacional y necesitan importar volúmenes cada vez mayores de los países productores (Cuadro 3) (García, 2018).

Cuadro 3. Principales importadores de miel en el mundo (García, 2018).

País	Miel importada en miles de toneladas
Estados Unidos	166,477
Alemania	81,959
Japón	48,445
Reino Unido	41,135
Francia	35,433
España	27,988
Bélgica	26,509
Polonia	23,869
Italia	22,568
Países bajos	16,348
Arabia Saudita	12,185
Australia	9,927
Emiratos Árabes Unidos	8,487
Suiza	7,865
Austria	7,490
Canadá	6,560
Dinamarca	6,094
China	6,032
Portugal	5,675
Taiwán	5,531
Suecia	4,813
Hong Kong	4,259
Irlanda	4,086
Sudáfrica	3,986
Malaysia	3,668

A través de la demanda que existe de miel, se ha originado un incremento en la producción en algunos países y han exportado su producto para satisfacer la demanda de mieles en otros lugares, en el Cuadro 4 se muestran algunos de los países que exportan mieles.

Cuadro 4. Países exportadores de miel (United States Department of Agriculture, 2020).

País	Miel exportada en miles de toneladas
Japón	2,849
Reino Unido	4,079
México	8,425
Islas Caimán	10,249
Alemania	12,794
China	12,879
Las Bahamas	23,615
Emiratos Árabes Unidos	35,110
Barbados	52,363
Panamá	75,286
China	79,691
Kuwait	153,182
Corea del Sur	284,746
Filipinas	485,518

De acuerdo con estos datos, se prevé que el mercado mundial de la miel alcance los 2.4 millones de toneladas para este año y se cree que gran parte de este crecimiento es debido a la percepción de la miel, como un producto natural, que no causa problemas de obesidad como otras fuentes de azúcar (Carreck, 2018).

3.4. Contaminantes en mieles

Cuando las abejas recolectan polen y néctar de las plantas, pueden transportar contaminantes que consiguen incorporarse a la miel y a otros productos de la colmena; además, el uso intensivo de tratamientos químicos terapéuticos para controlar enfermedades en los apiarios puede considerarse la fuente principal de contaminación directa (Saitta *et al.*, 2017). Por estas razones, las abejas son excelentes indicadores biológicos del nivel de contaminación en sus entornos de vida, porque son capaces de capturar y acumular contaminantes, además por que residen en diversos hábitats y cubren grandes áreas o distancias en kilómetros cuadrados desde la colmena (Gómez-Ramos *et al.*, 2019). En el Cuadro 5, se muestran los contaminantes que pueden estar presentes en las mieles.

Cuadro 5. Contaminantes en mieles (Al-Waili, et al., 2012).

Zona de contaminación	Contaminantes
Contaminante ambiental	Plomo, cadmio y mercurio Isótopos radiactivos Contaminantes orgánicos, bifenilos policlorados (PCB). Plaguicidas (insecticidas, fungicidas, herbicidas y bactericidas) Bacterias patógenas Organismos genéticamente modificados
Los contaminantes de la apicultura	Acaricidas: compuestos sintéticos lipofílicos y no tóxicos sustancias como ácidos orgánicos y componentes de aceites esenciales Antibióticos, principalmente tetraciclinas, estreptomicina, sulfonamidas y cloranfenicol. Paradiclorobenceno.

La presencia de estos contaminantes provoca envenenamiento, lo cual es un efecto adverso grave, ya que conduce a una disminución en la población de insectos, reducción en la producción de miel, destrucción de comunidades de plantas, presencia de residuos de insecticidas en los alimentos y antibióticos en los alimentos y, en última instancia, a una pérdida significativa de ingresos para los apicultores (Al-Waili *et al.*, 2012).

3.5. Antibióticos en mieles

La presencia de residuos de antibióticos en la miel es desfavorable, debido a su potencial toxicidad o reacciones alérgicas que pueden provocar a las personas sensibles, así como a la creación de resistencia a los antibióticos en ciertos patógenos, lo que representa un problema de salud pública mundial, debido al número cada vez mayor de bacterias resistentes, y por otro lado a la falta de antibióticos capaces de tratar eficazmente las infecciones causadas por esas bacterias resistentes a múltiples medicamentos (Li y Webster, 2018).

3.5.1. Tetraciclinas

Son antibióticos de tetraciclina (TC) son bien conocidos por su amplio espectro de actividad, que abarca la gama de bacterias Gram positivas y negativas, espiroquetas, bacterias intracelulares y parásitos protozoarios (Grossman, 2016). Este antibiótico se usa como aditivo de medicamentos veterinarios y alimentos, por lo que tiende a acumularse en los productos alimenticios terminados, representando un grave riesgo para los consumidores. Durante la producción de miel, la tetraciclina se utiliza a menudo para el tratamiento de las enfermedades bacterianas en la apicultura, como la Loque americana causada por *Bacillus larvae* y Loque europea causada por *Streptococcus pluton* (Wang *et al.*, 2015).

La presencia de la tetraciclina y sus productos de degradación en la miel pueden tener efectos nocivos en los consumidores, así como posibles reacciones alérgicas, daño hepático, coloración amarillenta en los dientes y alteraciones gastrointestinales debido a la ingesta de los antibióticos y sus efectos en la microbiota del ser humano (Saleh *et al.*, 2016). Debido al uso intensivo clínico y agrícola en los últimos 65 años, se ha propiciado a que se desarrolle resistencia a la tetraciclina en microorganismos ambientales, humanos, animales y entre los patógenos bacterianos (Forsberg *et al.*, 2015).

Dado al riesgo que representa en los alimentos, se han establecido estándares regulatorios para la determinación de residuos de TCs (tetraciclinas) en la miel, y se están volviendo más estrictos en todo el mundo. Por ejemplo, en Corea del Sur, el LMR (Límite Máximo de Residuos) para los residuos de TC (tetraciclina) se estableció en 300 ng g⁻¹, y en China en 50 ng g⁻¹ (Huang *et al.*, 2019). Por otra parte, la Unión Europea (UE) ha adoptado un límite máximo de residuos de 100 µg kg⁻¹ para tetraciclinas en alimentos de origen animal (Arabsorkhi y Sereshti, 2018).

Kumar *et al.* (2020), realizaron un estudio en 150 muestras de mieles indias mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) acoplado un detector de matriz de diodos (DAD), encontraron que el 15.3 % de mieles contenían oxitetraciclina, con concentraciones que oscilaban entre 9 y 60 ng g⁻¹. Otra investigación realizada por Korkmaz *et al.* (2017), emplearon el método de ensayo de inmunoabsorción ligado a

enzimas (ELISA), para determinar residuos de antibióticos en mieles turcas, donde 35 de 59 muestras estaban contaminadas con tetraciclinas, las cuales tenían una concentración entre 6 y 42 $\mu\text{g kg}^{-1}$. También Mahmoudi *et al.* (2014a), reportaron que, de 135 muestras de mieles colectadas en el norte de Irán, el 14.07 % contenían tetraciclina con concentraciones entre 0.5 a 6.5 ng g^{-1} .

3.5.2. Estreptomicinas

La estreptomicina (STR) es un antibiótico producido por *Streptomyces griseus*, y el primer fármaco descubierto de la clase llamada aminoglucósido (Wentz *et al.*, 2019). Es ampliamente utilizada en las prácticas médicas y veterinarias para tratar infecciones de bacterias Gram negativas, estas ocasionan enfermedades en las abejas; su uso incorrecto o el hecho de no observar el tiempo de retiro después del tratamiento, puede conducir a la presencia de residuos, y pueden provocar efectos tóxicos directos en los consumidores, o reacciones alérgicas a las personas sensibles a los antibióticos (Granja *et al.*, 2009).

Debido a su bajo costo, buena eficacia y efectivo desempeño bactericida, la STR ha sido ampliamente utilizada en de la agricultura y en productos acuáticos como aditivos alimenticios o agentes terapéuticos, sin embargo, el abuso de STR ha causado serios problemas residuales, la ingesta a largo plazo de residuos de STR puede poner en peligro la salud humana, causar el desequilibrio de la microbiota intestinal, alergias o shock en personas sensibles e incluso dañar los riñones en los bebés (Sun *et al.*, 2019).

Por lo tanto, para proteger la salud humana contra los peligros de los residuos de STR, ciertas organizaciones establecieron el LMR para algunos productos alimenticios, por ejemplo, la Comisión Europea estipuló que los LMR para STR en la leche, riñón y músculo porcino son 200, 1,000 y 500 mg kg^{-1} respectivamente (He *et al.*, 2016).

En el 2022, Rama *et al.* realizaron un estudio para la cuantificación de estreptomicina utilizando el método de ensayo inmuno-absorbente ligado a enzimas (ELISA) utilizando el kit de prueba “*I'screen STREPTO*”, donde analizaron miel producida localmente e importada en la zona de Kosovo, de las cuales se recolectaron 155 muestras, donde se

encontraron 45 muestras contaminadas con residuos de estreptomicina de entre los 2.1 y 9.78 ng mL⁻¹.

