



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS TABASCO**

**PROGRAMA PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO**

**DETECCIÓN DE RESIDUOS DE ACARICIDAS EN MIELES DEL ESTADO  
DE TABASCO**

**CHRISTIAN ORLANDO ÁLVAREZ SÁNCHEZ**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO**

**2019**



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas  
Campeche-Córdoba-Montecillo-Puebla-San Luis Potosí-Tabasco-Veracruz

## CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR

### Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **CHRISTIAN ORLANDO ÁLVAREZ SÁNCHEZ**, alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección del Profesor **JUAN MANUEL ZALDÍVAR CRUZ**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **DETECCIÓN DE RESIDUOS DE ACARICIAS EN MIELES DEL ESTADO DE TABASCO** y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

H. Cárdenas, Tabasco, a 28 de junio de 2019.

  
Christian Orlando Álvarez Sánchez

Firma

  
Dr. Juan Manuel Zaldívar Cruz

Vo. Bo. Profesor Consejero

La presente tesis, titulada “DETECCIÓN DE RESIDUOS DE ACARICIDAS EN MIELES DEL ESTADO DE TABASCO”, realizado por el alumno: Christian Orlando Álvarez Sánchez, 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 ZALDÍVAR CRUZ

ASESOR:



DR. ÁNGEL SOL SÁNCHEZ

ASESOR:



DR. PEDRO ANTONIO MOSCOSO  
RAMÍREZ

ASESOR  
EXTERNO:



DR. FRANCISCO JAVIER GABINO  
ROMÁN

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO 28 DE JUNIO DE 2019

# DETECCIÓN DE RESIDUOS DE ACARICIDAS EN MIELES DEL ESTADO DE TABASCO

Christian Orlando Álvarez Sánchez, MC.

Colegio de Postgraduados, 2019

## RESUMEN

La plaga más grave para las colonias de abejas melíferas que pone en peligro la apicultura en el mundo es sin duda la *Varroa destructor*, aunque no existe potencial zoonótico, sí existen pérdidas económicas al reducir la población de abejas, la producción de miel y los rendimientos de muchos cultivos que dependen de la polinización de las abejas. Por ello los apicultores tratan sus colonias con acaricidas para controlar este ácaro, lo cual implica un riesgo de contaminación directa de la miel y otros productos de la colmena. La presencia de residuos de acaricidas en estos productos puede disminuir su calidad y devaluar sus propiedades, además de poner en peligro la salud humana. Debido a esto, se realizó el presente estudio para la detección de residuos de acaricidas: amitraz y cumafós (utilizados ampliamente para prevenir o detener afecciones en abejas *Apis mellifera*) en las mieles tabasqueñas a través del análisis por Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (UHPLC). Se analizó un total de 11 muestras de miel de las cuales se detectaron presencia de residuos de cumafós en dos muestras, y en todas, residuos de amitraz. El 81% de las muestras analizadas está libre de cumafós y podrían cumplir los requisitos para ser una miel inocua, sin embargo, amitraz está presente en todas ellas a niveles que superan los LMR de la legislación europea, mexicana y estadounidense.

Palabras clave: Miel, acaricidas, amitraz, cumafós, UHPLC.

# **DETECTION OF RESIDUES OF ACARICIDES IN HONEY FROM THE STATE OF TABASCO**

Christian Orlando Álvarez Sánchez, MC.

Colegio de Postgraduados, 2019

## **Abstract**

The most serious pest for honey bee colonies that endangers beekeeping in the world is undoubtedly the destroyer Varroa, although there is no zoonotic potential, there are economic losses to reduce the population of bees, honey production and yields of many crops that depend on the pollination of bees. Therefore beekeepers treat their colonies with acaricides to control this mite, which implies a risk of direct contamination of the honey and other products of the hive. The presence of acaricide residues in these products can reduce their quality and devalue their properties, in addition to endangering human health. Due to this, the present study was conducted for the detection of acaricide residues: amitraz and coumaphos (widely used to prevent or stop conditions in *Apis mellifera* bees) and thus determine the presence of possible contaminants in the Tabasco honeys through the analysis by Ultra High Resolution Liquid Chromatography (UHPLC). A total of 11 honey samples were analyzed, of which presence of coumaphos residues was detected in two samples, and in all, residues of amitraz. 81% of the analyzed samples are free of coumaphos and could meet the requirements to be an innocuous honey, however, amitraz is present in all of them at levels that exceed the MRLs of European, Mexican and American legislation.

Key words: Honey, acaricides, amitraz, coumaphos, UHPLC.

## DEDICATORIAS

**A Dios Padre**, porque sus bendiciones no han faltado en mi vida y gracias a Él he podido concluir un proyecto más en mi formación como profesionista.

**A mi padre Sodel Álvarez Sánchez**, quien ha sido ejemplo en mi formación como ciudadano responsable, por su fuerza de voluntad sus buenos valores y apoyarme en todo momento.

**A mi tía María Emil Sánchez López**, por apoyarme incondicionalmente, por ser una segunda madre para mí.

**A mi hermano Geiner Francisco Álvarez Sánchez y su esposa Heydi Lorena Arias de la cruz** por tener su apoyo y cariño, por saber que puedo contar con ellos en todo momento.

**A mi esposa Kristel Guadalupe Santarelli Cruz**, por su comprensión, por ser una mujer con buenos valores y sobre todo por su sincero amor. Agradezco el apoyo que mis suegros me han brindado, Carlos Armando Santarelli y M. Candelaria Cruz.

**En memoria de mi madre Graciela Sánchez López**, por ser ella quien con su esfuerzo, tenacidad y verdadero amor dedicó su vida a nosotros, y por su memoria seguiré esforzándome por obtener más y mejores logros en mi vida con humildad y perseverancia, pues es lo que me dejó mi madre, esto es en su honor y a su memoria.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A CONACYT** por haber financiado esta investigación.

**Al Colegio de Postgraduados** Campus Tabasco, por haberme permitido realizar esta investigación.

**Al Dr. Juan Manuel Zaldívar Cruz**, por su apoyo y confianza que me permitió trabajar en esta investigación.

A mis asesores que apoyaron a la continuidad de este proyecto.

**Dr. Ángel Sol Sánchez**

**Dr. Pedro Antonio Moscoso Ramírez**

**Dr. Francisco Javier Gabino Román**

**Al Instituto Tecnológico de Mérida, al Dr. Enrique Sauri Duch**, que colaboró en esta investigación permitiendo la estancia en su laboratorio.

A los buenos amigos que hice en esa estancia, **Joel, Abraham, Rosario**, quienes apoyaron y brindaron su amistad en este proceso de la investigación.

A la comunidad de apicultores tabasqueños que aceptaron amablemente formar parte de esta investigación.

A todos mis amigos, compañeros de generación, técnicos y profesores.

A todos, ¡Muchas gracias!

## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| I. INTRODUCCIÓN .....   | 1  |
| II. OBJETIVOS .....   | 1  |
| 2.1. Objetivo General .....   | 1  |
| 2.2. Objetivos específicos .....  | 1  |
| III. HIPÓTESIS .....  | 2  |
| IV. REVISIÓN DE LITERATURA.....   | 2  |
| 4.1. Resumen de investigaciones relevantes relacionadas con el problema ..... | 2  |
| 4.1.1. La miel .....  | 2  |
| 4.2. Acaricidas .....   | 5  |
| 4.2.1. Uso de acaricidas en los apiarios .....                                | 5  |
| 4.2.2. Tipos de acaricidas y su efecto en la miel .....                       | 6  |
| 4.2.3. Amitraz.....   | 7  |
| 4.2.4. Cumafós (Figura 2).....  | 8  |
| V. Técnicas analíticas para la identificación de pesticidas en la miel.....   | 8  |
| 5.1. Técnicas para la cuantificación de acaricidas en la miel.....            | 11 |
| 5.2. Legislación .....  | 12 |
| VI. Materiales y métodos.....   | 12 |
| 6.1. Localización del sitio de estudio.....                                   | 12 |
| 6.2. Colecta de muestras de miel.....   | 13 |
| 6.3. Reactivos .....  | 14 |
| 6.4. Métodos de análisis .....  | 14 |
| 6.5. Método de extracción.....  | 14 |
| 6.5.1. Extracción y limpieza de la muestra.....                               | 14 |
| 6.5.2 Preparación de estándares de amitraz y cumafós.....                     | 15 |



|   |    |
|---|----|
| 6.6. Análisis de las muestras .....                                 | 15 |
| 6.6.1. Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (UHPLC) ..... | 15 |
| 6.6.2. Condiciones Cromatográficas .....                            | 15 |
| 6.6.3. Curva de calibración .....                                   | 15 |
| 6.7. Análisis de muestras de miel en UHPLC .....                    | 15 |
| VII. Resultados .....   | 16 |
| 7.1. Curva de calibración .....                                     | 16 |
| 7.2. Resultados de las muestras analizadas .....                    | 18 |
| 7.3. Discusión .....  | 21 |
| 7.3.1. Cumafós .....  | 21 |
| 7.3.2. Amitraz .....  | 22 |
| 7.4. Prueba de hipótesis .....                                      | 24 |
| VIII. Conclusiones .....  | 24 |
| IX. Referencias bibliográficas .....                                | 25 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Estructura química de amitraz.....                                   | 8  |
| Figura 2. Estructura química de Cumafós .....                                  | 8  |
| Figura 3. Curva de calibración para Cumafós .....                              | 17 |
| Figura 4. Curva de calibración para amitraz.....                               | 17 |
| Figura 5. Cromatograma de acaricidas cumafós y amitraz en estándar .....       | 19 |
| Figura 6. Cromatograma de acaricidas cumafós y amitraz en muestra de miel .... | 19 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Detalle de muestras recolectadas .....   | 13 |
| Tabla 2. Concentración de acaricidas en muestras de mieles respecto a los LMR Internacionales ..... | 20 |

