



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS
DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

**“DESARROLLO DE MODELOS QUIMIOMETRICOS
MEDIANTE ESPECTROSCOPIA FTIR-MIR Y NIR PARA
LA DETECCION DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN
MIEL DE ABEJA”**

TESIS QUE PRESENTA

KARINA URIBE HERNÁNDEZ

DIRECTORES:

DRA. TZAYHRI GALLARDO VELÁZQUEZ (ENCB)

DRA. NORMA ALMARAZ ABARCA (CIIDIR-
DURANGO)



México, 2015

INDICE GENERAL

INDICE	i
INDICE DE CUADROS	v
INDICE DE FIGURAS	vii
GLOSARIO	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 INSECTOS POLINIZADORES	3
2.1.1 Valor económico de la polinización	4
2.2 LA ABEJA MIELIFERA	4
2.2.1. Subespecies de <i>Apis Mellifera</i>	5
2.3 LA MIEL DE ABEJA	5
2.3.1 Composición de la miel	7
2.4 PRODUCCIÓN DE MIEL A NIVEL MUNDIAL	8
2.4.1 Producción de miel en México	9
2.5 CONTAMINANTES QUE PUEDEN ESTAR PRESENTES EN LA MIEL	12
2.6 ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS EN APICULTURA	12
2.6.1 Regulación internacional de antibióticos en miel	14
2.6.2 Regulación en México de antibióticos en miel	16
2.7 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETECTAR Y CUANTIFICAR	
RESIDUOS DE	17
ANTIBIÓTICOS EN MIEL	18
2.7.1 Métodos de cribado	20
2.7.2 Métodos de cuantificación	21
2.8 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (IR).	22
2.8.1 Modos normales de vibración	23
2.9 INSTRUMENTACIÓN	25

2.9.1. Tipos de medidas en infrarrojo	25
2.9.1.1 Reflectancia total atenuada (ATR)	26
2.9.1.2 Absorbancia	27
2.10 ESPECTROSCOPIA Y QUIMIOMETRIA	28
2.10.1 Modelos matemáticos	29
2.10.1.1 Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)	30
2.10.1.2 Regresión de componentes principales (PCR)	31
2.10.1.2.1 Técnicas de reconocimiento de patrones	31
2.10.1.2.1.1 Modelos SIMCA	32
2.10.2 Desarrollo de modelos quimiométricos	33
2.10.2.1 Tratamientos espectrales realizados a los algoritmos	33
2.10.2.1.1 Región espectral	34
2.10.2.1.2 Autoescalado	34
2.10.2.1.3 Suavizado	35
2.10.2.1.4 Espectroscopia derivada	35
2.10.2.1.5 Normalización	
3 ESTADO DEL ARTE	36
4. JUSTIFICACION	38
5. OBJETIVOS	39
5.1 OBJETIVO GENERAL	39
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
6. MATERIALES Y MÉTODOS	40
6.1 SELECCIÓN DE LA MUESTRAS	40
6.2 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA	40
6.2.1 Verificación de la pureza de la miel mediante la técnica ELISA	40
6.2.1.1 Construcción de la curva de calibración y determinación de antibióticos en la muestra de miel	41
6.3 DESARROLLO DE MODELOS QUIMIOMETRICOS	46
6.3.1 Preparación de la muestras	46
6.3.2. Adquisición de espectros FTIR	46

6.3.3 Condiciones para la obtención de los espectros	46
6.3.4 Obtención del modelo Quimiométrico	46
6.3.5 Clasificación de las mieles mediante modelado suave independiente de la analogía de clases (SIMCA)	48
6.4 ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO	49
7. RESULTADOS	50
7.1 ACTIVIDADES PRELIMINARES. OBTENCIÓN DE ESPECTROS DE ABSORCIÓN PARA ANTIBIÓTICOS Y MUESTRA DE MIEL	50
7.1.1 Obtención del espectro de clorhidrato de oxitetraciclina	50
7.1.2 Obtención del espectro de sulfatiazol sódico	50
7.1.3 Obtención del espectro de sulfato de estreptomina	52
7.1.4 Obtención del espectro de la muestra de miel en la región MIR y NIR	53
7.1.4.1 Espectro de la muestra de miel en la región MIR	56
7.1.4.2 Espectro de la muestra de miel en la región NIR	56
7.2 DESARROLLO DE MODELOS QUIMIOMETRICOS	58
7.2.1. Obtención del conjunto de muestras de calibración	60
7.2.1.1 Espectros de las muestras de calibración adicionadas con antibióticos en la región MIR	60
7.2.1.2 Espectros de las muestras de calibración adicionadas con antibióticos en la región NIR	60
7.2.2 Pretratamientos espectrales realizados a las muestras de calibración, para obtener los modelos de cuantificación optimados.	64
7.2.3 Modelos de cuantificación optimizados en ambas regiones (MIR y NIR)	67
7.2.3.1 Modelos de cuantificación optimizados en la región MIR	68
7.2.3.1.1 Análisis de los modelos optimizados para los tres antibióticos en la región MIR mediante graficas de diagnóstico	68
7.2.3.1.1.1 Número de componentes (factores), muestras atípicas y distancia de Mahalanobis para oxitetraciclina (OTC)	69
7.2.3.1.1.2 Número de componentes (factores), muestras atípicas y distancia de Mahalanobis para Sulfatiazol (SFZ)	73
7.2.3.1.1.3 Número de componentes (factores), muestras atípicas y distancia de Mahalanobis para estreptomina (ESM).	76

7.2.3.2 Modelos de cuantificación optimizados para la región NIR	79
7.2.3.2.1 Análisis de los modelos optimizados para los tres antibióticos en la región NIR mediante graficas de diagnóstico.	80
7.2.3.2.1.1 Elección del número de componentes (factores), muestras atípicos y distancia de Mahalanobis para oxitetraciclina	80
7.2.3.2.1.2 Elección del número de componentes (factores), grafica de muestras atípicos y distancia de Mahalanobis para sulfatiazol	83 86
7.2.3.2.1.3. Elección del número de componentes (factores), grafica de muestras atípicos y distancia de mahalanobis para estreptomicina	89
7.2.3.3 Validación interna y externa de los modelos optimados para las regiones MIR Y NIR	89
7.2.3.3.1 Validación interna de los modelos para OTC, SFZ y ESM para la región MIR	93
7.3.3.3.2 Validación externa de los modelos para OTC, SFZ y ESM para la región MIR	96
7.2.3.4 Validación interna y externa de los modelos optimados para las regiones NIR	96
7.2.3.4.1 Validación interna de los modelos para OTC, SFZ y ESM para la región NIR	99 103
7.3.3.4.2 Validación externa de los modelos para OTC, SFZ y ESM para la región NIR	103
7.3 DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS MEDIANTE LA TÉCNICA ELISA	106
7.3.1 Comparación de resultados obtenidos con los modelos quimiométricos PLS1 en la región MIR y la técnica ELISA	
7.3.2 Comparación de resultados obtenidos con los modelos quimiométricos PLS1 y PLS2 en la región NIR y la técnica ELISA	108
7.4 DESARROLLO DE MODELO DE CLASIFICACIÓN SIMCA PARA GRUPOS DE MUESTRAS DE MIEL SIN ANTIBIÓTICO Y MUESTRAS ADICIONADAS CON OXITETRACICLINA, SULFATIAZOL, ESTREPTOMICINA EN LA REGIÓN MIR Y NIR.	108 109 111 115

7.4.1 Calibración del modelo SIMCA	
7.4.1.1 Preprocesamiento de datos espectrales	
7.4.1.1.1 Digramas de Coomans para los modelos de clasificación creados	
7.4.2 Validación de los modelo	
8.CONCLUSIONES	118
8.1 Conclusión general	119
9 BIBLIOGRAFIA	120
INDICE DE CUADROS	
1. Razas de <i>Apis mellifera</i> relevantes para la industria apícola y sus características morfológicas generales	6
2. Composición de la miel	7
3. Contaminantes que pueden estar presentes en las abejas y en los productos de la colmena	13
4. Comparación de la regulación de antibióticos en la miel para diferentes países.	15
5. Metodologías usadas para determinar el contenido de varios residuos de antibióticos en la miel	18
6. Resultado obtenido con el kit ELISA para oxitetraciclina.	41
7. Resultado obtenido con el kit ELISA para estreptomicina.	42
8. Resultado obtenido con el kit ELISA para sulfatiazol	42
9. Concentraciones presentes en las muestras utilizadas para el desarrollo de los modelos quimiometricos	47
10. Enlaces relacionados a la energía infrarroja absorbida que presenta el compuesto oxitetraciclina	52
11. Enlaces relacionados a la energía infrarroja absorbida que presenta el compuesto sulfatiazol	53
12. Enlaces relacionados a la energía infrarroja absorbida que presenta el compuesto estreptomicina.	56

13. Enlaces relacionados a la energía infrarroja absorbida que presenta la miel en la región MIR	58
14. Enlaces relacionados a la energía infrarroja absorbida que presenta la miel en la región NIR	60
15. Características de los modelos desarrollados que presentaron menores errores de calibración y predicción para los tres antibióticos de interés.	68
16. Características de los modelos desarrollados que presentaron menores errores de calibración y predicción para la región NIR	80
17. Resumen de los errores de calibración y predicción para los 3 algoritmos utilizados para la validación de los modelos, así como sus coeficientes de determinación (MIR)	92
18. Comparación de los valores obtenidos con los modelos con respecto a las concentraciones reales que se tenían en las muestras para validación externa	94
19. Resumen de los errores de calibración y predicción para los 3 algoritmos utilizados para la validación de los modelos, así como sus coeficientes de correlación (NIR)	97
20. Comparación de los valores obtenidos con los modelos con respecto a las concentraciones reales que se tenían en las muestras para validación externa	100
21. Resultados obtenidos al calcular las concentraciones de muestras problemas con el modelo quimiométrico y con la técnica ELISA en la región MIR	104
22. Diferencias obtenidas al comparar los resultados de PLS1 y ELISA con respecto a la concentración real de las muestras	105
23. Resultados obtenidos al calcular las concentraciones de muestras problemas con el modelo quimiométrico y con la técnica ELISA en la región NIR	106
24. Diferencias obtenidas al comparar los resultados de PLS1 y ELISA con respecto a la concentración real de las muestras	108
25. Distancia interclase para muestras contaminadas con oxitetraciclina, sulfatiazol y comparadas con miel sin antibiótico para la región MIR	114
26. Distancia interclase para muestras contaminadas con oxitetraciclina, sulfatiazol y comparadas con miel sin antibiótico para la región NIR	114

27. Tasas de reconocimiento y rechazo obtenidas con los modelos simca para muestras contaminadas con oxitetraciclina, sulfatiazol, estreptomicina y comparadas con miel sin adicionar antibiótico en la región MIR	115
28. Tasas de reconocimiento y rechazo obtenidas con los modelos simca para muestras contaminadas con oxitetraciclina, sulfatiazol, estreptomicina y comparadas con miel sin adicionar antibióticos la región NIR	115
29. Distancia total y residual de las muestras utilizadas para de validación del modelo SIMCA en la región MIR	116

INDICE DE FIGURAS

1. Diagrama general de la polinización.	3
2. Principales países productores de miel.	9
3. Principales países exportadores de miel.	10
4. Rutas de sustancias contaminantes para las abejas y los productos de colmena presentes en el ambiente	11
5. Diferentes tipos de residuos encontrados en la miel según su origen	16
6. Principio básico de la técnica de ELISA	19
7. Conjunto continuo de radiaciones electromagnéticas de diferente frecuencia.	22
8. Modos de vibración que presentan las moléculas	23
9. a) Diagrama de energía potencial y niveles energéticos, osciladores armónicos y anarmónico. b) absorciones características en NIR	24
10. Descripción general de un espectrofotómetro IR con transformada de Fourier.	25
11. Reflexion total interna y elemento de reflexión interna (IRE) utilizando el sistema ATR	26
12. Cuando la radiación (I ₀) incide en la muestra (Izquierda) puede sufrir diferentes fenómenos: absorción (I _A), transmisión (I _T) y reflexión (I _R).	27
13. Modelos de dos clase de objetos creados por SIMCA	32
14. Curvas de calibración obtenida con el kit comercial ELISA para oxitetraciclina.	43
15. Rectas de calibración aplicando obtenida con el kit comercial ELISA para oxitetraciclina.	43
16. Curva de calibración obtenida con el kit comercial ELISA para	44

estreptomicina	
17. Recta de calibración aplicando obtenida con el kit comercial ELISA para estreptomicina	44
18. Curvas de calibración obtenida con el kit comercial ELISA para sulfatiazol	45
19. Recta de calibración aplicando obtenida con el kit comercial ELISA para sulfatiazol.	45
20. Esquema General de trabajo	49
21. Espectro infrarrojo de clorhidrato de oxitetraciclina obtenido en la región del infrarrojo medio mediante 64 scans, longitud de onda de 2cm-1, y resolución de 4 cm-1	51
22. Espectro infrarrojo de sulfatiazol obtenido en la región del infrarrojo medio	54
23. Espectro infrarrojo de estreptomicina obtenido en la región del infrarrojo medio	55
24. Espectro infrarrojo la muestra de miel	57
25. Espectro infrarrojo la muestra de miel en NIR	59
26. Comportamiento de las muestras de miel adicionadas con oxitetraciclina a diferentes concentraciones	62
27. Comportamiento de las muestras de miel, adicionadas con oxitetraciclina a diferentes concentraciones, obtenidos en la región de 1460- 1180 cm -1 en la zona de la huella digital	63
28. Comportamiento de las muestras adicionadas con oxiteraciclina a diferentes concentraciones obtenidos en la región de 940- 740 cm -1	63
29. Comportamiento de las muestras de miel adicionadas con sulfatiazol a diferentes concentraciones	65
30. Absorción del conjunto de muestras de sulfatiazol en el intervalo de 7250- 5350 cm-1	66
31. Absorción del conjunto de muestras de sulfatiazol en el intervalo de 5300- 4500 cm-1	66
32. Comportamiento del número de componentes con respecto al SEP para los tres modelos creados para detectar oxitetraciclina utilizando: a) PCR, b)-PLS1 y c)-PLS2..	69
33. Indica cómo influye cada una de las muestras con respecto al error residual del modelo obtenido con a) PCR, b) PLS1 y c)-PLS2 para muestras con	71

- diferentes concentraciones de oxitetraciclina.
34. Indica la distancia de Mahalanobis para cada una de las muestras con el modelo obtenido con a) PCR, b) PLS1 y c) PLS2 para muestras con diferentes concentraciones de oxitetraciclina. **73**
 35. Comportamiento del número de componentes con respecto al SEP para los tres modelos creados para detectar sulfatiazol utilizando a)-PCR, b)-PLS1 y c)- PLS2). **74**
 36. Indica cómo influye cada una de las muestras con respecto al error residual del modelo obtenido con a) PCR, b) PLS1 y c)-PLS2 para muestras con diferentes concentraciones de sulfatiazol. **75**
 37. Indica la distancia de Mahalanobis para cada una de las muestras con modelo a) PCR, b) PLS1 y c) PLS2 para muestras con diferentes concentraciones de sulfatiazol. **76**
 38. Comportamiento del número de componentes con respecto al SEP para los tres modelos creados utilizando los tres diferentes algoritmos a)-PCR, b)-PLS1 y c)-PLS2. **77**
 39. Indica cómo influye cada una de las muestras con respecto al error residual del modelo obtenido con a) PCR, b) PLS1 y c) PLS2 para muestras con diferentes concentraciones de estreptomicina. **78**
 40. Indica la distancia de Mahalanobis para cada una de las muestras con el modelo a) PCR, b) PLS1 y c) para PLS2. **79**
 41. Comportamiento del número de componentes con respecto al SEP para los tres modelos creados para detectar oxitetraciclina utilizando a)- PCR, b)-PLS1, c) - PLS2. La línea vertical indica el número de factores para obtener el menor error de predicción del modelo. **81**
 42. Indica cómo influye cada una de las muestras con respecto al error residual del modelo a) PCR, b)- PLS1 y c)-PLS2 para muestras con diferentes concentraciones de oxitetraciclina. **82**
 43. Indica la distancia de Mahalanobis para cada una de las muestras con el modelo a) PCR, b) PLS1 y c) PLS2 para muestras con diferentes concentraciones de oxitetraciclina. **83**
 44. Comportamiento del número de componentes con respecto al SEP para los tres modelos creados para detectar sulfatiazol utilizando a)-PCR, b)-PLS1 y **84**

c)-PLS2 para muestras con diferentes concentraciones de sulfatiazol.	
45. Indica cómo influye cada una de las muestras con respecto al error residual del modelo obtenido con a) PCR, b) PLS1 y c) PLS2 para muestras con diferentes concentraciones de sulfatiazol.	85
46. Indica la distancia de Mahalanobis para cada una de las muestras con el modelo obtenido con a) PCR, b) PLS1 y c) para PLS2.	86
47. Comportamiento del número de componentes con respecto al SEP para los tres modelos creados para detectar estreptomicina utilizando a)-PCR, b)-PLS1 y c)-PLS2 para muestras con diferentes concentraciones de estreptomicina.	87
48. Indica cómo influye cada una de las muestras con el modelo a) PCR, b)-PLS1 y c) PLS2 para muestras con diferentes concentraciones de estreptomicina.	88
49. Indica la distancia de Mahalanobis para cada una de las muestras con el modelo a) PCR, b)- PLS1 y c)-PLS2 para estreptomicina.	89
50. Rectas de validación para el antibiótico oxitetraciclina, a) indica la recta obtenida con el modelo PCR, b)- PLS1 y c)- para PLS2	90
51. Rectas de validacion para el antibiótico sulfatiazol, a) indica la recta obtenida con el modelo PCR, b)-PLS1 y c) para PLS2	91
52. Rectas de validacion para el antibiótico eritromicina, 38a indica la recta obtenida con el modelo.	91
53. Coeficientes de determinación obtenidos para las muestras de validación para los tres modelos desarrollado para oxitetraciclina a)-PCR, b)-PLS1 y c)-para PLS2	95
54. Coeficientes de determinación obtenidos para las muestras de validación para los tres modelos desarrollado para sulfatiazol a)-PCR, b)-PLS1 y c)-para PLS2 .	95
55. Coeficientes de determinación obtenidos para las muestras de validación para los tres modelos desarrollado para estreptomicina a)-PCR, b)-PLS1 y c)-para PLS2.	96
56. Rectas de validacion para el antibiótico oxitetraciclina, a) indica la recta obtenida con el modelo a- PCR, b) PLS1 y c) para PLS2	98

57 Rectas de validación para sulfatiazol; a)-indica la recta obtenida con el modelo PCR, b) PLS1 para y c) PLS2	98
58. Rectas de validación para estreptomycin: a-indica la recta obtenida con el modelo a) PCR, b) PLS1 y c) para PLS2	99
59. Coeficientes de determinación obtenidos para las muestras de validación para los tres modelos desarrollado para oxitetraciclina a) PCR, b) PLS1 y c) para PLS2	101
60. Coeficientes de determinación obtenidos para las muestras de validación para los tres modelos desarrollado para sulfatiazol	101
61. Coeficientes de determinación obtenidos para las muestras de validación para los tres modelos desarrollado para estreptomycin	102
62 Coeficientes de determinación para ambas técnicas en la región MIR a) Oxitetraciclina, b) Sulfatiazol c) Estreptomycin	105
63 Coeficientes de determinación para ambas técnicas en la región MIR a) Oxitetraciclina, b) Sulfatiazol c) Estreptomycin	107
64 Ambas imágenes son representativas del mismo modelo realizado en la región MIR, la a es el modelo sin optimizar, b corresponde al modelo final.	110
65 Ambas imágenes son representativas del mismo modelo realizado en la región MIR, la a es el modelo sin optimizar, b corresponde al modelo final	111
66 Diagramas de Coomans para las los modelos obtenidos con SIMCA en la región del infrarrojo medio MIR	112
67. Diagramas de Coomans para las los modelos obtenidos con SIMCA en la región del infrarrojo medio NIR	113

GLOSARIO

Siglas	Significado
IR	Espectroscopia infrarroja
FTIR	Espectroscopia Infrarroja con transformada de Fourier
ATR	Reflectancia total atenuada
OTC	Oxitetraciclina
SFZ	Sulfatiazol
ESM	Estreptomina
ppb	partes por billón
MIR	Región infrarroja media
NIR	Región Infrarroja cercana
PCA	Análisis de componentes principales
PCR	Regresión de componentes principales
PLS1	Regresión de mínimos cuadrados parciales con integración de variables
PLS2	Regresión de mínimos cuadrados parciales sin integración de variables
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
SIMCA	Modelado independiente por analogía de clases

ABSTRACT

This thesis explored the possibility of using infrared spectroscopy in the middle and near region (MID-FTIR, NIR) with chemometrics to develop models for classification and quantification in honey samples contaminated with different concentrations of sulfathiazole, streptomycin and oxytetracycline. The best models to predict levels of these antibiotics were obtained using the partial least squares algorithm (PLS). The models obtained were evaluated using the standard error of calibration (SEC), standard error of prediction (SEP) and the coefficient of determination (R^2); the results obtained by these methods were compared with commercial ELISA kits. The lowest concentrations which are able to detect by these models were 7 ppb (sulfathiazole and oxytetracycline) and 8 ppb (streptomycin) in the MIR and 9 ppb (sulfathiazole and streptomycin) and 8 ppb (oxytetracycline) in the NIR region. Classification models of the three groups of samples were developed by the technique of Class Analogy Soft Independent Modeling (SIMCA). Results showed a 100 % recognition and the rejection rate of 100% for the standard antibiotics; these models were validated by external validation. According to the models developed MID-FTIR, NIR and chemometric techniques may represent a screening tool for detection of these antibiotics in honey.

RESUMEN

En esta tesis, se exploró la posibilidad de utilizar la espectroscopia infrarroja en la región media y cercana (MID-FTIR, NIR), acoplada a quimiometría, para desarrollar modelos de clasificación y cuantificación de muestras de miel contaminados con diferentes concentraciones de sulfatiazol, estreptomicina y oxitetraciclina. Los mejores modelos para predecir los niveles de estos antibióticos, se obtuvieron utilizando el algoritmo de mínimos cuadrados parciales (PLS). Los modelos obtenidos se evaluaron utilizando el error estándar de calibración (SEC), de predicción (SEP) y el coeficiente de determinación (R^2); los resultados obtenidos por estos métodos, se compararon con kits de ELISA comerciales. Las concentraciones más bajas detectables por estos modelos fueron: 7 ppb (sulfatiazol y oxitetraciclina) y 8 ppb (estreptomicina) en el MIR y 9 ppb (sulfatiazol y estreptomicina) y 8 ppb (oxitetraciclina) en la región NIR. Los modelos de clasificación de los tres grupos de muestras, fueron desarrollados utilizando la técnica de Modelado Independiente por Analogía Clases (SIMCA). Los resultados mostraron un reconocimiento y una tasa de rechazo del 100% para los estándares de antibióticos. Estos modelos fueron validados mediante el método de validación externa. De acuerdo con esto las técnicas quimiométricas pueden representar una herramienta de cribado para la detección de estos antibióticos en la miel.

1. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, la desaparición de las abejas se ha convertido en un fenómeno mundial que está repercutiendo de manera negativa sobre la diversidad de las especies vegetales, en la productividad de los cultivos y en la producción de miel (Valdés, 2013).

El Síndrome de Colapso de las Abejas o Colony Collapse Disorder (CCD) es un término acuñado por científicos norteamericanos en el año 2006, para definir la desaparición masiva de abejas, denunciada por los apicultores que en algunos casos, causó pérdidas de 50 % a 90 % de sus colmenas en pocas semanas. Se ha señalado que algunas de las causas del CCD podrían estar relacionadas con cambios en el hábitat los cuales han modificado las interacciones planta-polinizador debido a que las modificaciones ambientales afectan los nichos de los polinizadores, por otra parte el movimiento de las colmenas utilizadas para polinización favorece la dispersión y propagación de plagas y enfermedades (Le Conte *et al.*, 2010), lo que reduce el vigor, la longevidad y la viabilidad de estos insectos y por último también se indica que las prácticas y manejos agrícolas favorecen la mortandad e las abejas. En ese sentido, el uso de cierto tipo de antibióticos y plaguicidas puede provocar una serie de intoxicaciones a las abejas, así como también causar efectos sub-letales que alteran el comportamiento habitual de estos insectos, incluso cuando estos productos son utilizados en concordancia con las instrucciones y las buenas prácticas(EC, 2010).

En las últimas décadas con el incremento de la utilización de antibióticos y plaguicidas para aumentar la producción del sector agropecuario, ha originado la aparición de contaminantes en los alimentos. Generalmente los contaminantes son sustancias las cuales se producen en alguna fase de los procesos técnicos y por lo tanto se infiltran y permanecen en la miel (Lullman, 1998). El potencial de contaminantes en la miel son: antibióticos (Cloranfenicol, estreptomicina, tetraciclinas, sulfonamidas, entre otros); acaricidas (organofosforados,

organoclorados, Piretroides, amidinas, etc); metales pesados (plomo y cadmio) (Lullman, 2007).

En el ámbito de la sanidad apícola, los antibióticos son utilizados para el control de la loque americana (*Paenibacillus larvae*) y la loque europea (*Melissococcus pluton*). (González *et al.*, 2001). La presencia de residuos de antibióticos en representa un peligro potencial para los consumidores, relacionado con la aparición de reacciones alérgicas (hipersensibilidad), desarrollo de resistencia bacteriana y modificaciones en la flora intestinal. (Molino *et al.*, 2006).

Varias técnicas están disponibles para detectar residuos de antibióticos en la miel, entre los que se encuentran los métodos inmunológicos (ELISA), biosensores y métodos cromatográficos (Toldrá y Reig, 2006). En la actualidad las técnicas de análisis en química analítica se están orientando hacia metodologías que requieren menos tiempo para la obtención de resultados. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos métodos que son sencillos en su aplicación, así como rápidos y confiables, se ha convertido en ineludible.

Debido a que la espectroscopia infrarroja cumple con los requisitos antes mencionados, se utiliza en combinación con la quimiometría en diferentes áreas para el análisis de alimentos (Ruoff *et al.*, 2006); estas técnicas son cada vez más comunes durante el análisis de la miel, sin embargo a pesar de sus ventajas aun no se han utilizado para el análisis de residuos de antibióticos. Por lo anterior, en este trabajo se desarrollaron modelos para la detección de este tipo de compuestos mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier en la región del infrarrojo medio y cercano (MIR-FTIR y NIR), como una alternativa a los métodos existentes para determinar residuos de tetraciclina, sulfatiazol y estreptomicina, debido a que el potencial de este tipo de técnicas no se ha explorado hasta el día de hoy.

2. ANTECEDENTES

2.1. INSECTOS POLINIZADORES

Los insectos polinizadores cumplen una función vital para los ecosistemas, ya que ayudan a la fecundación de un gran número de especies de plantas angiospermas o plantas con flores. La polinización puede ser realizada por diferentes agentes (Figura 1), alcanzó un alto valor para el ser humano cuando se comenzó a desarrollar la agricultura. Particularmente la polinización entomófila permite hacer más eficiente la producción de semillas y frutos para la alimentación humana y garantiza la viabilidad de los recursos agrarios y ganaderos (Klein *et al.*, 2007).

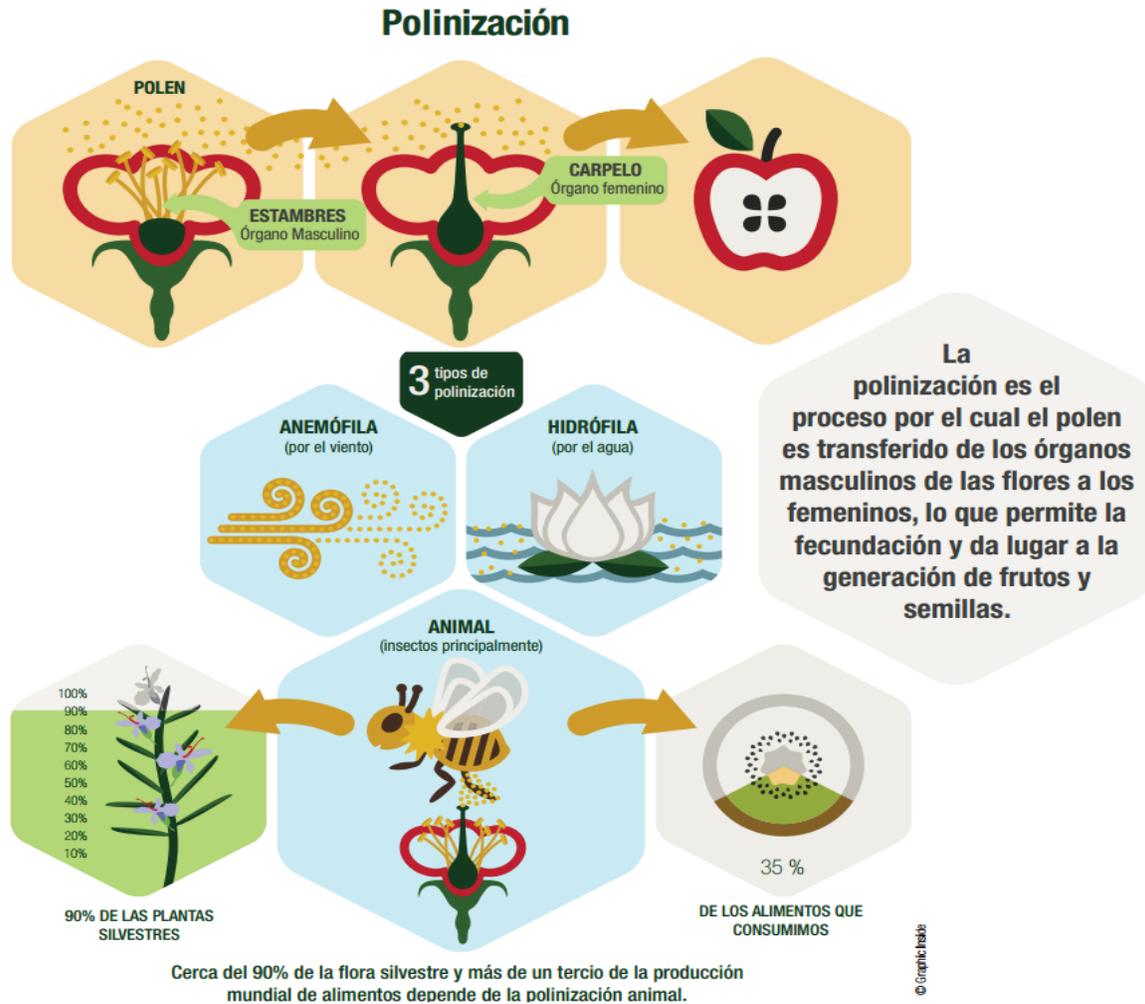


Figura 1. Diagrama general de la polinización. Modificado de Alimentos bajo amenaza, Greenpeace, España, 2014.