3.5.3. Sulfonamidas

Las sulfonamidas son agentes bacteriostáticos sintéticos de amplio espectro que se utilizan contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como contra protozoos en terapia humana y veterinaria. Son muy buenos agentes terapéuticos y de fácil acceso, lo que ocasiona un uso excesivo y presencia de residuos de sulfonamidas en alimentos de origen animal (leche, carne, huevos, pescado o miel) (Dluhošová *et al.*, 2018).

Se emplean en la apicultura para la prevención y el tratamiento de las enfermedades bacterianas de las abejas, como la enfermedad de loque americano y el loque europeo, pero su utilización puede causar una acumulación de residuos en la miel, lo cual es de gran preocupación debido a su contribución en el desarrollo de bacterias patógenas resistentes a los antibióticos (Maudens *et al.*, 2004).

La presencia de sulfonamidas también puede causar reacciones alérgicas o tóxicas a los consumidores, por tal motivo, la UE ha establecido un LMR de 100 mg kg⁻¹ en alimentos de origen animal como en tejidos, leche y grasas; sin embargo, no han establecido ningún límite máximo de residuos para las sulfonamidas en la miel (Tölgyesi *et al.*, 2013).

Pero a pesar de estos LRM establecidos de sulfonamidas en alimentos, Kirkan *et al.* (2020), hicieron un estudio mediante cromatografía líquida no dirigida-acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS), en 13 muestras de mieles provenientes de la provincia de Bingöl, Turquía, donde 4 muestras dieron positivo a sulfametazina con concentraciones de 3.8 µg kg⁻¹, 0.96 µg kg⁻¹, 2.8 µg kg⁻¹, 5.1 µg kg⁻¹. También Er y Demirhan (2022) empleando la técnica analítica de cromatografía líquida con detector de masas triple cuadrupolo (LC-MS/MS), realizaron otro estudio en muestras de mieles comerciales provenientes de mercados locales de Ankara, Turquía, donde se encontraron también residuos de sulfametazina con concentraciones entre 1.22 y 6.18 µg kg⁻¹.

En otra investigación realizada por Popa *et al.* (2012), analizaron 12 muestras provenientes de diferentes regiones geográficas de Rumania, empleando la tecnología BAT (Biochip Array Technology) por sus siglas en inglés, donde dos muestras dieron positivo a varias sulfonamidas, la primera contenía sulfadiazina, sulfametacina, sulfatiazol y sulfametizol, con concentraciones entre 11.4 y 51.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$. En la segunda muestra encontraron la presencia de las mismas sulfonamidas, pero con concentraciones que oscilaban entre 9.2 y 68.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

También Tian *et al.* (2013), en un estudio realizado a 50 muestras de mieles, obtenidas en súper mercados de China, utilizando el método espectrométrico de cromatografía líquida en tándem (LC-MS-MS), encontraron residuos de sulfonamidas en 6 muestras, las cuales contenían niveles de concentración entre 2 y 75 mg kg^{-1}

3.5.4. Cloranfenicol

Entre los diversos antibióticos disponibles, el cloranfenicol se ha utilizado ampliamente en la medicina veterinaria, por su actividad de amplio espectro en contra de una amplia variedad de patógenos, y se aisló originalmente de la bacteria *Streptomyces venezuelae*, que es eficaz contra una amplia gama de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Campone *et al.*, 2019).

Debido a su alta toxicidad y efectos secundarios en seres humanos y animales, el uso de cloranfenicol fue prohibido en la UE, ya que tiene efectos secundarios graves, pues tienen la capacidad de formar agranulocitosis y anemia aplásica, por tal motivo la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) incluyó al cloranfenicol en el grupo 2A (moléculas potencialmente cancerígenas para los seres humanos), como consecuencia, las agencias reguladoras establecieron reglas estrictas con respecto al uso de cloranfenicol en los alimentos con el fin de reducir los problemas de salud pública (Rizzo *et al.*, 2020).

Sin embargo, en Suiza, un estudio con 75 muestras de mieles, 34 procedentes de países asiáticos, fueron analizadas con un método de cromatografía de líquidos con detección de espectrometría de masas en tándem (LC-MS-MS), mostró que 13 muestras contenían

residuos de cloranfenicol, las concentraciones medidas se situaron entre 0.4, 6, 0.8, 0.9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ justo por debajo del LMR suizo y dos muestras que contenían aproximadamente 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Ortelli *et al.*, 2004). En otro estudio realizado mediante un método inmunoquímico como alternativa para detectar cloranfenicol en miel utilizando la Tecnología Biochip, se analizaron 16 muestras de mieles provenientes de diferentes regiones de Rumania, las cuales dieron positivo a cloranfenicol, donde sus concentraciones oscilan entre 0.79 y 3.07 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Morariu *et al.*, 2019). También Tian *et al.*, en el 2013 encontraron, con la técnica cromatográfica LC-MS-MS, residuos de cloranfenicol en 4 de 50 muestras de mieles, obtenidas en supermercados de china, las cuales contenían una concentración que oscilaban entre los 0.30 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

3.6. Legislaciones

La salud humana está directamente relacionada con el medio ambiente y, en particular, con la naturaleza y calidad de los alimentos, los plaguicidas y otros productos químicos utilizados en la producción agrícola o alimentaria, además de los medicamentos de uso veterinario pueden estar presentes como residuos en los alimentos y, por tanto, inducen un posible problema de salud pública (Ortelli *et al.*, 2018).

En Europa, las abejas se consideran animales productores de alimentos y, por lo tanto, los productos de la colmena deben cumplir con la legislación sobre residuos de sustancias farmacológicamente activas, actualmente, el Reglamento de la Comisión N° 37/2010 de la UE, no ha establecido LMR para sustancias antimicrobianas en la miel y, por tanto, el uso de antibióticos en la apicultura no está permitido en la Unión Europea, la ausencia de Límites Máximos de Residuos significa, por tanto, "tolerancia cero" para los residuos de antibióticos en la miel (Savarino *et al.*, 2020).

De igual manera, el Codex Alimentarius, Norma para la miel CXS 12-198, especifica que la miel no deberá contener ningún ingrediente adicional, ni tampoco adición alguna que no sea propia de la misma. También en la Norma Oficial Mexicana NOM-004-SAG/GAN-2018, Producción de miel y especificaciones, cita que "La miel no deberá contener ningún aditivo como colorante, saborizantes, conservadores e inhibidores microbianos". Lo cual indica que, para los residuos de antibióticos, hay un límite de tolerancia cero en mieles.

3.7. Clasificación de métodos para la identificación de antibióticos en mieles

Los métodos para la determinación de antibióticos en mieles se pueden dividir en cualitativos y cuantitativos. Los métodos cualitativos incluyen a los análisis microbiológicos, inmunoquímicos o inmunoenzimáticos (ELISA). Mientras que dentro de las pruebas cuantitativas se incluyen la Cromatografía de Gases (GC) y la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) acopladas con detección de fluorescencia o espectrometría de masas (Jaksic *et al.*, 2017).

Por ejemplo, en el 2010, Wen-Hsien *et al.*, desarrollaron un método de extracción líquido-líquido asistido por endulzamiento combinado con cromatografía líquida de alto rendimiento con detección de fluorescencia (HPLC-FL), para determinar las concentraciones de sulfonamidas en mieles, las cuales obtuvieron recuperaciones del 80.9 y 99.6 % en mieles fortificadas entre los niveles 5, 20 y 100 ng g⁻¹. También Tomás *et al.*, en el 2005 desarrollaron otro método analítico para la determinación de siete antibióticos de sulfonamidas en mieles, empleando la técnica de cromatografía líquida en tándem (LC-MS/MS), donde fortificaron mieles con concentraciones de sulfonamidas de 5, 25, 50 y 100 µg kg⁻¹ de las cuales las recuperaciones de todos los antibióticos variaron de 84 a 112 % con un promedio del 100 %.

Otra técnica para la identificación de sulfonamidas en mieles, es la desarrollada por Catelani *et al.*, en el 2014, que consiste en un método de detección rápido y simple para la determinación de sulfonamidas en muestras de miel mediante análisis de inyección de flujo (FIA) acoplado a una célula capilar de guía de onda líquida (LWCC), donde se añadieron concentraciones de 80, 100 y 115 µg kg⁻¹ de sulfaquinoxalina de las cuales el porcentaje de recuperación estuvo entre los porcentajes 88 y el 112 %. Mahmoudi *et al.* (2014b), emplearon la técnica inmunoenzimática (ELISA) para calificar y cuantificar la contaminación de muestras de miel con oxitetraciclina, la cual mostró que, de 145 muestras, 34 muestras eran positivas con concentraciones mínimas y máximas entre 5.32 y 369.1 ng g⁻¹.