## **I. INTRODUCCIÓN**

Los alimentos de origen natural, como los productos apícolas, además de formar parte de la dieta humana, se utilizan como bioindicadores ambientales debido a que diversos estudios demuestran que las abejas, en el proceso de recolección de néctar, transportan una amplia variedad de contaminantes presentes en la zona, que son almacenados y concentrados en la colmena (Bogdanov, 2006). En consecuencia, los productos derivados de la colmena, como la miel, se contaminan con residuos de diversos plaguicidas (Balayiannis y Balayiannis, 2008). Adicionalmente, el uso de productos químicos para el control de enfermedades en la colmena es otra fuente importante de contaminantes en los productos apícolas (Bogdanov, 2006; Rial-Otero *et al.*, 2007). A fin de impedir que mieles contaminadas afecten a los consumidores, algunas organizaciones han establecido límites máximos de residuos para un extenso número de plaguicidas en este alimento (FAO/OMS, 2011). Por ello, es necesario realizar estudios de laboratorio que permitan detectar la presencia de posibles contaminantes (residuos de plaguicidas), en los productos derivados de la apicultura, con el propósito de agregar valor en un beneficio amplio para la apicultura tabasqueña.

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo General**

- Determinar la presencia de residuos de acaricidas en mieles del estado de Tabasco.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Cuantificar las concentraciones de los residuos de los acaricidas cumafós y amitraz.
- Determinar la calidad de la miel producida en el estado de Tabasco, mediante la comparación de los datos obtenidos, con los límites internacionales para residuos de acaricidas en mieles.

### III. HIPÓTESIS

- La concentración de amitraz y cumafós registrada en las mieles tabasqueñas se encuentran dentro de los límites establecidos por las organizaciones europea, estadounidense y mexicana.

### IV. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 4.1. Resumen de investigaciones relevantes relacionadas con el problema

##### 4.1.1. La miel

La miel es una sustancia dulce natural producida por las abejas *Apis mellifera* a partir del néctar de las flores o de otras partes vivas de la planta (Montenegro *et al.*, 2008) y de las secreciones de insectos, que las abejas recogen, transforman, combinan con sustancias específicas propias y almacenan en panales (Wilczynska y Przybylowski, 2007; Giorgi *et al.*, 2011; Panseri *et al.*, 2014); de los cuales se extrae el producto sin ninguna adición de otras sustancias (Saénz y Gomez, 2000). La composición y las propiedades de la miel dependen del origen botánico del néctar o de las secreciones utilizadas por las abejas (Tellería y Forcone, 2000). La miel principalmente está compuesta de azúcares y otros componentes tales como enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, carotenoides, vitaminas, minerales y sustancias aromáticas. Es rica en flavonoides y ácidos fenólicos que exhiben una amplia gama de efectos biológicos y actúan como antioxidantes naturales (Alqarni *et al.*, 2012).

La apicultura y la agricultura son consideradas prácticas agropecuarias complementarias, pues existe un beneficio mutuo. Sin embargo, la agricultura moderna depende cada vez más del uso de agroquímicos para el control de insectos, hongos, ácaros y arvenses para así garantizar altos rendimientos. Las abejas visitan estos cultivos frecuentemente y se exponen a estos químicos (Vanengelsdorp y Meixner, 2010).

Las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) realizan la tarea vital de polinizar cultivos agrícolas y especies nativas y son importantes para los productos comerciales de miel y cera de abejas. La composición de la miel depende principalmente del origen floral del néctar, las condiciones climáticas, la fisiología de las abejas, la recolección de la miel y el procesamiento posterior a la recolección (Panseri *et al.*, 2013).

Los productos de abeja tienen la imagen de ser naturales, sanos y limpios (Bogdanov, 2006). A menudo es consumido por niños, ancianos y enfermos, especialmente en los países en desarrollo. Por lo tanto, la miel debe estar libre de cualquier contaminación química para considerarse segura para el consumo humano (Eisa *et al.*, 2014).

Debido a esto, las nuevas condiciones del mercado requieren la adopción de sistemas de producción con estrictos controles de calidad. Estos procedimientos deben considerar las actividades que se realizan desde la obtención de la materia prima, hasta la venta del producto. Su correcta aplicación no depende solamente de la implementación de programas gubernamentales, sino de la participación comprometida de productores y comercializadores (Ramírez, 2012).

El Código Internacional de Conducta Sobre la Distribución y Uso de Plaguicidas de la OMS (2010) de las Naciones Unidas, establece que un plaguicida «es la sustancia o mezcla de ellas, destinada a prevenir, destruir o controlar plagas, incluyendo los vectores de enfermedad humana o animal; las especies no deseadas de plantas o animales que ocasionan un daño duradero u otras que interfieren con la producción, procesamiento, almacenamiento, transporte y comercialización de alimentos; los artículos agrícolas de consumo, la madera y sus productos, el forraje para animales o los productos que pueden administrarse para el control de insectos, arácnidos u otras plagas corporales». Por tanto, la finalidad de los plaguicidas es destruir organismos vivos, constituyéndose, así como un grupo particular de los biocidas que puede alcanzar una capacidad letal amplia.

Los plaguicidas organoclorados (POC's) y organofosforados (POF's) son los dos tipos de plaguicidas más utilizados en la actualidad para el control de plagas. El uso

desmesurado de estos compuestos en los cultivos, no solo genera desequilibrios ambientales, también afecta los ecosistemas, a los agricultores, y a los consumidores, esto es debido a la residualidad de estos compuestos orgánicos presentes en nuestros alimentos (Ripley *et al.*, 2003; Castro y Ramos, 2005).

A nivel medioambiental, las abejas recogen contaminantes a través de una amplia gama de vías: (i) por el consumo de polen y néctar contaminado, (ii) por contacto con plantas y suelo de cultivos en los cuales los agricultores aplican pesticidas (iii) por inhalación durante el vuelo y (iv) por ingestión de agua superficial contaminada y también (v) por rociado directo o al volar a través de la deriva de pulverización, entre otros (Colin *et al.*, 2004; Bogdanov, 2006).

La aplicación de pesticidas, particularmente en la primavera y el verano, puede conducir a la mortalidad masiva entre las abejas, y los productos químicos entran en los productos de la abeja. La presencia de xenobióticos en estos productos puede disminuir su calidad y devaluar sus propiedades, además de poner en peligro la salud humana. Por lo tanto, es de suma importancia vigilar los niveles de plaguicidas en estos productos alimenticios únicos (Bargańska y Namieśnik, 2010). Las abejas son en el contexto ambientalista, bioindicadores de la contaminación ambiental con sustancias tóxicas. Los insectos están en estrecho contacto con plaguicidas durante su "trabajo" en plantas con flores y por lo tanto pueden ser utilizados para evaluar la contaminación ambiental con pesticidas y sus metabolitos. Una consecuencia del tratamiento de los plaguicidas en los cultivos puede ser el envenenamiento de abejas, abejorros, mariquitas y otros insectos útiles (Morzycka, 2002). Por lo tanto, algunos estudios relacionados con la presencia de contaminantes en muestras de los productos de las abejas proporcionan información sobre los compartimentos ambientales cercanos a las colmenas y pueden servir para indicar anomalías en el medio ambiente, en el tiempo y el espacio (Conti y Botrè, 2001).

La contaminación por el uso de plaguicidas, especialmente organoclorados persistentes (OCP), ha sido una preocupación durante mucho tiempo, afectando a diversos sectores incluido la apicultura, esto debido a que las abejas transportan los residuos de los pesticidas en el néctar recolectado, el cual termina como una miel contaminada (Morzycka, 2002).