Los insectos polinizadores pertenecen fundamentalmente a cuatro órdenes **Coleópteros, Lepidópteros, Dípteros e Himenópteros**. En las zonas de clima templado se ha estimado que el 70-95% de los insectos polinizadores pertenecen al orden Himenoptera, principalmente las especies de abejas solitarias, los abejorros y la abeja doméstica o abeja europea (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758). Esta especie es hoy en día, la más abundante y su valor como especie polinizadora representa, en algunas zonas, entre el 60-90% del trabajo realizado por todos los polinizadores disponibles (Padilla y Flores, 2008).

2.1.1 Valor económico de la polinización

Los cultivos más dependientes de las abejas melíferas son las hortalizas y los frutales, lo que representa cerca de 50 mil millones de euros cada uno, seguido por las oleaginosas, los estimulantes (café, cacao, etc.), nueces y especias. A nivel mundial, el valor económico total anual de la polinización, se ha sido estimado en 53 mil millones de euros, equivalente al 9.5% del valor total de la producción mundial de alimentos de la agricultura. Las abejas polinizan el 35% de la producción mundial de cultivos y aumenta el rendimiento de 87 de los cultivos alimenticios más importantes a nivel mundial (FAO, 2015). Por lo anterior, la producción de miel y cera de las abejas, desempeñan un importante papel ecológico, su servicio en los ecosistemas es clave y en la mayoría de los casos no puede ser cuantificado desde un punto de vista económico.

2.2 LA ABEJA MELÍFERA

Las abejas melíferas europeas fueron traídas al Nuevo Mundo por los colonizadores y son descendientes de un grupo relativamente pequeño que fue trasladado hace unos 400 años (Brand, 1988). La abeja melífera (*Apis mellifera*) tiene su génesis en el continente europeo; aparece sobre la faz de la tierra mucho antes que el ser humano. En cada ambiente fue y está siendo moldeada mediante selección natural por factores como: clima, comunidad apibotánica, enfermedades, competencia con otras especies, parásitos y depredadores. Con el paso de los siglos, se desarrollaron diferentes tipos de

abejas que atienden a cada una de las presiones selectivas de cada ambiente ecológico. Dentro de un área geográfica extensa (un continente) se pueden encontrar subgrupos conocidos como ecotipos, los cuales desarrollan variaciones atendiendo a particularidades locales (Pensante, 2014). Del Viejo Mundo, evolucionan cinco especies de abejas melíferas: *Apis florea* o abeja melífera pequeña, *Apis dorsata* o abeja melífera gigante, *Apis cerana* o abeja melífera oriental, la cual se parece mucho a la cuarta especie *Apis mellifera* o abeja melífera occidental y una quinta especie *Apis intermisa*. En las abejas, los términos raza, variedad o subespecie son sinónimos; sin embargo, el término raza silvestre difiere del término raza doméstica; la cual se desarrolla como resultado de un proceso observado por el ser humano, ya que ha manipulado la genética de la abeja melífera a través de la crianza selectiva, desarrollando diferentes híbridos, mientras que en la primera, son moldeadas por el proceso de selección natural operante en cada medioambiente (Bienefeld *et al.*, 2008).

2.2.1 Subespecies de *Apis mellifera*

La primera clasificación de las subespecies de abejas melífera fue propuesta por DuPraw (1964), basada en mediciones morfométricas, tomando en cuenta la diferencia de tamaño y color, dicha clasificación fue mejorada por Ruttner (1992), quien clasificó a la especie de *Apis mellifera* en 24 subespecies, las cuales fueron divididas en tres ramas o líneas: abejas Europeas, Africanas y Orientales. De todas estas razas de abejas melíferas, las más importantes para la industria apícola son las que se presentan en el Cuadro 1.

2.3. LA MIEL DE ABEJA

La miel en una colonia representa una reserva de alimentos a largo plazo, permite a las colonias sobrevivir largos períodos sin flujo de alimentos desde el medio ambiente (Seeley y Visscher, 2005). La fuente natural de hidratos de carbono de las abejas melíferas es el néctar, el cual es recogido por las abejas pecoreadoras

o forrageras a partir de las plantas, es transportado a la colmena y finalmente almacenado en celdas selladas.

Cuadro 1. Razas de *Apis mellifera* relevantes para la industria apícola y sus características morfológicas generales.

<i>Apis mellifera mellifera</i>	Originaria del norte y oeste de los Alpes extendiéndose hasta Rusia central	
<i>A. mellifera ligustica</i>	Original de Sicilia, Italia	
<i>A. mellifera carnica</i>	Originaria de los Alpes Austriacos y el norte de Yugoslavia, Rumania, Hungría y Bulgaria	
<i>A. mellifera caucasica</i>	Originaria de los Valles del Cáucaso. Entre el Mar Báltico y Muerto	
<i>A. mellifera scutellata</i>	Originaria de África centro-oriental	

Fuente: Rutter, 1992

La transformación de néctar a miel es gradual y comienza durante el vuelo de regreso (Nicolson y Human, 2008). En la colonia el contenido de agua es reducido hasta 26- 20% y las enzimas invertasa, diastasa y glucosa oxidasa son añadidas, éstas modifican la composición de azúcares en la miel obteniéndose en promedio 38% de fructosa, 32% de glucosa y diferentes porcentajes de otros di y trisacaridos (Doner, 1977). La abeja produce miel mediante la eliminación de agua del néctar (la humedad inicial del néctar varía de 70-92%), ya sea por la absorción de agua por las propias abejas al pasarlo de una abeja a otra; abanicando sus alas para evaporar el agua del néctar almacenado y mediante la adición de enzimas. El contenido de azúcar del néctar puede variar desde un mínimo de 4% hasta un máximo de 80%, debido a que los componentes activos en las plantas

dependen de varios factores, como la especie de la planta, tipo de suelo y las condiciones climáticas (Alvarez, 2010).

2.3.1 Composición de la miel

Los principales componentes en la miel son los hidratos de carbono, además contiene también un gran número de otros componentes en pequeñas cantidades y trazas (Alvarez *et al.*, 2010). La composición general de la miel se indica en la Cuadro 2.

Cuadro 2. Composición química de la miel.

Porcentaje (%)	Compuestos	
27.2	Agua	
70-80	Monosacaridos	fructosa, glucosa
5	Disacaridos	maltosa, isomaltosa, sacarosa, nigerosa, turanosa, kojibiosa, maltulosa, trehalosa, gentiobiosa, y laminaribiosa
2.5- 2	Oligosacaridos	erlosa, theanderosa, panosa, maltotriosa, 2-cetosa, isopanosa, isomaltosiltetraosa, centosa, isomaltosil glucosa, isomaltosiltriosa
0.2-2	Ácidos orgánicos libres	ácido glucónico (70-80% del total de ácidos libres), acético, butírico, cítrico, fórmico, láctico, málico, oxálico, succínico, fumárico, α -cetoglutárico, piroglutámico, y maleico
0.2-2	Minerales	potasio, sodio, calcio, magnesio, hierro, cobre, manganeso, cloro, fósforo, azufre, aluminio, yodo, boro, titanio, molibdeno, cobalto, zinc, plomo, estaño, antimonio, cromo y níquel
Trazas	Vitaminas	ácido ascórbico (Vitamina C), Riboflavina (Vitamina B2), ácido pantoténico (vitamina B5), niacina (vitamina B3), tiamina (Vitamina B1), piridoxina (vitamina B6), biotina (vitamina H), ácido fólico (vitamina B9)
	Enzimas	invertasa (sacarasa), diastasa (amilasa), glucosa oxidasa, catalasa, ácido fosfatasa
	Ésteres	formiato de metilo, formiato de etilo, acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de isopropilo, propionato de etilo, metil butirato, etil butirato, isoamilo butirato, valerato de metilo, valerato de etilo, piruvato de metilo, benzoato de metilo, benzoato de etilo, metilfenilacetato
	Cetonas y aldehídos	formaldehído, acetaldehído, propilaldehído, butilaldehído, Isobutilaldehído, benzaldehído, metiletil cetona, isovaleraldehído, caproaldehído
	Alcoholes	metanol, etanol, 2-propanol, 2-propanol, 2-Butanol, 2-Butanol, isobutanol, 2-metil-2-butanol, alcohol bencílico
	Lípidos	glicéridos, esteroides, fosfolípidos, ácido oleico, ácido láurico, ácido esteárico
	Partículas microscópicas	restos de cera, polen, esporas de hongos, esporas bacterianas y levaduras

Fuente: Alvarez *et al.*, 2010; Matej, 2004; Chow, 2002; Pérez, 2002; Terrab *et al.*, 2003

La miel contiene, al menos, 282 sustancias (Chow, 2002); es una solución sobresaturada de azúcares, que también contiene minerales, proteínas, aminoácidos libres, enzimas y vitaminas (Pérez, 2002; Terrab *et al.*, 2003), así como una amplia gama de constituyentes menores, algunos con propiedades antioxidantes, como ácidos fenólicos y flavonoides (Martos *et al.*, 2000; Dimitrova *et al.*, 2007), ciertas enzimas (glucosa oxidasa, catalasa) (Molan y Betts, 2004) y amino ácidos (Pérez *et al.*, 2007).

El color, sabor, e incluso el aroma de un tipo de miel pueden diferir, dependiendo de las características del néctar de las flores. El color de la miel varía desde los tonos blancos hasta los pardos oscuros, aunque predominan los tonos castaño-claros o ambarinos. El color oscuro no significa inferior calidad, cuanto más oscura es la miel, más rica es en fosfato de calcio y en hierro. Las mieles de color claro son más rica en vitamina A y las oscuras en vitaminas B y C. El color de la miel también está en función de pigmentos que pueden estar presentes en el néctar. El sabor depende del tipo de planta, terreno, clima y estación del año, puede ser ligero o intenso; en ocasiones el olor de la miel, puede recordar ligeramente al tipo de flor visitada por las abejas (Montenegro *et al.*, 2015).

2.4 PRODUCCIÓN DE MIEL A NIVEL MUNDIAL

Los países que reúnen las condiciones adecuadas de vegetación, temperatura, precipitación pluvial y además sustentan un potencial néctar-polinífero son los más aptos para el desarrollo de la apicultura (Becerra y Contreras, 2014). Aparte de los factores naturales (condiciones climáticas y flora local), otros factores, como el tipo de colmena usado, el nivel técnico del apicultor y el uso de la transhumancia desempeñan un gran papel en la producción (Olivier y Combeaud; 2012). Fue en 1992 cuando China obtuvo el primer lugar en la clasificación mundial de países productores de miel, debido al fraccionamiento de la URSS. Durante este período, su producción se multiplicó por 2.25 veces; ya que pasó de 181,000 en 1992 a 407,000 toneladas en 2008. Según datos disponibles en la

FAO hasta el año 2012, dos tercios de la producción mundial está concentrada en 6 países (Figura 2). México se encontraba en el octavo lugar abarcando un 4.65 % de la producción de miel a nivel mundial (FAOSTAT, 2012).

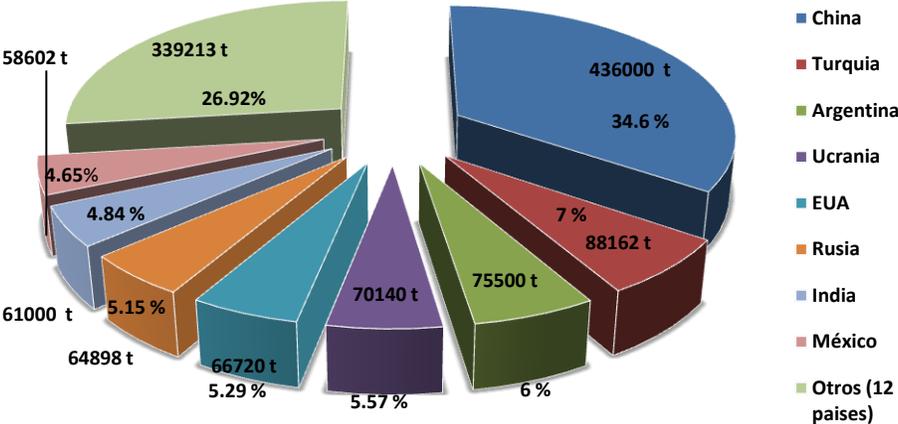


Figura 2. Principales países productores de miel. Elaboración propia con datos de FAOSTAT. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.

2.4.1. Producción de miel en México

Las exportaciones de miel de abeja alcanzaron sus mayores niveles en la primera mitad de la década de los ochenta con 36,000 toneladas, debido a los buenos niveles de producción y el atractivo precio de la miel en el mercado exterior. En la década de los años noventa las exportaciones disminuyeron de 43,000 toneladas en 1992 a 31,115 toneladas en el 2000, debido en gran medida a la afectación de la planta productiva por fenómenos meteorológicos y por el incremento del consumo interno, ya sea en forma directa o a través de procesos industriales. En 2008, se exportaron 29,684.45 toneladas con un valor récord de 83.87 millones de dólares estadounidenses (SAGARPA-ASERCA, 2010). En 2014 México se convirtió en el cuarto exportador de miel en el mundo con 39,152 toneladas (TRADE MAP, 2015) (Figura 3). Actualmente la península de Yucatán produce 40% de la miel del país, seguido del estado de Campeche y Quintana Roo (SIAP-SAGARPA, 2015).

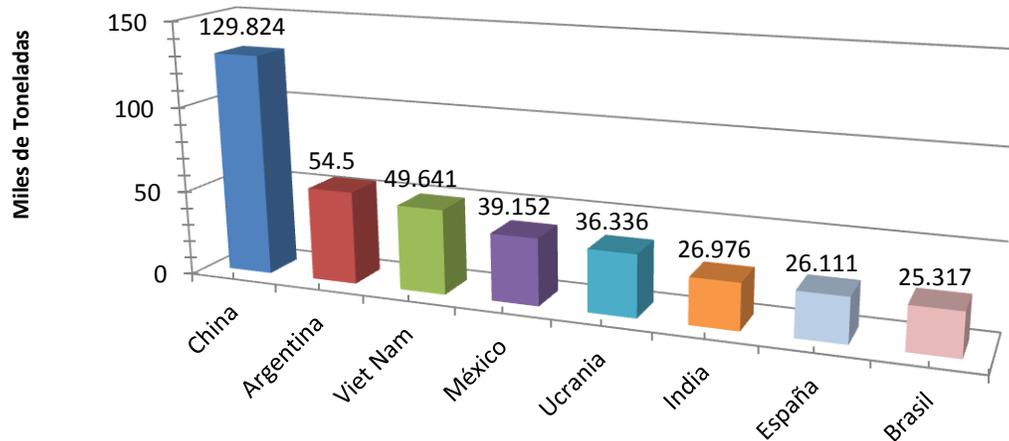


Figura 3. Principales países exportadores de miel. Elaboración propia con datos de Trade statistics for international business development (TRADE MAP, 2015).

La información disponible indica que en 2008 aproximadamente 41,000 apicultores manejaron en México alrededor de 1.8 millones de colmenas, cifra que resulta inferior a las 2 millones de colmenas con que se disponía en el año 2000. Esta disminución que afectó a la apicultura a lo largo de los últimos años, la cual se generó por la pérdida de colmenas a consecuencia de huracanes, principalmente en el Sureste del país, y por el retiro de colmenas de la actividad, debido a la pérdida del material biológico (abejas) por la baja disponibilidad de flora néctar-polinífera en regiones como la Costa de Guerrero, Chiapas, Oaxaca, Tabasco y Michoacán, así como en la Península de Yucatán por el exceso de lluvias; sumándose las heladas tempranas en el altiplano mexicano, que afectaron parte de la cosecha de Puebla, Tlaxcala e Hidalgo, así como la sequía que se registró en el norte del país. El incremento en el número de colmenas, observado desde 2006 hasta 2008 y que en cierta forma ha contrarrestado las pérdidas por los impactos meteorológicos, se debe a varios factores entre los que se destacan: la profesionalización progresiva de la apicultura y la tecnificación de los procesos de producción, y la mejora de las prácticas para el control de la abeja africana y del ácaro eparásito *Varroa destructor*, confundido anteriormente con *Varroa jacobsoni* (Oudemans, 1904), el cual actualmente se considera como una especie más del grupo *Varroa* (Anderson y Trueman, 2000).

Actualmente existen 43 mil productores de miel en México, con 1.9 millones de colmenas. De enero a agosto de 2014, México exportó 33.1 mil toneladas, siendo el destino principal la UE y Arabia Saudita. En este año, se incursionó en países como Angola, Portugal, Colombia y Canadá. En los últimos cinco años, se han exportado en promedio 28 mil toneladas. En 2013 fueron 33 mil, del total el 43.5% fue a Alemania, 16.3% a USA y 12.6% a Bélgica (Martínez, 2024).

La tecnificación de la apicultura nacional ha permitido la movilización de material biológico para el seguimiento de las floraciones y para la polinización de cultivos, lo cual ha contribuido a la distribución de enfermedades bacterianas, fúngicas, parasitarias y virales, así como de plagas que afectan a las abejas y por ende a la producción e inocuidad de la miel. Por lo tanto, es de suma importancia para los apicultores localizar y descartar las diferentes fuentes de contaminación a las que puede estar expuesta la miel que producen (SIFUPRO, 2015). La contaminación puede surgir a partir de las prácticas de la apicultura o desde el medio ambiente.. La Figura 4 indica las rutas de contaminación que sufre la abeja melífera y los productos de la colmena, la contaminación ambiental se ejemplifica como la zona de color gris.

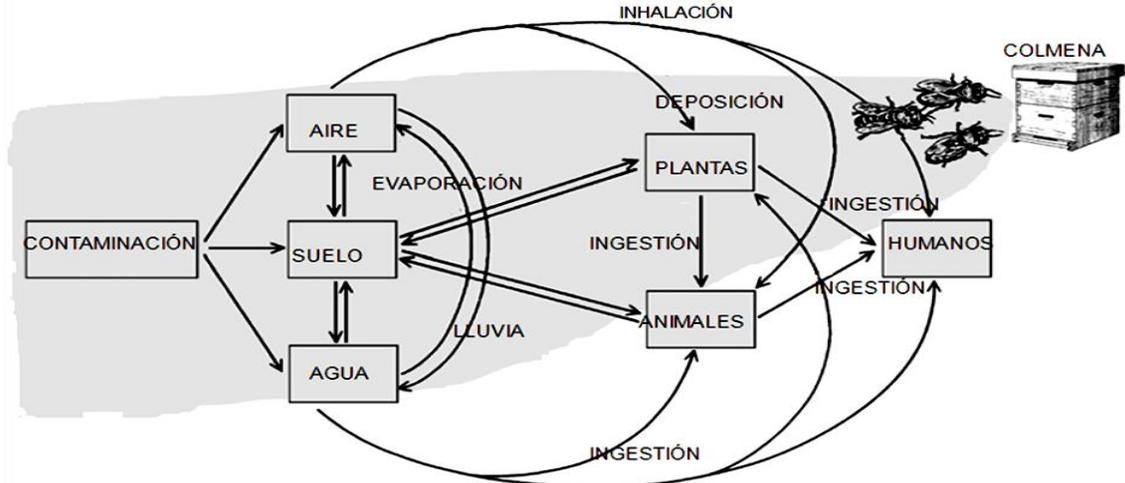


Figura 4. Rutas de sustancias contaminantes para las abejas y los productos de colmena presentes en el ambiente. La zona gris indica sitios en contacto con las abejas. Piro y Mutinelli, 2003.

Los contaminantes ambientales son los insecticidas, herbicidas, fungicidas, bactericidas y metales pesados (plomo, cadmio o mercurio). Los contaminantes antes mencionados están presentes en el aire, el agua, el suelo y las plantas, lo cual permite que sean transportados por las abejas a las colmenas (Bogdonov, 2006).

Por lo anterior, las abejas pueden ser utilizadas para la vigilancia del medio ambiente, ya que son buenos indicadores biológicos debido a dos señales: su mortandad y los residuos presentes en sus cuerpos o en los productos de la colmena (Piro y Mutinelli, 2003). De manera general las fuentes de contaminación pueden ser divididas en aquella proveniente del medio ambiente y la proveniente del manejo realizado por los apicultores.

2.5 CONTAMINANTES QUE PUEDEN ESTAR PRESENTES EN LA MIEL

Por muchos años, el mercado de la miel se caracterizó por la pureza y ausencia de residuos. Tras las crisis registradas en Inglaterra por la encefalopatía bovina esponjiforme (BSE por sus siglas en inglés, enfermedad también conocida como mal de las vacas locas) y en Bélgica por la identificación de dioxinas en pollos, (Grande *et al.*, 2000), la susceptibilidad de los consumidores y apicultores aumentó rápidamente. Inicialmente la atención estaba dirigida a la contaminación ambiental de metales pesados en la miel y posteriormente al problema causado por el uso de plaguicidas agrícolas (Mutinelli y Gallina, 2007). Sin embargo, el peligro principal de contaminación para los productos de la colmena se origina en mayor proporción de las prácticas apícolas que del medio ambiente (Bogdanov, 2006). En la Cuadro 3 se describen los principales riesgos de contaminación para los diferentes productos apícolas.

2.6 ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS EN LA APICULTURA

Una práctica bien documentada en la apicultura es la contaminación de miel con antibióticos. El uso de antibióticos en la apicultura se ha conocido desde 1940.

Cuadro 3. Contaminantes que pueden estar presentes en las abejas y en los productos de la colmena.

		Tipo de contaminante	Características
Provenientes del ambiente	Metales Pesados	Plomo y Cadmio Aire y el suelo contienen metales pesados, su principal fuente es la industria y la circulación de los autos.	El Pb en el aire contamina el néctar. El Cd procedente de industria del metal y de las incineradoras se transporta desde el suelo a las plantas.
	Compuestos orgánicos	PCB, (bifenilos policlorados) Se originan a partir de aceite de motor, refrigerantes y lubricantes, utilizados antes de 1980. Actualmente en la mayoría de los países están prohibidos	Dada su estabilidad están todavía presentes en el entorno y pueden contaminar las plantas y por lo tanto, las abejas y sus productos.
	Pesticidas utilizados en la agricultura	Insecticidas más comunes que se han encontrado en las mieles europeas	<ul style="list-style-type: none"> • Organoclorados (OC): lindano y sus isómeros, hexaclorociclohexano (HCH), aldrín, dieldrín, endrín, isómeros de DDT, heptacloro, epóxido de heptacloro, metoxicloro, endosulfán. Muchos OC ya no se utiliza, pero todavía están presentes en el medio ambiente. • Pesticidas organofosforados (OP): dialifor, triclorofenol y diclorvos. • Carbamatos: plaguicidas que contienen un grupo amino grupo: R2-NH-CO-OR2.
	Otros plaguicidas	Residuos de fungicidas sistémicos en árboles frutales y colza	Vinclozolina, iprodiona y metil tiofanato, captan, difenoconazole, ditianona, pirifenox, penconazol, ciproconazol, carbendazim
		Herbicidas	Contaminan las abejas y el polen, en algunas ocasiones la miel
	Organismos genéticamente modificados	Polen Proveniente de OGM, como la colza y el maíz, se cultivan en algunos países como E.U. y Canadá	En la unión europea la denominación de contenido de OMG en comida es obligatoria por encima de 2% (CE, 2000). El polen puede ser por lo tanto contaminado significativamente, mientras que la miel, que contiene menos de 0,2% de polen no necesita ser declarado como OMG
Contaminantes provenientes de la apicultura	Acaricidas	Sintéticos, sustancias persistentes	Cimiazol (Apitol), Fluvalinato (Apistan) Amitraz (Apivar) Flumetrina (Bayvarol) Cumafos (Perizin)
		Sustancias naturales no tóxicas.	Timol (Apiguard, Apilife-VAR, Thymovar) ácido láctico (solución acuosa). ácido oxálico (diferentes aplicaciones) ácido fórmico (solución acuosa)
	Residuos de antibióticos	Puede proceder de tratamientos contra enfermedades de la cría: Loque Americana (AFB) o Loque europea (EFB).	Sulfonamidas, Aminoglucósidos Tetaciclinas, Anfenicoles, Macrólidos, Betalactámicos, Metabolitos de nitrofuranos. Los tratamientos con antibióticos no son permitidos en la UE, mientras que en muchos otros países que son ampliamente utilizados.
	Otras sustancias utilizadas	Algunos apicultores lo usan para el control de la polilla de cera	p-diclorobenceno (PDCB), naftaleno

Fuente: Bogdanov, 2005; Al-Waili *et al.*, 2012.

Sulfonamidas, tetraciclinas, nitrofuranos y macrólidos se utilizan en la agricultura para prevenir y combatir las enfermedades de las plantas cultivadas (Kümmerer, 2009), y por los apicultores en dosis relativamente altas, como agentes terapéuticos para el tratamiento de infecciones clínicas (enfermedades bacterianas en las crías) o para ser administrados a dosis bajas subterapéuticas, como "factores de crecimiento" (Johnson *et al.*, 2010).

Sin embargo, el uso desmedido de antibióticos conduce a una acumulación de residuos en la miel y a la disminución de su calidad, haciendo más difícil su comercialización (Fuselli *et al.*, 2005). Los residuos de antibióticos muestran una vida media relativamente larga y pueden tener efectos tóxicos directos sobre los consumidores, por ejemplo: reacciones alérgicas en individuos hipersensibles y el trastorno del sistema hematopoyético o causar problemas indirectamente a través de la inducción de cepas bacterias resistentes (Tillotson *et al.*, 2006).

2.6.1 Regulación internacional de los antibióticos en la miel

Debido al hecho de que la miel es un producto importante que se comercializa a nivel internacional, la mayoría de los países suelen aceptar las normas establecidas por el Codex Alimentarius (CODEX STAN 12-1981, sección 4.2 residuos de plaguicidas y medicamentos veterinarios).

El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) ha realizado acuerdos internacionales para la seguridad en los alimentos estableciendo una serie de recomendaciones para distintos medicamentos veterinarios los cuales han sido adoptados por el CODEX. Sin embargo, aún no se ha llegado a un consenso de cuáles deberían ser los límites máximos de residuos (LMR) para los antibióticos en la miel. Por lo anterior la mayoría de los países también cuentan con normas locales. En la Cuadro 4 se presentan los niveles de antibióticos permitidos en la miel para diferentes países. Una dificultad mayor se deriva del hecho que la legislación es compleja, poco clara y no siempre homogénea (Mutinelli y Gallina, 2007).

La Unión Europea (UE) regula la miel bajo la Directiva 2001 Consejo/110/CE; la UE no permite el uso de antibióticos para el tratamiento de las abejas. Para la regulación de residuos de antibióticos en la miel importada ha fijado lo que se denomina RPAs (Reference Points for Action), o "valores de referencia" los cuales son las concentraciones de residuos que sean técnicamente viables de detectar por laboratorios de control de alimentos.

La UE también ha establecido un LMR provisional de 25 g/kg o partes por billón (ppb) para la oxitetraciclina en la miel. Algunos países, como Suiza, Reino Unido y Bélgica, han establecido los límites de acción de los antibióticos en la miel, que por lo general se encuentran entre 0.01 a 0.05 mg/kg para cada grupo de antibióticos.

Cuadro 4. Comparación de la regulación de antibióticos en la miel para diferentes países.

Antibiótico	Codex Alimentarius ²	EU ²	USA ³	Australia ⁴	Canada ⁵	México ²⁰
Oxitetraciclina	No MRL	Provisional MRL 50 ppb	No MRL	300 ppb	300 ppb	No MRL
Clorafenicol	No MRL	RPA ⁸ 0.3 ppb	No MRL	MRL ⁶	AMRL ⁷	0.25 ppb
Eritromicina	No MRL	No MRL	No MRL	No MRL	No MRL	No MRL
Ampicilina	No MRL	No MRL	No MRL	No MRL	200 ppb AMRL	No MRL
Enrofloxacina	No MRL	No MRL	No MRL	No MRL	30 ppb WRL ⁹	No MRL
Estreptomina	No MRL	No MRL	No MRL	No MRL	No MRL	20 ppb
Sulfatiazol	No MRL	No MRL	No MRL	No MRL	No MRL	200 ppb

2. FAO / OMS, 2008 Codex Alimentarius: Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos de límites máximos de residuos (LMR). <http://www.codexalimentarius.net/LMR/vetdrugs/jsp/vetd-qe.jsp>

2. EU- <http://www.emea.europa.eu/index/indexv2.htm>. Medicamentos veterinarios e Información del Comité de unidades de tecnología de los medicamentos veterinarios

3. USA- tolerancia de residuos de nuevos medicamentos veterinarios en los alimentos en el Título 22, Parte 556 (22 CFR 556). <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=556>

4. Australia / Nueva Zelanda Código de Normas Alimentarias <http://www.foodstandards.govt.nz>

5. Canada HC 2008a Health Canada WRLS en miel. http://hc-sc.gc.ca/dhp-mps/legislation/vet/pol/cfia-acia_amrram_table_e.html HC 2008 b Health Canada. Medicamentos y Productos Sanitarios, medicamentos veterinarios, administrativos Límites máximos de residuos (AMRLs) (LMR) establecidos por el Canadá y los límites máximos de residuos disponibles en <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/vet/mrl/mr/>

6. Nivel máximo de residuo (ppb o partes por millón)

7. AMRL - es LMR administrativa significa que la evaluación y las decisiones científicas están completos y que el proceso regulatorio de publicar esta información está en marcha. Una vez que el proceso de reglamentación se ha completado el AMRL convierte en un LMR

8. RPA - Punto de referencia para acción de la UE

9. WRL - Niveles de residuos de trabajo. WRLS. WRLS son los niveles recomendados para residuos de medicamentos en la miel por debajo del cual se considera que no hay riesgo indebido para la salud humana.

20. ND= no detectado. Los valores entre paréntesis se refieren a los límites mínimos de detección que los laboratorios deben garantizar , en el caso de los métodos de laboratorio que son más eficientes las operaciones de concentración detectada se considera por encima del LMR permitido. Proyecto de Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM- 004- ZOO- 2994 , Grasa, Hígado , músculo y riñón en aves, Bovinos , caprinos , cérvidos , equinos , ovinos y porcinos . Residuos Tóxicos . Límites Máximos permisibles y Procedimientos de Muestreo.