Muriano *et al.* (2013), desarrollaron una técnica para la detección de sulfonamidas en mieles, un magnetoinmunisensor electroquímico (EMIS) el cual es capaz de detectar

hasta diez diferentes sulfonamidas por debajo de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. Por otra parte, Cervera-Chiner *et al.*, en el 2020, emplearon un inmunosensor piezoeléctrico basado en la tecnología por sus siglas en inglés HFF-QCMD (High Fundamental Frequency Quartz Crystal Microbalance) para la determinación de sulfatiazol en miel, en cual obtuvieron límites de detección de $0.10 \mu\text{g kg}^{-1}$ y $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ de cuantificación.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Colecta de las muestras de miel

Las muestras de miel se colectaron en apiarios, que se seleccionaron de acuerdo con el Padrón de Apicultores registrados en la SAGARPA (2019). Se almacenaron a temperatura ambiente, en el Laboratorio de Alimentos del Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, hasta su análisis para la detección de sulfonamidas que se desarrolló en el Laboratorio de Proteómica del Instituto de Ecología A.C. en Xalapa, Veracruz. Las mieles procedieron de las diferentes regiones del estado de Tabasco (Centro, Chontalpa, Ríos, Pantanos y Sierra) correspondientes a la cosecha de primavera de 2021 (Cuadro 6).

Cuadro 6. Datos de las muestras colectadas de mieles.

Núm. De muestra	Nombre del apicultor	Municipio	Apiario	Tipo de floración
2	Dulvi Balan Landero	Tenosique	El naranjal	Multifloral
2	Marcelino Vázquez Vázquez	Balancán	La reina del sur	Multifloral
1	Ana María Castillo Córdoba	Huimanguillo	El refugio de Ani	Multifloral
3	Héctor Capetillo Martínez	Balancán	San José	Multifloral
3	Emmary Rachell Torres Guadarrama	Jalapa	Los Mangos	Multifloral
2	Manuela Pérez Flores	Tenosique	Las rosas	Multifloral

4.2. Determinación de sulfonamidas en mieles

Para el estudio de sulfonamidas se emplearon las metodologías descritas por Primus *et al.* (2007); Krivohlavek *et al.* (2005), los reactivos utilizados fueron: Agua desionizada, Fosfato dibásico de potasio (Fisher Scientific, Denver, CO), Acetonitrilo, Metanol, Agua ultrapura, estándares de Sulfadoxina (Sigma-Aldrich) y Sulfadimetoxina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Todos los reactivos fueron de grado analítico HPLC.

4.2.1 Método de extracción

Para la preparación de la muestra, concentración de los residuos de antibióticos y posterior análisis se siguieron las técnicas propuestas por los autores Primus *et al.* (2007); Krivohlavek *et al.* (2005). Así mismo, se hicieron modificaciones, donde únicamente se redujo la cantidad de muestra a pesar, la cantidad de solventes a utilizar y el tiempo de mezclado. Dicha extracción se aplicó de la siguiente manera:

4.2.2. Extracción y limpieza de la muestra

Se pesaron 5 g de miel y se mezclaron con 5 mL de HCl 0.2 M durante 10 minutos en un agitador magnético a 25° C. Se ajustó el pH a 6.5 con una solución de fosfato dibásico de sodio (pH 12). La mezcla homogeneizada se filtró a través de un embudo con papel filtro y se realizó la misma operación una vez más.

Los extractos combinados se transfirieron a un embudo de separación de 500 mL. Se añadieron 25 mL de agua destilada con pH ajustado con hidróxido de amonio al 0.28 %.

El embudo de separación se agitó vigorosamente y el filtrado se dejó separar en dos fases. La fase acuosa se descartó. La operación se repitió dos veces con 25 mL de agua destilada básica (pH 10).

Se colocó 5 g de sulfato de sodio anhídrido en un embudo tapado con un papel filtro y la fase resultante de la separación se filtró. El extracto combinado se concentró por evaporación a sequedad en una estufa a 50°C.

El residuo obtenido se disolvió en 5 mL de acetona, se filtró en un filtro de nailon de 0.45 µm. La muestra se analizó por UHPLC

4.2.3. Preparación de estándares

Se pesaron 0.5 µg de cada estándar y se aforaron a 1 mL con acetona, a concentración de 0.5 µg mL⁻¹, se pasaron por el filtro de nailon de 0.45 µm y se almacenaron en un refrigerador a 8 °C, en oscuridad hasta su análisis.

4.3. Análisis de las muestras

4.3.1. Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (UHPLC)

Se utilizó un UHPLC Vanquish Flex de la marca Thermo Fisher Scientific acoplado a un detector UV. Se trabajó con una columna de fase reversa Hypersil Gold, 5 micras, 4.6 mm x 150 mm.

4.3.2. Condiciones Cromatográficas

Las condiciones cromatográficas: la fase móvil fue acetonitrilo-agua (80:20, v/v) ajustado con hidróxido de amonio 0.28 % a pH 9, a una velocidad de flujo de 1 mL min⁻¹. Los compuestos se analizaron en condiciones óptimas, por lo que se usó la longitud de onda de 270 nm para cada analito.

4.3.3. Curva de calibración

Para la realización de la curva de calibración se utilizaron las condiciones cromatográficas previamente establecidas. Se tomaron concentraciones de 0, 0.001, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5 µg µL⁻¹ de cada estándar. Donde posteriormente se utilizó la ecuación resultante $y = mx + b$ para el cálculo de los estándares.

4.3.4. Análisis de muestras de miel en UHPLC

Se analizaron 13 muestras de miel de la siguiente manera:

Cada muestra fue analizada por duplicado, el procedimiento se llevó a cabo de manera manual. Las diferentes concentraciones fueron preparadas en viales eppendorf de 3 mL, del cual se tomaron alícuotas de 50 µL que se inyectaron en el UHPLC (Vanquish Flex), acoplado a un detector UV. La separación cromatográfica se realizó en una columna de fase reversa Hypersil Gold de 5 micras, 4.6 mm x 150 mm a una temperatura de 35 °C.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Curva de calibración

En ambos estándares se obtuvieron coeficientes de determinación (r^2) de 0.9851 para la sulfadoxina y 0.9865 para la sulfadimetoxina respectivamente (Figura 1).

Con las curvas de calibración obtenidas y sus ecuaciones correspondientes, se cuantificó la concentración de los residuos de antibióticos en las muestras analizadas.

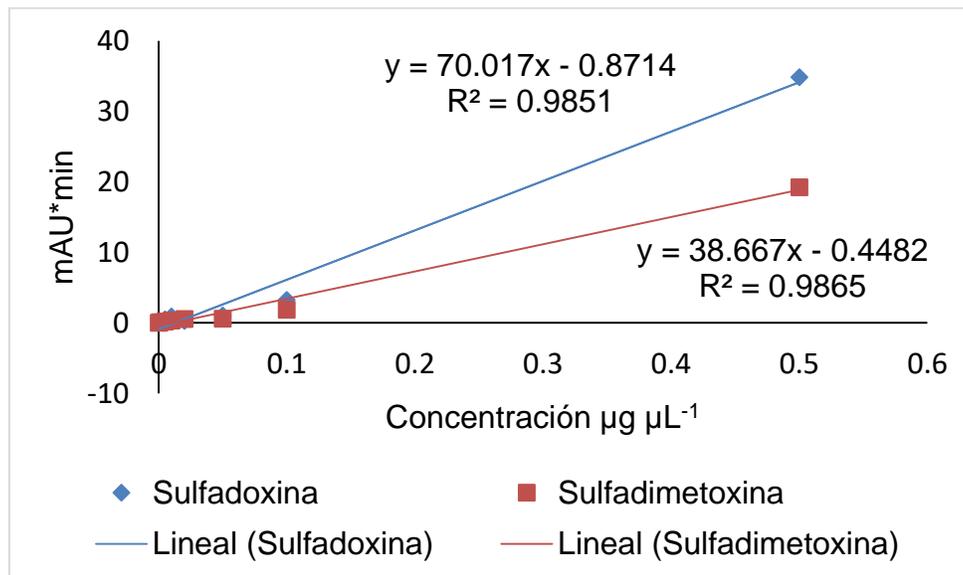


Figura 1.- Curva de calibración estándar de sulfadoxina y sulfadimetoxina obtenida en un UHPLC.

5.2. Resultados de las muestras analizadas

Para la determinación de sulfadoxina y sulfadimetoxina, la longitud de onda se ajustó a los 270 nm para los estándares con concentración conocida, y se obtuvieron picos con tiempos de retención (t_r) de 16.512 minutos para el estándar de sulfadoxina (Anexo 8.1), mientras que para la sulfadimetoxina se obtuvieron tiempos de retención (t_r), de 21.528 minutos (Anexo 8.1).

Posteriormente de que se obtuvieron los tiempos de retención de los estándares, se procedió a analizar un total de 13 muestras de mieles. Las cuales dieron positivo para

sulfonamidas, mostrando en el cromatograma picos con tiempo de retención (t_r) de 16.178 minutos para sulfadoxina (anexo 8.2), mientras que para sulfadimetoxina se obtuvieron tiempos de retención (t_r) de 20.378 minutos (anexo 8.3).

Para el cálculo de las concentraciones de sulfadoxina y sulfadimetoxina, se tomó en cuenta la altura del pico del estándar en relación a su concentración, la altura del pico de la muestra, el volumen de inyección y el volumen de resuspensión, quedando expresada de la siguiente manera:

$$\frac{[(AM)(CE)/(AE)(VR)]}{(VI)}$$

Dónde: AM: Altura Muestra, CE: Concentración Estándar, AE: Altura Estándar, VR: Volumen de Resuspensión, VI: Volumen de Inyección.

De las 13 muestras analizadas de miel, nueve contenían residuos de sulfadoxina y en todas había residuos de sulfadimetoxina a niveles trazas (Cuadro 7).