Varios métodos han sido reportados para la determinación de POC's en la miel. Los plaguicidas se extraen de una matriz de alto contenido de azúcar ya sea por extracción líquido-líquido (LLE) con líquidos inmiscibles (Blasco *et al*, 2003), o extracción en fase sólida (SPE) con diversos absorbentes. También se emplearon micro-extracción en fase sólida (SPME) y la extracción de fluido supercrítico (SFE) (Rissato *et al.*, 2004). La especificidad y la sensibilidad al átomo de cloro electronegativo ha dado a Detector de Captura de Electrones (ECD) su popularidad. El detector de espectrometría de masas (MS) es un detector universal y se emplea para la detección de varios grupos de plaguicidas, incluyendo POC (Fernández *et al*, 2001; Blasco *et al*, 2003; Rissato, 2004). Sin embargo, la mayoría de los métodos que emplean MS en el modo de monitorización de iones seleccionados (GC/SIM-MS), en el que la sensibilidad se mejora a expensas de las capacidades de identificación (Fernández *et al*, 2002; Rissato, 2004). Sin embargo, ya existen métodos para cuantificar residuos múltiples en concentraciones muy bajas, gracias a la disponibilidad de equipos analíticos cada vez más precisos (Ahmed, 2001).

## **4.2. Acaricidas**

### **4.2.1. Uso de acaricidas en los apiarios**

A fines del siglo XIX, el ambiente químico de las abejas melíferas manejadas, cambió profundamente con la introducción de agroquímicos, especialmente pesticidas; desde ese momento, las abejas melíferas se han encontrado con gran diversidad de toxinas sintéticas a través de los residuos de plaguicidas en los cultivos tratados. Desde 1990, el entorno químico de la abeja melífera cambió una vez más, con el uso extendido y deliberado de acaricidas en colmena para controlar el ácaro ectoparasitario, *Varroa destructor* (Maoa *et al.*, 2011).

*Varroa destructor* es la plaga más grave de las colonias de abejas melíferas que pone en peligro la apicultura de todo el mundo, ya que éste ácaro debilita las colonias de dos maneras: directamente, al consumir la hemolinfa de abejas adultas y pupales e, indirectamente, al vectorizar virus de abejas melíferas y causar inmunosupresión en abejas parasitadas (Korta *et al.*, 2001; Kamel y Ghamdi, 2006; Boncristiani *et al.*, 2012).

A pesar de que este ácaro no es dañino para los seres humanos o el ganado, existe un impacto económico devastador en términos de una menor producción de miel y una disminución en los rendimientos de muchos cultivos que dependen de la polinización de las abejas (Korta *et al.*, 2002).

Por ello, con la finalidad de evitar pérdidas económicas, los apicultores tratan sus colonias con acaricidas, siendo cumafós y fluvalinato, los contaminantes más abundantes en el ambiente de la colmena porque ambos se introducen deliberadamente como acaricidas terapéuticos para controlar este ácaro (Kamel y Ghamdi, 2006) lo cual implica un riesgo de contaminación directa de la miel y otros productos de la colmena, por lo que en muchos países se han fijado los niveles máximos de residuos (LMR) en la miel para proteger a los consumidores (Korta *et al.*, 2001).

#### **4.2.2. Tipos de acaricidas y su efecto en la miel**

Frente a los serios desafíos presentados por *Varroa*, la apicultura se ha vuelto dependiente de el uso de productos químicos para combatir las enfermedades de las abejas o infestaciones de parásitos, lo que ha llevado a la contaminación de la miel y otros productos de la colmena, que en última instancia pueden afectar la salud humana (Kamel y Ghamdi, 2006; Rial-Otero *et al.*, 2007).

Los acaricidas, que se utilizan en las colonias de abejas melíferas para el control de los ácaros parásitos, se pueden dividir en tres categorías: orgánicos sintéticos, productos naturales y pesticidas de ácidos orgánicos. Los acaricidas orgánicos sintéticos incluyen: el tau-fluvalinato piretroide, cumafós, amitraz, y Fenpiroximato.



Los pesticidas naturales incluyen timol y mentol, ambos monoterpenoides que son componentes de aceites esenciales derivados de plantas. Y, por último, los ácidos orgánicos incluyen el ácido oxálico y ácido fórmico (Boncristiani *et al.*, 2012).

Amitraz, bromopropilato, cumafós, ciazolol y fluvalinato son los acaricidas más comunes utilizados por los apicultores para combatir los ácaros (Rial-Otero *et al.*, 2007). Esto ha llevado a una disminución de la efectividad de tau-fluvalinato y cumafós a medida que las poblaciones de *Varroa* han desarrollado resistencia a estos acaricidas. Sin embargo, el tau-fluvalinato y cumafós siguen siendo contaminantes comunes en el ambiente de la colmena, en parte como resultado de la aplicación continua por los apicultores, y en parte debido a sus propiedades lipofílicas que conducen a la acumulación y persistencia en la cera de las abejas (Kamel y Ghamdi, 2006).

#### **4.2.3. Amitraz**

Amitraz es un medicamento antiparasitario. Algunos productos registrados son Preventic (Veterquímica), amitraz (Eximerck) y en asociación con piretroides Vetancid (Vetanco).

Se trata de un agonista alfa-adrenérgico. Es un derivado triazapentadieno, miembro de la clase amidina (Figura 1). Es un insecticida y acaricida usado para el control de la araña roja, minadores, cochinillas, y áfidos con un mecanismo de acción parecido a otros agonistas del  $\alpha$ 2-adrenoreceptores como también por inhibición de la enzima monoaminooxidasa. Se ha descrito sedación, analgesia y depresión cardiovascular como otros agonistas  $\alpha$ 2-adrenoreceptores en diversas especies posterior a la inyección de amitraz. En algodón se emplea en el control de *Heliothis*, mosca blanca y polillas. En animales se emplea en el control garrapatas, ácaros, pulgas y otras pestes animales. La autoridad norteamericana United States Environmental Protection Agency clasifica al amitraz como ligeramente tóxico es decir de Clase Tercera.

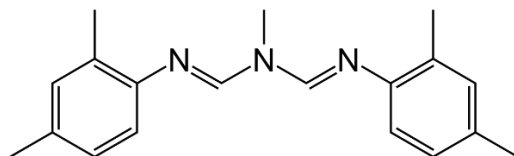


Figura 1. Estructura química de amitraz

#### 4.2.4. Cumafós (Figura 2).

Cumafós es un ectoparasiticida no-volátil, lipo-soluble organofosforado: mata insectos y garrapatas. Es conocido de los proveedores de baño de inmersión, usado en animales mayores y domésticos en el control de diversos insectos como pulgas (*Ctenocephalides canis*) y garrapatas. También se emplea en el control de Varroa en los panales.

En Australia, su registro fue cancelado por Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority en junio de 2004 cuando el fabricante no pudo demostrar seguridad en el uso doméstico.

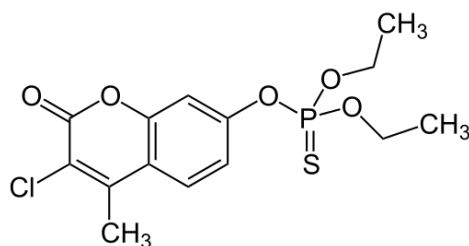


Figura 2. Estructura química de Cumafós

## V. Técnicas analíticas para la identificación de pesticidas en la miel

Varios métodos han sido reportados para la determinación de pesticidas en la miel. El análisis de la miel es difícil debido a su composición compleja y, particularmente, a la presencia de ceras y pigmentos. La técnica de extracción clásica utilizada en la determinación de residuos de plaguicidas en la miel ha sido la partición con disolventes orgánicos, a menudo seguido de procedimientos de limpieza posterior

antes de su análisis por cromatografía de gases. El análisis de extractos se realiza generalmente por cromatografía de gases con diferentes detectores selectivos como el Detector de Nitrógeno-Fósforo (NPD) (Sánchez-Brunete *et al.*, 2002) para los pesticidas organofosforados. La determinación de los residuos de plaguicidas, en particular aquellos térmicamente inestables, también puede llevarse a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Korta *et al.*, 2001), pero generalmente la sensibilidad alcanzada en este caso es algo menor. La espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gas (GC-MS) o líquida (HPLC-MS) se utiliza con mayor frecuencia en la actualidad para el análisis de plaguicidas en miel (Fernández *et al.*, 2001; Volante *et al.*, 2001; Blasco *et al.*, 2003), debido a la posibilidad de confirmar la identidad de residuos de plaguicidas.