En los EE.UU, Canadá y Argentina, los tratamientos preventivos con antibióticos se consideran un procedimiento de rutina para prevenir brotes de AFB, en consecuencia, varias cepas de *P. larvae* han mostrado resistencia a los antibióticos, como es la oxitetraciclina (OTC), la cual ha sido detectada en Argentina (Alippi, 2007), así como en muchas áreas de los Estados Unidos (Miyagi *et al.*, 2000) Figura 5.

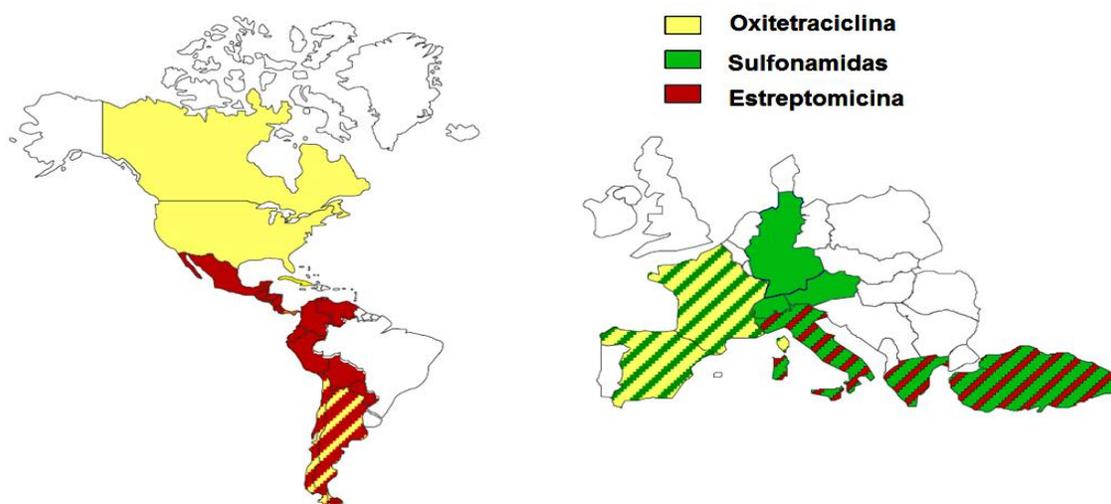


Figura 5. Diferentes tipo de residuos encontrados en la miel según su origen (Service de Protection de la Consommation, Switzerland, 2000).

2.6.2. Regulación de antibióticos en la miel en México

En México, los siguientes productos se utilizan principalmente como germicidas en miel: Terramicina (oxitetraciclina) para el control de loque americana, Apisulid (sulfatiazol sodico) y Estrepen (estreptomina), para controlar loque europea, ESB-3 (sulfadiazina) y Fumidil-B (fumagilina) para el control de nosemosis (CONASA, 2012).

Considerando la importancia de la comercialización de la miel mexicana dentro y fuera del país, así como los actuales requerimientos sanitarios del mercado para los alimentos, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), en coordinación con el SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria) e INCA Rural (Instituto Nacional

para el Desarrollo de Capacidades del Sector Rural, A.C) ha establecido el Programa Nacional de Calidad y Seguridad para la Miel, a fin de implementar buenas prácticas y normas de producción. Las líneas del Programa Nacional de Seguridad y Calidad son: a) mejorar el conocimiento técnico de los apicultores con el fin de reducir el riesgo de contaminación (como el uso inadecuado de medicamentos para el control de enfermedades), b) la creación de un programa de seguimiento de la calidad de la miel con el fin de garantizar la calidad para el mercado nacional e internacional, c) registro de apicultores y empresas productoras, d) asesoría para la obtención de certificación para el mercado nacional e internacional.

2.7 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETECTAR Y CUANTIFICAR RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN MIEL

La estimación de residuos de antibióticos en miel es realizada mediante dos métodos: Presuntivos o “Screening” y Confirmatorios. Los métodos de “screening” (microbiológicos: multiplate test, inmunoensayos: ELISA, sistema de ensayo receptor: CHARM II) son pruebas que tienen como objetivo identificar la presencia de una y/o varias drogas en una muestra sospechosa (Montoya 2004), y por lo general proporcionar resultados semi-cuantitativos (Cooper *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007). Las ventajas de estos métodos son una mínima extracción y su fácil aplicación, sus características ideales implican: una tasa baja de muestras como falsos positivos, alto rendimiento, facilidad de uso, tiempo de análisis corto, buena selectividad y bajo costo (Bargańska *et al.*, 2011). En el análisis rutinario de antibióticos en miel generalmente son utilizadas las técnicas exploratorias Charm II Test ELISA y las metodologías confirmatorias HPLC, LC-MS para las muestras positivas (Bogdanov, 2003). La Cuadro 5 enumera las técnicas presuntivas que se utilizan comúnmente para determinar el contenido de residuos de antibióticos en la miel.

Cuadro 5. Metodologías usadas para determinar el contenido de varios residuos de antibióticos en la miel.

Tipo de método	Ensayo	Principio	Observaciones
Presuntivo	Charm II (Charm Sciences, Inc.)	Analitos diana se unen a receptores y el nivel de radioactividad de H3 o C14 se determina.	Se utiliza en las pruebas de detección para las sulfonamidas, tetraciclinas, b-lactámicos, macrólidos, anfenícoles y amino-glucósidos (estreptomina).
	ELISA (prueba de inmunoensayo enlazado a enzimas)	Método inmunológico utilizado para la determinación cuantitativa de antibióticos por medio de anticuerpos	El método es aplicable para análisis cuantitativo preliminar. Permite la detección de un antibiótico en la miel en el intervalo por encima de 1-50 ppb, dependiendo de sus propiedades químicas.
	Tetrasensor (Unisensor)	La prueba utiliza dos elementos: un reactivo que contiene una cantidad de receptor marcado y una tira reactiva que consiste de un conjunto de membranas de captura.	Se utiliza como prueba de detección para la rápida determinación de las tetraciclinas presentes en la miel incluso a niveles de 10ppb.
	Sulfasensor (PAC Transia, Biacore)	Este ensayo emplea un anticuerpo capaz de detectar 10 sulfonamidas.	Se utiliza en la prueba de detección de sulfonamidas a nivel de detección de 25 ppb.
Confirmación	HPLC	Cada clase de antibiótico tiene que ser probado por separado, la confirmación de los analitos objetivo se basa principalmente en la comparación del tiempo de retención con un estándar generalmente de alto costo y algunos analitos tienen que ser derivatizados para obtener su detección	Límites de detección cercanos a 1 ppb en análisis de antibióticos. Los tiempos de análisis, costos de reactivos y dificultad de aplicación a gran escala, son las desventajas que cuentan al momento de su elección
	LC/MS-MS	Metodología basada en cromatografía líquida (LC) acoplada a espectrometría de masas (MS). El análisis se basa en la limpieza por SPE, la separación por HPLC de fase inversa y posterior detección por MS-MS. El MS-MS asegura una detección específica casi de "100% "	El límite de detección es de 0.5 dependiendo de la sustancia.

Fuente: Morlot y Beaune, 2003; Bogdanov, 2003; Reybroeck *et al.*, 2007; Moeller *et al.*, 2007

2.7.1. Métodos Presuntivos

La técnica **ELISA** (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados (ligados) con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una

enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoadsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmobilizada y por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un substrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro (Lefkovits y Pernis, 1988) (Figura 6). Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad, debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo. Como enzimas se suelen utilizar la peroxidasa, la galactosidasa o la glucosa oxidasa. Esta técnica se utiliza para la medida de hormonas, antígenos de la hepatitis y otras muchas sustancias que se encuentran a muy bajas concentraciones. En este tipo de técnicas inmunológicas se utilizan anticuerpos de alta afinidad para evitar al máximo la reactividad cruzada (Calderon, 2007).

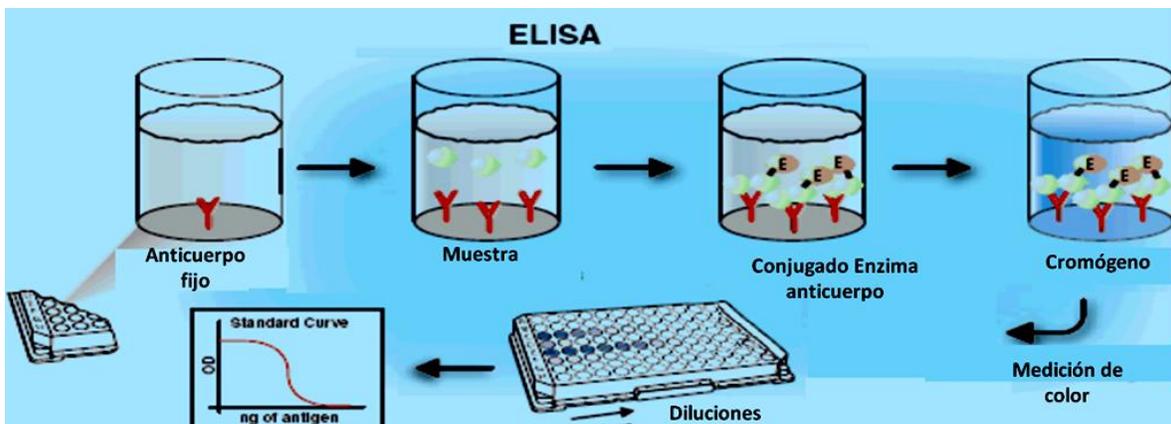


Figura 6. Principio básico de la técnica de ELISA (Calderon, 2007).

Esta metodología se ha probado con éxito en la miel (Usleber *et al.*, 1996; Heering *et al.*, 1998). El límite de detección de los kits comerciales suele estar entre 1 a 10 ppb (Montoya, 2004). Con este método, el intervalo de concentración de antibióticos individuales puede ser determinado cuantitativamente sin embargo, debido a que puede presentar reactividad cruzada con otros antibióticos del mismo grupo, el método puede ser utilizado solamente para la determinación semicuantitativa (Bogdanov, 2003). Por otra parte, se ha encontrado que el desempeño de técnicas de inmunoensayo que se aplican a muestras de miel están de

acuerdo con los resultados obtenidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como método confirmatorio (Ferguson *et al.*, 2002).

Charm II. Este método ha sido utilizado para diferentes alimentos como la carne y la leche y ha sido adaptado para las pruebas de miel (Kocher *et al.*, 1996, Edder y Corvi 2001, Bogdanov 2003). Los resultados de la prueba se consideran como cualitativos o semi-cuantitativos y para algunos antibióticos (por ejemplo, estreptomicina) son más exactos que otros (por ejemplo, sulfonamidas) ya que se ha observado que el ácido para Amino benzoico (PABA), un componente de la miel, puede alterar la prueba de sulfonamidas y dar resultados "falsos positivos" (Bogdanov 2003). En su conjunto, la prueba del Charm de la miel es una herramienta valiosa para evaluaciones de rutina ya que son bastante sensibles (0.3 ppb) para sulfonamidas, cloranfenicol, tetraciclinas, aminoglucósidos específicos y macrólidos (Montoya, 2004).

2.7.2 Métodos de Confirmación

Los métodos HPLC, LC-MS y LC/MS/MS se utilizan para la confirmación de residuos de antibióticos. A diferencia de los métodos de screening, las características principales de los métodos confirmatorios son la especificidad y sensibilidad. Estas metodologías debido a su alta especificidad, sensibilidad e intervalo cuantitativo, permiten una elevada confiabilidad y disminución de resultados falsos-positivos. Sin embargo, los tiempos de análisis, costos de reactivos y dificultad de aplicación a gran escala son las desventajas que cuentan al momento de su elección (Montoya, 2004).

Se ha demostrado la utilidad de los métodos de análisis mencionados anteriormente, para evaluar la detección y cuantificación de los antibióticos en la miel. (Mondragon y Ulloa, 2011); sin embargo, la mayoría de estos métodos necesitan de pretratamientos de muestras muy largas y tediosas además de utilizar una cantidad importante de reactivos. Es por esto que en los últimos años se han desarrollado metodologías rápidas y sencillas que no tienen las

características antes mencionadas, como es el caso de la espectroscopia infrarroja media (MIR), cercana (NIR) acoplada a la quimiometría. A continuación se presentan aspectos básicos de la espectroscopia en la región media y cercana así como de la quimiometría.

2.8 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (IR)

La radiación electromagnética es una forma de energía que presenta características de corpúsculo y onda. Dependiendo de la región del espectro en la que se trabaje y por tanto de la energía de la radiación utilizada, la interacción con la materia será de diferente naturaleza: excitación de electrones, vibraciones moleculares y rotaciones moleculares (Figura 7) (Schwedt, 1997).

La parte del espectro electromagnético, denominada infrarrojo (IR), se divide habitualmente en tres regiones como consecuencia de su diferente uso en aplicaciones prácticas, la naturaleza de las transiciones vibracionales implicadas y la instrumentación que se requiere para su generación y detección. Estas tres regiones son: IR cercano o NIR entre 13000 y 4000 cm^{-1} (donde se producen absorciones debidas a sobretonos y combinaciones de las bandas fundamentales), denominado así porque se encuentra a continuación de la región visible del espectro; IR medio (MIR o simplemente IR, donde tienen lugar las vibraciones fundamentales) entre 4000 y 200 cm^{-1} ; e IR lejano (FIR) entre 400 y 10 cm^{-1} (Figura 7) (Duque, 2010).

Hoy en día, la espectroscopia infrarroja (IR) es una de las técnicas analíticas más importantes, se basa en las vibraciones de los átomos de las moléculas (Serrano, 2015). Un espectro infrarrojo se obtiene haciendo pasar radiación infrarroja a través de una muestra y posteriormente determinar qué fracción de la radiación incidente se absorbe a una energía en particular (Ellis et al., 2012). Cuando una muestra es irradiada con un haz de radiación infrarroja, los grupos funcionales dentro de la muestra absorben esta radiación y vibran en una de una serie de formas conocidas (vibraciones de extensión y flexión) (Stuart, 1997).

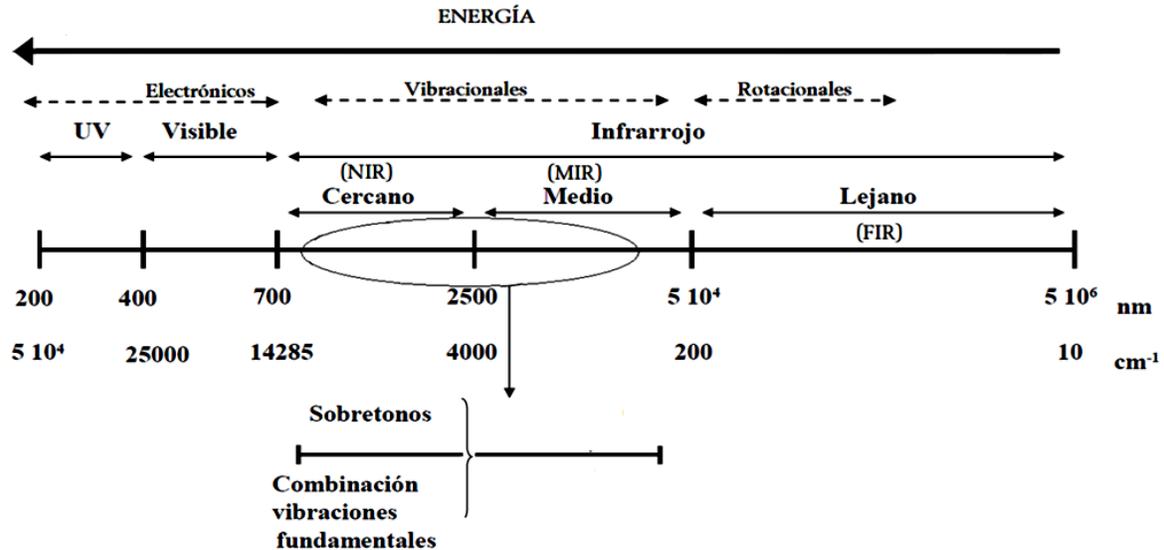


Figura 7. Conjunto continuo de radiaciones electromagnéticas de diferente frecuencia. La intensidad de la energía es proporcional a $\tilde{\nu}$. Se indica la región de trabajo para la región MIR y NIR (Modificado de Ventura, 2007; Hernández, 2008).

Estas vibraciones/absorciones pueden entonces ser correlacionadas directamente con especies químicas. El espectro de absorbancia resultante, puede ser descrito como una "huella digital" química, ya que es característica de la muestra particular bajo análisis, por lo tanto, cada sustancia química tendrá su propio perfil infrarrojo (Dunn y Ellis, 2005) En un espectro de absorción, la energía a la que cualquier banda aparece, corresponde a la frecuencia de un tipo de vibración de una parte de una molécula presente en una muestra, por ello las vibraciones de moléculas son cruciales para la interpretación de los espectros (Serrano, 2015).

2.8.1. Modos de vibración

Las interacciones de la radiación infrarroja con la materia pueden ser entendidas en términos de cambios en dipolos moleculares asociados a las vibraciones y rotaciones. Una molécula puede ser considerada como un sistema de masas unidas por enlaces con propiedades de tipo resorte. Los átomos en las moléculas también pueden moverse uno con relación al otro, es decir, las longitudes de enlace pueden variar o un átomo puede moverse hacia fuera del plano donde se encuentre. Los movimientos de estiramiento o tensión (cambios en la longitud de enlace) y flexión (cambio en el ángulo de enlace), se conocen colectivamente

como vibraciones (Figura 8). Una molécula sólo puede absorber energía cuando la radiación infrarroja entrante es de la misma frecuencia que uno de los modos fundamentales de vibración de la molécula (Ventura, 2007).

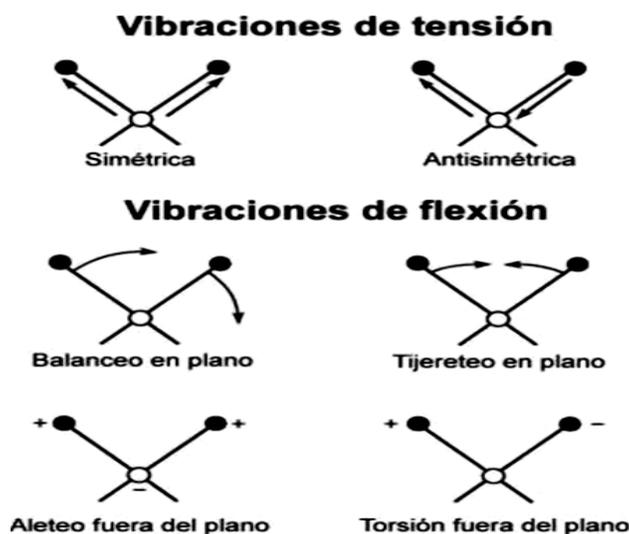


Figura 8. Modos de vibración que presentan las moléculas : Estiramiento y Flexión. Tomado de http://luz.izt.uam.mx/mediawiki/index.php/Firmas_espectroscopicas.

En el caso de la espectroscopia NIR, los espectros reflejan absorciones debidas a sobretonos y combinaciones de bandas como consecuencia de la interacción de dos vibraciones diferentes de los grupos funcionales (Groenewald y Koster, 2006). Utilizando la mecánica cuántica y el modelo del oscilador anarmónico para representar los enlaces, se demuestra que las bandas en NIR se producen como consecuencia de transiciones entre niveles de energía en los que el número cuántico vibracional cambia en una unidad denominada banda fundamental, o en más de una unidad, que se denominan sobretonos (Hollas, 1992).

2.9 INSTRUMENTACIÓN

Los avances más significativos en la espectroscopia infrarroja han surgido como resultado de la introducción de espectrómetros con transformada de Fourier (FTIR). Este tipo de instrumento emplea un interferómetro y explota el proceso matemático ya mencionado (Stuart, 2004).

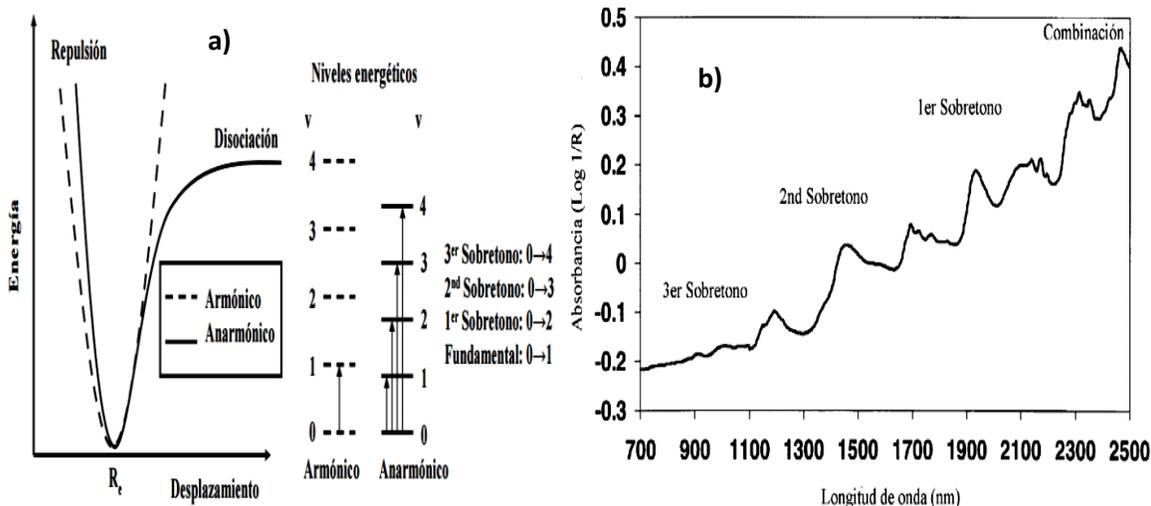


Figura 9. a) Diagrama de energía potencial y niveles energéticos, osciladores armónicos y anarmónico. b) absorciones características en NIR (Hernández, 2008).

Los espectrofotómetros IR tienen los mismos componentes básicos que el resto de aparatos utilizados en procesos de absorción. Básicamente, se necesita un instrumento para medir la transmisión de radiación electromagnética de una muestra en función de la longitud de onda o del número de onda. Los espectrofotómetros de transformada de Fourier (FT) utilizan un interferómetro que permite una modulación de la radiación dependiente de la longitud de onda, cuentan con una fuente de radiación que debe aportar la mayor intensidad posible en la región de longitud de onda que se está investigando (Stuart, 2004). El sistema óptico presente en este tipo de equipos permite transmitir la radiación desde la fuente al detector con la mínima pérdida, de modo que se utilizan espejos de vidrio con un recubrimiento de oro o aluminio. El sistema óptico va equipado con un compartimento para la muestra, que se sitúa en el camino de la radiación; en esta parte se realizan medidas diferentes a la transmisión (Ejemplo Reflectancia total atenuada: ATR) mediante celdas u otros accesorios (Figura 10) (Spraggs, 1999). Por último el detector se emplea para convertir la señal óptica en una señal eléctrica. Los aparatos basados en el método de transformada de Fourier ofrecen una relación señal/ruido mucho mejor, en éstos el componente más importante es el interferómetro de Michelson, en el cual el haz de radiación que viene de la fuente se divide mediante un espejo (beamsplitter) en dos haces

parciales que se reflejan en espejos, uno fijo y otro móvil, vuelven al beamsplitter y se recombinan dando una interferencia. La intensidad de señal que llega al detector tras atravesar la muestra, representada como función de la diferencia en la trayectoria de ambos haces (retardo) es lo que se llama interferograma. Si la fuente suministra diferentes radiaciones el patrón de interferencia corresponde a la suma de las señales generadas por las frecuencias individuales. Este proceso permite recoger información simultánea acerca de la respuesta de la muestra a todas las frecuencias en el intervalo de estudio (Carbonato y Nucara, 2010). La solución de la expresión matemática que describe el interferograma para todos los números de onda se resuelve mediante la transformada de Fourier y representa el espectro de la muestra.

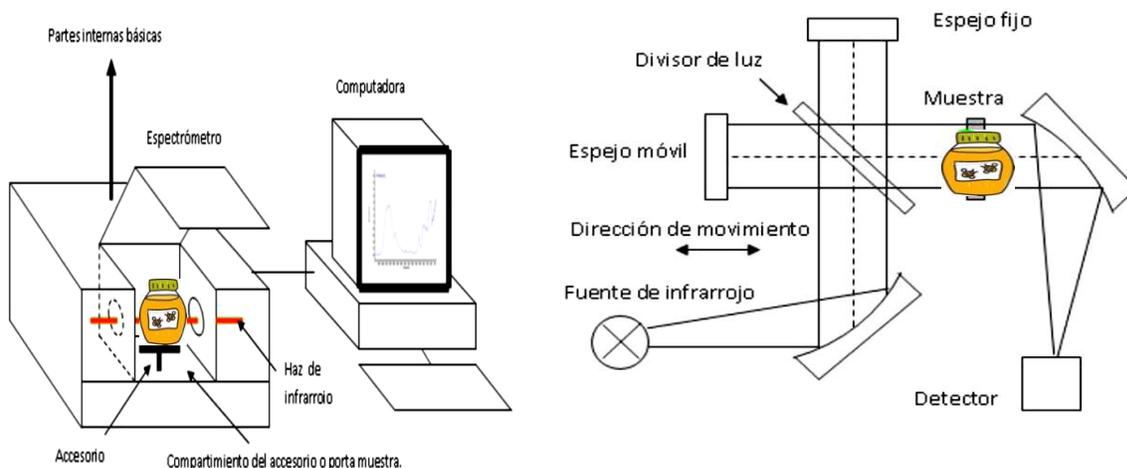


Figura 10. Derecha: diseño óptico básico de un espectrómetro FT con interferómetro de Michelson. Izquierda: descripción general de un espectrofotómetro IR con transformada de Fourier (Modificado de Mondragon y Ulloa, 2011).

2.9.1 Tipos de medidas en infrarrojo

2.9.1.1 Reflectancia total atenuada (ATR)

Cuando se realiza el espectro de una muestra la radiación que incide sobre ella puede sufrir diferentes fenómenos: absorción, transmisión y reflexión. La espectroscopia basada en el fenómeno de la reflexión se denomina reflectancia total atenuada (ATR) (Jiménez, 2007).

La ATR es una medida de reflexión total interna (Spraggs, 1999), que se basa en la formación de una onda evanescente en el límite entre dos superficies con diferente índice de refracción (n). Si el haz de radiación incide en el material con un ángulo mayor que un valor crítico, la radiación electromagnética no puede atravesar el medio de menor índice de refracción. Así pues, el haz se refleja totalmente en la cara interna del cristal (ZnSe). La onda evanescente creada penetra ligeramente en el otro medio, unos pocos μm , interaccionando con la muestra y dando lugar a la absorción por ésta de la radiación (la luz que viaja a través del cristal se verá atenuada (de ahí el nombre de la técnica) (Duque, 2010) El haz se refleja varias veces en las caras internas del cristal (y por ende penetrando de forma repetida en la muestra), aumentando así la sensibilidad de la medida (Figura 11).

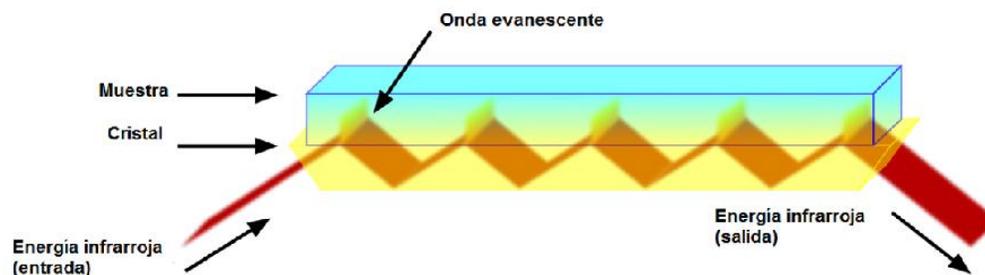


Figura 11. Reflexión total interna y elemento de reflexión interna (IRE) utilizando el sistema ATR. <http://www.chromacademy.com/lms/sco533/15-infrared-spectroscopy-attenuated-total-reflectance.html?fChannel=14&fCourse=77&fSco=533&fPath=sco533/15-infrared-spectroscopy-attenuated-total-reflectance.html>

El índice de refracción (n) del material del cristal determina la penetración de la onda evanescente en la muestra: a mayor n menor penetración y, consecuentemente, la absorción es menor, obteniéndose espectros menos intensos. Un cristal de Ge con $n= 4.0$ producirá espectros ATR más débiles que un cristal de ZnSe con $n= 2.3$ (Ventura, 2007).

2.9.1.2 Absorbancia

La medida más común en el infrarrojo es la que se basa en la absorción (o la intensidad transmitida) (Duque, 2010). El espectro por transmisión a través de la muestra determinada está relacionado con la concentración de la muestra (Miller,

1993). Para que se produzca la absorción infrarroja de la materia, la energía del fotón incidente debe de tener la energía precisa para satisfacer los requerimientos energéticos de la muestra a analizar ya que los niveles energéticos se encuentran cuantizados (Duque, 2010). La representación de la transmitancia o de la absorbancia como una función de la longitud de onda (λ), es lo que conforma el espectro de la muestra. La relación que existe entre la concentración y la absorbancia para cada longitud de onda esta descrita por la ley de Lambert-Beer, la cual es lineal para soluciones diluidas; la absorción de la radiación por parte de la muestra es proporcional a la longitud del camino óptico (espesor de la celda), a la concentración de la solución y a una constante de proporcionalidad específica de cada muestra y para cada longitud de onda (λ), denominada absorptividad molar (ϵ). (Figura 12).

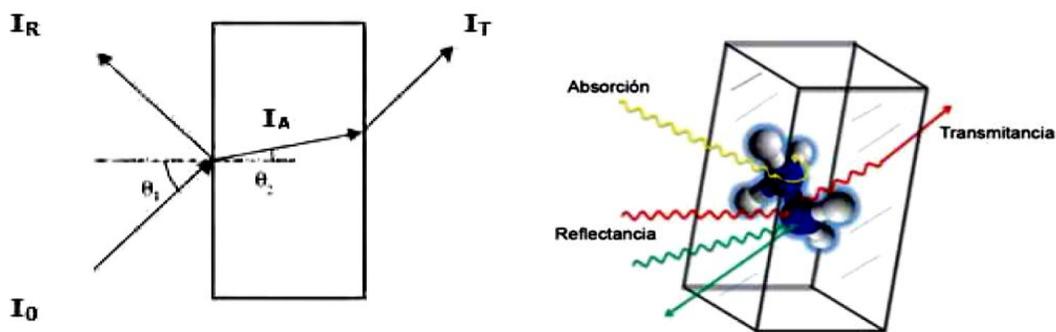


Figura 12. Diferentes formas de absorción de la materia, cuando la radiación (I_0) incide en una muestra. Izquierda: se indican fenómenos de absorción (I_A), transmisión (I_T) y reflexión (I_R). (Barreto 2010). Derecha: se indican fenómenos de absorción (línea amarilla), transmitancia (línea roja) y reflectancia (línea verde) que pueden tener los componentes moleculares de un objeto incidido por un haz de energía infrarroja. (Ramirez *et al.*, 2012).