Cuadro 7.- Concentración de sulfonamidas en mieles Tabasqueñas

Muestra	Sulfadoxina Sulfadimetoxina	
	µg mL ⁻¹	
A	6.317	12.6
B	0.05228	1.019
C	0.7193	0.6983
D	ND*	0.9228
E	0.1972	1.137
F	ND*	1.969
G	ND*	4.282
H	ND*	1.009
I	0.03157	2.103
J	0.03476	0.4236
K	0.07133	0.2029
L	2.211	0.0422
M	0.2413	0.221

ND* No detectado

La presencia de ambos antibióticos en las muestras de mieles colectadas, aunque sea a nivel de trazas, no cumple con las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana, NOM-004-SAG/GAN-2018, Producción de miel y especificaciones, ya que dicha NOM, especifica que la miel no deberá contener ningún inhibidor microbiano, y no deberían ser comercializadas, y mucho menos consumidas. Por otro lado, estas mieles deberían ser monitoreadas dentro del Programa Nacional de Control y Monitoreo de Residuos Tóxicos del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural que estipula que las mieles con presencia de sulfonamidas, como sulfadoxina y sulfadimetoxina, serán monitoreados para su control.

Independientemente de la Norma Oficial Mexicana NOM-004-SAG/GAN-2018, la Unión Europea (EU), en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas, en la Directiva 2001/110/CE del 20 de diciembre de 2001, relativa a la miel, también estipula que la composición miel debe estar exenta, en la medida de lo posible de materias orgánicas e inorgánicas ajenas a su composición, lo que indica que hay un nivel de tolerancia cero, de residuos de antibióticos en mieles. Por lo tanto, aunque los niveles de sulfadoxina y sulfadimetoxina sean a nivel de trazas, incumplen con las normas antes mencionadas.

5.3. Discusión

La presencia de contaminantes en los alimentos es de suma importancia porque representa un riesgo para la salud, por tal motivo las autoridades reguladoras en el tema de la seguridad alimentaria implementan normas para garantizar la inocuidad en los alimentos y que no representen un riesgo para los consumidores. Sin embargo, a pesar de las leyes existentes, en el mundo hay una gran variedad de investigaciones realizadas sobre la incidencia de antibióticos en mieles.

En las 13 muestras de mieles analizadas en esta investigación, se encontró la presencia de sulfadoxina con concentraciones entre 0.03476 y 6.37 $\mu\text{g mL}^{-1}$, también se obtuvo la presencia de sulfadimetoxina con concentraciones entre 0.221 y 12.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Estos valores son menores que los hallados por Krivohlavek *et al.* (2005), en mieles europeas, provenientes de distintas regiones de Croacia, ya que reportaron que sus muestras

contenían sulfametoxazol con concentraciones entre 25 y 62 $\mu\text{g kg}^{-1}$, sulfadimetoxina con 92 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y para sulfametizol 39 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Lo que indica que las mieles croatas tienen un índice de contaminación mayor que las mieles Tabasqueñas.

Sin embargo, a parte de las mieles de las regiones Tabasqueñas (Centro, Chontalpa, Ríos, Pantanos y Sierra) las Croatas no son las únicas exentas de residuos de antibióticos, Galarini *et al.* (2015) investigaron en 74 muestras de mieles de diferentes orígenes botánicos y geográficos, recolectadas del mercado italiano, encontrando que nueve de ellas, presentaron niveles traza de sulfonamidas mayores que las de Tabasco, con concentraciones entre 0.3 y 1.7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de sulfatiazol y 0.2 a 1.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de sulfadimetoxina. La presencia de estos antibióticos en de Italia y Tabasco, es un indicativo de inadecuadas prácticas de producción apícolas a nivel estatal (caso Tabasco) y a nivel internacional, aunque las concentraciones encontradas en las mieles sean diferentes.

Otro caso de contaminación, relacionado con sulfonamidas al igual que en las mieles tabasqueñas, es el de Kaufmann *et al.* (2002), donde 106 muestras analizadas de mieles, obtenidas del mercado Suizo, 12 resultaron positivas, siendo la sulfanilamida el antibiótico más detectado, con ocho muestras positivas, sin embargo; la mayoría de las muestras contenían menos de 0.05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de esta sustancia, aunque habían mieles con 0.6, 2 e incluso 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfatiazol, y lo que esto indica, es que no solo se puede encontrar sulfadoxina y sulfadimetoxina en mieles de Tabasco, sino también sulfanilamida y sulfatiazol, como en las Suizas.

Aparte de las mieles Tabasqueñas y Suizas contaminadas, las de origen griego, analizadas en el 2012, también mostraron concentraciones entre 5.3 y 5.9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de sulfatiazol y de sulfametoxazol de 1.8 y 3.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente (Economou *et al.*, 2012), aunque sean diferentes sulfonamidas que las reportadas en las mieles de los municipios de Tabasco, ambas están contaminadas por antibióticos, lo que demuestra que pueden haber más de un antibiótico presente en las mieles.

Por ejemplo, Ahmed *et al.* (2022), revelaron que algunas muestras de mieles provenientes de las regiones de Beheira e Ismailia en Libia, Egipto y Arabia Saudita,

contenían sulfametazina y sulfametoxazol con concentraciones inferiores a $52 \mu\text{g kg}^{-1}$, pero superiores a los niveles trazas de sulfadoxina y sulfadimetoxina encontrados en las muestras de mieles analizadas en los municipios de Tenosique, Balancán, Huimanguillo y Jalapa del estado de Tabasco. Estos investigadores, también hallaron una alta incidencia en muestras de mieles de las regiones de Gharbia y Giza en Egipto de sulfametazina y sulfametoxazol con concentraciones de 23.5 y $86.9 \mu\text{g kg}^{-1}$.

A pesar de que las concentraciones de las sulfonamidas sulfadoxina y sulfadimetoxina encontradas en las mieles pertenecientes a algunos municipios de Tabasco, son inferiores en comparación a los resultados obtenidos por los autores antes mencionados, en mieles de otras regiones del mundo, aun se necesita realizar una investigación más amplia para la determinación de una gama más amplia de antibióticos en mieles mexicanas, ya que actualmente existe muy pocos estudios sobre la incidencia de estos contaminantes farmacológicos. Está claro que a pesar de que las concentraciones encontradas en esta investigación sean mínimas, estas mieles no son aptas para su exportación, pues no cumplen con la normativa de la Norma Oficial Mexicana ni la del Diario Oficial de las Comunidades Europeas, en la Directiva 2001/110/CE del Consejo, de 20 de diciembre de 2001, relativa a la miel y mucho menos deberían ser ingeridas por los peligros que representan en la salud de los consumidores.

5.4. Prueba de hipótesis

Debido a los datos obtenidos de las muestras de mieles analizadas que fueron colectadas de diferentes regiones del estado de Tabasco, se acepta la hipótesis planteada en esta investigación, ya que, en las muestras de mieles, se encontraron residuos de antibióticos de las sulfonamidas (sulfadoxina y sulfadimetoxina), las cuales incumplen con la Norma Oficial Mexicana, NOM-004-SAG/GAN-2018, Producción de miel y especificaciones y la norma extranjera del Diario Oficial de las Comunidades Europeas, en la Directiva 2001/110/CE del Consejo, de 20 de diciembre de 2001, relativa a la miel.

VI. CONCLUSIONES

En las muestras de mieles analizadas, de origen multifloral, pertenecientes a la cosecha del año 2021, solo se encontró sulfadoxina en nueve muestras, mientras que en las trece muestras se encontró sulfadimetoxina, por lo tanto, dado que la presencia de contaminantes en mieles está prohibida en la norma mexicana y en la europea, ninguna de las mieles analizadas es inocua, y no debería ser comercializada porque representa un riesgo para la salud los consumidores.

La linealidad del sistema analítico empleado (UHPLC-UV), presento un coeficiente de determinación de (r^2) de 0.9851 para la sulfadoxina y 0.9865 para la sulfadimetoxina, en un rango de concentraciones de (0 a $0.5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) los cuales no son aceptables, debido a la sensibilidad del equipo analítico para la cuantificación de sulfonamidas a nivel de trazas en las muestras de miel analizadas. Se recomienda emplear un método de detección de mayor sensibilidad, para obtener determinaciones cuantitativas más exactas.