Se han comunicado métodos multiresiduales para la determinación de plaguicidas en los alimentos (Fillion *et al.*, 2000). Los métodos para el análisis multiresiduo de plaguicidas en la miel son escasos en la literatura científica y es necesario desarrollar procedimientos analíticos que permitan la cuantificación y la confirmación rápidas y fiables del mayor número posible de plaguicidas en una única determinación de manera rentable. Los métodos analíticos publicados para la determinación de plaguicidas en la miel generalmente determinan sólo compuestos pertenecientes a diferentes clases químicas, principalmente organoclorados, organofosforados o acaricidas (Fernández *et al.*, 2001).

Morzycka (2002) describió un método multiresiduo simple para la determinación de insecticidas en abejas melíferas. El método desarrollado se basó en la técnica de Matriz de Dispersión en Fase Sólida. Mediante este método se determinó un total de 12 insecticidas (azinfos-metilo, buprofezina, clorpirifos, clorpirifos-metilo, diazinón, etion, fenitrothion, fipronil, metidatión, fosadona, pirimicarb, propoxur) utilizados en campos de floración.

Mullin (*et al.*, 2010) utilizaron LC/MS-MS y GC/MS para analizar abejas y matrices de colmenas para residuos de plaguicidas, utilizando un método QuEChERS modificado, con el cual se encontraron 121 diferentes plaguicidas y metabolitos dentro de 887 muestras de cera, polen, abeja y de colmenas asociadas.

Pareja (*et al.*, 2011) investigaron la influencia de insecticidas comúnmente utilizados para fines agrícolas en la despoblación de colmenas en Uruguay. Un total de 37 muestras fueron analizadas, representando 14.82 colmenas. En las colmenas despobladas sólo se detectaron imidacloprid y fipronil y en las colmenas activas se encontraron endosulfán, coumaphos, cipermetrina, etión y clorpirifos. Las concentraciones más altas, alrededor de 1,000 ppm fueron obtenidos de Coumaphos, en todas las muestras de propóleos de colmenas activas.

En Colombia, Rodríguez (*et al.*, 2014) analizaron un total de 61 muestras de miel durante 2011. Los niveles residuales de insecticidas, fungicidas y acaricidas seleccionados se determinaron mediante un método multiresiduo, para el análisis se utilizó cromatografía de gases con detector de nitrógeno fosforo/detector de captura de microelectrones y cromatografía de gases acoplado a detector de espectrometría de masas para confirmación. En este estudio, se identificaron residuos de plaguicidas en 32 muestras, donde se encontraron con frecuencia plaguicidas organoclorados y organofosforados. Los principales compuestos detectados fueron: Clorpirifos (36.1% de incidencia), Profenofos (16.4% de incidencia), DDT (6.6% incidencia), HCB, g-HCH (4.9% incidencia), Fenitrotion (1.6% incidencia). Los resultados indicaron que los residuos de los plaguicidas sometidos a ensayo se detectaron en el 55.6% de las muestras recogidas y que la mayoría de los plaguicidas detectados pertenecían a los grupos organoclorados y organofosforados.

Chiesa (*et al.*, 2016) investigaron la ocurrencia de diferentes clases de contaminantes seleccionados como representativos de posibles fuentes de contaminación en 59 mieles orgánicas: organoclorados, organofosfatos, policlorobifenilos, PCB y polibromodifeniléteres, PBDE. Se desarrolló un método basado en la extracción acelerada de disolventes con limpieza "en línea" y detección de GC-MS/MS para detectar estos contaminantes.

Diazinon, Mevinfos, Cumafos, Clorpirifos y Quinoxifen fueron los residuos frecuentemente detectados en muestras procedentes de las áreas de huertos de manzanos y cítricos.

Irungu (*et al.*, 2016) analizaron 96 residuos de plaguicidas en 28 muestras de miel de Kenya y Etiopía. A partir de datos preliminares, se detectaron 17 residuos de plaguicidas aproximadamente 10 veces por debajo del límite máximo de residuos (LMR) establecido para los productos alimenticios, excepto para el malatión, que se detectó casi dos veces por encima de su LMR aceptable.

### **5.1. Técnicas para la cuantificación de acaricidas en la miel**

El uso de acaricidas dentro de las colmenas implica un riesgo de contaminación directa de la miel y otros productos de la colmena, por lo que se han desarrollado diversos métodos para la determinación de residuos acaricidas en muestras de miel y cera de abejas. El nivel de concentración de residuos está influenciado por el uso del acaricida en condiciones y cantidades adecuadas, la estación, el método de extracción de miel utilizado, la polaridad y estabilidad de las sustancias químicas (Korta *et al.*, 2002; Kamel y Ghamdi, 2006).

Tradicionalmente, el análisis de los acaricidas se lleva a cabo mediante cromatografía de gases, empleando un detector de captura de electrones, un detector de nitrógeno-fósforo o un detector de espectrómetro de masas. La extracción se basa en la destilación al vapor, extracción líquido-líquido, extracción sólido-líquido, extracción de fluido supercrítico o microextracción en fase sólida (Korta *et al.*, 2002).

La cromatografía líquida es menos usada que la cromatografía de gases, puesto que, aparentemente sólo hay un método para analizar multiresiduos de acaricidas en la miel (cumafós, bromopropilato, 4,49-dibromoben-zophenone y fluvalinato), y esto es a través de la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), el cual hace uso de la detección de matriz de diodos. La limpieza de la muestra para estos métodos se basa en la destilación al vapor, la extracción líquido-líquido, la extracción en fase sólida, extracción de fluido supercrítico o microextracción en fase sólida (Korta *et al.*, 2001).

Sin embargo, para el caso del amitraz, se han presentado problemas para su determinación debido a que este compuesto es extremadamente inestable en medios ácidos y se descompone en la miel, además de que tampoco se ha detectado en la cera de abejas debido a su descomposición e inestabilidad en la cera, por lo tanto, es necesario considerar la determinación de amitraz con sus productos de degradación. De igual manera, se ha informado que otros acaricidas son inestables en la miel, como el cumafós y el fluvalinato lo cual complica la determinación de estos acaricidas en la miel (Kamel y Ghamdi, 2006).

## **5.2. Legislación**

Debido a la dependencia de la apicultura a nivel mundial con el uso de acaricidas, la Unión Europea y otros países han establecido diferentes regulaciones que limiten los niveles máximos residuales (LMR) de acaricidas en la miel. Por ejemplo, el Reglamento del Consejo 2377/90 / CEE de la UE y sus modificaciones posteriores han establecido LMR en miel para amitraz y cumafós en 0.2 y 0.1 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Además, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) ha establecido LMR para amitraz, cumafós y fluvalinato de la siguiente manera: 0.1, 0.1 y 0.05 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Sin embargo, aún no se han establecido LMR para el bromopropilato en la miel para la USEPA o las regulaciones de la UE, pero algunos países como Alemania y Suiza han establecido sus propios LMR para este compuesto a niveles de 1 mg kg<sup>-1</sup>. Los límites más restrictivos para el bromopropilato en la miel han sido fijados por la legislación italiana, la cual establece un LMR para este compuesto de 0.01 mg kg<sup>-1</sup> (Rial-Otero *et al.*, 2007).

## **VI. Materiales y métodos**

### **6.1. Localización del sitio de estudio**

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Alimentos del Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. Mientras que la detección de acaricidas se

desarrolló en el Laboratorio de Análisis Instrumental del Instituto Tecnológico de Mérida en Mérida, Yucatán.

## 6.2. Colecta de 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 (2017). Las muestras se almacenaron hasta su análisis a temperatura ambiente. Las mieles procedían de los apiarios que se encuentran en el municipio de Huimanguillo, Tabasco; que pertenece a la Región de La Chontalpa (Tabla 1). Las muestras obtenidas pertenecen a la cosecha de primavera de 2018.