La pérdida en la linealidad a concentraciones muy elevadas se puede producir al variar ϵ como consecuencia de cambios en el índice de refracción de la disolución. Otras desviaciones de la linealidad tienen su origen en la propia instrumentación: presencia de radiación reflejada o dispersada (Skoog y Leary, 1992).

2.10 ESPECTROSCOPIA Y QUIMIOMETRÍA

Hoy en día, los instrumentos analíticos modernos permiten producir grandes cantidades de información (variables o características) para un gran número de

muestras (objetos) que puede ser analizadas relativamente en poco tiempo. Esto conduce a la disponibilidad de matrices de datos multivariantes que requieren el uso de procedimientos matemáticos y estadísticos, con el fin de extraer de manera eficiente el máximo de información útil (Alcalá, 2006). Obtener datos no es sinónimo de poseer información; se debe interpretarlos y colocarlos en el contexto adecuado para convertirlos en información útil (Massart *et al.*, 1997). La Quimiometría es la disciplina que tiene esta finalidad. Sus fundadores la definieron como: “la disciplina química que utiliza la Matemática, la Estadística y la lógica formal para (a) diseñar o seleccionar procedimientos experimentales óptimos; (b) proporcionar la máxima información química relevante a partir del análisis de datos químicos, y (c) obtener conocimiento de dichos sistemas (Ramis y García 2001). Por todo ello, la Quimiometría se sitúa en un campo interdisciplinario. Muchos autores, coinciden en considerarla como una rama aplicada de la Química Analítica y la Estadística (Nuñez *et al.*, 2011). El impulso definitivo de la Quimiometría como disciplina científica independiente ocurre al lograrse el acoplamiento de la instrumentación científica con los microordenadores a mediados de la década 1980-1990 y con ello, el desarrollo del análisis químico instrumental (Talavera y Rodríguez, 2010).

2.10.1 Modelos matemáticos

Los modelos de predicción y clasificación se encuentran entre las metodologías más ampliamente utilizadas para el análisis de datos y juegan un papel importante en aplicaciones quimiométricas. El objetivo principal de estas técnicas estadísticas es modelar y predecir una o más respuestas en términos de un conjunto de variables relacionadas (Hemmateenejad *et al.*, 2007). De tal forma que un gran avance en la aplicación de la técnica de FTIR a los sistemas complejos (alimentos, tejidos biológicos, etc.) ha sido la aplicación de técnicas quimiométricas como: regresión de componentes principales (PCR) y regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS), ambos métodos de calibración multivariante son de los más utilizados para el análisis estadístico de los datos espectrales. Estas técnicas

hacen uso del enfoque de calibración inversa, la estimación de estos modelos implica la inversión de una matriz de datos, PCR y PLS resuelven esta matriz mediante la sustitución de las variables originales con combinaciones de nuevas variables lineales o de componentes principales (PC). Los modelos matemáticos cumplen un papel importante en la espectroscopia, ya que son necesarios para la predicción de los valores de las propiedades de las muestras realizadas en IR (Conzen, 2003).

2.10.1.1 Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS, Partial Least Squares Regression).

PLS es un método de regresión desarrollada por Wold (1966). Se utiliza para encontrar las relaciones fundamentales entre las variables independientes (X) y las variables dependientes (Y), las cuales son modeladas simultáneamente teniendo en cuenta no sólo la varianza de X , sino la covarianza entre X e Y (Martens, 1992). Entonces, X e Y se descomponen simultáneamente en un producto de otras dos matrices de valores (scores) y coeficientes (loadings); este algoritmo se describe por las ecuaciones (1) y (2):

$$X = TP^T + E \dots \dots \dots (1)$$

$$Y = UQ^T + F \dots \dots \dots (2)$$

Donde: TP^T se aproxima a los datos de la matriz X y UQ^T a los verdaderos valores de Y . La descomposición no es independiente y existe una relación lineal entre los valores (scores) T y U . Los términos E y F de las ecuaciones son matrices de error y el superíndice T significa la transpuesta de la matriz. El algoritmo PLS trata de encontrar factores (llamados variables latentes) que maximizan la cantidad de variación explicada en X que es relevante para la predicción de Y (Brereton, 2003).

2.10.1.2 Regresión de componentes principales (PCR)

El método PCR aprovecha las propiedades de la descomposición en componentes principales (PCA), realizando una regresión múltiple inversa (ILS) de la propiedad a determinar sobre los resultados obtenidos en el PCA, en lugar de realizarla sobre los datos originales (Massart *et al.*, 1997). En PCA, los datos originales se transforman en una combinación lineal de variables no correlacionadas entre sí, llamadas componentes principales (PCs). No todos los componentes principales contienen la misma información; los primeros son los que describen la mayor variación en los datos, que se asocia a la información más relevante, mientras que los últimos describen variaciones en los datos que pueden ser debidas a ruido o error experimental, o a un sobreajuste del modelo y pueden ser descartados, con lo que se consigue una importante reducción del número de variables. Este algoritmo aplica la ecuación (3):

$$X = \sum_{i=1}^a t_i p_i^T + E \quad \dots\dots\dots(3)$$

Donde: X es la matriz de datos a tratar (datos espectrales o después de su pretratamiento), a es el número de componentes principales que contienen la información deseada, t_i son los valores (scores) para cada componente principal, p_i los coeficientes (loadings) y E es una matriz de error, es decir la variación residual de X que no es explicada por el modelo con a componentes principales. El superíndice T indica la matriz traspuesta. La ecuación anterior se puede expresar de la siguiente manera: $X = TPT+E$ donde T es la matriz de valores (scores), con tantas filas como la matriz original X , y que contiene la información sobre las filas (los objetos) de la matriz original; PT corresponde a la traspuesta de la matriz de coeficientes (loadings), con tantas columnas como los datos originales, y que contiene información sobre las columnas (las variables) de la matriz original. El número de columnas de la matriz de valores o scores corresponde al número calculado de componentes principales. PC1 explica la máxima variabilidad de la matriz X , PC2 es ortogonal a la primera componente y abarca la mayor cantidad de la variación restante, y así sucesivamente, hasta que

se explica el total de la variación útil de la matriz original X (Sun, 2009). En general la diferencia entre los algoritmos PCR y PLS está en cómo se calculan los factores (variables latentes) o PC (Beebe *et al.*, 1998).

2.10.1.2.1 Técnica de reconocimiento de patrones

Para reducir las dimensiones de las series de datos se utiliza el análisis de componentes principales (PCA), ya que este algoritmo permite determinar los principales factores que influyen en la composición de las muestras (Wold *et al.*, 1987). Sin embargo, objetivo mayor de esta técnica de reconocimiento de patrones es el agrupamiento y clasificación de las muestras (Martín, 2000).

En espectroscopia infrarroja se puede decir que un análisis cualitativo significa clasificar las muestras de acuerdo a su espectro (Martens *et al.*, 2007). Los métodos de clasificación pueden dividirse en técnicas supervisadas y no supervisadas. Con respecto a las técnicas no supervisadas las muestras son clasificadas sin un conocimiento previo. El reconocimiento supervisado de patrones sí utiliza un conocimiento previo, así el modelo de clasificación se desarrolla con un conjunto de muestras de calibración pertenecientes a grupos o clases conocidos (Vandeginste *et al.*, 1988). Existen diferencias primordiales en los algoritmos utilizados por las técnicas supervisadas. La primera distinción es que algunas metodologías se enfocan en la discriminación como k-vecinos más cercanos (KNN) y otras se enfocan en la “similaridad” de las muestras como modelado suave independiente de clases (SIMCA). Una clasificación clásica para este tipo de técnicas los divide en métodos basados en correlaciones y métodos basados en distancia como SIMCA (Martens *et al.*, 2007).

2.10.1.2.1.1 Modelos SIMCA

SIMCA es una de las técnicas de modelado de clases más utilizada. En SIMCA, cada categoría se modela de forma independiente mediante PCA, y puede ser descrita por un número de componentes principales (Martens *et al.*, 2007). Este tipo de técnica de reconocimiento de patrones tiene como fin desarrollar reglas

de clasificación o modelado de clases para muestras (objetos) desconocidas a partir de un grupo de muestras conocidas (conjunto de calibración o training set), que están caracterizadas por los valores de las variables medidas. El objetivo final es verificar si una muestras desconocida pertenece o no a un grupo o clase (Massart,1997). El modelo SIMCA desarrolla una estructura geométrica conocida como hyperbox, que se construye alrededor de las muestras de cada clase y los límites de este espacio se definen a un nivel específico de confianza. Por ejemplo en la Figura 13 se presentan dos clases de objetos. Al aplicar PCA a la clase A (puntos verdes), se obtiene un modelo de dos componentes (un plano), mientras que la clase B (puntos rojos) se ajusta a un modelo de un componente (una recta). Las regiones de confianza aparecen alrededor de cada clase. La asignación de los nuevos objetos se hace comprobando si están localizados en la región de confianza de alguno de los modelos (Vázquez, 2011). Por ejemplo el objeto k de la Figura 13 se puede asignar a la clase b mientras que el h a ninguna de ellas.

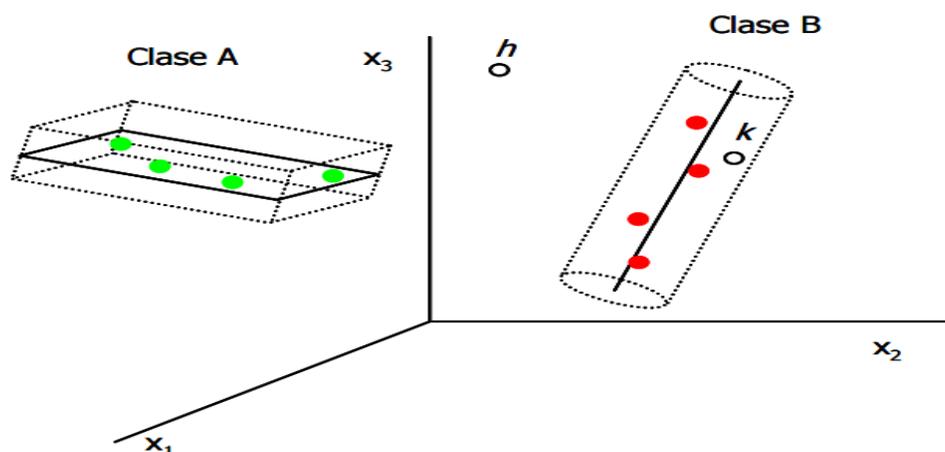


Figura 13. Modelos de dos clases de objetos A y B indicando sus componentes principales, regiones de confianza y predicción de dos muestras (Vázquez, 2011).

2.10.2 Desarrollo de modelos quimiométricos

El procedimiento para la construcción de modelos utilizando PCR y PLS implica dos pasos, el primero es la calibración y el segundo es la predicción que pone a prueba la validez de la calibración (validación). La validación de un conjunto de muestras puede calcularse directamente utilizando los modelos resultantes en las

mismas condiciones. La evaluación del rendimiento de calibración se puede estimar calculando el error estándar de calibración (SEC), y la capacidad de predicción del modelo se evalúa a través del error estándar de validación (SEP) del conjunto de validación y el coeficiente de determinación (R^2), que indica la relación entre los valores predichos y los valores de referencia (Beebe *et al.*, 1998).

En la calibración se busca obtener la mayor información a partir de los datos analíticos mediante un conjunto de pretratamientos (Gemperline, 2006). Son varias las técnicas quimiométricas que se pueden utilizar, en esta sección se describen aquéllas que han sido utilizadas en el desarrollo de los modelos que se presentan en los resultados.

2.10.2.1 Tratamientos espectrales realizados a los algoritmos

Generalmente las señales analíticas obtenidas mediante el empleo de métodos espectroscópicos van acompañados de efectos o componentes no deseados, los cuales reciben la denominación global de “ruido”. Las fuentes de dicho ruido son de diferente naturaleza, pudiendo deberse a componentes de la instrumentación empleada para el registro de las señales (ruido instrumental), a condiciones ambientales (ruido ambiental) o variaciones inherentes a la naturaleza de la muestra. Para corregir o reducir este ruido de los datos espectrales, es necesario aplicar un tratamiento previo a los espectros obtenidos antes de calibrar.

2.10.2.1.1 Región espectral

Algunos autores eliminan ciertas regiones del espectro por considerar que pueden interferir mientras que otros, optan por usar la región completa de infrarrojo. Al eliminar ciertas regiones espectrales, se busca eliminar información no útil (ruido o bandas correspondientes a enlaces de no interés para el modelo).

2.10.2.1.2 Autoescalado

El centrado y el autoescalado son dos tratamientos habituales en los procedimientos de reducción de variables. El autoescalado consiste en un centrado seguido de una normalización. De esta forma, la mediana y la varianza de las nuevas variables autoescaladas es de 0 y 1 respectivamente. El centrado considera una matriz X de datos donde cada fila corresponde al espectro de una muestra y cada columna corresponde a una longitud de onda (variable), el centrado y el autoescalado transforman esta matriz de la siguiente forma (ecuación 4):

$$X_{ik}^{centrado} = X_{ik} - \bar{X}_k \dots \dots \dots (4)$$

El centrado calcula el valor medio de cada variable \bar{X}_k del conjunto de calibración (de cada columna de la matriz) y resta este valor a cada punto (X_{ik}) de la columna. El valor medio corresponde al “centro del modelo” y los valores de todas las variables están ahora referidos a dicho centro. Este tratamiento permite seguir manteniendo las unidades originales. El autoescalado consiste en centrar cada columna y después dividir el resultado por la desviación estándar de la misma, de esta forma la varianza de cada variable es igual a uno. El escalar favorece la determinación de compuestos minoritarios en presencia de aquellos que presentan mayor absorbancia (Todeschini, 1998).

2.10.2.1.3 Suavizado

Mediante el suavizado se reduce el ruido aleatorio existente en la señal instrumental. La técnica más utilizada es la propuesta por Savitzky y Golay (1964). El principio en el que se basa este método es que, para un pequeño intervalo de número de ondas, se puede ajustar un polinomio de grado adecuado. Los nuevos valores tras el ajuste son de un mejor estimado que los valores medidos ya que se ha eliminado parte del ruido que los afectaba.

2.10.2.1.4 Aplicación de la derivada a los espectros

El traslapamiento de bandas espectrales dificulta y a veces, imposibilita la identificación de grupos funcionales o compuestos. Los espectros derivados consisten en el cálculo de la primera derivada o segunda derivada en función de la frecuencia o número de onda de la radiación. El proceso de derivación de un espectro se podría equiparar al de un filtro que permite observar cambios en pequeños intervalos de número de onda (en IR se trabaja con número de onda y no con longitud de onda) y por lo tanto realza la estructura del mismo obteniéndose una mejor discriminación de sus detalles, de manera que, a pesar de que se trata de una técnica que no proporciona información adicional, los datos se redistribuyen de tal forma que resultan muchos más significativos. La espectroscopia de derivadas ofrece dos ventajas importantes: de un lado un aumento en la resolución espectral y por otra parte la discriminación a favor de las estructuras finas del espectro. La resolución aumenta con el orden de la derivada n , por ello la derivada del espectro es una mejor huella que el espectro normal (Macho, 2002).

2.10.2.1.5 Normalización

Esta operación suprime las fuentes de la variabilidad no deseada. La corrección de la línea de tendencia permite eliminar variaciones en la línea base que se producen a menudo durante el proceso de lectura de la muestra del espectro. Corrección del efecto multiplicativo de la dispersión (MSC) es método propuesto por Geladi y colaboradores (1985), tiene la finalidad de corregir desplazamientos espectrales debido al diferente tamaño de partícula de las muestras. La corrección de los espectros originales se realiza comparando con un espectro de referencia (espectro medio del conjunto a tratar). Normalización de la variable normal estándar o SNV el cual es otro pretratamiento utilizado en la corrección de efectos de tamaño de partícula y a diferencia de MSC la corrección se aplica individualmente a cada espectro, sin depender de ningún espectro de referencia.

3. ESTADO DEL ARTE

La espectroscopia IR se ha aplicado con éxito para evaluar el control de calidad de los alimentos y para clasificación según diferentes características como el origen geográfico (Tzouros y Arvanitoyannis, 2001). Su uso está documentado para productos cárnicos (Arvanitoyannis y Houwelingen, 2003; Meza *et al.*, 2011), pescado, chocolate (Che *et al.*, 2005), la adulteración de la miel (Gallardo *et al.*, 2009; Arvanitoyannis *et al.*, 2005), vino (Di *et al.*, 2010), pasteles (Syahariza *et al.*, 2005), el aceite de oliva las bebidas alcohólicas y la cerveza (Lachenmeier, 2007; Maggio *et al.*, 2009) entre otras aplicaciones. La espectrometría de infrarrojo cercano NIR y medio (ATR-MIR) se ha utilizado para diferentes tipos de análisis en la miel, se ha aplicado con éxito para el análisis cuantitativo (Cho *et al.*, 1998; Qiu *et al.*, 1999, García *et al.*, 2000; Cozzolino *et al.*, 2003), para el análisis de su composición (Tewari *et al.*, 2004) y para la determinación del origen geográfico. Con respecto a la aplicación de FTIR MIR y NIR para detectar residuos veterinarios en los alimentos, los trabajos publicados son pocos. Meza *et al.*, (2011), utilizando FTIR-ATR desarrollaron un modelo de cuantificación estableciendo niveles mínimos de detección de clenbuterol de 2 ppb en muestras de hígado y riñón de res. Entre los trabajos realizados para la detección de residuos de antibióticos, se encuentra el de Dračková *et al.*, (2009), ellos utilizando FT-NIR desarrollaron modelos de cuantificación para la detección de antibióticos en leche en un intervalo de 0 a 0,05 mg/kg. Los métodos fueron evaluados con base a los coeficientes de correlación (R^2) y los errores estándar de calibración (SEC). Para la penicilina, establecieron los siguientes valores $R^2 = 0,951$ y $SEC = 0,004$. Para cloxacilina, los valores fueron $R^2 = 0,871$ y $SEC = 0,007$. Sivakesava e Irudayaraj (2002) estudiaron la viabilidad de la medición de la tetraciclina en niveles de ppb en la leche, los modelos fueron obtenidos mediante FT-MIR y FT-NIR, utilizando mínimos cuadrados parciales (PLS) en una gama de concentraciones de 4 a 2000 ppb para tetraciclina. Usando diferentes intervalos de concentración, el coeficiente de correlación (R^2) mayor que obtuvieron fue de

0,89. Los errores de predicción eran más altos para el método obtenido con FT-NIR lo cual indicó que la espectroscopia FT-MIR es una mejor opción para la detección rápida de residuos de tetraciclina en la leche.

Si bien, ya se han desarrollado modelos quimiométricos utilizando FTIR MIR y NIR para la detección de residuos de medicamentos veterinarios en los niveles de ppb, no se ha publicado algún reporte del uso de esta técnica quimiométrica para la detección y cuantificación de residuos de antibióticos en la miel.

4. JUSTIFICACIÓN

La apicultura es una importante actividad socio-económica en México, la cual se encuentra entre las tres actividades agrícolas principales del país, con cerca de 39,000 toneladas exportadas por año (TRADE MAP, 2015). A nivel internacional la miel mexicana es ampliamente conocida por su alta calidad; sin embargo, debido al uso inadecuado de antibióticos como oxitetraciclina, sulfatiazol y estreptomicina, utilizados para el control de ciertas enfermedades en las colmenas, puede ser contaminada, lo que resulta en una serie de problemas de calidad que limita su comercialización. Para corroborar esta contaminación, actualmente se utilizan métodos analíticos para la detección y cuantificación de los residuos de antibióticos en la miel, tales como ELISA, HPLC, LC/MS, los cuales, son métodos caros, complejos y que requieren de tiempo para su aplicación, además de una cantidad importante de reactivos. Hoy en día, la evolución de la química analítica se dirige hacia los métodos analíticos más sencillos que consumen menor inversión de tiempo y recursos, por eso actualmente, la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-MIR y NIR) junto con el análisis multivariante se está utilizando como alternativa para los métodos tradicionales de análisis. A pesar de que los modelos quimiométricos desarrollados FTIR-MIR y NIR se han utilizado en la detección de residuos de medicamentos veterinarios en los niveles de ppb, aún no se ha publicado el uso de esta técnica para la detección y cuantificación de residuos de antibióticos en la miel. Debido a lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue investigar la factibilidad del uso de las espectroscopias MIR y NIR FTIR-ATR como una herramienta analítica para la detección rápida de tres de los antibióticos más comúnmente encontrados en la miel.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar modelos quimiométricos FTIR MIR y NIR para detectar y cuantificar residuos de tres antibióticos (oxitetraciclina, sulfatiazol y estreptomicina) en la miel.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar y validar modelos quimiométricos para cuantificar los antibióticos en la miel utilizando los algoritmos: regresión de componentes principales (PCR), mínimos cuadrados parciales sin variables de interacción (PLS1) y mínimos cuadrados parciales con variables de interacción (PLS2) para la región del infrarrojo medio (FTIR-MIR).
- Desarrollar y validar modelos quimiométricos para cuantificar los antibióticos en la miel mediante algoritmos PCR, PLS1 y PLS2 para la región del infrarrojo cercano (FT-NIR).
- Desarrollar y validar modelos de clasificación para grupos de muestras con antibióticos, mediante FTIR en la región MIR y NIR utilizando la técnica SIMCA.
- Comparar los modelos quimiométricos desarrollados por espectroscopia NIR y MIR con las técnicas analíticas ELISA específicas para el análisis de cada antibiótico.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 SELECCIÓN DE LA MUESTRA

La muestra de miel utilizada para el desarrollo de los modelos quimiométricos, fue seleccionada mediante un análisis de comparación entre los espectros de 15 muestras de diferente origen y su espectro promedio, para ello se utilizó la herramienta para comparación de espectros del programa Spectrum ver. 2.1 (Perkin Elmer), el cual permitió cotejar y elegir el espectro del conjunto de muestras, más parecido al espectro promedio. Para el desarrollarlo de los modelos en ambas regiones del espectro infrarrojo, se utilizaron dos lotes de miel, con una diferencia de muestreo de seis meses (marzo-octubre, 2013).

6.2 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

La muestra de miel utilizada fue adquirida con el Doctor Daniel Prieto Merlos responsable del área de apicultura del Centro de Educación Ambiental (CEA) “Acuexcomatl”- UNAM, las muestras fueron tomadas de la colmena para asegurar la pureza de la miel y fueron almacenadas a temperatura ambiente y en la oscuridad.

6.2.1 Verificación de la pureza de la miel mediante la técnica ELISA

Con el fin de obtener un método de comparación y verificar la ausencia de antibióticos en la miel, se utilizaron kits de ELISA marca RIDASCREEN®, para Sulfatiazol, Estreptomina y Oxitetraciclina. Estas pruebas se realizaron según las indicaciones del fabricante. Los resultados se obtuvieron con el software RIDAssoft Win-net.

El ensayo de ELISA consta de los siguientes pasos: Al soporte o placa tapizado con el anticuerpo del antígeno a determinar se le añade la muestra. Se adiciona el anticuerpo secundario marcado con la enzima que en presencia de su sustrato da un producto coloreado soluble y este producto es cuantificado mediante el lector de ELISA. Esta técnica implica un lavado cada que se agrega un reactivo, después de un segundo lavado que elimina el material no retenido (muestra). De

tal forma que cada molécula de antígeno estará unido a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo (Calderon, 2007).

6.2.1.1 Construcción de la curva de calibración y determinación de antibióticos en la muestra de miel

Para cada uno de los antibióticos, se construyeron las curvas de calibración con los estándares incluidos en los kits ELISA, posteriormente con la curva de calibración correspondiente se verificó la ausencia de este tipo de compuestos en la miel.

Los resultados de las concentraciones calculadas por el método ELISA, para los estándares y la miel, se muestran en las Cuadro 6,7 y 8.

Cuadro 6. Resultado obtenido con el kit ELISA para oxitetraciclina.

Antibiótico: Oxitetraciclina			
Número de estándar	Concentración presente en el estándar (ppb)	Absorbancia	Concentración calculada con el método de Elisa (ppb)
1	0.0	1.673	
2	0.5	1.414	0.52
3	1.5	1.202	1.51
4	3.0	0.839	2.99
5	6.0	0.601	6.05
6	18.0	0.286	17.8
Miel		1.561	<0.5

En la Figuras 14,16 y 18 se presentan las curvas de calibración realizadas con las absorbancias desarrolladas en los micropozos utilizando los estándares de los kits para el caso de los tres antibióticos. Las curvas de calibración se obtuvieron mediante el software Ridasoft.winNet.

Cuadro 7. Resultado obtenido con el kit ELISA para estreptomicina.

Antibiótico: Estreptomicina			
Número de estándar	Concentración presente en el estándar (ppb)	Absorbancia	Concentración calculada (ppb) con el método de Elisa
1	0.0	2.015	
2	0.5	1.804	0.499
3	2.0	0.837	2.0
4	8.0	0.597	7.99
5	32.0	0.521	32.03
6	128.0	0.288	126.9
Miel		1.917	<0.5

Cuadro 8. Resultado obtenido con el kit ELISA para sulfatiazol.

Antibiótico: Sulfatiazol				
Numero estándar	de	Concentración presente en el estándar (ppb)	Absorbancia	Concentración calculada (ppb) con el método de Elisa
1		0.0	1.886	
2		1.0	1.585	0.95
42-45		3.0	1.262	3.02
4		10.0	0.900	9.97
5		30.0	0.529	30.05
6		100.0	0.286	99.8
Miel			1.731	<1

En las Figuras 15, 7, 19 las rectas de calibración el respectivo R^2 obtenido, aplicando la función estadística Logit en valores de absorbancia. La función Logit permite obtener una recta de calibración partiendo de una relación no lineal entre las variables y lo incluye el programa RIDAsoft Win-net para el tratamiento de resultados.

Como se puede observar en cuadros 6,7 y 8, la muestra de miel en ningún caso estuvo por arriba del límite de detección (concentración más baja que pueden detectar los kits según los estándares incluidos: 0.05, 0.5 ppb y 1 ppb), para cada una de las pruebas ELISA. Esto quiere decir que la miel utilizada, en caso de tener algún tipo de los compuestos analizados tendría que estar por debajo de estas concentraciones, situación muy poco probable por el origen la muestra, la cual ya ha sido mencionada.

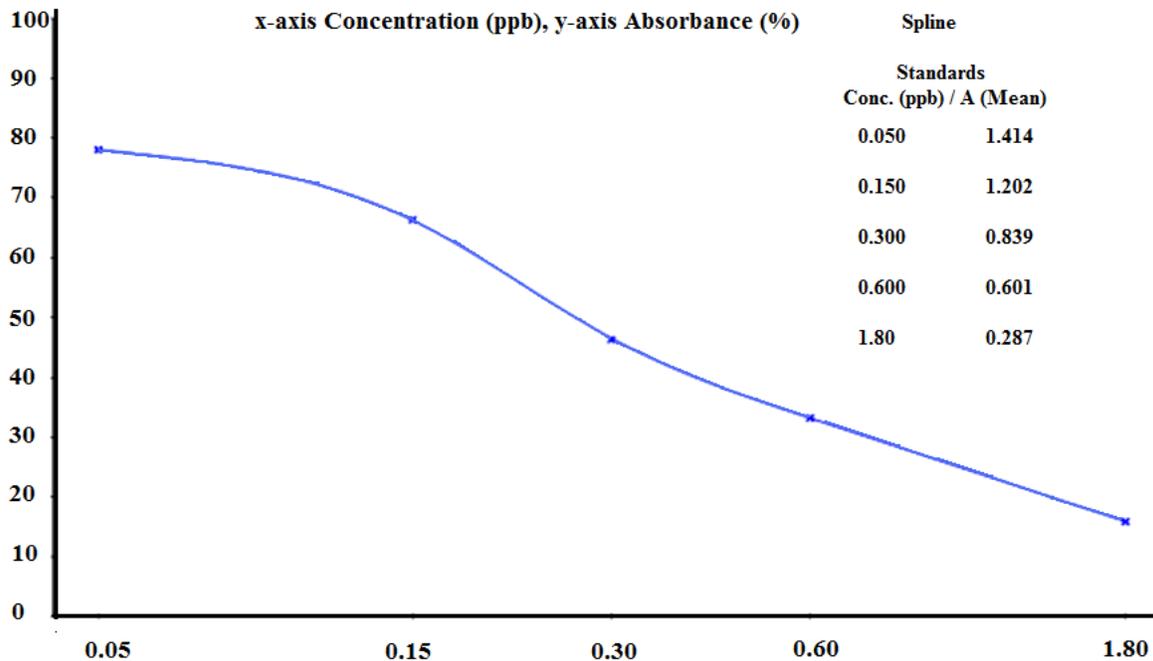


Figura 14. Curvas de calibración obtenida con el kit comercial ELISA para oxitetraciclina.

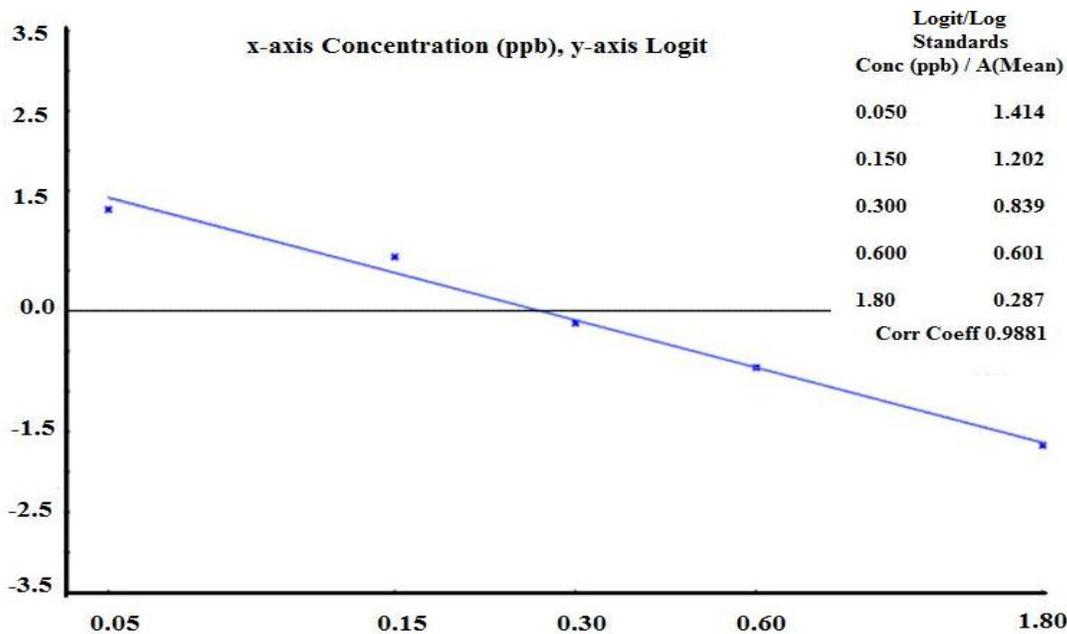


Figura 15. Rectas de calibración aplicando obtenida con el kit comercial ELISA para oxitetraciclina.