VII. LITERATURA CITADA

- Ahmed M. B. M., Taha A. A., & Mehaya F. M. S. (2022). Method validation and risk assessment for sulfonamides and tetracyclines in bees honey from Egypt, Libya and Saudi Arabia. *Environ Geochem Health*, <https://doi.org/10.1007/s10653-022-01258-0>
- Albaridi, N. A. (2019). Antibacterial Potency of Honey. *International Journal of Microbiology*, 2019, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2019/2464507>
- Álvarez-Sánchez J. M. (2017). Bee products chemical and biological properties. (1st. Ed.), *Springer*. Cham, Switzerland. 301 p.
- Álvarez-Suarez J. M., Gasparrini M., Forbes-Hernández T. Y., Mazzoni L., & Giampieri F. (2014). The composition and biological activity of honey: A focus on Manuka honey. *Foods*, 3(3), 420-432. Doi: [10.3390/foods3030420](https://doi.org/10.3390/foods3030420)
- Álvarez Rodríguez A.; Santos Santos E.; Suárez Torres S.; Correa Benítez A.; Ramos Cuellar A. K. (2017). Identificación y cuantificación de sulfamidas en diferentes muestras de miel de abeja en México por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC). Colección Memorias de los Congresos de la Sociedad Química de México. 52° Congreso Mexicano de Química y 36° Congreso Nacional de Educación Química.
- Al-Waili N., Salom K., Al-Ghamdi A., & Javed Ansari M. (2012). Antibiotic, pesticide, and microbial contaminants of honey: human health hazards. *The Scientific World Journal*, 12, 1-9. <https://doi.org/10.1100/2012/930849>
- Arabsorkhi B., & Sereshti H. (2018). Determination of tetracycline and cefotaxime residues in honey by micro-solid phase extraction based on electrospun nanofibers coupled with HPLC. *Microchemical Journal*, 140, 241-247. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.04.030>
- Baglio E. (2018). Chemistry and technology of honey production. (1st Ed.), *Elsevier*. Cham, Switzerland. 40 p.
- Barrasso R., Bonerba E., Savarino A. E., Ceci E., Bozzo G., & Tantillo G. (2019). Simultaneous quantitative detection of six families of antibiotics in honey using a biochip multi-array technology. *Veterinary sciences*, 6(1), 1-10. <https://doi.org/10.3390/vetsci6010001>
- Bocian A., Buczkowicz J., Jaromin M., Hus K. K., & Legáth J. (2019). An effective method of isolating honey proteins. *Molecules*, 24(13), 1-10. <https://doi.org/10.3390/molecules24132399>

- Campono L., Celano R., Piccinelli A. L., Pagano I., Cicero N., Sanzo R. D., Carabetta S., Russo M., & Rastrelli L. (2019). Ultrasound assisted dispersive liquid-liquid microextraction for fast and accurate analysis of chloramphenicol in honey. *Food Research International*, 115(1), 572-579. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.006>
- Carreck N. L. (2018). Special issue: honey. *Journal of Apicultural Research*, 57(1),1-4. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1412565>
- Catelani T. A., Tóth I. V., Lima J. L. C., Pezza L., & Pezza Redigolo H. (2014). A simple and rapid screening method for sulfonamides in honey using a flow injection system coupled to a liquid waveguide capillary cell. *Talanta*, (121), 281-287. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.12.034>
- Cervera-Chiner L., Jiménez Y., Montoya Á., Juan-Borrás M., Pascual N., Arnau A., & Escriche I. (2020). High fundamental frequency quartz cristal microbalance (HFF-QCMD) immunosensor for detección of sulfathiazole in honey. *Food Control*, 115(2020), 107296. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107296>
- Chen W., Whang S., Wu Y., Shen X., Xu S., Guo Z., Zhang R., & Xing D. (2020). The physiologic activity and mechanism of quercetin-like natural plant flavonoids. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(8), 654-658. <https://doi.org/10.2174/1389201021666200212093130>
- Chua L. S., Lee J. Y., & Chan G. F. (2015). Characterization of the proteins in honey. *Analytical Letters*, (48), 697-709. <https://doi.org/10.1080/00032719.2014.952374>
- Cianciosi D., Forbes-Hernández T. Y., Afrin S., Gasparri M., Reboredo-Rodríguez P., Manna P. P., Zhang J., Bravo L. L., Martínez F. S., Agudo T. P., Quiles J. L., Giampieri F., & Battino M. (2018). Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: a review. *Molecules*, 23(9), 1-20. <https://doi.org/10.3390/molecules23092322>
- Ciulu M., Solinas S., Floris I., Panzanelli A., Pilo M. I., Piu P. C., Spano N., & Sanna G. (2011). RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey. *Talanta*, 83(3), 924-929. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.10.059>
- Codex Alimentarius. (1981). Norma para la miel. CXS 12-19811. Adoptada en 1981. Revisada en 1987, 2001. Enmendada 2019. Disponible en: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B12-1981%252FCXS_012s.pdf
Accedido: 6 julio, 2022.
- Combs Jr. G. F. (2012). The vitamins, Fundamental aspects in nutrition and health. (4th Ed.), *Elsevier*. USA. 570 p.

- Contreras U. L. C., & Magaña Magaña M. A. (2018). Análisis FODA de la apicultura a pequeña escala en el Litoral Centro de Yucatán. *Revista de El Colegio de San Luis*, 8(16), 295-310.
- Da Silva P. M., Gauche C., Gonzaga L. V., Oliveira Costa A., & Fett R. (2015). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, (196), 309-323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>
- De-Melo A. M. M., Almeida-Muradian L. B., Sancho M. T., & Pascual-Maté A. (2018). Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of Apicultural Research*, 57(1), 5-37. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1338444>
- De la Fuente E., Ruiz-Matute A. I., Valencia-Barrera R. M., Sanz J., & Martínez Castro I. (2011). Carbohydrate composition of spanish unifloral honeys. *Food Chemistry*, 129(4), 1483-1489. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.121>
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Directiva 2001/110/CE del Consejo, de 20 de diciembre de 2001, relativa a la miel. Disponible en: [EUR-Lex - 32001L0110 - ES \(europa.eu\)](http://eur-lex.europa.eu/lexuris/ui.do?uri=CELEX:32001L0110-ES). Accedido: 6 Julio, 2022.
- Dluhošová S., Borkovcová I., Kaniová L., & Vorlová L. (2018). Sulfonamide Residues: Honey Quality in the Czech Market. *Journal of Food Quality*, (2018), 1-7. <https://doi.org/10.1155/2018/2939207>
- Donato-Capel L., Garica-Rodenas C. L., Pouteau E., Lehmann U., Srichuwong S., Erkner A., Kolodziejczk E., Hughes E., Wooster T. J., & Sagalowicz L. (2014). Technological means to modulate food digestion and physiological response. *Food Structures, Digestion and Health*, 389–422. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404610-8.00014-1>
- Džugan M., Tomczyk M., Sowa P., & Grabek-Lejko D. (2018). Antioxidant activity as biomarker of honey variety. *Molecules*. 23(8), 1-14. <https://doi.org/10.3390/molecules23082069>
- Economou A., Petraki O., Tsiipi D., & Botisi E. (2012). Determination of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of sulfonamides, trimethoprim and dapsone in honey and validation according to Commission Decision 2002/657/EC for banned compounds. *Talanta*, (97), 32-41. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.03.058>
- Er D. B., & Demirhan B. (2022). Detection of antibiotic residues in blossom honeys from different regions in Turkey by LC-MS/MS method. *Antibiotics*, 11(3), 357- 368. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030357>

- Erban T., Shcherbachenko E., Talacko P., & Harant K. (2019). The unique protein composition of honey revealed by comprehensive proteomic analysis: Allergens, venom-like proteins, antibacterial properties, royal jelly proteins, serine proteases, and their inhibitors. *Journal of natural products*, 82(5), 1217-1226. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00968>
- Fernández Uriel P. (2011). Dones del cielo. Abeja y miel en el mediterráneo antiguo. (1ra Ed.), *Universidad Nacional de Educación a Distancia*. Madrid, España. 280 p.
- Forsberg K. J., Patel S., Wencewicz T., & Dantas G. (2015). The tetracycline destructases: a novel family of tetracycline-inactivating enzymes. *Chemistry & Biology*, 22(7), 888-897. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.05.017>
- Galarini R., Saluti G., Giusepponi D., Rossi R., & Moretti S. (2015). Multiclass determination of 27 antibiotics in honey. *Food control*, (48), 12-24. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.048>
- García N. L. (2018). The current situation on the international honey market. *Journal Bee World*. 95(3), 89-94. <https://doi.org/10.1080/0005772X.2018.1483814>
- Gómez-Ramos M.M., Ucles S., Ferrer C., Fernández-Alba A. R., & Hernando M.D. (2019). Exploration of environmental contaminants in honeybees using GC-TOF-MS and GC-Orbitrap-MS. *Science of the Total Environment*, (647), 232-244. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.009>
- Granja R. M. M., Montes Niño A. M., Zucchetti R. A. M., Montes Niño R. E., Patel R., & Salerno A. G. (2009). Determination of streptomycin residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica*, 637(1-2), 64-67. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.01.006>
- Grossman T. H. (2016). Tetracycline antibiotics and resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(4), 1-24. <https://doi.org/10.1101%2Fcshperspect.a025387>
- Hasam S., Qarizada D., & Azizi M. (2020). A review: honey and its nutritional composition. *Asian Journal of Research in Biochemistry*, 7(3), 34-43. <https://doi.org/10.9734/ajrb/2020/v7i330142>
- He Q., Yan Y., Cheng N., Xue X., Wu L., & Cao W. (2016). Removal of streptomycin from honey by cation-exchange resin. *Journal of Residuals Science & Technology*, 13(1), 33-38. <https://doi.org/10.12783/ISSN.1544-8053%2F13%2F2%2FS6>
- Huang Y., Yan X., Zhao L., Qi X., Wang S., & Liang X. (2019). An aptamer cocktail-based electrochemical aptasensor for direct capture and rapid detection of tetracycline in honey. *Microchemical Journal*, (150), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104179>