Tabla 1. Detalle de muestras recolectadas

| <b>N° de muestras</b> | <b>MUNICIPIO</b> | <b>LOCALIDAD</b>                          | <b>APIARIO</b> | <b>PRODUCCTOR</b>             | <b>FECHA DE COSECHA</b> |
|-----------------------|------------------|---|----------------|-------------------------------|-------------------------|
| 01.                   | Huimanguillo     | Poblado estación Zanapa                   | Los mangos     | Jesús del Pilar López Córdova | 15 de marzo de 2018     |
| 02.                   | Huimanguillo     | Marcelino Inorrueta de la Fuente          | La naranja     | Aurora Hernández Alegría      | 20 de abril de 2018     |
| 03.                   | Huimanguillo     | José Mercedes Gamas 2da sección           | La piña        | María Jesús Fuentes Ricardez  | 29 de marzo de 2018     |
| 04.                   | Huimanguillo     | Gilberto Flores Muñoz                     | Los cocos      | Nancy Nuñez Guzmán            | 24 de abril de 2018     |
| 05.                   | Huimanguillo     | Emiliano Zapata                           | El mango       | Miguel Ángel Villa Díaz       | 17 de abril de 2018     |
| 06.                   | Huimanguillo     | El encomendero                            | Amigos II      | Dorides Alejandro Juárez      | 21 de marzo de 2018     |
| 07.                   | Huimanguillo     | Poblado estación Zanapa                   | La Loma        | Elide López Torres            | 18 de marzo de 2018     |
| 08.                   | Huimanguillo     | Laguna de los limones                     | El mango       | Dorlis Carrillo Garduza       | 6 de marzo de 2018      |
| 09.                   | Huimanguillo     | El encomendero                            | Amigos I       | Oliver Javier Izquierdo       | 13 de abril de 2018     |
| 10.                   | Huimanguillo     | Estación Zanapa                           | La Loma        | Elide López Torres            | NR                      |
| 11.                   | Huimanguillo     | Colonia agraria José Mercedes 2da sección | Zamora         | José Alfredo Fuentes Ricardes | NR                      |

### **6.3. Reactivos**

Los reactivos utilizados para los analitos fueron: Agua destilada, N-hexano, 2-propanol, Hidróxido de amonio, Sulfato de sodio anhídrido, Acetona, Acetonitrilo, Metanol, Agua ultrapura, estándares de Amitraz y Cumafós, (Sigma-Aldrich). Todos los reactivos fueron de grado analítico HLPC.

### **6.4. Métodos de análisis**

Los acaricidas que se analizaron fueron cumafós y amitraz, que son utilizados en apicultura para el control de *Varroa destructor*, por medio de Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (UHPLC).

### **6.5. Método de extracción**

Para la preparación de la muestra, concentración de los residuos de acaricidas y posterior análisis se siguieron las técnicas propuestas por los autores Martel y Zeggane (2002). 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:

#### **6.5.1. Extracción y limpieza de la muestra**

Se pesaron 10 gramos de miel y se mezclaron con 30 mL de n-hexano y 15 mL de 2-propanol durante 4 minutos en un homogeneizador Ultra-Turrax, ajustando el pH a 8.0 con una solución de hidróxido de amonio al 0.28%. La mezcla homogeneizada se filtró a través de un embudo con papel filtro y se realizó la misma operación una vez más. El Ultra-Turrax se enjuagó con 20 mL de n-hexano, se filtró y se agregó a la mezcla de miel.

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.

### **6.5.2 Preparación de estándares de amitraz y cumafós**

Se pesaron 2.5 mg del estándar y se aforaron a 25 mL con acetona, a concentración de 100 mg/L, 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.

## **6.6. Análisis de las muestras**

### **6.6.1. Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (UHPLC)**

Se utilizó un UHPLC Dionex Ultimate 3000 series de la marca Thermo Scientific acoplado a luz, UV. Se trabajó con una columna C<sub>18</sub>, ODS, 5 micras, 4.6mm x 25 cm. Ultrasphere marca Beckman.

### **6.6.2. 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<sup>-1</sup>. Los compuestos se analizaron en condiciones óptimas, por lo que se usó la longitud de onda de 313 nm para cada analito.

### **6.6.3. Curva de calibración**

Para la realización de la curva de calibración se utilizaron las condiciones cromatográficas previamente establecidas. Se tomaron concentraciones de 0, 0.5, 1, 5, 10, 20, y 30 mg kg<sup>-1</sup> de cada estándar.

## **6.7. Análisis de muestras de miel en UHPLC**

Se analizaron 11 muestras de miel de la siguiente manera:

Cada muestra fue analizada por triplicado, 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  $\mu$ L que se inyectaron en el equipo UHPLC para su lectura.

## **VII. Resultados**

### **7.1. Curva de calibración**

La curva de calibración para los estándares de acaricidas cumafós y amitraz se realizó utilizando las condiciones cromatográficas establecidas. Se tomaron en cuenta 7 puntos para realizar la curva, en concentraciones de 0, 0.5, 1, 5, 10, 20 y 30 ppm.

En ambos estándares se obtuvieron coeficientes de determinación ( $r^2$ ) de 0.9936 y 0.9977 para cumafós y amitraz respectivamente (Figura 4 y 5).

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

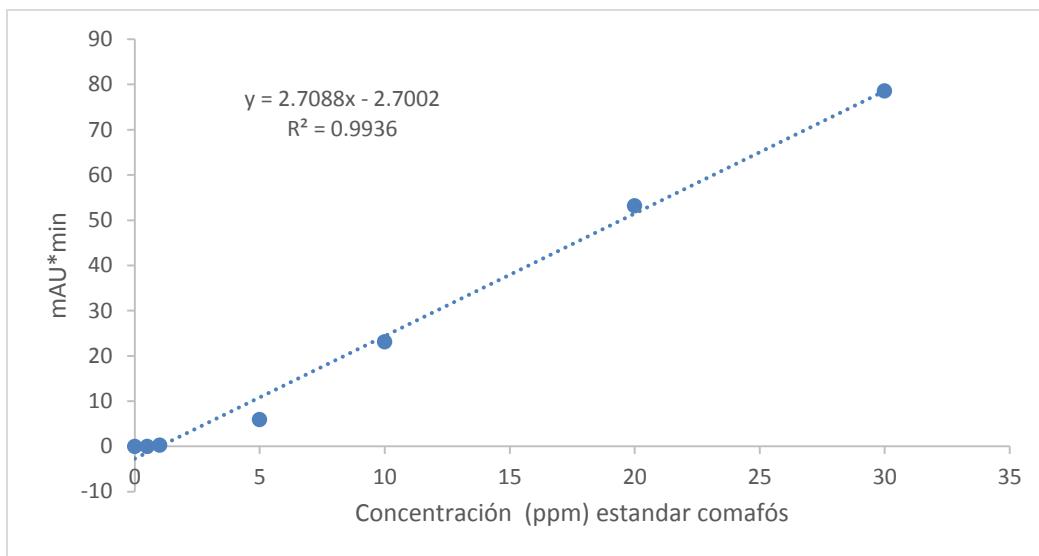


Figura 3. Curva de calibración para Cumafós

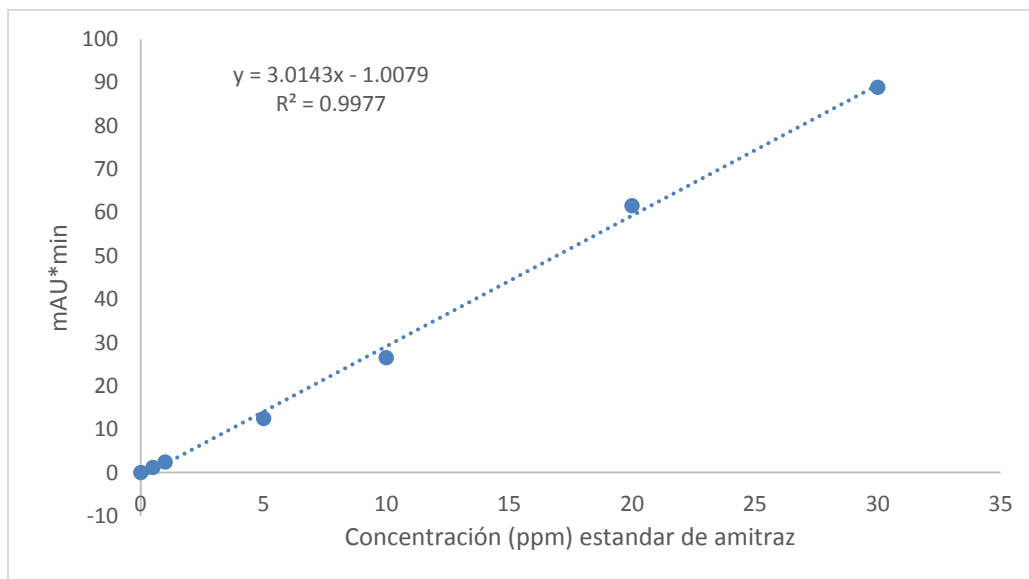


Figura 4. Curva de calibración para amitraz

La ecuación resultante para el cálculo de residuos de cumafós es la siguiente:

---

|  |                                 |
|--|---------------------------------|
| <b>Ecuación de la recta:</b>               | $y = mx + b$                    |
| <b>Ecuación de la curva de calibración</b> | $y = 2.7088 x - 2.7002$         |
| <b>Ecuación despejada:</b>                 | $y = \frac{x + 2.7002}{2.7088}$ |

---

La ecuación resultante para el cálculo de residuos de amitraz es la siguiente:

---

|  |                                 |
|--|---------------------------------|
| <b>Ecuación de la recta:</b>               | $y = mx + b$                    |
| <b>Ecuación de la curva de calibración</b> | $y = 3.0143 x - 1.0079$         |
| <b>Ecuación despejada:</b>                 | $y = \frac{x + 1.0079}{3.0143}$ |

---

Donde x corresponde a la absorbancia (mAU\*min) de cada muestra analizada.