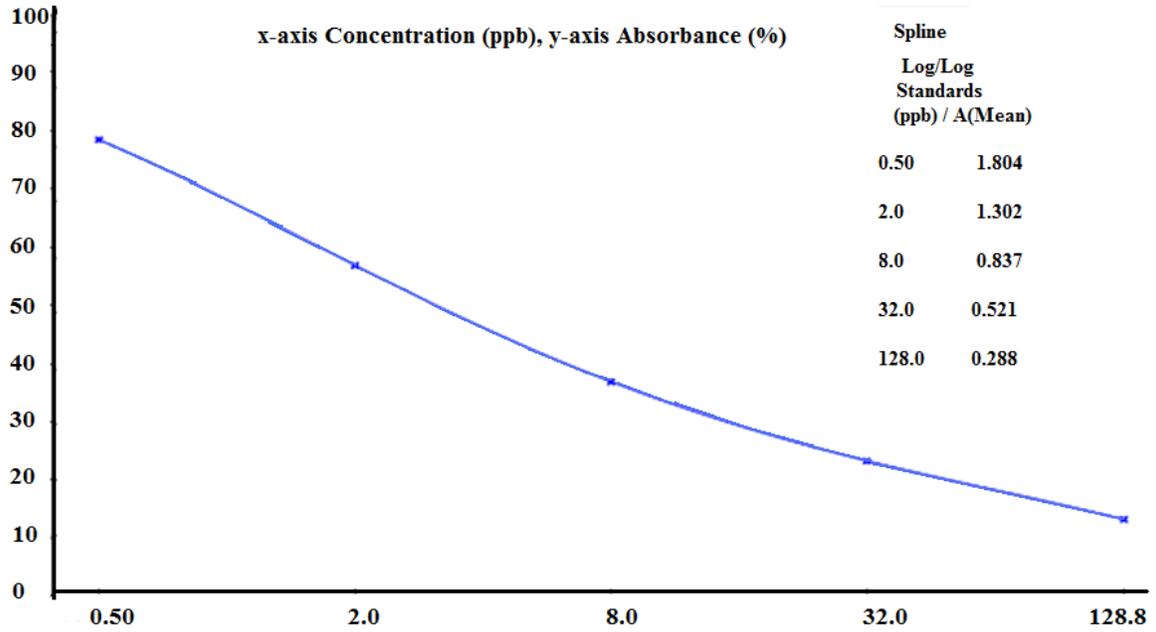


Figura 16. Curva de calibración obtenida con el kit comercial ELISA para estreptomicina.

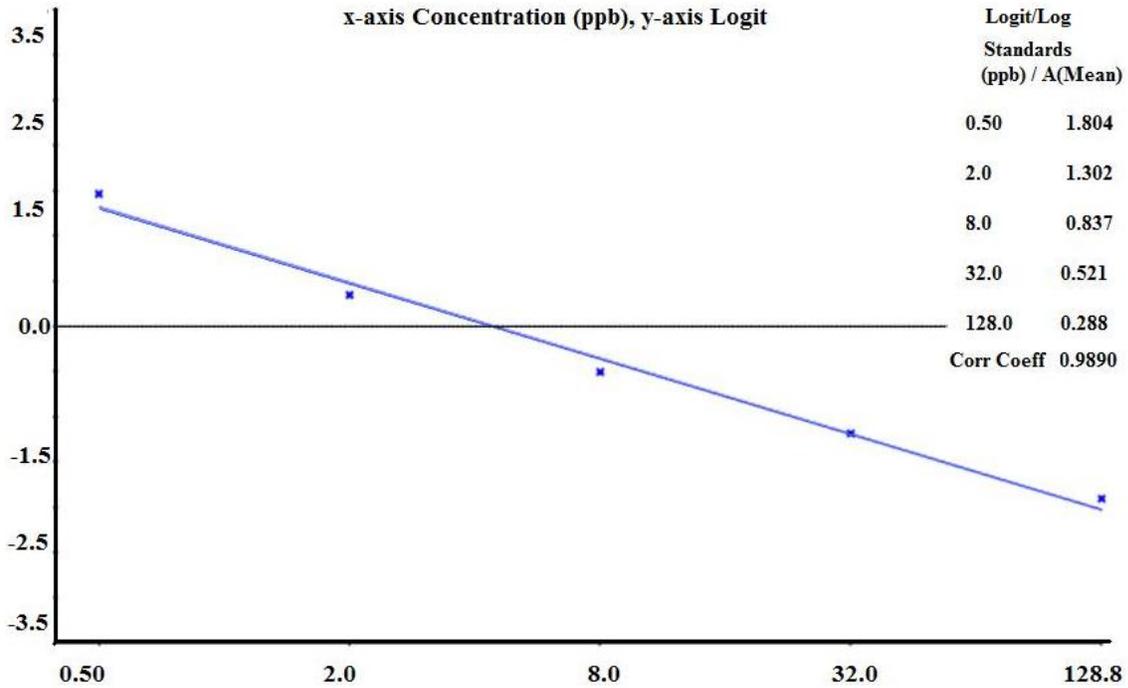


Figura 17. Recta de calibración aplicando obtenida con el kit comercial ELISA para estreptomicina.

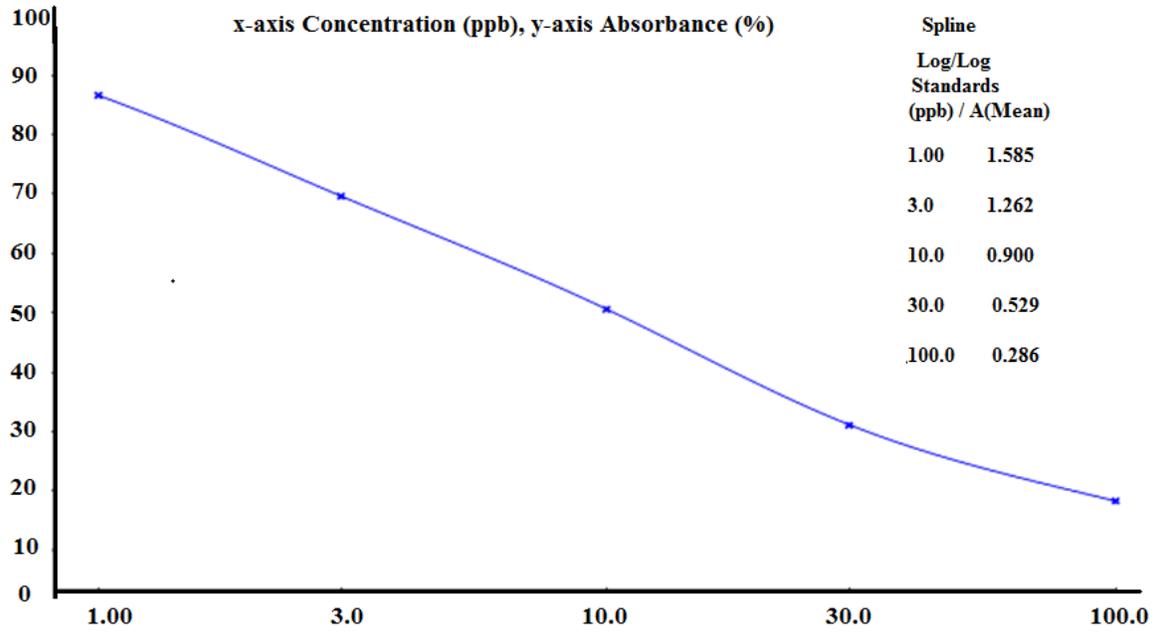


Figura 18. Curvas de calibración obtenida con el kit comercial ELISA para sulfatiazol

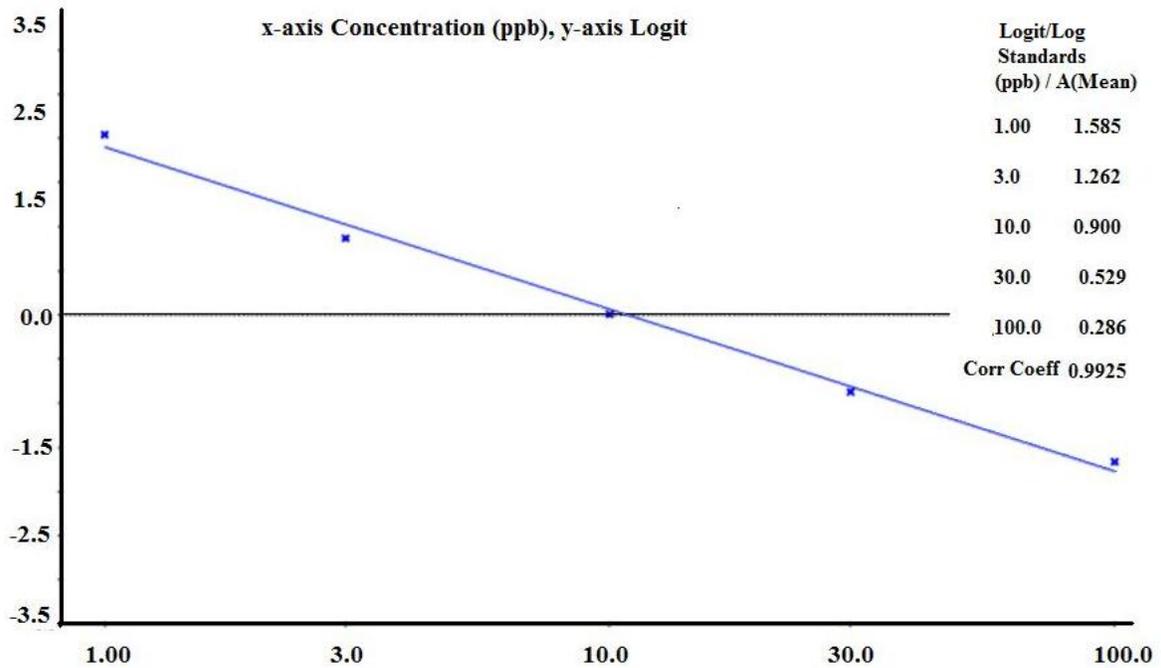


Figura 19. Recta de calibración aplicando obtenida con el kit comercial ELISA para sulfatiazol.

6.3 DESARROLLO DE LOS MODELOS QUIMIOMÉTRICOS

6.3.1 Preparación de la muestras.

A partir de una solución inicial de 0.04g/ 100mL se realizaron una serie de diluciones en agua destilada de los antibióticos: clorhidrato de oxitetraciclina (Sigma-Aldrich número de catálogo 6153-64-6), Sulfatiazol sódico (Sigma-Aldrich número de catálogo 144-74-1) y sulfato de estreptomicina (Sigma-Aldrich número de catálogo S9137), abarcando el intervalo de 2-10,000 ppb (Meza et al., 2011). A cada muestra de miel de 3.9 g se le adicionó 0.1 mL (100 μ L) de cada una de las soluciones con diferente concentración del antibiótico respectivo. Las muestras fueron preparadas con 24 horas de anticipación homogenizadas manualmente antes de obtener sus respectivos espectros.

6.3.2 Adquisición de espectros FTIR

Los espectros en la región MIR se obtuvieron mediante un Espectrómetro FT-IR marca Perkin Elmer modelo GX (Massachusetts, EE.UU), utilizando un accesorio de reflectancia total atenuada (HATR) con cristal de selenuro de zinc y para la región NIR se utilizó una celda de cuarzo con paso de luz de 1mm.

6.3.3 Condiciones para la obtención de los espectros

Los espectros se obtuvieron realizando 64 exploraciones a cada muestra con una resolución de 4 cm^{-1} y en la región espectral de 4000 a 650 cm^{-1} región del infrarrojo medio MIR; para la región NIR se utilizó la región espectral de 10000-4000 cm^{-1} . Para cada muestra se realizaron triplicados para su posterior promedio. A cada espectro se le restó el respectivo fondo de aire y se presentó en unidades de absorbancia. La visualización y manejo de espectros se realizó utilizando el programa Spectrum ver. 2.1 (Perkin Elmer.)

6.3.4 Obtención del modelo Quimiométrico

La calibración de los modelos se realizó utilizando el programa QUANT⁺ (versión 4.51, Perkin Elmer) utilizando para ello 30 muestras para calibración y 6 de validación. Para llegar al modelo definitivo se utilizaron los 3 algoritmos PLS1,

PLS2 y PCR que incluye el programa estadístico Quant⁺. Las concentraciones de las muestras utilizadas para el desarrollo de los modelos se indican en la Cuadro 9.

Cuadro 9. Concentraciones presentes en las muestras utilizadas para el desarrollo de los modelos quimiométricos.

Numero de muestra	Concentración (ppb)
1	10000
2	9600
3	9200
5	8800
6	8400
7	8000
8	7600
9	7200
10	6800
11	6400
12	6000
13	5600
14	5200
15	4800
16	4400
17	4000
18	3600
19	3200
20	1600
21	400
22	360
23	320
24	160
25	40
26	36
27	32
28	16
29	8
30	2

6.3.5 Clasificación de las mieles mediante modelado suave independiente de la analogía de clases (SIMCA)

El método de análisis SIMCA se realizó utilizando el software Assure ID de Perkin Elmer versión 3.0. Evaluando el modelo SIMCA desarrollado a través de las distancias interclase entre los tipos de muestras de miel con antibióticos, el análisis de componentes principales tridimensional (PCA), gráfico de Coomans, las tasas de reconocimiento y rechazo y validación externa (Gallardo *et al.*, 2009).

Para el desarrollo del modelo de clasificación SIMCA se utilizó una estrategia común en las técnicas de reconocimiento de patrones que consistió en la siguientes pasos (Brereton, 2003)

(1) Selección de un conjunto de calibración, formado por objetos pertenecientes a una clase conocida (conjuntos separados de muestras adicionados cada uno con un tipo diferente de antibiótico y un grupo de muestras sin contaminar). El conjunto de calibración se utilizó para la optimización de los parámetros de cada modelo.

(2) La selección de variables (números de onda). Esas variables que contienen información para la clasificación se mantienen, mientras que las variables que codifica el ruido y/o sin capacidad de discriminación no son tomadas en cuenta.

(3) Construcción de un modelo usando el conjunto de calibración, aplicando diferentes preprocesos en el momento de optimizar el modelo.

(4) La validación del modelo mediante un conjunto de muestras independientes, con el fin de evaluar la capacidad de clasificación realizada por los modelos.

6.4. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO

La Figura 20 muestra el esquema general para el desarrollo del presente trabajo.

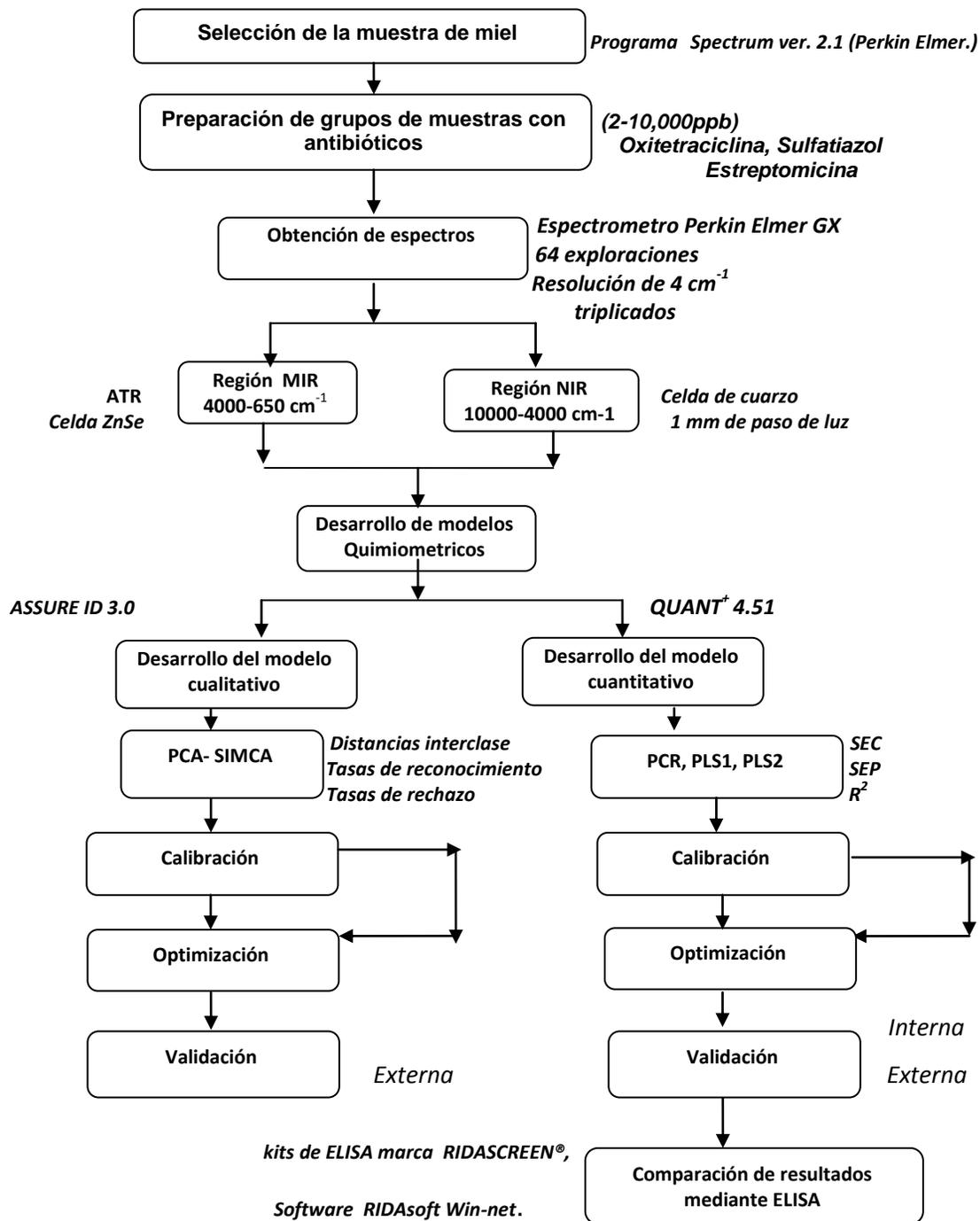


Figura 20. Esquema General de trabajo

7. RESULTADOS

7.1 ACTIVIDADES PRELIMINARES. OBTENCIÓN DE ESPECTROS DE ABSORCIÓN PARA ANTIBIÓTICOS Y MUESTRA DE MIEL

Como actividad preliminar antes de desarrollar los modelos quimiométricos, se obtuvieron espectros en la región MIR de los tres antibióticos de interés (oxitetracilina sulfatiazol y estreptomycin) y de la miel; utilizando para ello el accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) con la celda de selenuro de zinc (ZnSe). Lo anterior con el objetivo de observar la posibilidad de obtener una señal de lectura en la región del infrarrojo medio. A continuación, se muestran los espectros y la caracterización de estas cuatro muestras.

7.1.1 Obtención del espectro de clorhidrato de oxitetraciclina (OTC)

En la Figura 18 se muestra el espectro para el antibiótico oxitetracilina, en el cual se pueden observar las bandas de absorción a diferente número de onda en la región del infrarrojo medio. Una vez obtenido el espectro se identificaron las bandas o picos presentes para relacionarlos con los enlaces y grupos químicos presentes en la oxitetraciclina.

En la Cuadro 10 se muestran los enlaces más comunes relacionados a las bandas de absorción del espectro (Figura 21); así como también el tipo de vibración que presentan los enlaces entre átomos. Los espectros se grafican de acuerdo a la absorbancia que presentan las muestras con respecto al número de onda $\tilde{\nu}$, (la cual se define como $1/\lambda$ o inversa de la frecuencia) y su unidad es cm^{-1} , debido a que de todas las propiedades inherentes a la radiación electromagnética, el número de onda es la unidad más utilizadas para su descripción (Barreto, 2010).

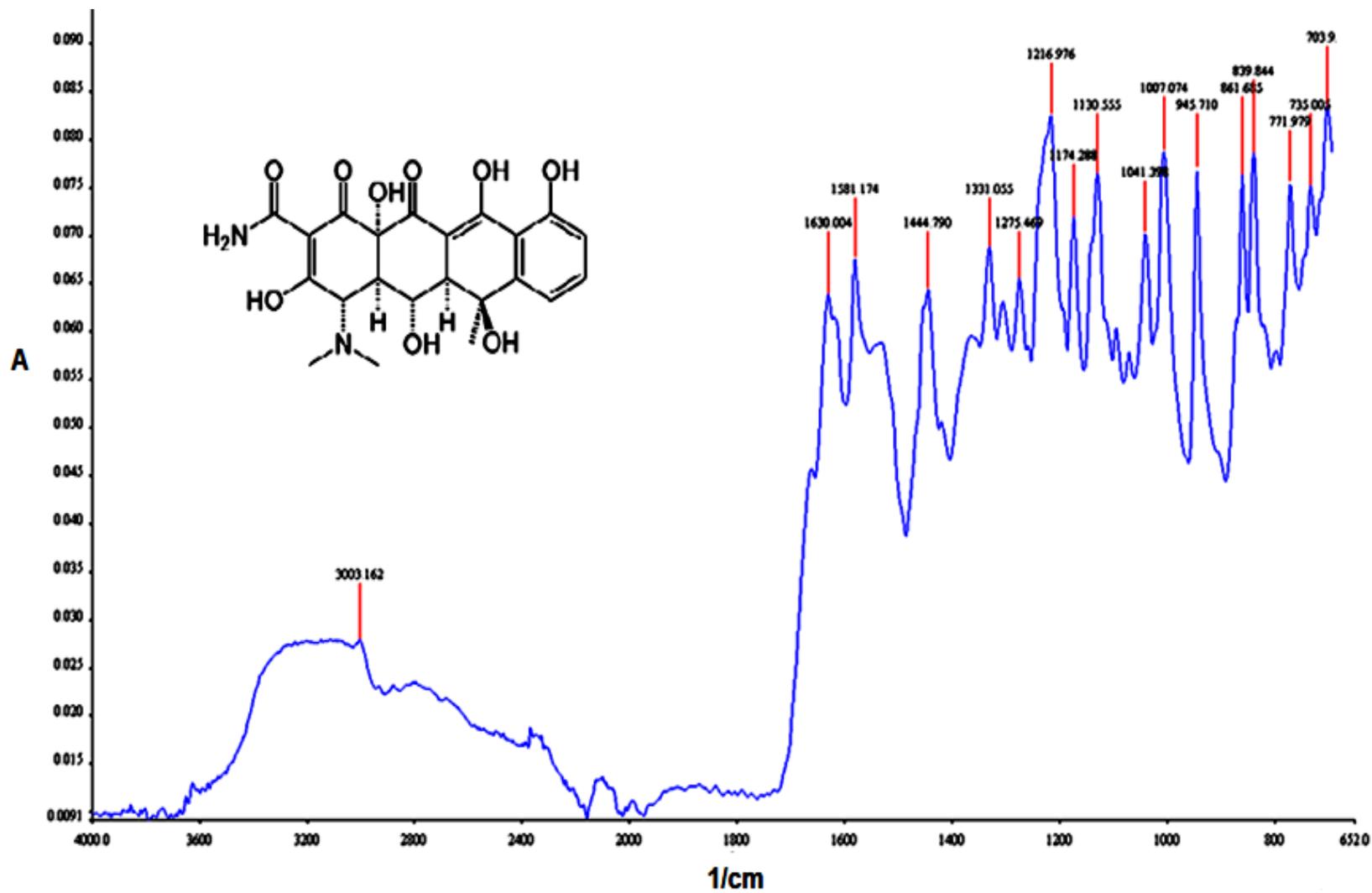
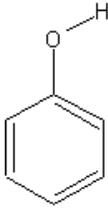
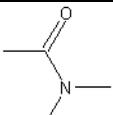
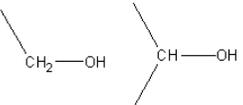
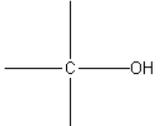
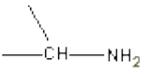


Figura 21. Espectro infrarrojo de clorhidrato de oxitetraciclina obtenido en la región del infrarrojo medio mediante 64 scans, longitud de onda de 2cm^{-1} , y resolución de 4cm^{-1}

Los espectros son divididos en tres regiones para su descripción: la región por arriba de 3000 cm^{-1} incluyen bandas relacionadas con grupos hidroxilos y amino, la región dividida entre 3000 y 1500 cm^{-1} incluyen vibraciones de extensión grupos acilo, carbonilos y alquenos; la región por debajo de 1500 cm^{-1} se caracteriza principalmente por regiones de extensión de grupos acilo y diversos grupos funcionales, la región por debajo de 1500 cm^{-1} como región de la huella digital porque es específica para un compuesto (Coates, 2000).

Cuadro 10. Enlaces relacionados a la energía infrarroja absorbida que presenta el compuesto oxitetraciclina (Coates, 2000)

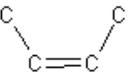
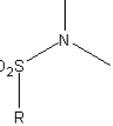
Intervalo (s) (cm^{-1})	Grupo o enlace asociado	Tipo de vibración
3000 - 3250 1600-1660 1330 - 1390 1180 - 1260 1010-1010 600-720		O-H extensión C=C extensión O-H tensión y C-O extensión O-H tensión y C-O extensión C-H tensión O-H flexión fuera del plano
1580 - 1660	C=C	C=C extensión
1580 - 1650 650 - 900	RNH ₂	N-H tensión N-H flexión fuera del plano
3140-3180 3080 - 3080 1440 - 1450		N-H flexión N-H extensión
1310 - 1410 1125 - 1205		C-H extensión
1310 - 1410 1125 - 1205		C-O extensión
1080 - 1140 1035 - 1045		C-N extensión

7.1.2 Obtención del espectro de sulfatiazol sódico (SFZ)

En la Figura 22 se muestra el espectro para el antibiótico sulfatiazol, donde se pueden observar las bandas de absorción a diferente número de onda y en el

Cuadro 11, se resumen los enlaces correspondientes a dichas bandas y el tipo de vibración relacionada con los enlaces presentes.

Cuadro 11. Enlaces relacionados a la energía infrarroja absorbida que presenta el compuesto sulfatiazol.

Intervalo (s) (cm^{-1})	Grupo asociado o enlace	Tipo de vibración
3330 - 3550 3250 - 3450 650-900		NH ₂ extensión asimétrica N-H flexión fuera del plano
3300 - 3500		N-H extensión
1620 - 1680	$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$; C=C extensión
1610 - 1640	$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$	C=C extensión
1580 - 1660	$\text{C}=\text{C}$	C=C extensión
1590 - 1625 1575 - 1590 1470 - 1525 1430 - 1465		=C-H y C=C extensión
780 - 860 695 - 695 615 - 650 1250 - 1270 1175 - 1175 1110 - 1125 1015 - 1015 985 - 985		tensión (2 átomos de H adyacentes) anillo aromático =C-H tensión
700 - 715		SO ₂ extensión asimétrica

7.1.3 Obtención del espectro de sulfato de estreptomicina (ETM)

En la Figura 23 se muestra el espectro para el antibiótico estreptomicina, se observan las bandas de absorción a diferente número de onda y en el Cuadro 12 se resumen los enlaces correspondientes a dichas bandas de absorción y el tipo de vibración relacionada con los enlaces presentes.