- Jaksic S. M., Ratajac R. D., Prica N. B., Ápic J. B., Ljubojevic D. B., Zekic Stosic M. Z., & Zivkov Balos M. M. (2017) Methods of determination of antibiotic residues in honey. *Journal of Analytical Chemistry*, 7(4), 317-324. <https://doi.org/10.1134/S1061934818040044>
- Kamal M. A., & Klein P. (2011). Determination of sugars in honey by liquid chromatography. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18(1), 17-21. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2010.09.003>
- Kaufmann A., Roth S., Ryser S., Widmer M., & Guggisber D. (2002). Quantitative LC/MS-MS determination of sulfonamides and some other antibiotics in honey. *Journal of AOAC International*, 84(4), 853-860. <https://doi.org/10.1093/jaoac/85.4.853>
- Kedzierska-Matysek M., Florek M., Wolanciuk A., Barlowska J., & Litwinczuk Z. (2018). Concentration of minerals in nectar honeys from direct sale and retail in Poland. *Biological Trace Element Research*, (186), 579-588. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1315-0>
- Kirkan E., Tahir A. O., Bengü A. S., Hakiye A., Aslan H., Ciftci M., & Aydoğan C. (2020). Rapid determination of sulfonamide residues in honey samples using non-targeted liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Separation Science Plus*, 3(10), 451-459. <https://doi.org/10.1002/sscp.202000051>
- Korkmaz S. D., Kuplulu O., Iplikcioglu Cil G., & Akyuz E. (2017). Detection of sulfonamide and tetracycline antibiotic residues in Turkish pine honey. *International Journal of Food Properties*, 20(1), 50-55. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1288135>
- Krivohlavek A., Smit Z., Bastinac M., Zuntar I., & Plavsic-Plavsic F. (2005). The determination of sulfonamides in honey by high performance liquid chromatography--mass spectrometry method (LC/MS). *Journal of Separation Science*, 28(13), 1434–1439. <https://doi.org/10.1002/jssc.200400084>
- Kumar A., Singh Gill J. P., Singh Bedi J., Kumar Chhuneja P., & Kumar Amit. (2020). Determination of antibiotic residues in Indian honeys and assessment of potential risks to consumers. *Journal of Apicultural Research*, 59(1), 25-34. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1677000>
- Li B., & Webster T. J. (2018) Bacteria antibiotic resistance: new challenges and opportunities for implant-associated orthopaedic infections. *Journal of Orthopaedic Research*, 36(1), 22-32. <https://doi.org/10.1002/jor.23656>
- Mahmoudi R., Norian R., & Pajohi-Alamoti M. (2014a). Antibiotic residues in Iranian honey by Elisa. *International Journal of Food Properties*, 17(10), 2367-2373. <https://doi.org/10.1080/10942912.2013.809539>
- Mahmoudi R., Moosavy M., Norian R., Kazemi S., Mohammad Reza A. N., & Mardani K. (2014b). Detection of oxytetracycline residues in honey samples using ELISA and HPLC methods. *Pharmaceutical Sciences*, 19(4), 145-150.

- Majdinasab M., Yaqub M., Rahim A., Catanante G., Hayat A., & Marty J. L. (2017). An overview on recent progress in electrochemical biosensors for antimicrobial drug residues in animal-derived food. *Sensor*, 17(9), 1-21. <https://doi.org/10.3390/s17091947>
- Maudens K. E., Guo-Fang Z., & Lambert W. E. (2004). Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography*, 1047(1), 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.07.007>
- Minatel I. O., Borgues C. V., Ferreira M. I., Gomez Gomez H. A., Chen C. O., & Pereira Lima G. P. (2017). Phenolic Compounds: Functional properties, impact of processing and bioavailability. Biological Activity. (1st Ed.), *InTech*. Croatia. 211 p.
- Morariu I. D., Avasilcă L., Vieriu M., Cioancă A., & Hăncianu M. (2019). Immunochemical assay of chloramphenicol in honey. *Farmacia*, 67(2), 235-239. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2019.2.6>
- Muriano A., Pinacho D. G., Chabottaux V., Diserens J. M., Granier B., Stead S., Sánchez Baeza F., Pividori M. I., & Marco M. P. (2013). A portable electrochemical magnetoimmunosensor for detection of sulfonamide antimicrobials in honey. *Anal Bioanal Chem*, (405), 7885-7895. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7219-0>
- Nolan V. C., Harrison J., & Cox J. A. C. (2019). Dissecting the antimicrobial composition of honey. *Antibiotics*, 8(4), 1-16. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040251>
- Nollet L. M. L., & Toldrá F. (2012). Food analysis by HPLC. (3rd Ed.), *Taylor & Francis*. Bosa Roca, United States. 1078 p.
- NOM-004-SAG/GAN-2018. Norma Oficial Mexicana. Producción de miel y especificaciones. DOF, 29 de abril 2020. Disponible en: [DOF - Diario Oficial de la Federación](https://www.dof.gob.mx/). Accedido: 6 julio, 2022.
- Olas B. (2020). Honey and its phenolic compounds as an effective natural medicine for cardiovascular diseases in humans. *Nutrients*, 12(2), 283-297. <https://doi.org/10.3390/nu12020283>
- Ortelli D., Edder P., & Corvi C. (2004). Analysis of Chloramphenicol residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chromatographia*, 59, 61-64. <https://doi.org/10.1365/s10337-003-0132-5>
- Ortelli D., Spörri A. S., & Edde P. (2018). Veterinary drug residue in food of animal origin in Switzerland: A health concern?. *Chimia*, 72(10), 713-717. <https://doi.org/10.2533/chimia.2018.713>
- Özcan M. M., & Ölmez C. (2014). Some qualitative properties of different monofloral honeys. *Food Chemistry*, (163), 212-218. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.072>

- Pasupuleti V. R., Sammugam L., Ramesh N., & Gan S. H. (2017). Honey, propolis, and royal jelly: A comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017: 1-21. <https://doi.org/10.1155/2017/1259510>
- Popa Morariu I. D., Elena-Corina S., Matiut S., & Cuciureanu R. (2012). Method Validation for simultaneous, determination of 12 sulfonamides in honey using biochip array technology. *Farmacía*, 60(1), 143-154.
- Primus T. M., Jojola S. M., Robinson S. J., & Johnston J. J. (2007). Determination of sulfadimethoxine residues in skunk serum by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 30(14), 2095-2102. <https://doi.org/10.1080/10826070701435095>
- Rama A., Haziri I., Miftari I., Zuka A., Zhuri B., Latifi A., Hasani D., & Latifi F. (2022). Determination of streptomycin residue in imported and locally produced honey in Kosovo. *International Journal of Food Contamination*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1318821/v1>.
- Ramos Díaz A. L.; Pacheco López N. A. (2016). Producción y comercialización de miel y sus derivados en México: Desafíos y oportunidades para la exportación. *CIATEJ*. Mérida, México. pp. 21-22.
- Rizzo S., Russo M., Labra M., Campone L., & Rastrelli L. (2020). Determination of Chloramphenicol in Honey Using Salting-Out Assisted Liquid-Liquid Extraction Coupled with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Validation According to 2002/657 European Commission Decision. *Molecules*, 25(15), 1-13. <https://doi.org/10.3390/molecules25153481>
- Ruiz-Ruiz C. J., Matus-Basto A. J., Acereto-Escoffí P., & Segura-Campos M. R. (2017). Antioxidant and anti-inflammatory activities of phenolic compounds isolated from *Melipona beecheii* honey. *Food and Agricultural Immunology*, 28(6), 1424-1437. <https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1347148>
- SADER (Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural). 2022. Crecen producción y exportaciones de miel en México al cierre del 2021: Agricultura. Disponible en: <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/crecen-produccion-y-exportaciones-de-miel-en-mexico-al-cierre-de-2021-agricultura-293944?tab=#:~:text=los%20mercados%20internacionales,.Al%20cierre%20preliminar%20de%202021%2C%20la%20producci%C3%B3n%20de%20miel%20en,de%20Agricultura%20y%20Desarrollo%20Rural> Accedido: 16 Marzo, 2022.
- Saitta M., Di Bella G., Fede M. R., Lo Turco V., Giorgia Potorti A., Rando R., Ruso M. T., & Dugo G. (2017). Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry multi-residual analysis of contaminants in Italian honey samples. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 34(5), 800-808. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1292054>