## 7.2. Resultados de las muestras analizadas

Se utilizaron longitudes de onda para cada acaricida como lo indican Martel y Zeggane (2002) 313 nm para cumafós y 289 nm para amitraz, pero se observó que, a una longitud de onda de 313 nm, el amitraz presentaba picos definidos en el cromatograma (Figura 5 y 6), por lo cual se decidió analizar los dos acaricidas a una longitud de onda de 313 nm.

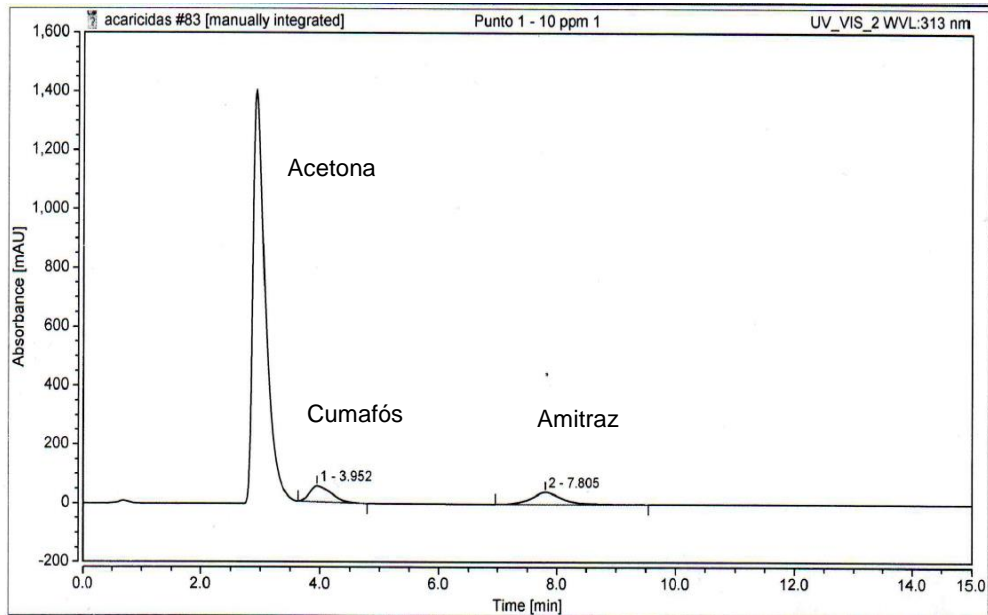


Figura 5. Cromatograma de acaricidas cumafós y amitraz en estándar

Se obtuvieron los siguientes tiempos de retención ( $t_r$ ): Los estándares mostraron picos con tiempos de retención ( $t_r$ ) de 7.612 a 7.825 min para amitraz, y 3.885 a 3.972 min para cumafós, respectivamente. En lo que respecta a las muestras analizadas, éstas presentaron tiempos de retención ( $t_r$ ) de 7.31 a 7.53 min para amitraz y 3.79 a 3.93 para cumafós. (Figura 6).

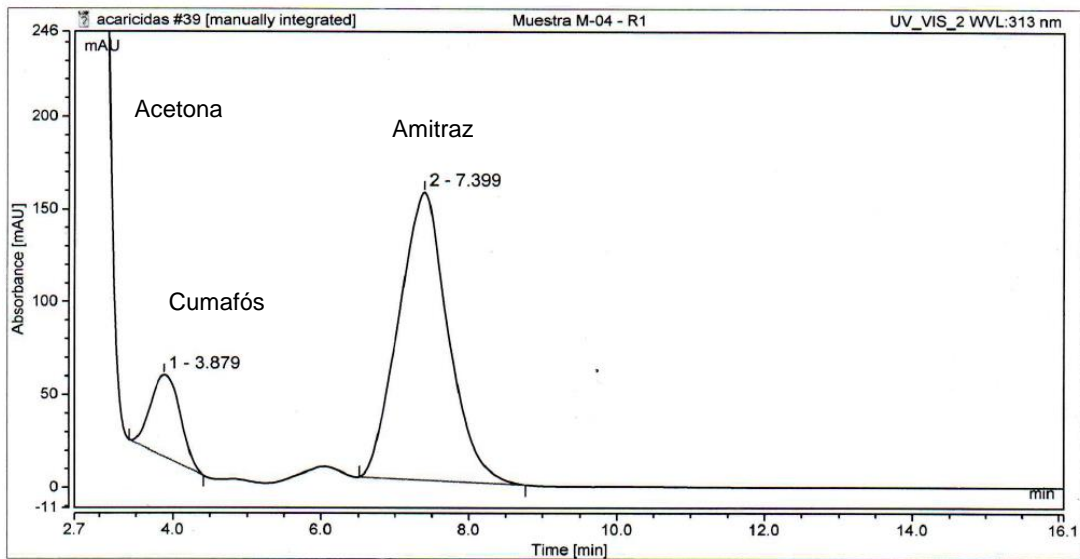


Figura 6. Cromatograma de acaricidas cumafós y amitraz en muestra de miel

Se analizaron un total de 11 muestras de miel, de estas en dos muestras se detectaron residuos de cumafós, y todas reportan residuos de amitraz (Tabla 2).

A pesar de que la presencia de residuos de cumafós ha sido mínima en las muestras analizadas, la cuantificación de éstas sobrepasa los límites máximos residuales permitidas. En el caso de las muestras con residuos de amitraz, la cuantificación de los resultados indica que, están por encima del límite máximo residual que establecen las leyes tanto mexicanas europeas y estadounidense; (SENASICA, 2016); Reglamento (CE) n.º 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo y sus modificaciones posteriores (Reglamento UE, 2017); y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, 2019)

Tabla 2. Concentración de acaricidas en muestras de mieles respecto a los LMR Internacionales

| Muestra | Cumafós                              |                          |                            | Amitraz                 |                         | LMR SENASICA            | LMR UE                  | LMR USEPA               |                                      |                          |
|---------|--------------------------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------------------|--------------------------|
|         | Promedio mg kg <sup>-1</sup> en miel | Coeficiente de variación | LMR* SENASICA <sup>1</sup> | LMR UE <sup>2</sup>     | LMR USEPA <sup>3</sup>  |                         |                         |                         | Promedio mg kg <sup>-1</sup> de miel | Coeficiente de variación |
| M-01    | ND                                   |                          | 0.1 mg kg <sup>-1</sup>    | 0.1 mg kg <sup>-1</sup> | 0.1 mg kg <sup>-1</sup> | 0.2 mg kg <sup>-1</sup> | 0.2 mg kg <sup>-1</sup> | 0.2 mg kg <sup>-1</sup> |                                      |                          |
| M-02    | ND                                   |                          |                            |                         |                         |                         |                         |                         | 0.7365 ± 0.064                       | 8.6955                   |
| M-03    | 0.571 ± 0.049                        | 8.622                    |                            |                         |                         |                         |                         |                         | 0.6892 ± 0.026                       | 3.7440                   |
| M-04    | 0.639 ± 0.007                        | 1.021                    |                            |                         |                         |                         |                         |                         | 0.7869 ± 0.095                       | 12.0733                  |
| M-05    | ND                                   |                          |                            |                         |                         |                         |                         |                         | 0.9807 ± 0.103                       | 10.4646                  |
| M-06    | ND                                   |                          |                            |                         |                         |                         |                         |                         | 1.8228 ± 0.030                       | 1.6344                   |
| M-07    | ND                                   |                          |                            |                         |                         |                         |                         |                         | 0.2707 ± 0.005                       | 1.8198                   |
| M-08    | ND                                   |                          |                            |                         |                         |                         |                         |                         | 0.3172 ± 0.010                       | 3.1427                   |
| M-09    | ND                                   |                          |                            |                         |                         |                         |                         |                         | 0.3998 ± 0.007                       | 1.7604                   |
| M-10    | ND                                   |                          |                            |                         |                         |                         |                         |                         | 0.4125 ± 0.029                       | 6.9673                   |
| M-11    | ND                                   |                          |                            |                         |                         |                         |                         |                         | 0.6137 ± 0.073                       | 11.8488                  |
|         |                                      |                          | 0.7638 ± 0.033             | 4.3460                  |                         |                         |                         |                         |                                      |                          |

LMR = Límite Máximo de Residuos. ND = No detectado. <sup>1</sup>SENASICA, (2016), <sup>2</sup> Reglamento (CE) n.º 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo y sus modificaciones posteriores; <sup>3</sup>Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, 2019)

### 7.3. Discusión

Existe una gran cantidad de trabajos alrededor del mundo orientados a la detección, de residuos de pesticidas con diversas metodologías y técnicas para la preparación extracción, análisis y cuantificación de los mismos en muestras de mieles, en muestras de cera de abejas y en las propias abejas. Sin embargo, en México son poco conocidos los trabajos que se realizan en este tema, en comparación a la producción y exportación de este producto. De igual manera Tabasco es uno de los estados que produce miel de abeja, pero no compite a nivel Nacional con los estados productores que no sólo comercializan de manera local y nacional, sino que son los estados que aportan toneladas de este producto para exportación.