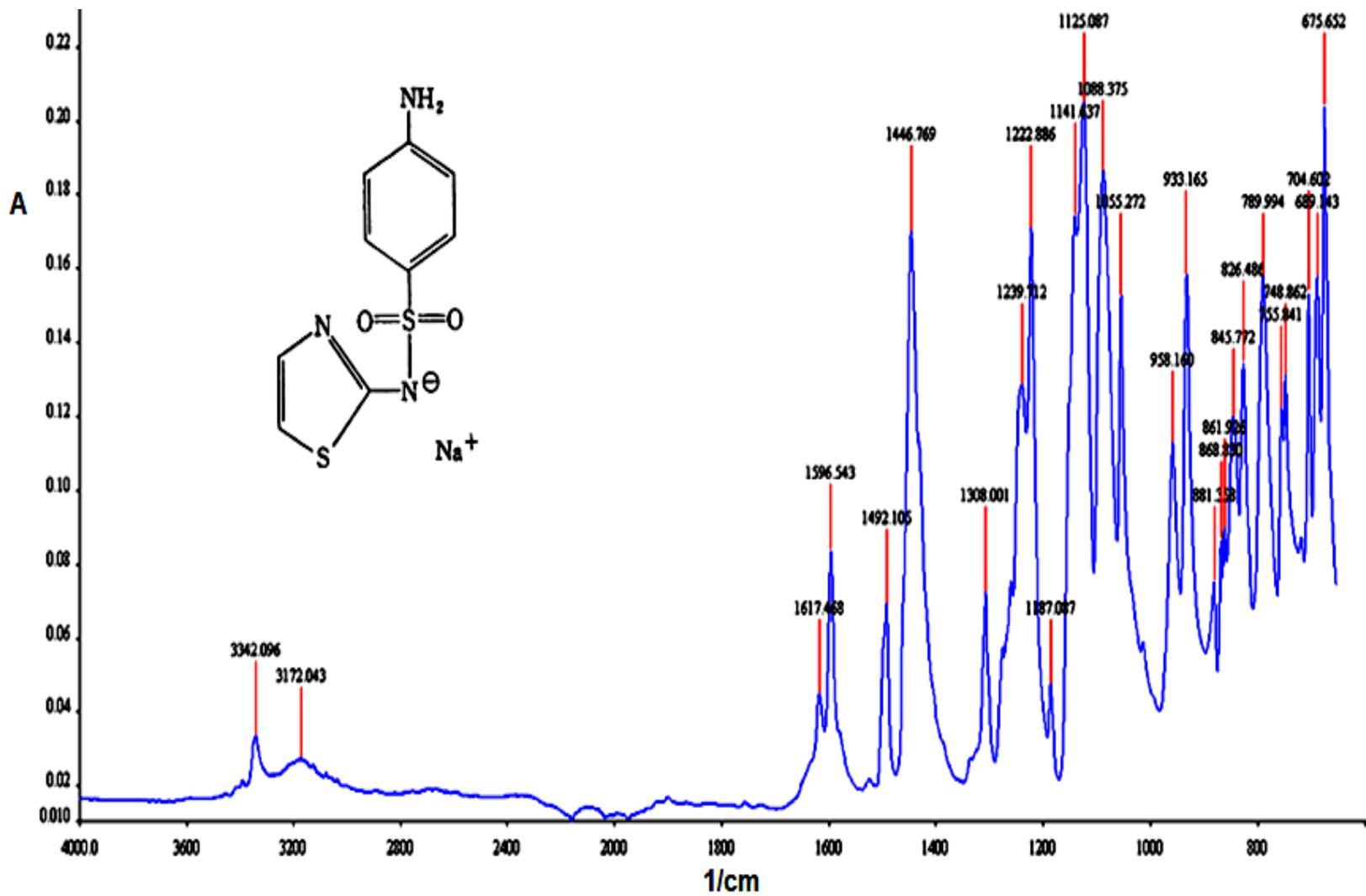


Figura 22. Espectro infrarrojo de sulfatazol obtenido en la región del infrarrojo medio

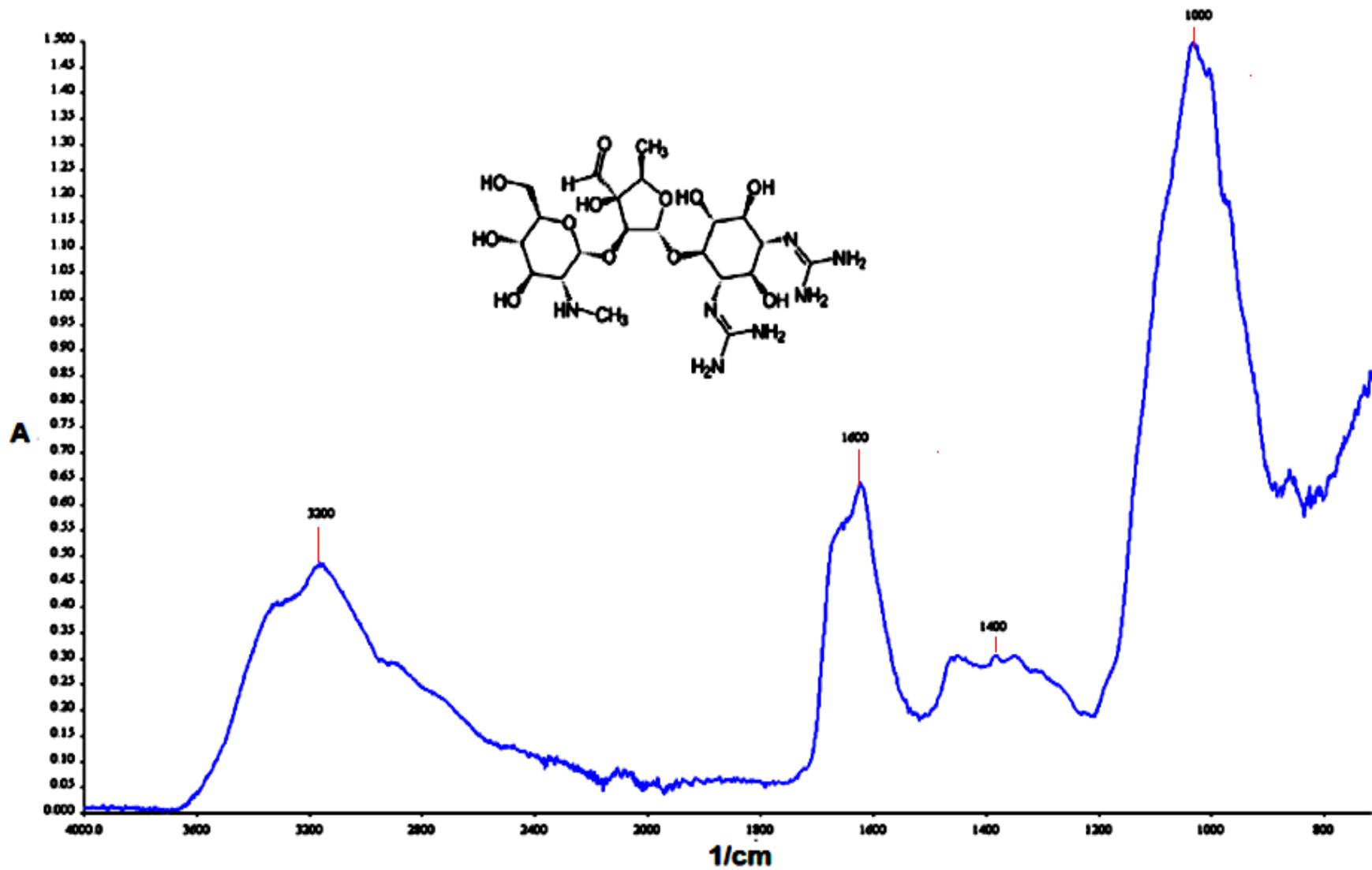


Figura 23. Espectro infrarrojo de estreptomicina obtenido en la región del infrarrojo medio.

Cuadro 12. Enlaces relacionados a la energía infrarroja absorbida por los diferentes enlaces que presenta el compuesto estreptomocina (Coates, 2000).

Intervalo (s) (cm^{-1})	Grupo asociado o enlace	Tipo de vibración
3330 - 3550 3250 - 3450		NH2 extensión asimétrica NH2 extensión asimétrica
3300 - 3500		N-H extensión
3140-3180 3080 - 3080 1440 - 1450		N-H flexión N-H extensión
1580 - 1650 650 - 900	RNH_2	N-H tensión N-H flexión fuera del plano
1080 - 1140 1035 - 1045		C-N extensión
1590 - 1625 1575 - 1590 1470 - 1525 1430 - 1465		=C-H y C=C extensión.
1310 - 1410 1125 - 1205		C-H extensión
1310 - 1410 1125 - 1205		C-O extensión

7.1.4 Obtención del espectro de la muestra de miel en la región MIR y NIR

Antes de iniciar la etapa correspondiente a la obtención del conjunto de espectros para el desarrollo de los modelos, se identificaron las diferentes tipos de absorción de energía en ambas regiones, así como los enlaces relacionados a las bandas de su espectro en la muestra de miel utilizada. En este apartado se muestran los espectros y los tipos de vibraciones presentes en la muestra.

7.1.4.1 Espectro de la muestra de miel en la región MIR

En la Figura 24 se muestra su espectro con las bandas de absorción a diferente número de onda y en el Cuadro 13 se muestran los enlaces correspondientes a las bandas de absorción.

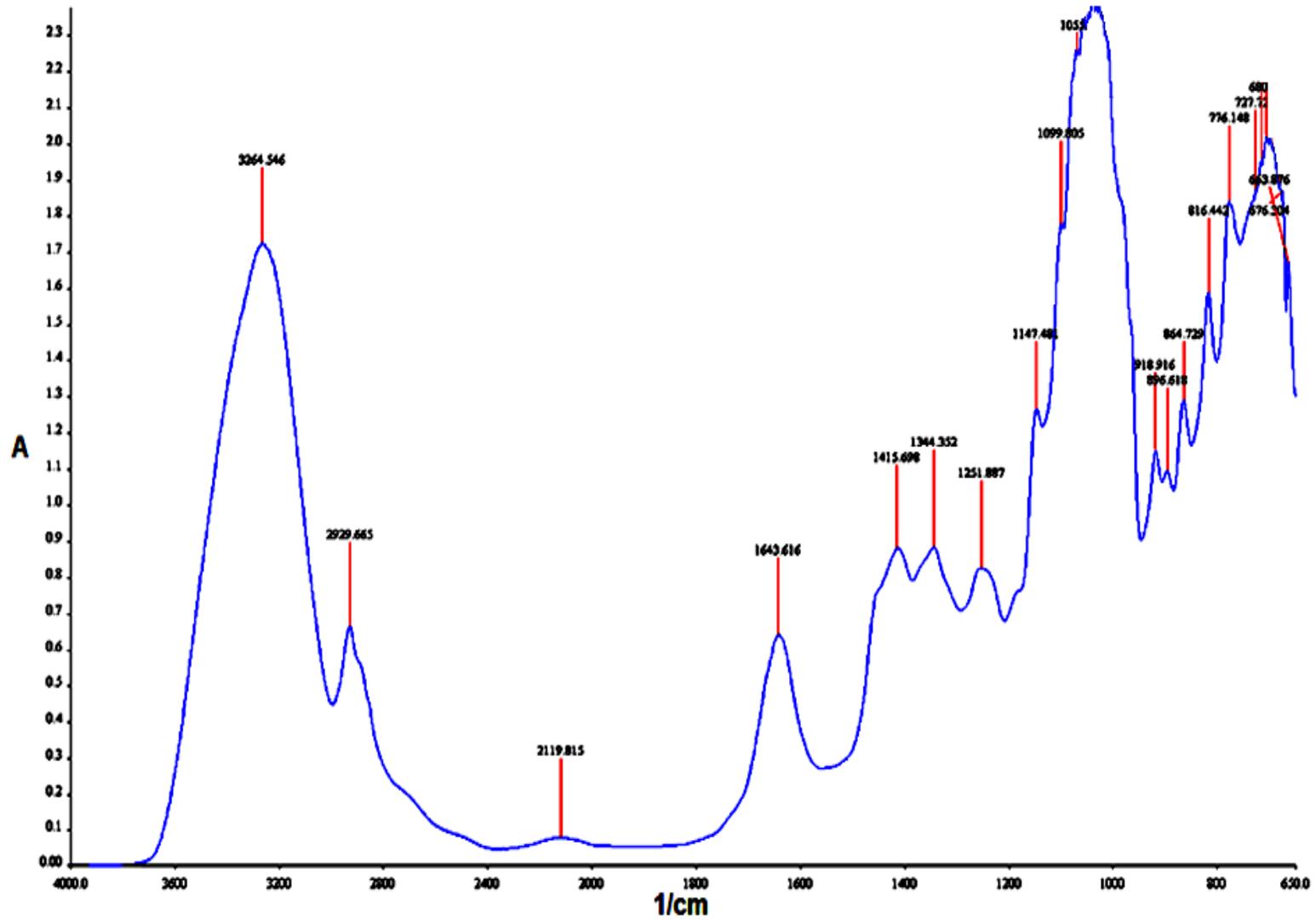
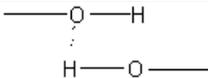


Figura 24. Espectro infrarrojo la muestra de miel.

La Figura 24 presenta el espectro de la miel pura con la correspondiente asignación de bandas, las cuales son representativas de los grupos químicos presentes en la muestra. La asignación de los modos de vibración correspondientes a diferentes grupos funcionales, fue basada en la identificación de regiones del espectro y el número de onda a la cual absorben los diferentes grupos funcionales en la región MIR. La región de 800-1500 cm^{-1} corresponde a la absorción de azúcares como fructosa, glucosa y sacarosa. La región de 900-750 cm^{-1} corresponde a estructuras anómericas de los carbohidratos. Las bandas de 900-1200 cm^{-1} son asignadas a modos de extensión de enlaces C-C y C-O. Bandas entre 1480-1200 cm^{-1} son asignadas a modos de vibración de flexión de enlaces C-O, C-C y C-H (García, 2015).

Cuadro 13. Enlaces relacionados a la energía infrarroja absorbida por los diferentes enlaces que presenta la miel en la región MIR (Coates, 2000).

Intervalo (s) (cm^{-1})	Grupo o enlace asociado	Tipo de vibración
3230 - 3550		Puentes de hidrógeno
3350 - 3350 2900 - 2900 1200 - 1460 1000 - 1160 730 - 960	Carbohidratos	O-H extensión C-H extensión C-H y O-H tensión C-O extensión C-H tensión
1580 - 1650 650 - 900	RHN ₂	N-H tensión N-H flexión fuera del plano

7.1.4.2 Espectro de la muestra de miel en la región NIR

En la Figura 25 se muestra el espectro de miel, donde se pueden observar las bandas de absorción a diferente número de onda y en el Cuadro 14 se presentan los enlaces correspondientes a dichas bandas. Los espectros en la región NIR están constituidos por bandas producidas por la combinación de vibraciones y sobretonos de enlaces como, C-H, N-H y OH. Los sobretonos corresponden a transiciones energéticas que son más altas que las vibraciones fundamentales. Las bandas incluyen dos o más modos de vibración de un grupo funcional ocurriendo simultáneamente (Osborne *et al.*, 1993).

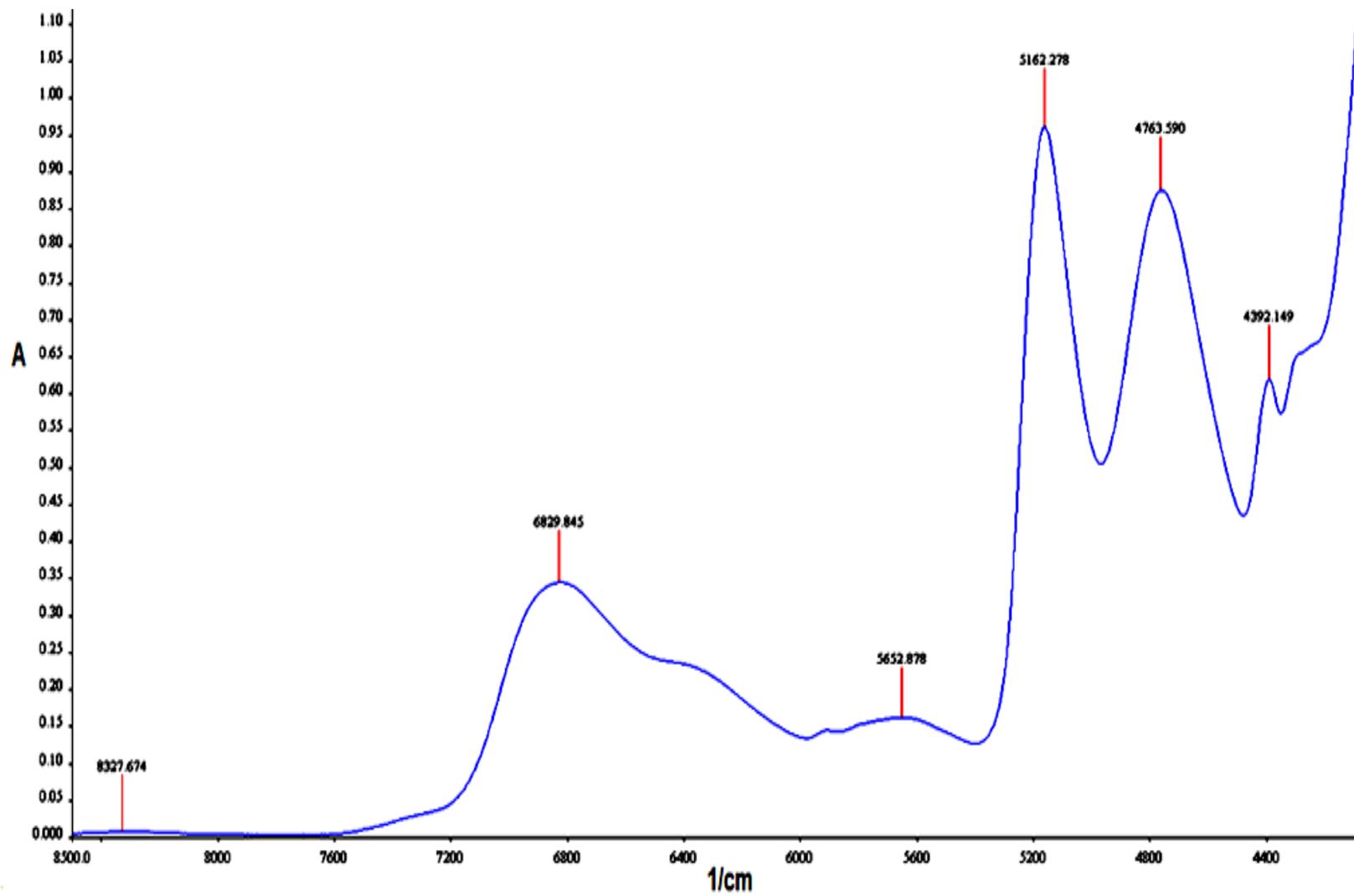


Figura 25. Espectro infrarrojo la muestra de miel en NIR

Cuadro 14. Enlaces relacionados a la energía infrarroja absorbida que presenta la miel en la región NIR (Osborne *et al.*, 1993).

Intervalo (cm ⁻¹)	Grupo o enlace asociado	Tipo de vibración
7200-6500 cm ⁻¹	-OH,	Primer sobretono-OH, extensión
6500 cm ⁻¹	-CH ₂	primer sobretono de -CH ₂ -
5200 cm ⁻¹	-OH	Combinación de bandas de flexión y extensión -OH
4750 cm ⁻¹	-OH y C-O	combinación de bandas de deformación -OH y flexión - C-O
4400 cm ⁻¹	-CH	Combinación de bandas de flexión y deformación -CH
4200 cm ⁻¹	-CH ₂	Combinación de bandas de flexión y deformación -CH ₂

7.2 DESARROLLO DE MODELOS QUIMIOMETRICOS

7.2.1. Obtención del conjunto de muestras de calibración

Para estimar la composición química de una muestra con algún modelo quimiométrico ya validado, se requiere previamente hacer calibraciones, para lo cual se necesita contar con un conjunto de muestras representativas de una misma población, coleccionar sus espectros y desarrollar la calibración de los métodos que relacionen los datos espectrales. Finalmente, validar dichas metodologías con otras muestras de la misma población general, pero que no formen parte del set de calibración (Garrido *et al.*, 1993).

Por lo anterior, una vez que se conocían las características de los antibióticos y de la muestra de miel, se inició la construcción de los modelos quimiométricos; para ello, se prepararon tres grupos de muestras de miel (un grupo para oxitetraciclina, otro para sulfatiazol y otro para estreptomycin) y se procedió a obtener los espectros de acuerdo a las condiciones ya especificadas en la metodología en ambas regiones del infrarrojo MIR y NIR.

7.2.1.1 Espectros de las muestras de calibración contaminadas con antibióticos en la región MIR

En la Figura 26 se presentan, algunos espectros del conjunto de muestras de calibración con diferentes concentraciones de oxitetraciclina; se puede observar que presentan cambios en la intensidad de absorción de energía infrarroja, lo cual se ve reflejado en la diferencia de altura de cada banda, para cada una de las

muestras, indicando que a mayor cantidad de antibiótico se presenta mayor absorbancia. Las muestras con sulfatiazol y estreptomicina mostraron el mismo tipo de comportamiento.

El espectro obtenido de una muestra es la representación gráfica del grado en que absorbe la radiación infrarroja, en función de número de onda. De tal forma que los cambios de intensidad de las bandas presentados en las Figuras 24,25 y 26, se deben a un mayor número de distintas vibraciones que están absorbiendo energía infrarroja en la región del espectro analizado, como consecuencia del enriquecimiento de las muestras de miel con distintas concentraciones de antibióticos, lo cual modifica la absorbancia de las muestras y se ve reflejado en los cambios en la altura de los espectros, una vez ajustando la línea base.

Los cambios en los espectros infrarrojos obtenidos mediante espectroscopia FTIR-MIR, son más evidentes al observar los espectros en diferentes regiones específicas como se muestra en las Figuras 27 y 28, verificando con mayor claridad el cambio en la intensidad de las bandas (altura), para el conjunto de muestras adicionadas con antibiótico oxitetraciclina.

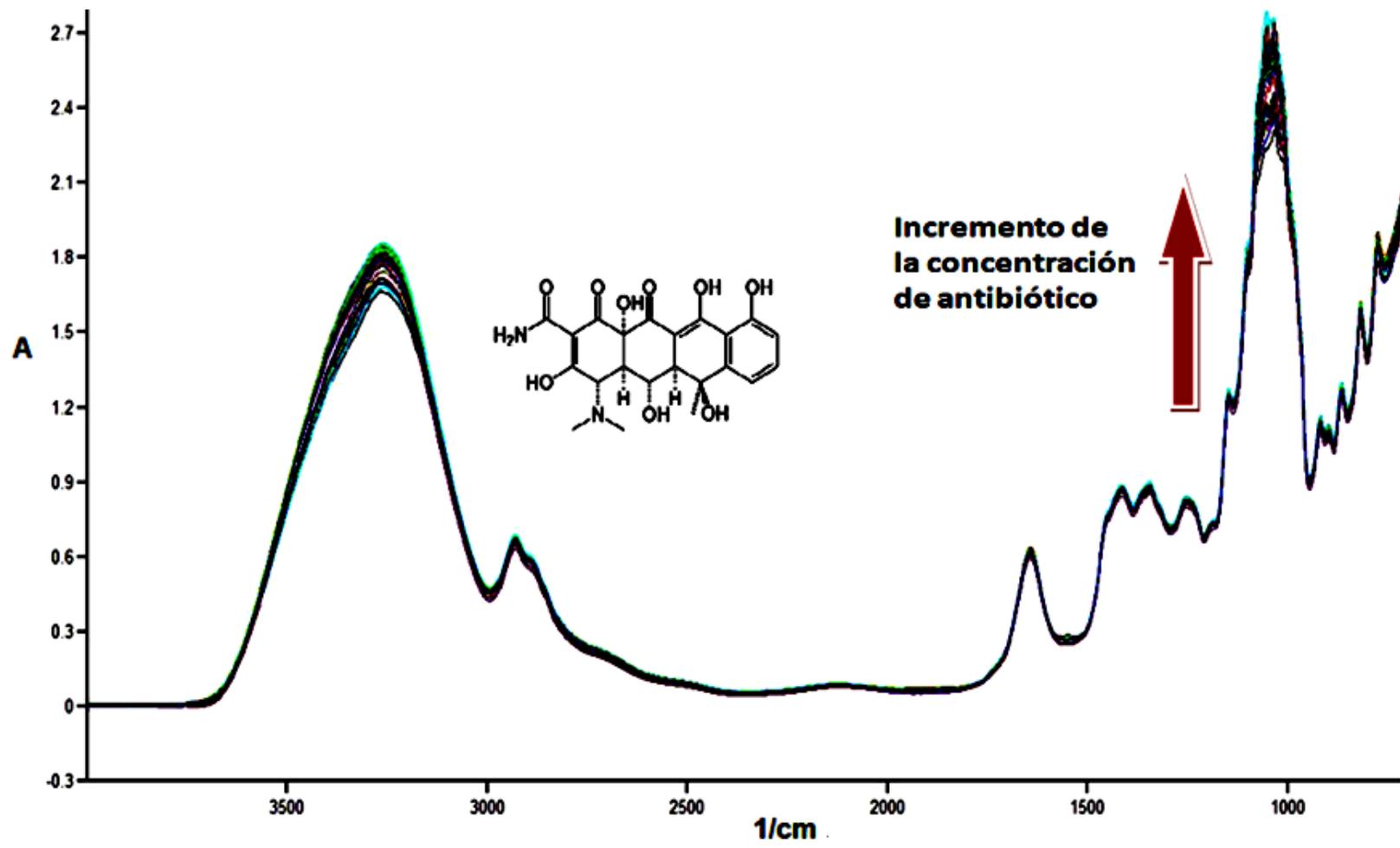


Figura 26. Comportamiento de las muestras de miel adicionadas con oxitetraciclina a diferentes concentraciones.

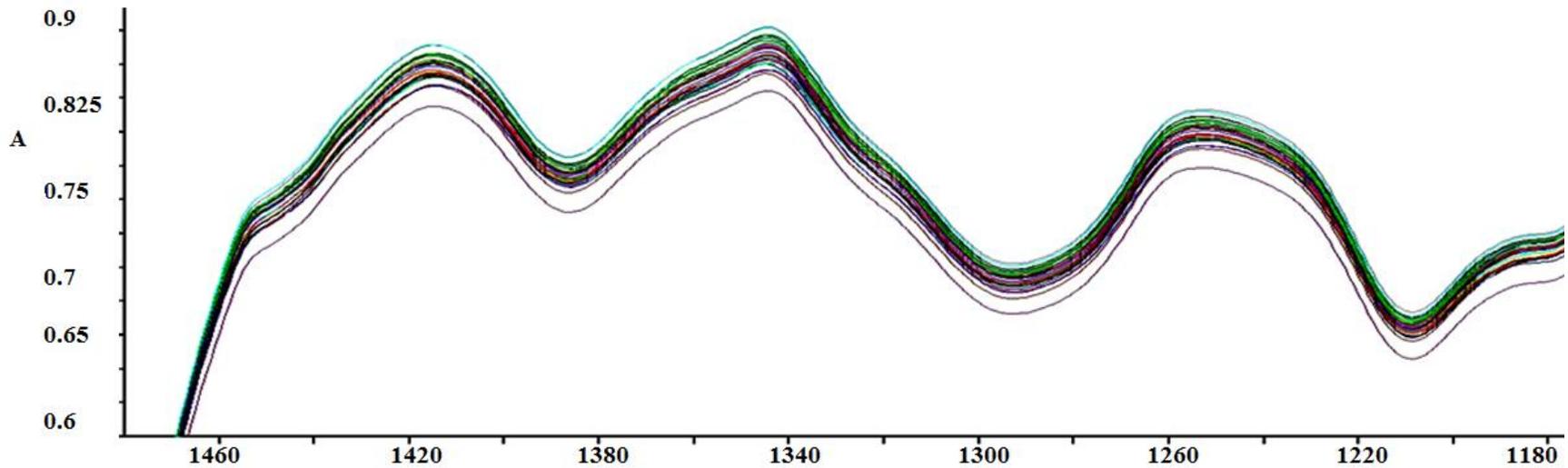


Figura 27. Comportamiento de las muestras de miel, adicionadas con oxitetraciclina a diferentes concentraciones, obtenidos en la región de 1460-1180 cm^{-1} en la zona de la huella digital.

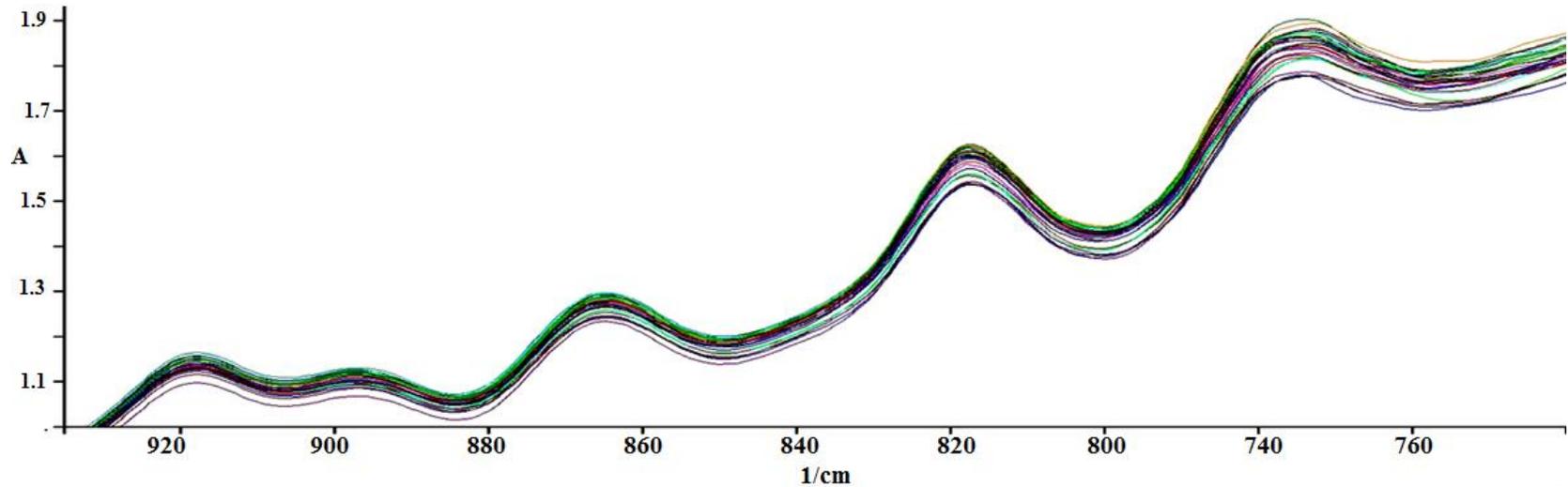


Figura 28. Comportamiento de las muestras adicionadas con oxitetraciclina a diferentes concentraciones obtenidos en la región de 940-740 cm^{-1}

7.2.1.2 Espectros de las muestras de calibración contaminadas con antibióticos en la región NIR

Como ejemplo, de los resultados obtenidos para el conjunto de muestras de calibración, se presentan en la Figura 29 algunos espectros con diferentes concentraciones de sulfatiazol obtenidos en la región NIR entre 10,000 y 4000 cm^{-1} .

La absorbancia de los espectros de miel con o sin antibiótico a cualquier longitud de onda es proporcional al número de moléculas absorbentes presentes en el camino recorrido por la radiación. Cuando se obtienen los espectros es importante mantener un paso óptico constante, por lo que se utilizó una celda de cuarzo, con el fin de minimizar los fenómenos de radiación difusa, la cual modifica el paso óptico efectivo (Cozzolino, 2003).

En la Figura 30 y 31 se muestran las diferencias de absorción en diferentes intervalos de números de onda para el conjunto de muestras de sulfatiazol, haciendo más evidentes los cambios de intensidad en las muestras.

En las Figuras 26 a la 31, es evidente que las muestras presentan modificaciones en la intensidad de las bandas, lo cual es el requisito para poder desarrollar modelos quimiométricos, ya que indican la variación necesaria entre las muestras, para relacionar la concentración de antibióticos, que se desean cuantificar con sus respectivos espectros, mediante quimiometría.