- Saleh S. M., Mussaed A.M., & A-Hariri F. M. (2016). Determination of tetracycline and oxytetracycline residues in honey by high performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural Science and Technology B*, (6), 135-139. <https://doi.org/10.17265/2161-6264%2F2016.02.009>
- Santos-Buelga C., & González-Paramás A. M. (2017). Chemical composition of honey. Bee products – Chemical and Biological Properties. *Springer, Cham*, pp. 43-82
- Savarino A. E., Terio V., Barrasso R., Ceci E., Panseri S., Chiesa L. M., & Bonerba E. (2020). Occurrence of antibiotic residues in Apulian honey: potential risk of environmental pollution by antibiotics. *Italian Journal of Food Safety*, 9(1), 14-19. <https://doi.org/10.4081%2Fijfs.2020.8678>
- Sun Y., Han R., Dai Y., Zhu X., Liu H., Gao D., Lou C., Wang X., & Wei Q. (2019). Highly selective and sensitive streptomycin chemiluminescence sensor based on aptamer and G-quadruplex DNAzyme modified three-dimensional graphene composite. *Sensors and Actuators B: Chemical*. (301), 127122. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127122>
- Suto M., Kawashima H., & Nakamura Y. (2020). Determination of organic acids in honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Analytical Methods*, (13), 2249-2257. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01845-w>
- Theron M. M., & Rykers Lues J. F. (2010). Organic acids and food preservation. (1st Ed.), *Taylor & Francis*. London, UK. 340 p.
- Tian W., Gao L., Zhao Y., Peng W., & Chen Z. (2013). Simultaneous determination of metronidazole, chloramphenicol and 10 sulfonamide residues in honey by LC-MS/MS. *Analytical Methods*, (5), 1283-1288. <https://doi.org/10.1039/C2AY25998B>
- Tomás S., Thompson D., & Noot K. (2005). Determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 551 (1-2), 168-176. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.03.077>
- Tölgyesi Á., Berky R., Békési K., Fekete S., Fekete J., & Sharma V. K. (2013). Analysis of sulfonamide residues in real honey samples using liquid chromatography with fluorescence and tandem mass spectrometry detection. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 36(8), 1105-1125. <https://doi.org/10.1080/10826076.2012.685911>
- United States Department of Agriculture. (2020). *National Honey Report*, 40(10), 1-11.
- Wang S., Liu J., Yong., Chen Q., Zhang L., Dong Y., Su H., & Tan T. (2015). A direct competitive assay-based aptasen for sensitive determination of tetracycline residue in honey. *Talanta*, (131), 562-569. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.08.028>

- Wentz B. L. F., Dos Santos C., Almeida G. J., Moura D. J., Zimnoch S. J. H., & Brandelli A. (2019). Silica xerogels as novel streptomycin delivery platforms. *Journal of Drug Delivery Science and Tecnology*, (53), 101210. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101210>
- Wen-Hsien T., Hung-Yi C., Ho-Hsien C., Yuh-Wern W., Shou-Hsun C., & Tzou-Chi H. (2010). Application of sugaring-out extraction for the determination of sulfonamides in honey by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1217(49), 7812-7815. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.008>
- Zhang Y., Zhou W., Yan J., Liu M., Zhou Y., Shen X., Ma Y., Feng X., Yang J., & Li G. (2018). A review of the extraction and determination methods of thirteen essential vitamins to the human body: An update from 2010. *Molecules*, 23(6), 1484. <https://doi.org/10.3390/molecules23061484>