#### 7.3.1. Cumafós

El máximo valor encontrado correspondió a la muestra M-04 ( $0.639 \pm 0.007 \text{ mg kg}^{-1}$ ), que pertenece al municipio de Huimanguillo de la localidad de Gilberto Flores Muñoz. La concentración es superior a los obtenidos por Kamel y Al-Ghamdi (2006) para mieles de Arabia Saudita, quienes determinaron residuos de acaricidas en muestras de miel y de cera. Los acaricidas estudiados fueron: flumetrina, tau-fluvalinato, cumafós, amitraz y sus metabolitos. Los resultados que arrojaron sus análisis indican que nueve de las 21 muestras analizadas estaban contaminadas con los acaricidas tau-fluvalinato y cumafós, los cuales únicamente fueron detectados en muestras de mieles. Sin embargo, en dos de las nueve muestras analizadas, detectaron residuos de cumafós, a niveles que sobrepasan los límites de tolerancia establecidos por la EPA en  $0.1 \text{ mg kg}^{-1}$  y reglamentos de la CE fijado en  $0.05 \text{ mg kg}^{-1}$ .

García (*et al.*, 1996) analizaron muestras de miel para la determinación de residuos de acaricidas: amitraz, cumafós y fluvalinato. En sus resultados indican que las muestras contaminadas corresponden a menos del 40% aproximadamente durante 4 años consecutivos (1988-1991) a excepción del último año, donde las muestras contaminadas superan el 60% de las muestras analizadas. Así mismo, corroboraron

sus resultados obtenidos de la cuantificación con información solicitada a los apicultores. Obtuvieron valores para cumafós de  $0.006 \text{ mg kg}^{-1}$ . Los autores indican que los niveles de residuos de acaricidas, están muy por debajo de los límites establecidos actualmente.

Martel y Zeggane (2002) describen métodos analíticos para controlar la calidad de las mieles en relación con los residuos de acaricidas aplicados sobre las colmenas para la prevención de infestación de *Varroa jacobsoni*. Realizaron un análisis simultáneo de cumafós, bromopropilato, amitraz y fluvalinato. Recorrieron colmenas de diversas áreas de Francia durante 3 años, recolectando un total de 320 muestras de miel con información sobre los tratamientos aplicados, teniendo como resultados dos muestras que presentan altos niveles de cumafós ( $0.26$  y  $0.11 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Los autores atribuyen esto a la mala implementación del agroquímico sobre las colmenas infestadas. En comparación, nuestros resultados en residuos de cumafós, supera tres veces los resultados obtenidos por estos autores.

Rial-Otero (*et al.*, 2007) desarrollaron un método basado en la microextracción en fase sólida para la detección de pesticidas en la miel utilizando cromatografía de gases, para la determinación y cuantificación de residuos de acaricidas analizándose 11 muestras de mieles comerciales portuguesas, en dos de ellas se detectó residuos de cumafós a niveles inferiores a los establecidos por el Consejo Europeo.

### **7.3.2. Amitraz**

Para el caso de amitraz donde los resultados indican concentraciones que exceden los LMR, se tiene como el valor máximo encontrado, la muestra M-05 ( $1.8228 \pm 0.030$ ), el cual pertenece al municipio de Huimanguillo de la localidad de Emiliano Zapata.

Estos resultados son superiores a los reportados por Kamel y Al-Ghamdi (2006) donde no detectaron residuos de amitraz ni de sus metabolitos en muestras de miel



y de cera de abejas, los autores asumen, que es debido a la inestabilidad del propio acaricida en medios ácidos. García (*et al.*, 1996) reportaron un valor medio de amitraz de 0.00042 mg kg<sup>-1</sup>. Los resultados de Martel y Zeggane (2002) mostraron que amitraz no sobrepasa los LMR de la UE.

Por otra parte, Rial-Otero (*et al.*, 2007) no detectaron residuos de amitraz y en las muestras de miel. De la misma manera Fernández Muiño (*et al.*, 1997) analizaron por cromatografía de gases muestras de miel para detectar residuos de acaricidas, pero no obtuvieron mieles contaminadas por amitraz. Esto indica que estas mieles tienen un control de la calidad estricto y se pueden considerar como mieles libres de contaminantes.

Como recomendación en esta investigación, es necesario realizar un análisis a profundidad con un mayor número de muestras y compararlas con diferentes periodos de cosechas, corroborarlos con información proveniente del apicultor que permita consolidar la información obtenida, analizar no sólo la miel, sino también la cera y la propia abeja. Para el caso de amitraz es necesario realizar una cuantificación de los productos de degradación 2,4-dimetil-anilina (DMA), 2,4-dimetilfenilformamida (DMF) y N-(2,4-dimetilfenil)-N'-metilformamidina (DPMF), debido que este principio activo es inestable en medios ácidos (Korta *et al.*, 2001) ya que éstos se consideran más perjudiciales para la salud que el principio activo como tal.

Es indispensable realizar cursos de capacitación a los apicultores tabasqueños, con el fin de lograr un uso de acaricidas permitidos por SENASICA que no contamine a la miel, ya que reducir la presencia de estos agroquímicos, permitirán que las mieles tabasqueñas compitan a nivel nacional y sean idóneos para exportación, dado que el mercado extranjero es riguroso con los controles de calidad en este y otros productos.

Este trabajo de investigación promueve la mejora en la producción de miel local y adjuntar información que beneficie los trabajos posteriores en coordinación con los apicultores y de esta manera garantizar productos inocuos y de calidad para los consumidores.

Los métodos y técnicas utilizados en este trabajo fueron basados a los utilizados por Martel y Zeggane (2002), obteniendo resultados satisfactorios.

#### **7.4. Prueba de hipótesis**

Con base a los resultados obtenidos, se rechaza la hipótesis establecida, debido a que todas las muestras presentan residuos de amitraz que sobrepasan los LMR de SENASICA ( $0.2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (SENASICA, 2016); Reglamento (CE) n.º 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo y sus modificaciones posteriores ( $0.2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Reglamento UE, 2017); y de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) ( $0.2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (USEPA, 2019). Y a pesar de que sólo dos muestras presentan residuos de cumafós, éstas se encuentran por encima de los LMR establecidos en  $0.1 \text{ mg kg}^{-1}$  en las tres legislaciones.

### **VIII. Conclusiones**

En las muestras analizadas, que pertenecen al periodo de cosecha de primavera de 2018, se encontraron residuos de amitraz en todas ellas, mientras que la presencia de cumafós sólo en dos muestras.

El 81% de las muestras analizadas está libre de cumafós y podrían cumplir los requisitos para ser miel inocua, sin embargo, dado que amitraz está presente en todas ellas a niveles que superan los LMR de las legislaciones europea, mexicana, y estadounidense, ninguna de las muestras son mieles inocuas y esto contribuye a que se vea comprometida la calidad de la misma, por lo tanto, ninguna de ellas debería ser comercializadas.

## IX. Referencias bibliográficas

- Ahmed, F. E. (2001). Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 20(11), 649-661.
- Alqarni, A. S., Owayss, A. A., Mahmoud, A. A., y Hannan, M. A. (2012). Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. *Journal of Saudi Chemical Society*, 18(5), 618-625.
- Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA). (2019) Electronic Code of Federal Regulations. e-CFR data is current as of May 31, 2019 [https://www.ecfr.gov/cgi-bin/retrieveECFR?gp=1&SID=485a131b918913dcb534ec6b17260725&ty=HTML&h=L&mc=true&r=PART&n=pt40.26.180#se40.26.180\\_1287](https://www.ecfr.gov/cgi-bin/retrieveECFR?gp=1&SID=485a131b918913dcb534ec6b17260725&ty=HTML&h=L&mc=true&r=PART&n=pt40.26.180#se40.26.180_1287)
- Balayiannis, G., y Balayiannis, P. (2008). Bee honey as an environmental bioindicator of pesticides' occurrence in six agricultural areas of Greece. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 55(3), 462.
- Bargańska, Ż., y Namieśnik, J. (2010). Pesticide analysis of bee and bee product samples. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 40(3), 159-171.
- Blasco, C., Fernández, M., Pena, A., Lino, C., Silveira, M. I., Font, G., y Picó, Y. (2003). Assessment of pesticide residues in honey samples from Portugal and Spain. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(27), 8132-8138.
- Bogdanov, S. (2006). Contaminants of bee products. *Apidologie*, 37(1), 1-18.
- Boncrisiani, H., Underwood, R., Schwarz, R., Evans, J. D., Pettis, J., y vanEngelsdorp, D. (2012). Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.* 58, 613-620.
- Castro, P. A., y Ramos, J. P. (2005). Determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en muestras de tomate de la ciudad de Bogotá. Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia.
- Chiesa, L. M., Labella, G. F., Giorgi, A., Panseri, S., Pavlovic, R., Bonacci, S., y Arioli, F. (2016). The occurrence of pesticides and persistent organic pollutants in Italian organic honeys from different productive areas in relation