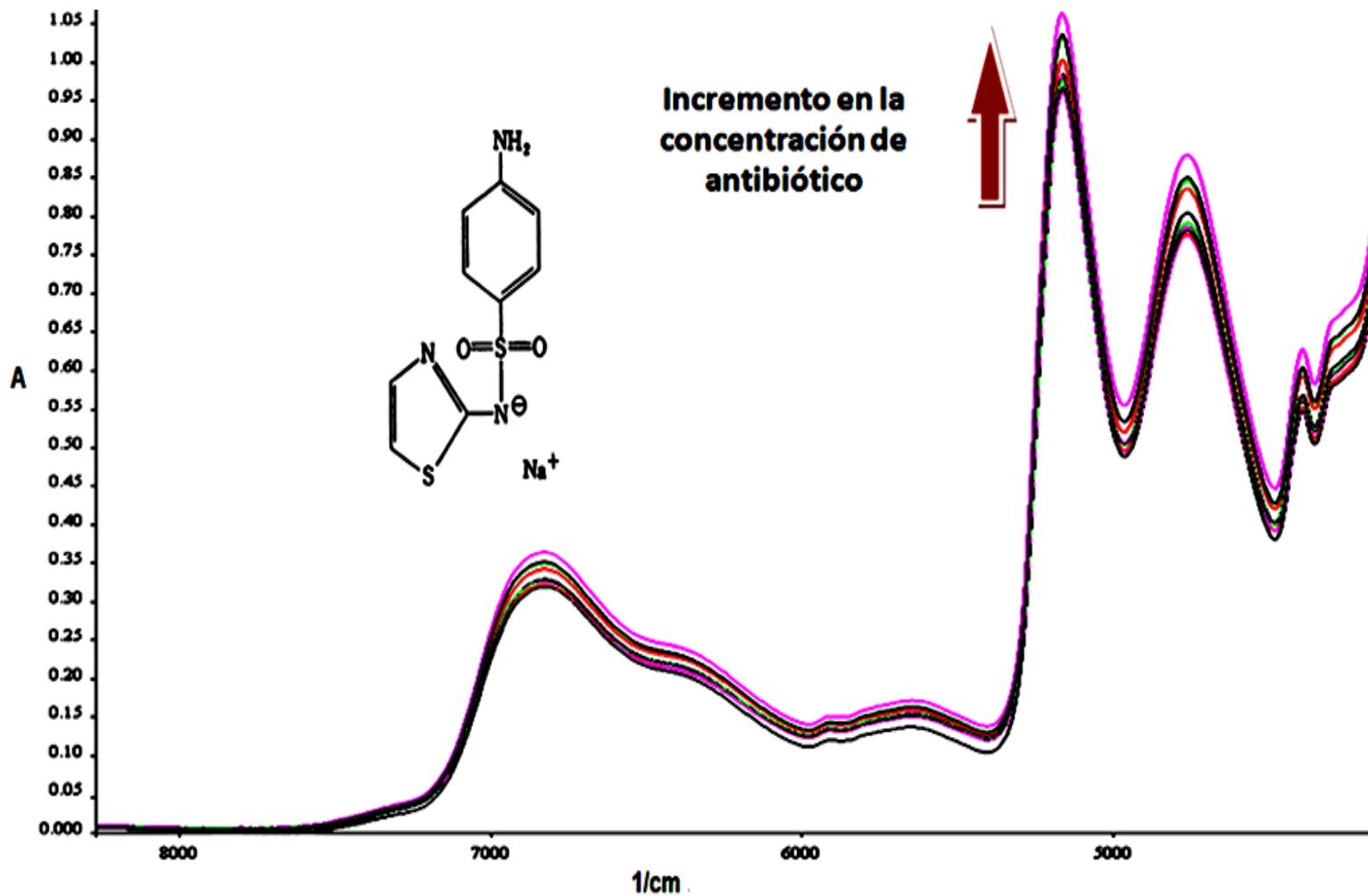


Figura 29. Comportamiento de las muestras de miel adicionadas con sulfatiazol a diferentes concentraciones

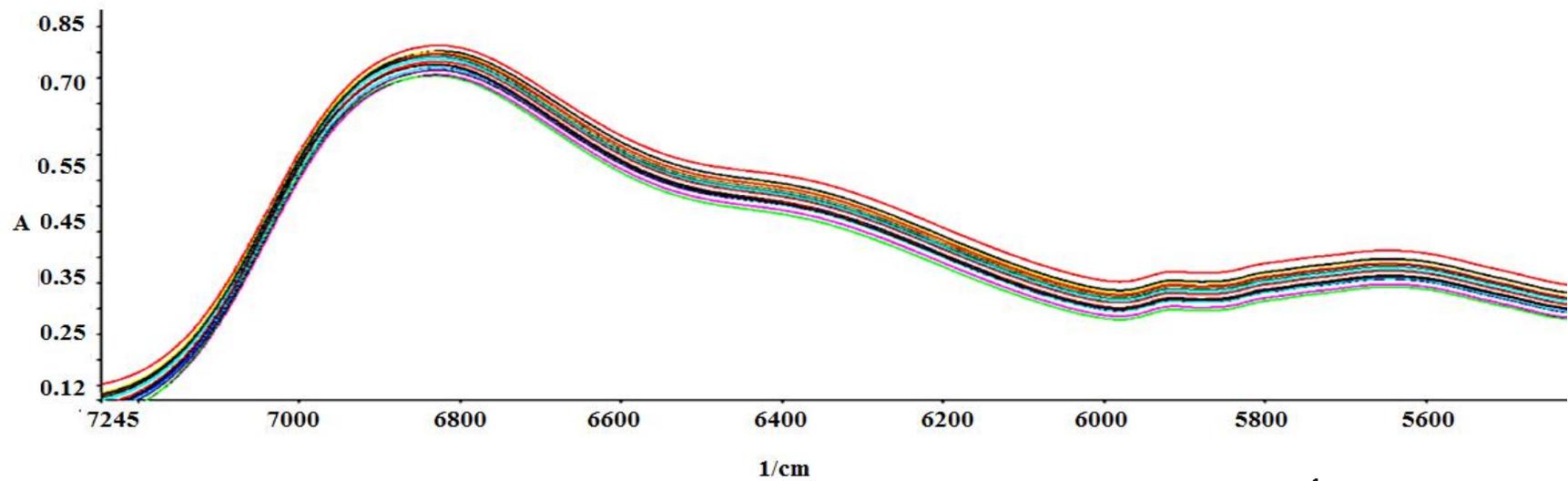


Figura 30. Absorción del conjunto de muestras de sulfatiazol en el intervalo de 7250-5350 cm^{-1}

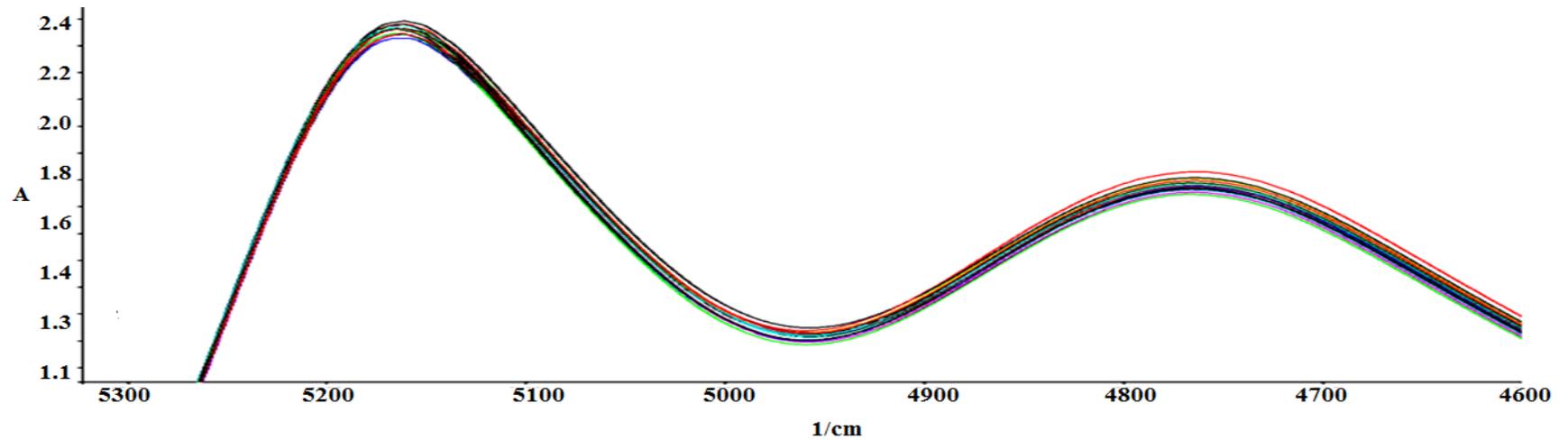


Figura 31. Absorción del conjunto de muestras de sulfatiazol en el intervalo de 5300-4500 cm^{-1}

7.2.2 Pretratamientos espectrales realizados a las muestras de calibración, para obtener los modelos de cuantificación optimizados.

Generalmente las señales analíticas obtenidas mediante el empleo de métodos espectroscópicos van acompañados de efectos o componentes no deseados los cuales reciben la denominación global de “ruido”. Para corregir o reducir este ruido en los datos espectrales, es necesario aplicar un tratamiento previo a los espectros obtenidos antes de calibrar. El propósito del pretratamiento es obtener una respuesta lineal la de las variables y eliminar las fuentes extrañas de variación que no son de interés en el análisis (Hendriks, 2005). No existe una regla fija en cuanto al tratamiento matemático más conveniente de los datos espectrales, esto dependerá de la calidad de la calibración obtenida, luego de probar diferentes combinaciones (ISI, 1992). Pero es importante el conocimiento general acerca del comportamiento de las muestras, por ejemplo, se sabe que el elevado contenido de agua causa fuertes bandas de absorción y generalmente la derivación de los espectros es eficiente para mejorar los modelos (Dardenne *et al*, 1996).

7.2.3 Modelos de cuantificación optimizados en ambas regiones (MIR y NIR)

Para obtener los modelos definitivos, se realizaron un conjunto de “n” calibraciones con los tres algoritmos con los que cuenta el programa Quant: PCR, PLS1 y PLS2. Inicialmente se calibró sin realizar ningún pretratamiento de los espectros y utilizando toda la región del infrarrojo, 4000-650 y 10000-4000 cm^{-1} para la región MIR y NIR respectivamente. Posteriormente, se fueron introduciendo modificaciones (pretratamientos), se calibró y analizó cada modelo mediante errores de calibración y predicción, su comportamiento mediante las graficas de diagnóstico, el mejor ajuste de los datos a la recta de valores especificados y estimados, la cantidad de componentes principales y el comportamiento de datos que se consideran fuera del modelo (outliners); lo cual permitió determinar cuáles eran los algoritmos que predecían mejor. Esto se corroboró posteriormente en la fase de validación de los modelos definitivos. Todo

el proceso se llevó a cabo el número de veces que fue necesario hasta obtener los modelos adecuados para la cuantificación.

7.2.3.1 Modelos de cuantificación optimizados en la región MIR de oxitetraciclina (OTC), Sulfatiazol (SFZ) y estreptomycin (ETM)

En la Cuadro 15 se presenta el resumen de los modelos finales con los que se obtuvieron el menor error de calibración (SEC) y predicción (SEP), así como los pretratamientos aplicados para en la región MIR.

Cuadro 15. Características de los modelos desarrollados que presentaron menores errores de calibración y predicción para los tres antibióticos de interés.

	Algoritmo	Número de factores	Suavizado (puntos)	Derivada (orden, puntos)	Normalización	Regiones utilizadas (cm-1)
Oxitetraciclina (OTC)	PCR	11	13	(2,13)	MSC*	3500-700
	PLS1	8	9	(1,5)	SNV**	1500-800
	PLS2	3	13	(2,5)	SNV	2400-600
Sulfatiazol (SFZ)	PCR	16	13	(2,13)	MSC	3500-600
	PLS1	5	5	(2,5)	SNV	1450-7000
	PLS2	7	9	(2,9)	SNV	2400-600
Estreptomycin (STM)	PCR	8	9	(2,9)	MSC	3500-600
	PLS1	9	5	(1,5)	MSC	1750-700
	PLS2	11	9	(1,9)	SNV	1500-600

*MSC (corrección del efecto multiplicativo de la dispersión)

**SNV (normalización normal estándar)

7.2.3.1.1 Análisis de los modelos optimizados para los tres antibióticos en la región MIR mediante graficas de diagnóstico

La elección de los modelos finales que se presentan en la Cuadro 11 se realizó mediante las graficas de diagnóstico que fueron calculados por el programa Quant+ para los tres algoritmos (PCR, PLS1 y PLS2), con los cuales se calibraron y optimaron. A continuación, se presentan las graficas de diagnóstico en la región MIR para los tres antibióticos de los modelos indicados en la Cuadro 15.

7.2.3.1.1.1 Número de componentes (factores), muestras atípicas y distancia de Mahalanobis para oxitetraciclina (OTC)

En la Figura 32 se presentan las graficas para la determinación del error estándar de predicción (SEP) en función del número de componentes principales para los modelos de oxitetraciclina y se indica el número de componentes elegido con una línea paralela al eje de las y. La elección del número de componentes principales o factores indicado por la línea vertical, se hace tomando en cuenta los resultados para los coeficientes de correlación, SEP y SEC, obtenidos para cada modelo. Los cuales deben de ser lo más cercanos a uno para el caso de R^2 y lo más bajos posibles en el caso de los errores.

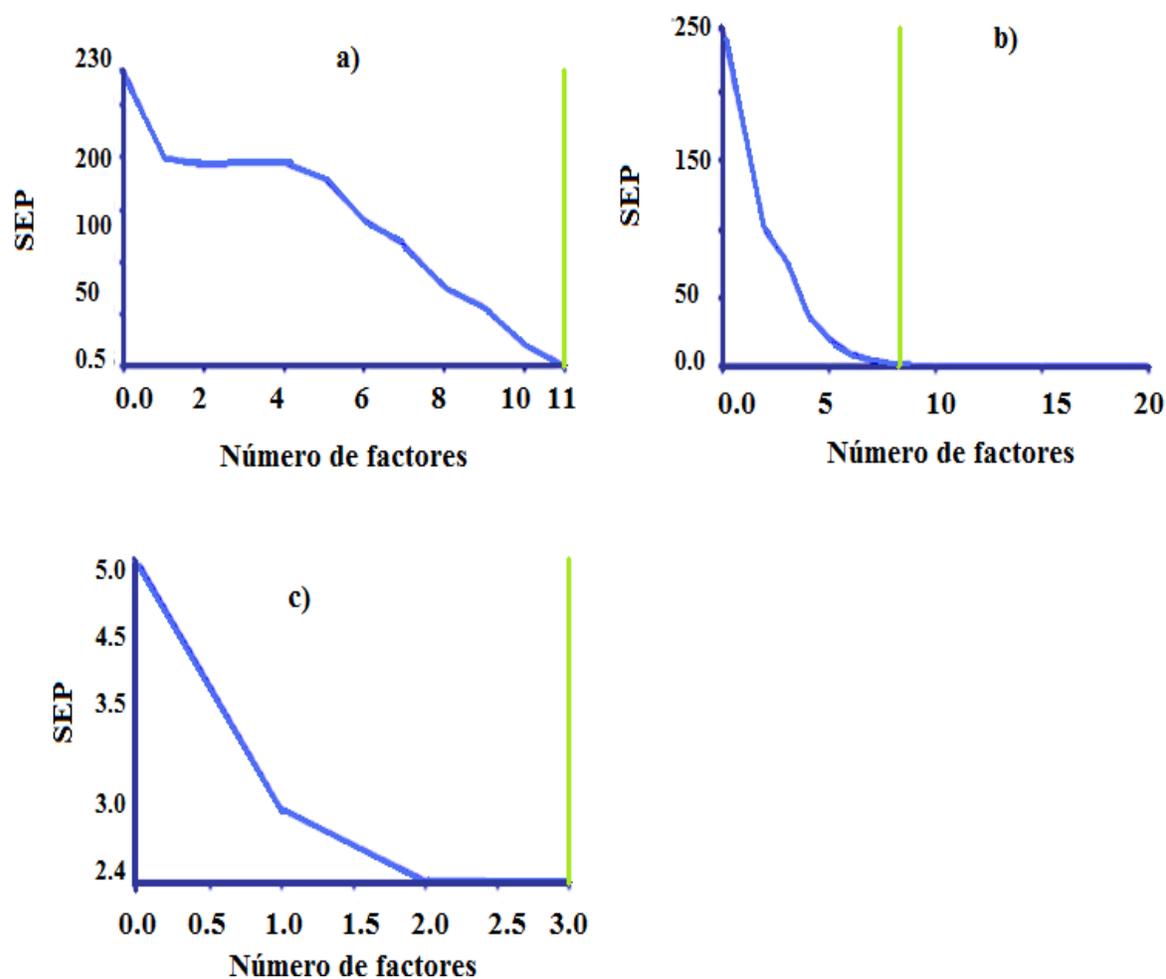


Figura 32. Comportamiento del número de componentes con respecto al SEP para los tres modelos creados para detectar oxitetraciclina utilizando: a) PCR, b)- PLS1 y c)-PLS2. La línea vertical indica el número de factores para obtener el menor error de predicción del modelo.

Es importante mencionar que al elegir el número de factores, el SEP puede disminuirse a un valor cercano a cero, esto puede provocar un sobredimensionamiento incluyendo información innecesaria (ruido) y puede alterar los resultados en el momento de la validación para la predicción de muestras.

Los métodos quimiométricos desarrollados se basan en que la información contenida en las variables de la señal puede estar contenida en un número menor sin que haya pérdida de información relevante, por ello el proceso de calibración se realiza no sobre los datos originales sino sobre estas nuevas variables, simplificando el modelos y la interpretación de los resultados.

En el desarrollo de un modelo, una de las primeras fases a atender, es detectar muestras que se consideren extrañas ("outliers"), que no ajustan o no corresponden al conjunto de calibración. Para clasificar una muestra como extraña, se usan el criterio denominado residual (desvío) entre el valor de predicción y el de referencia, para cada muestra (Murray, 1993). Este análisis se realizó mediante las graficas de error residual que presentó cada muestra con respecto a la influencia que tenían en el modelo. En la Figura 33 se presentan las graficas para los modelos optimizados de OTC en la región MIR, para los 3 algoritmos utilizados

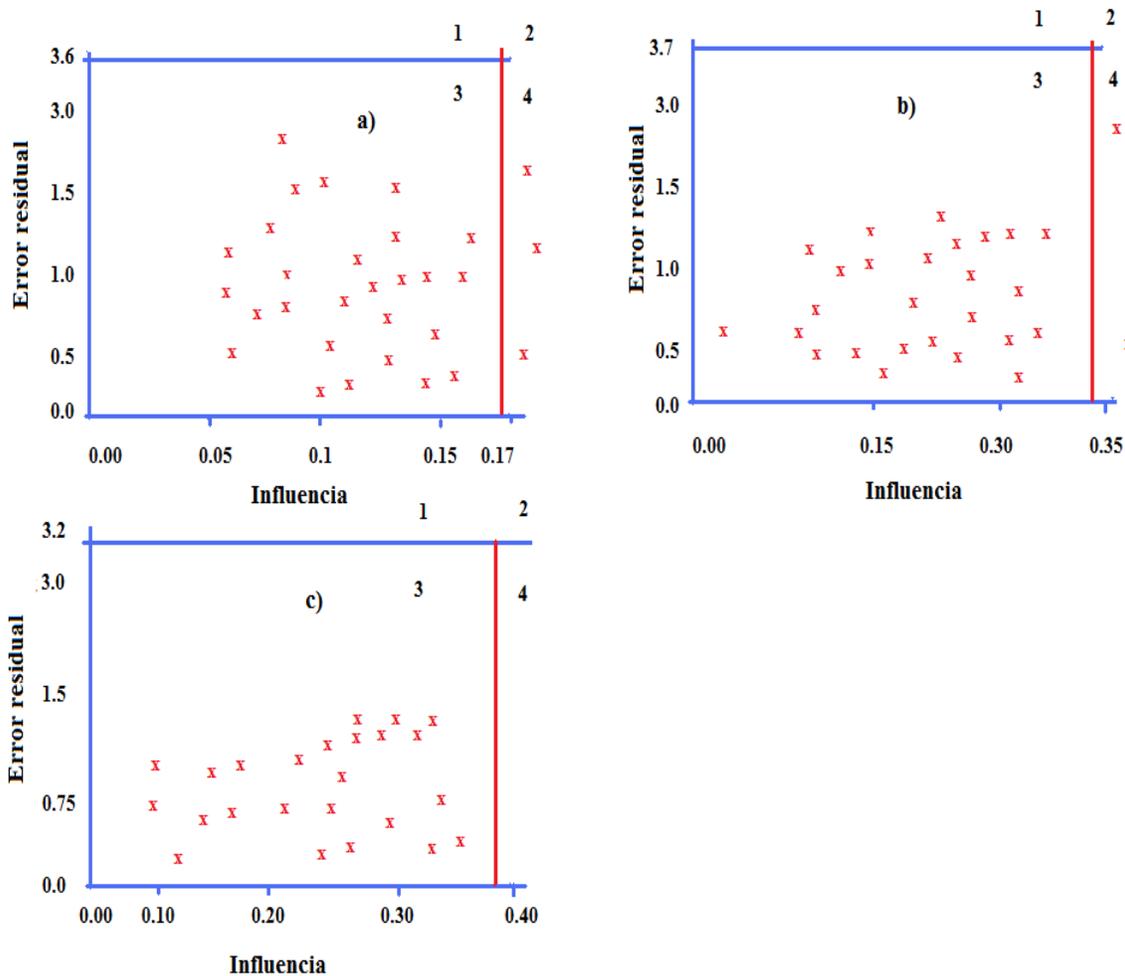


Figura 33. Indica cómo influye cada una de las muestras con respecto al error residual del modelo obtenido con a) PCR, b) PLS1 y c)-PLS2 para muestras con diferentes concentraciones de oxitetraciclina.

Los puntos considerados como pertenecientes a los modelos, son aquellos con bajo error y baja influencia (cuadrante 3). Los pertenecientes al cuadrante 1 y 2 representan muestras con una alta influencia en el modelo, pero con un error residual alto y aquellos pertenecientes al cuadrante cuatro corresponden a muestras con las concentraciones más altas o más bajas de OTC. Se considera que el punto de corte adecuado para el error residual debe de ser menor a 3 (Perkin Elmer, 2000) para tener una capacidad de predicción adecuada en los modelos. Como se puede apreciar en las graficas (Figura 33), ningún modelo

sobrepasa dicho valor para los modelos obtenidos con los algoritmos PCR, PLS1 y PLS2.

Otro criterio importante para los modelos optimizados, es la distancia de Mahalanobis. La distancia de Mahalanobis es una herramienta frecuentemente usada en la detección de muestras anómalas “outliners” o para indicar la probabilidad de una determinada muestra de pertenecer a un determinado grupo. Este parámetro representa la distancia de una muestra con respecto a la media de todas las muestras. La distancia de Mahalanobis disminuye a medida que aumenta la correlación entre las variables y se aplica un punto de corte menor a 1 para determinar que una muestra este bien representada en el modelo, Figura 34 (Perkin Elmer 2000).

En la Figura 34 se muestran la influencia de las muestras con respecto a la distancia de Mahalanobis que presentaron los modelos desarrollados para OTC. En un grupo de muestras, aquellas que exhiben mayor influencia en los modelos presentan absorbancias máximas y mínimas. Como se puede observar en la Figura 34, estas muestras se representan después del punto de corte (indicado en este caso por una línea vertical y paralela al eje y). Se recomienda que aquellas muestras que se encuentran en esta zona de las graficas sean consideradas como puntos atípicos, sin embargo esto no es una regla general, ya que en los modelos optimizados, suelen pertenecer a las concentraciones más bajas o altas en el conjunto de calibración.

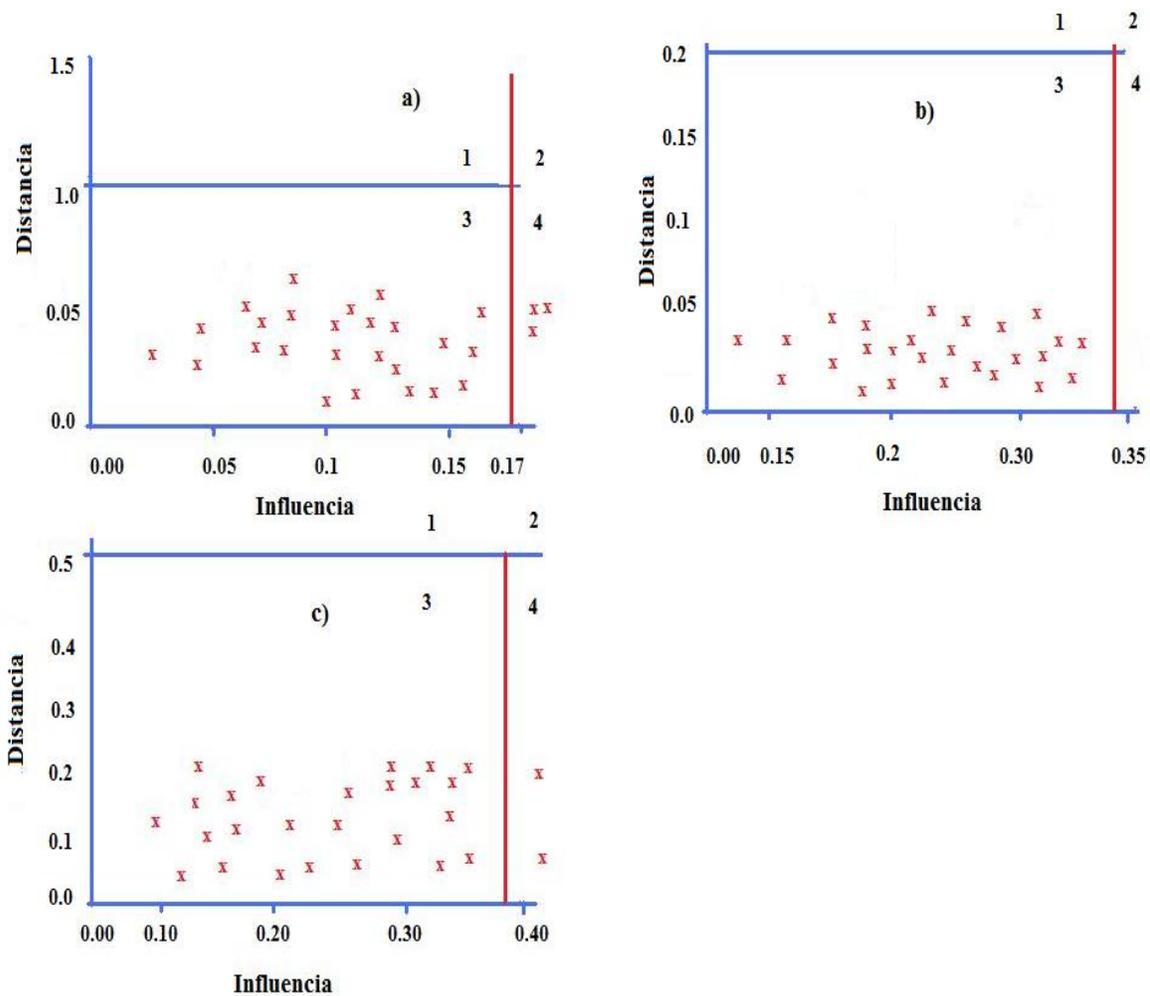


Figura 34. Indica la distancia de Mahalanobis para cada una de las muestras con el modelo obtenido con a) PCR, b) PLS1 y c) PLS2 para muestras con diferentes concentraciones de oxitetraciclina.

7.2.3.1.1.2 Número de componentes (factores), muestras atípicas y distancia de Mahalanobis para Sulfatiazol (SFZ)

A continuación, se muestran las graficas de diagnostico para el número de factores elegido con cada algoritmo (Figura 35), a la influencia de las muestras con respecto al error residual (Figura 36) y a la distancia de Mahalanobis (Figura 37), obtenidas para los modelos desarrollados.

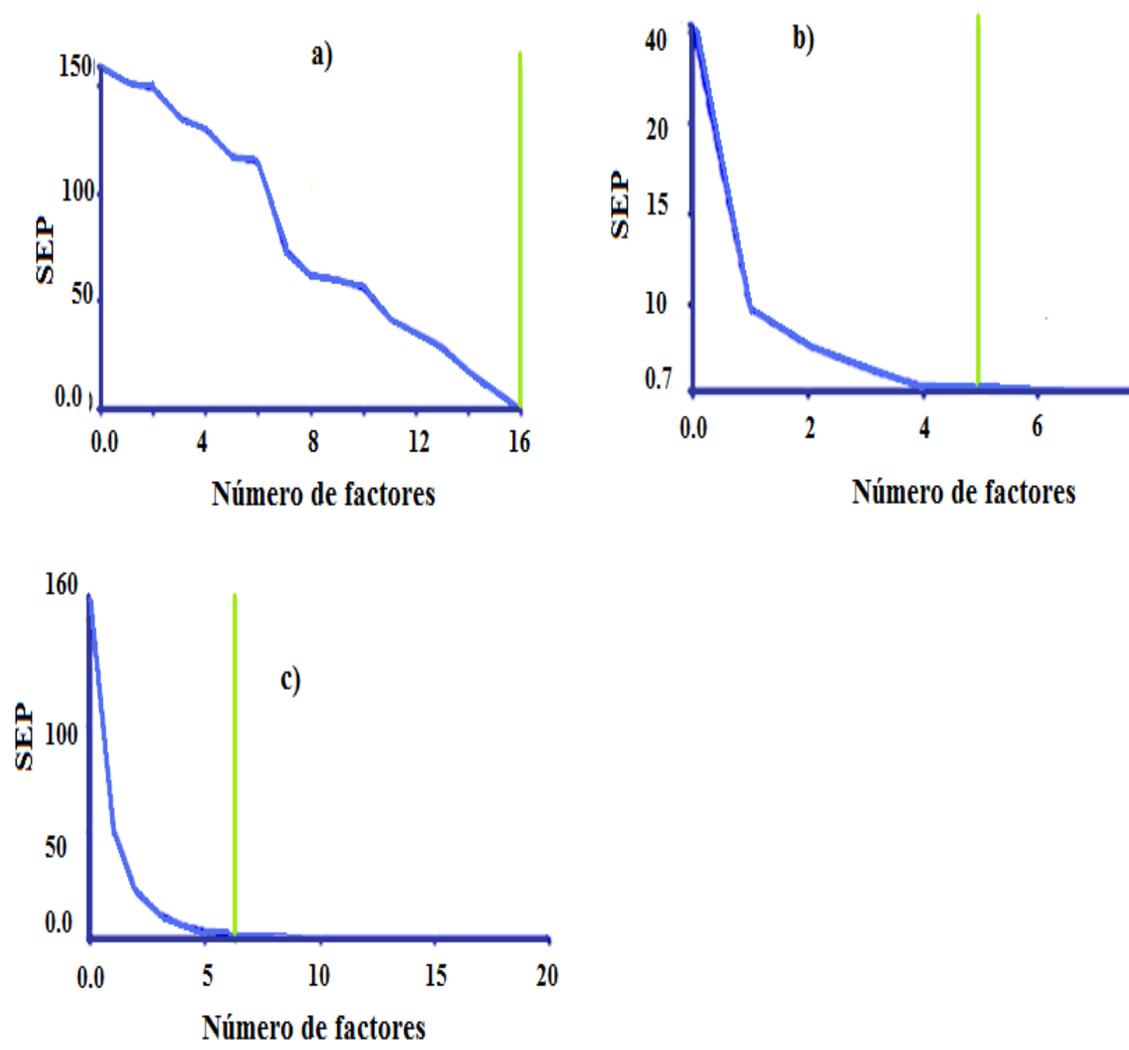


Figura 35. Comportamiento del número de componentes con respecto al SEP para los tres modelos creados para detectar sulfatiazol utilizando a)-PCR, b)-PLS1 y c)- PLS2). La línea vertical indica el número de factores para obtener el menor error de predicción del modelo.