VIII. ANEXOS

8.1. ANEXO 1

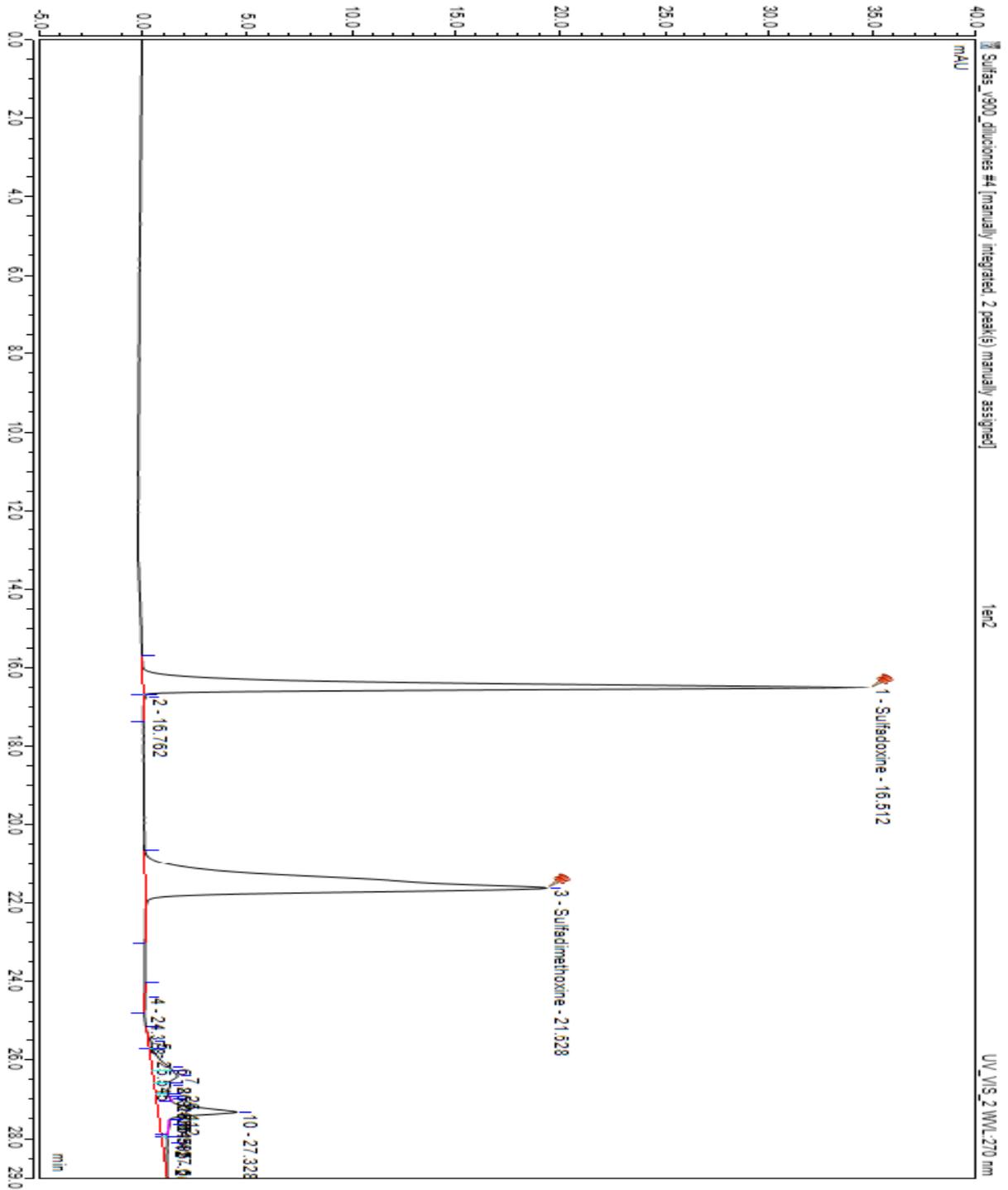


Figura 2.- Cromatograma de los estándares de sulfadoxina y sulfadimetoxina

8.2. ANEXO 2

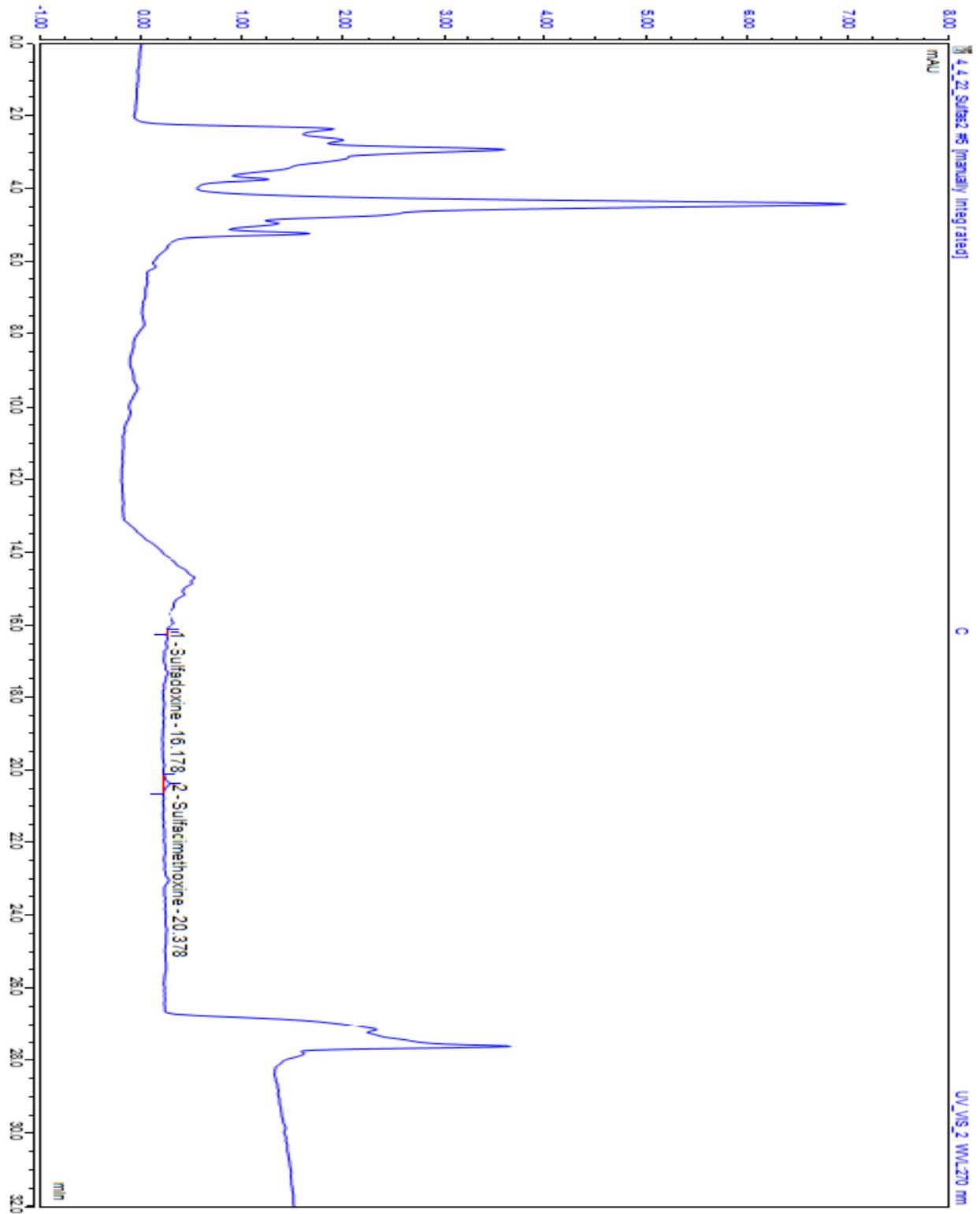


Figura 3.- Cromatograma de la muestra C de miel

8.3. ANEXO 3

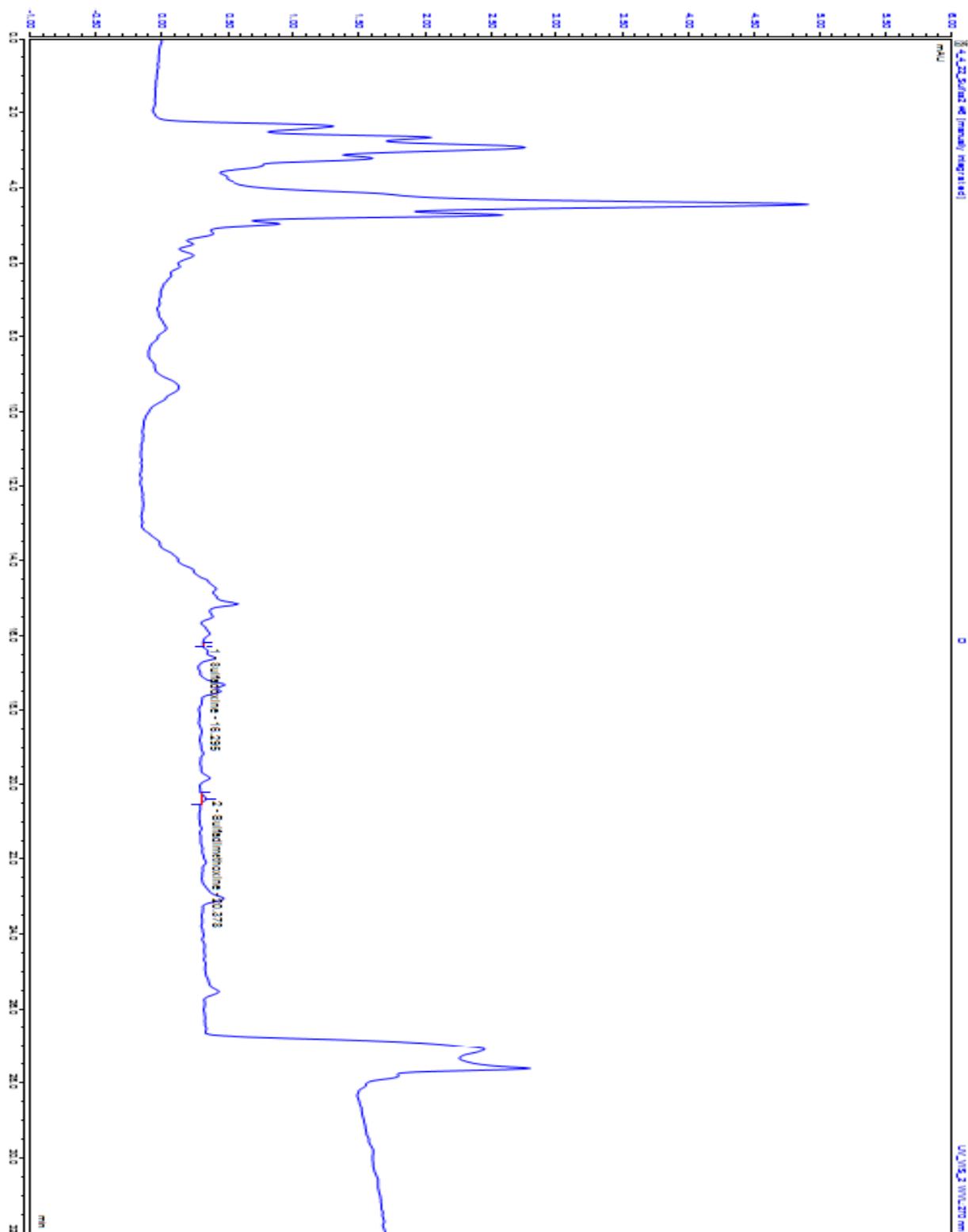


Figura 4.- Cromatograma de la muestra D de miel

8.4. ANEXO 4

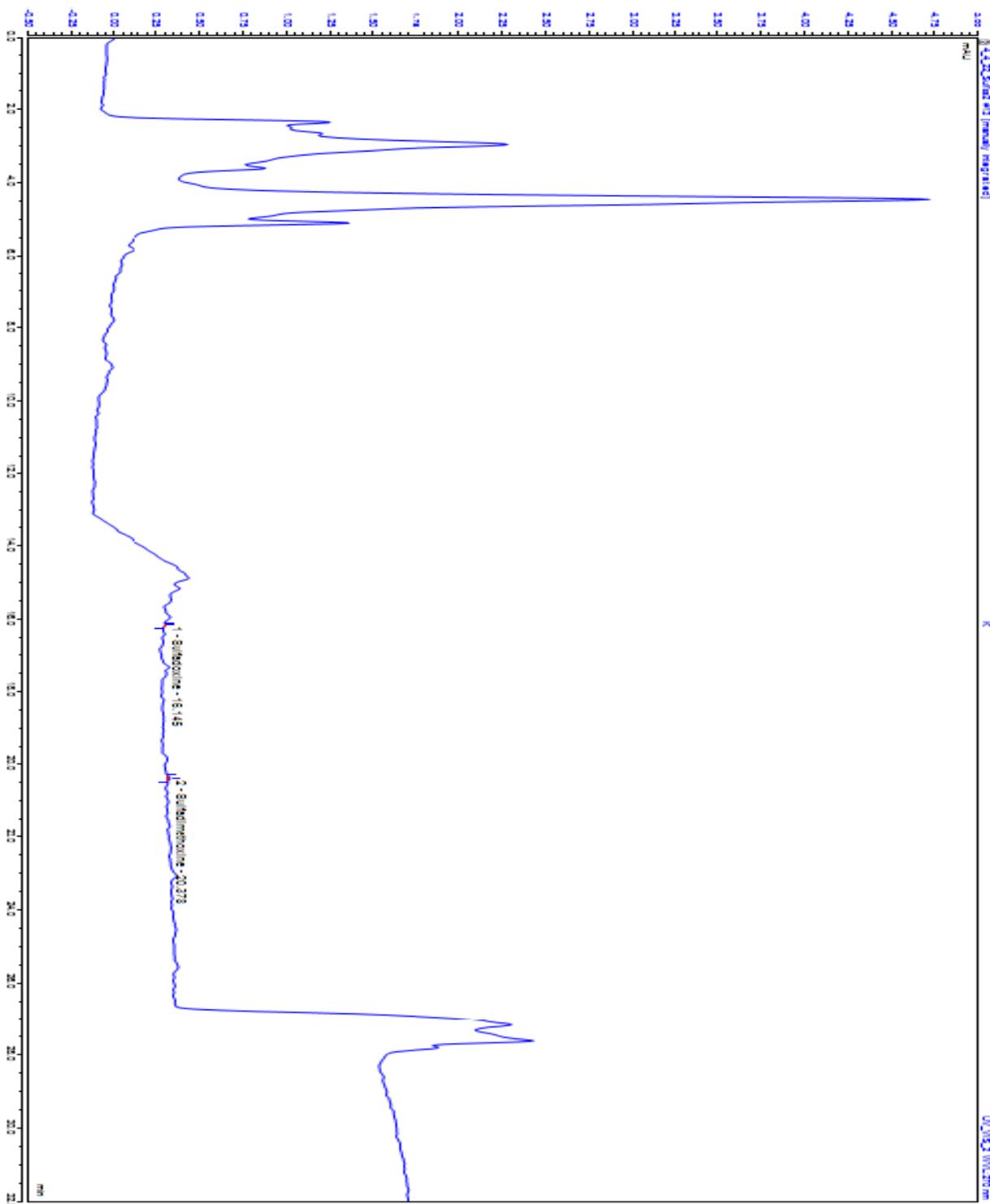


Figura 5.- Cromatograma de la muestra K de miel