- to potential environmental pollution. *Chemosphere*, 154, 482–490. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.004>
- Colin, M. E., Bonmatin, J. M., Moineau, I., Gaimon, C., Brun, S., y Vermandere, J. P. (2004). A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 47(3), 387-395.
- Conti, M. E., y Botrè, F. (2001). Honeybees and their products as potential bioindicators of heavy metals contamination. *Environmental monitoring and assessment*, 69(3), 267-282.
- Eissa, F., El-sawi, S., y Zidan, N. E. (2014). Determining Pesticide Residues in Honey and their Potential Risk to Consumers. *Polish Journal of Environmental Studies*, 23(5), 1573–1580.
- FAO/OMS, 2011. *Comisión del Codex Alimentarius: Manual de procedimiento*. (Vigésima edición). FAO, Roma.
- Fernandez, M., Pico, Y., Girotti, S., y Manes, J. (2001). Analysis of organophosphorus pesticides in honeybee by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization– mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(8), 3540-3547.
- Fernandez Muiño, M. A., Sancho, M. T., Simal-Gandara, J., Creus-Vidal, J. M., Huidobro, J. F., y Simal-Lozano, J. (1997). Acaricide residues in honeys from Galicia (N.W. Spain). *Journal of Food Protection*, 60(1), 78–80. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-60.1.78>
- Fernández, M., Picó, Y., y Manes, J. (2002). Analytical methods for pesticide residue determination in bee products. *Journal of Food Protection*, 65(9), 1502-1511.
- García, M. A., Fernández, M. I., Herrero, C., y Melgar, M. J. (1996). Acaricide Residue Determination in Honey. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 56(6), 881–887. <https://doi.org/10.1007/PL00002971>
- Giorgi, A., Madeo, M., Baumgartner, J., y Lozzia, G. C. (2011). The relationships between phenolic content, pollen diversity, physicochemical information and radical scavenging activity in honey. *Molecules*, 16(1), 336-347.

- Irungu, J., Raina, S., y Torto, B. (2016). Determination of pesticide residues in honey: a preliminary study from two of Africa's largest honey producers. *International Journal of Food Contamination*, 3(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s40550-016-0036-4>
- Kamel, A., y Al-Ghamdi, A. (2006). Determination of acaricide residues in Saudi Arabian honey and beeswax using solid phase extraction and gas chromatography. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 41(2), 159–165.
- Korta, E., Bakkali, A., Berrueta, L. A., Gallo, B., y Vicente, F. (2001). Study of semi-automated solid-phase extraction for the determination of acaricide residues in honey by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 930(1), 21-29.
- Korta, E., Bakkali, A., Berrueta, L. A., Gallo, B., y Vicente, F. (2002). Study of an Accelerated Solvent Extraction Procedure for the Determination of Acaricide Residues in Honey by High- Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector, 65(1), 161–166.
- Maoa W., Schulerb M.A., y Berenbauma M.R. 2011. CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). *PNAS*. 108(31): 12657–12662.
- Martel, A.-C., Zeggane, S., Aurières, C., Drajnudel, P., Faucon, J.-P., y Aubert, M. (2007). Acaricide residues in honey and wax after treatment of honey bee colonies with Apivar® or Asuntol® 50. *Apidologie*, 38(6), 534–544. <https://doi.org/10.1051/apido:2007038>
- Montenegro, G., Gómez, M., Díaz-Forestier, J., y Pizarro, R. (2008). Aplicación de la Norma Chilena Oficial de denominación de origen botánico de la miel para la caracterización de la producción apícola. *Ciencia e investigación agraria*, 35(2), 181-190.
- Morzycka, B.(2002). Simple method for the determination of trace levels of pesticides in honeybees using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *J. Chromatogr. A* 2002, 982, 267-273.
- Mullin, C. A., Frazier, M., Frazier, J. L., Ashcraft, S., Simonds, R., vanEngelsdorp, D., y Pettis, J. S. (2010). High Levels of Miticides and Agrochemicals in North

- American Apiaries: Implications for Honey Bee Health. *PLoS ONE*, 5(3).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009754>
- OMS. (2010). Código internacional de conducta sobre la distribución y utilización de plaguicidas: directrices para el registro de plaguicidas.
- Panseri, S., Manzo, A., Chiesa, L. M., y Giorgi, A. (2013). Melissopalynological and volatile compounds analysis of buckwheat honey from different geographical origins and their role in botanical determination. *Journal of Chemistry*, 2013.
- Panseri, S., Catalano, A., Giorgi, A., Arioli, F., Pocopio, A., Britti, D., y Chiesa, L., (2014). Occurrence of pesticide residues in Italian honey from different areas in relation to its potential contamination sources. *Food Control*. 38(1), 150-156.
- Pareja, L., Colazzo, M., Pérez-Parada, A., Niell, S., Carrasco-Letelier, L., Besil, N., Cesio, M. V., y Heinzen, H. (2011). Detection of pesticides in active and depopulated beehives in uruguay. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(10), 3844–3858.  
<https://doi.org/10.3390/ijerph8103844>
- Ramírez Vásquez, A. C. (2012). Formulación de un plan de negocios para el uso y aprovechamiento de los recursos naturales, caso de estudio – Asociación Apícola de Santuario Apisantuario. Universidad Tecnológica de Pereira.
- Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of on maximum residue levels of pesticide in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC. FAOLEX.
- Reglamento (UE) 2017/623 de la Comisión, de 30 de marzo de 2017, que modifica los anexos II y III del Reglamento (CE) n.º 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos del acequinocilo, el amitraz, el cumafós, el diflufenicán, la flumequina, la metribuzina, la permetrina, la piraclostrobina y la estreptomina en determinados productos (Texto pertinente a efectos del EEE.)
- Rial-Otero, R., Gaspar, E. M., Moura, I., y Capelo, J. L. (2007). Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: An overview. *Talanta*, 71(2), 503-514.

- Ripley, B. D., Ritcey, G. M., Harris, C. R., Denommé, M. A., y Lissemore, L. I. (2003). Comparative persistence of pesticides on selected cultivars of specialty vegetables. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(5), 1328-1335.
- Rissato, S. R., Galhiane, M. S., Knoll, F. R., and Apon, B. M. (2004). Supercritical fluid extraction for pesticide multiresidue analysis in honey: determination by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 1048(2), 153-159.
- Rodríguez López, D., Ahumada, D. A., Díaz, A. C., y Guerrero, J. A. (2014). Evaluation of pesticide residues in honey from different geographic regions of Colombia. *Food Control*, 37(1), 33–40.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.011>
- Sáenz Laín, C., y Gómez Ferreras, C. (2000). Mielles españolas: características e identificación mediante el análisis del polen (No. Sirsi) i9788471148773). Ediciones Mundi Prensa. 151-163p.
- Sanchez-Brunete, C., Albero, B., Miguel, E., y Tadeo, J. L. (2002). Determination of insecticides in honey by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography with nitrogen–phosphorus detection and mass spectrometric confirmation. *Journal of AOAC International*, 85(1), 128-133.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). (2016). Límites máximos de residuos tóxicos y contaminantes. <https://www.gob.mx/senasica/documentos/limites-maximos-de-residuos-toxicos-y-contaminantes?state=published>
- Tellería, M. C., y Forcone, A. (2000). El polen de las mieles del valle de Río Negro, provincia fitogeográfica del Monte (Argentina). *Darwiniana*, 273-277.
- Unión Europea. Reglamento (CE) No 396/2005 del parlamento europeo y del consejo de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo y posteriores modificaciones. 2005.

- Vanengelsdorp, D., y Meixner, M. D. (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of invertebrate pathology*, 103, S80.
- Volante, M., Galarini, R., Miano, V., Cattaneo, M., Pecorelli, I., Bianchi, M., Marinoni, M. T.; Cossignani, L y Damiani, P. (2001). A SPME-GC-MS approach for antivarrroa and pesticide residues analysis in honey. *Chromatographia*, 54(3-4), 241-246.
- Wilczynska, A., y Przybylowski, P. (2007). Residues of organochlorine pesticides in Polish honeys. *Apiacta*, 42, 16-24.