Para el criterio de puntos extraños (outliers) se puede observar (Figura 36), que las muestras para estos modelos no sobrepasan la línea de corte (3) para el error residual.

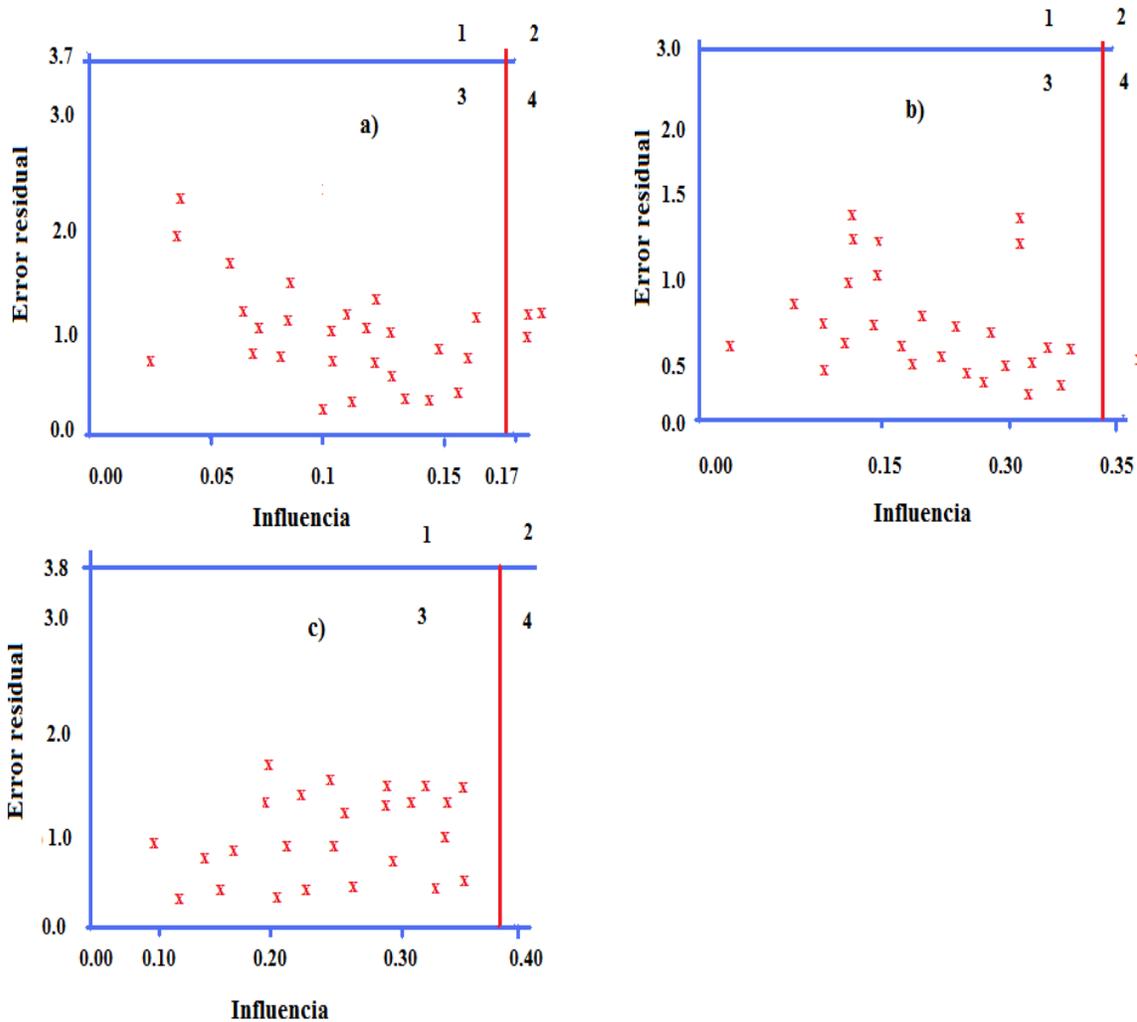


Figura 36. Indica cómo influye cada una de las muestras con respecto al error residual del modelo obtenido con a) PCR, b) PLS1 y c)-PLS2 para muestras con diferentes concentraciones de sulfatiazol.

En el caso de la distancia de Mahalanobis en la Figura 37 se indica que ningún modelo sobrepasó la línea de corte (indicado con la horizontal igual a 1) para las muestras utilizadas en los tres modelos.

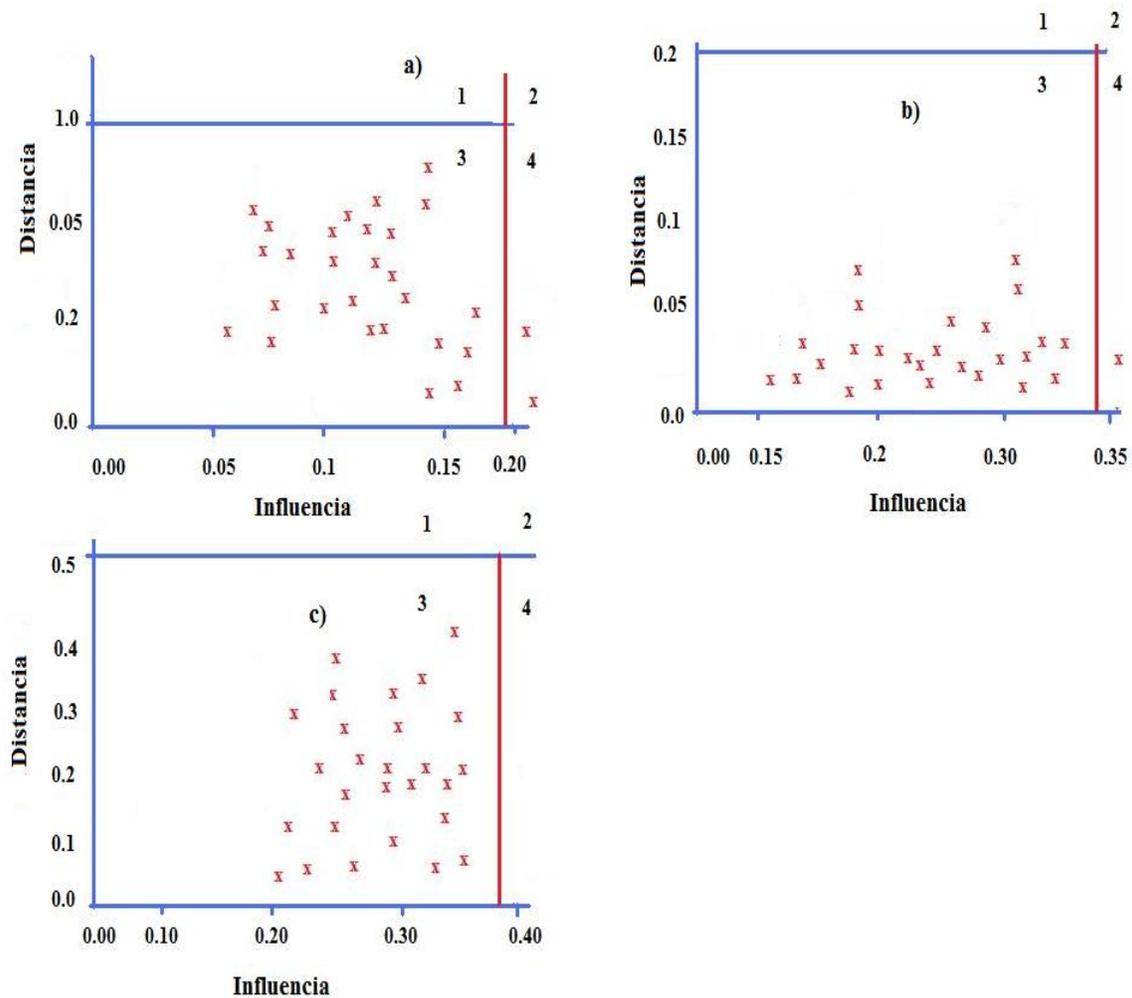


Figura 37. Indica la distancia de Mahalanobis para cada una de las muestras con modelo a) PCR, b) PLS1 y c) PLS2 para muestras con diferentes concentraciones de sulfatiazol.

7.2.3.1.1.3 Número de componentes (factores), muestras atípicas y distancia de Mahalanobis para estreptomicina (ETM).

Los mismos pasos antes mencionados fueron realizados para la construcción de los modelos para la detección de estreptomicina. En la Figura 38 se presentan las graficas para la determinación del número de componentes principales indicados en la Cuadro 15 en función del SEP.

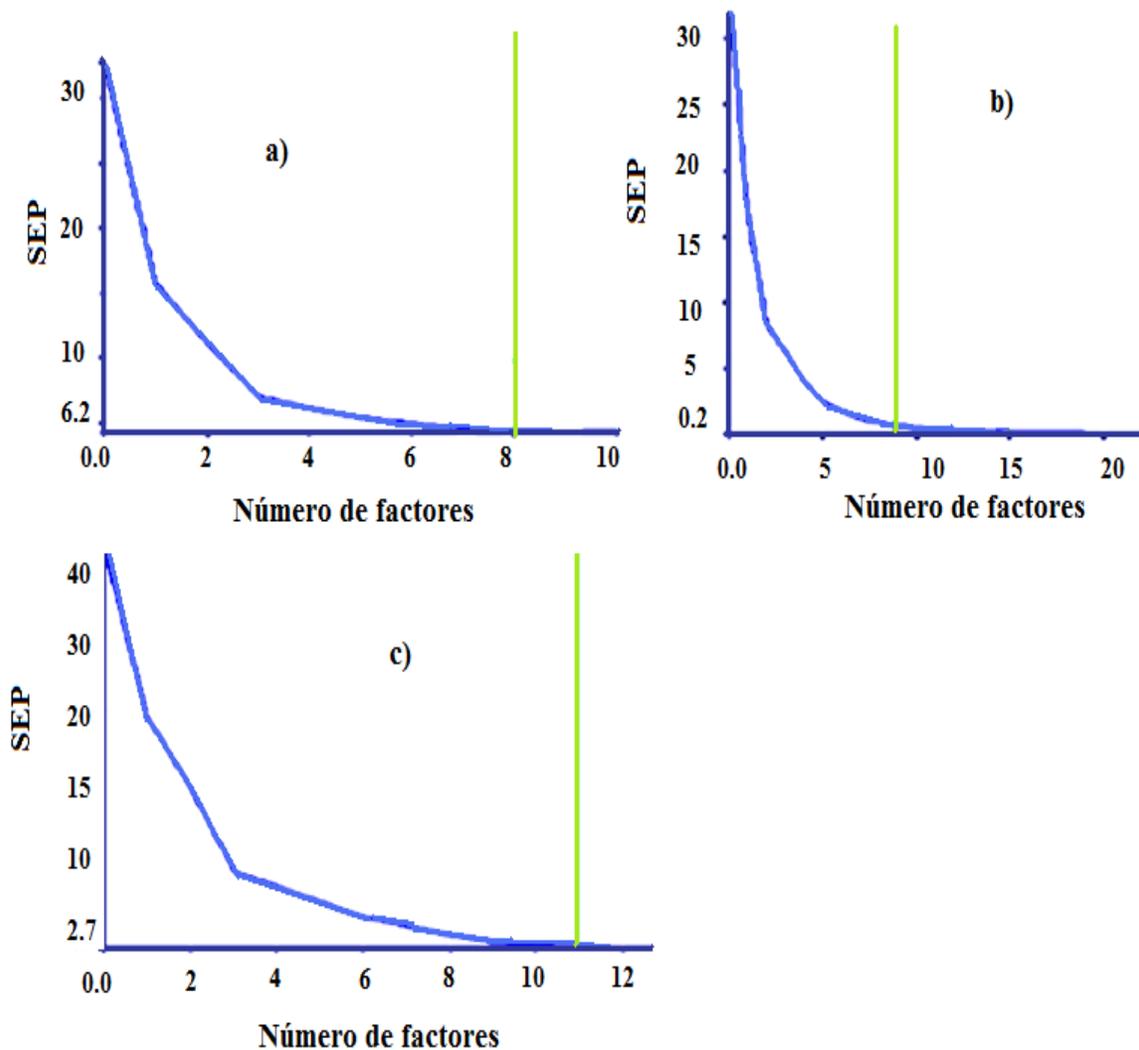


Figura 38. Comportamiento del número de componentes con respecto al SEP para los tres modelos creados utilizando los tres diferentes algoritmos a)-PCR, b)-PLS1 y c)-PLS2.

En la Figura 39 se presentan las graficas de diagnostico para puntos atípicos o anormales (outliers). Observándose en ellas que ninguna muestra sobrepasa el punto de corte (error residual) que debe ser mayor a 3. La distancia de Mahalanobis, es menor a 1 para todas las muestras por lo tanto están representadas adecuadamente en el modelo (Figura 40).

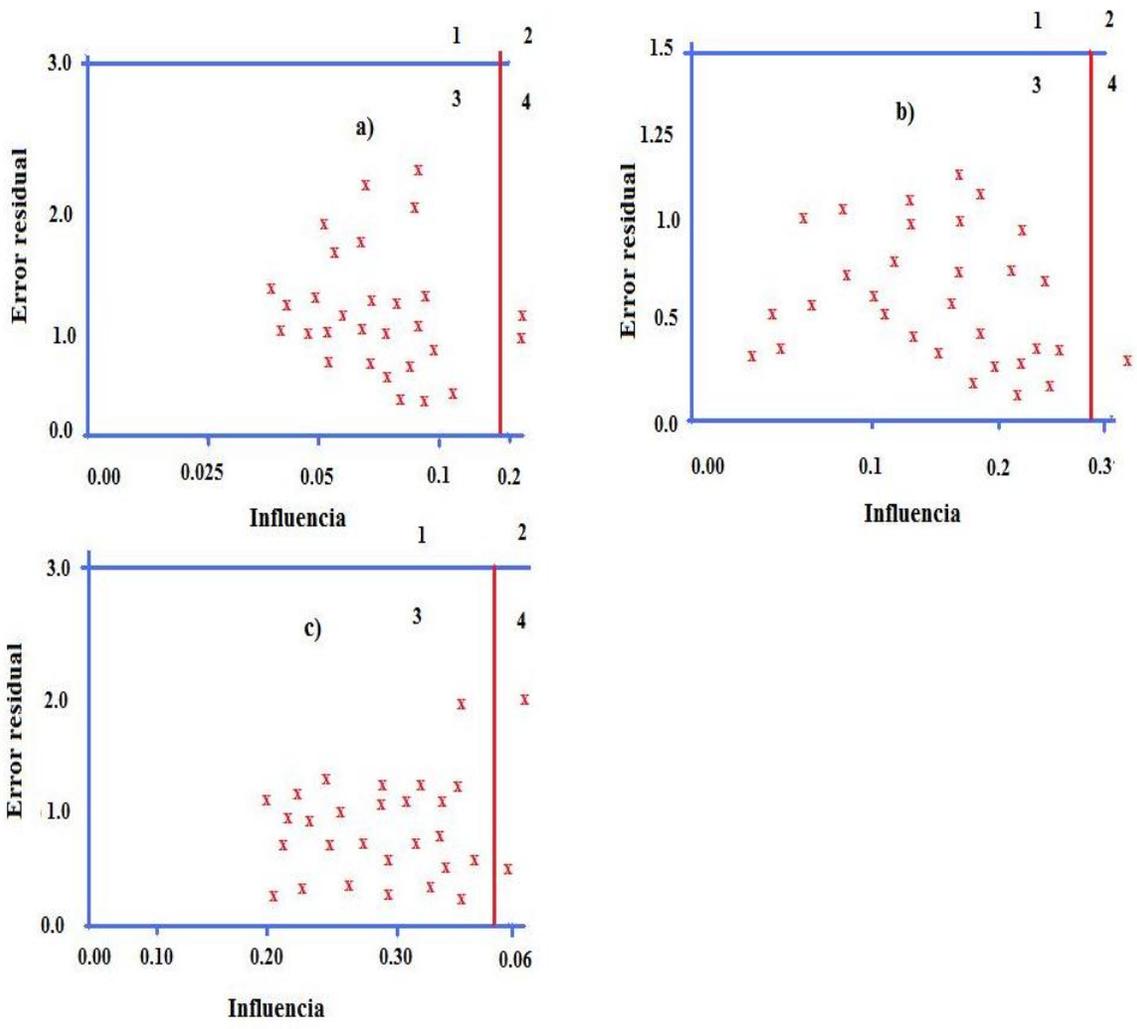


Figura 39. Indica cómo influye cada una de las muestras con respecto al error residual del modelo obtenido con a) PCR, b) PLS1 y c) PLS2 para muestras con diferentes concentraciones de estreptomicina.

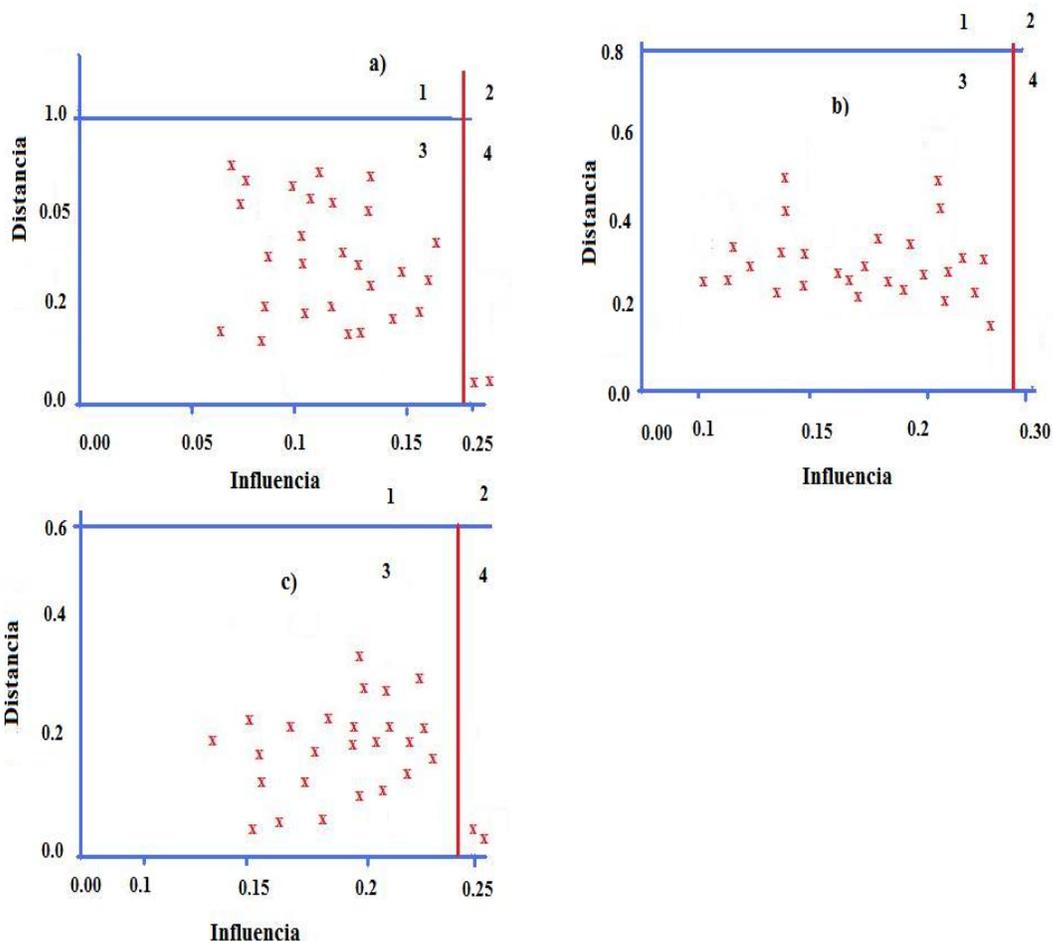


Figura 40. Indica la distancia de Mahalanobis para cada una de las muestras con el modelo a) PCR, b) PLS1 y c) para PLS2.

7.2.3.2 Modelos de cuantificación optimizados para OTC, SFZ y ETM en la región NIR

Una vez más, la correlación de los datos espectrales y los datos de las concentraciones en las muestras se realizó utilizando análisis de componentes principales y análisis de cuadrados mínimos parciales. Al desarrollar la calibración y optimización de los modelos en la región NIR, se relacionó, mediante cada algoritmo, la concentración de antibiótico en las muestras con la información espectral. Se realizaron un número “n” de calibraciones modificando los

pretratamiento ya mencionados con anterioridad. En la Cuadro 16, se indican las características de los modelos finales.

Cuadro 16. Características de los modelos desarrollados que presentaron menores errores de calibración y predicción para la región NIR

	Algoritmo	Número de factores	Suavizado	Derivada (orden, puntos)	Normalización	Regiones utilizadas (cm-1)
Oxitetraciclina (OTC)	PCR	15	9 puntos	(2,19)	MSC	8000-4350
	PLS1	11	5 puntos	(1,5)	SNV	7500-4500
	PLS2	12	9 puntos	(2,5)	MSC	7500-4500
Sulfatiazol (SFZ)	PCR	15	9 puntos	(2, 9)	MSC	7500-4300
	PLS1	10	9 puntos	(2,9)	SNV	6300-4500
	PLS2	7	13 puntos	(2,13)	SNV	5300-4500
Estreptomicina (STM)	PCR	12	9 puntos	(2, 9)	MSC	8000-4300
	PLS1	12	9 puntos	(1,9)	SNV	5300-4500
	PLS2	10	13 puntos	(2,13)	SNV	5300-4500

*MSC (corrección del efecto multiplicativo de la dispersión)

*SNV (normalización normal estándar)

7.2.3.2.1 Análisis de los modelos optimizados para los tres antibióticos en la región NIR mediante graficas de diagnóstico.

7.2.3.2.1.1 Elección del número de componentes (factores), muestras atípicos y distancia de Mahalanobis para oxitetraciclina

A continuación, se indican en las siguientes las graficas el número de factores elegido para cada uno de los modelos optimizados (Figura 41), la de influencia de las muestras con respecto al error residual (Figura 42) así como la referente a la distancia de Mahalanobis (Figura 43)

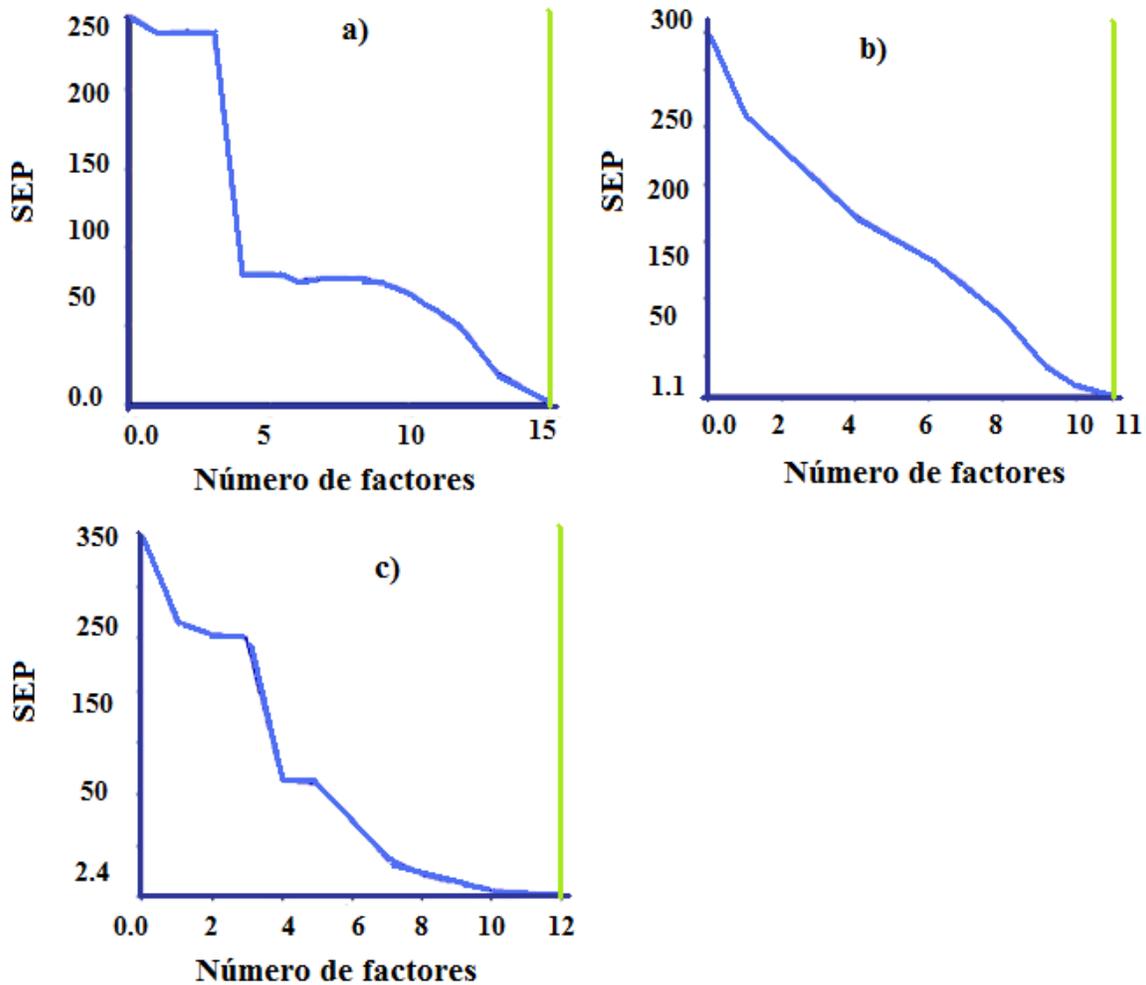


Figura 41. Comportamiento del número de componentes con respecto al SEP para los tres modelos creados para detectar oxitetraciclina utilizando a)- PCR, b)- PLS1, c) - PLS2. La línea vertical indica el número de factores para obtener el menor error de predicción del modelo.

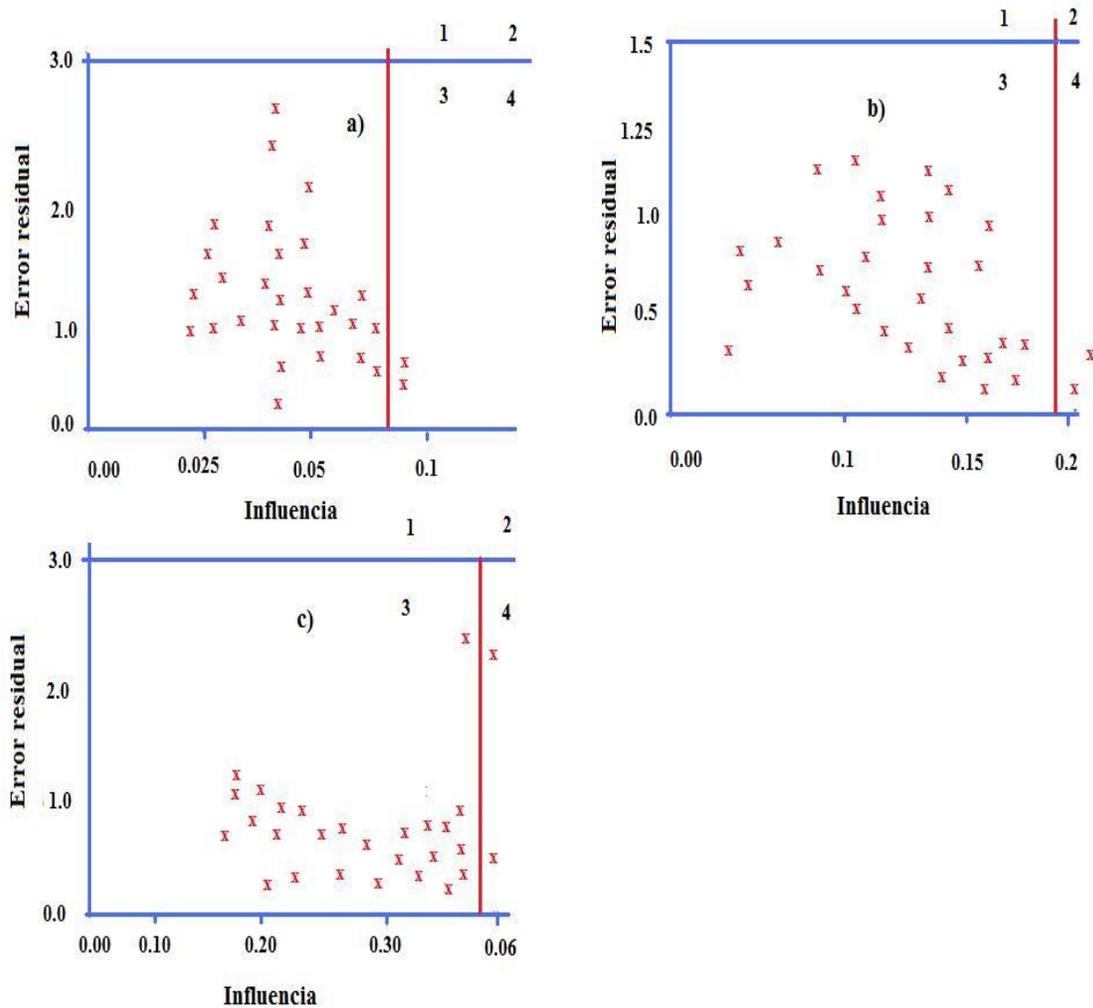


Figura 42. Indica cómo influye cada una de las muestras con respecto al error residual del modelo a) PCR, b)- PLS1 y c)-PLS2 para muestras con diferentes concentraciones de oxitetraciclina.

Para el siguiente criterio (outliners) se puede observar en la Figura 36 las muestras para estos modelos no sobrepasan la línea de corte (3) para el error residual. En el caso de la distancia de Mahalanobis (Figura 37), se indica que ningún modelo sobrepasó la línea de corte (1) para las muestras utilizadas en los tres modelos.

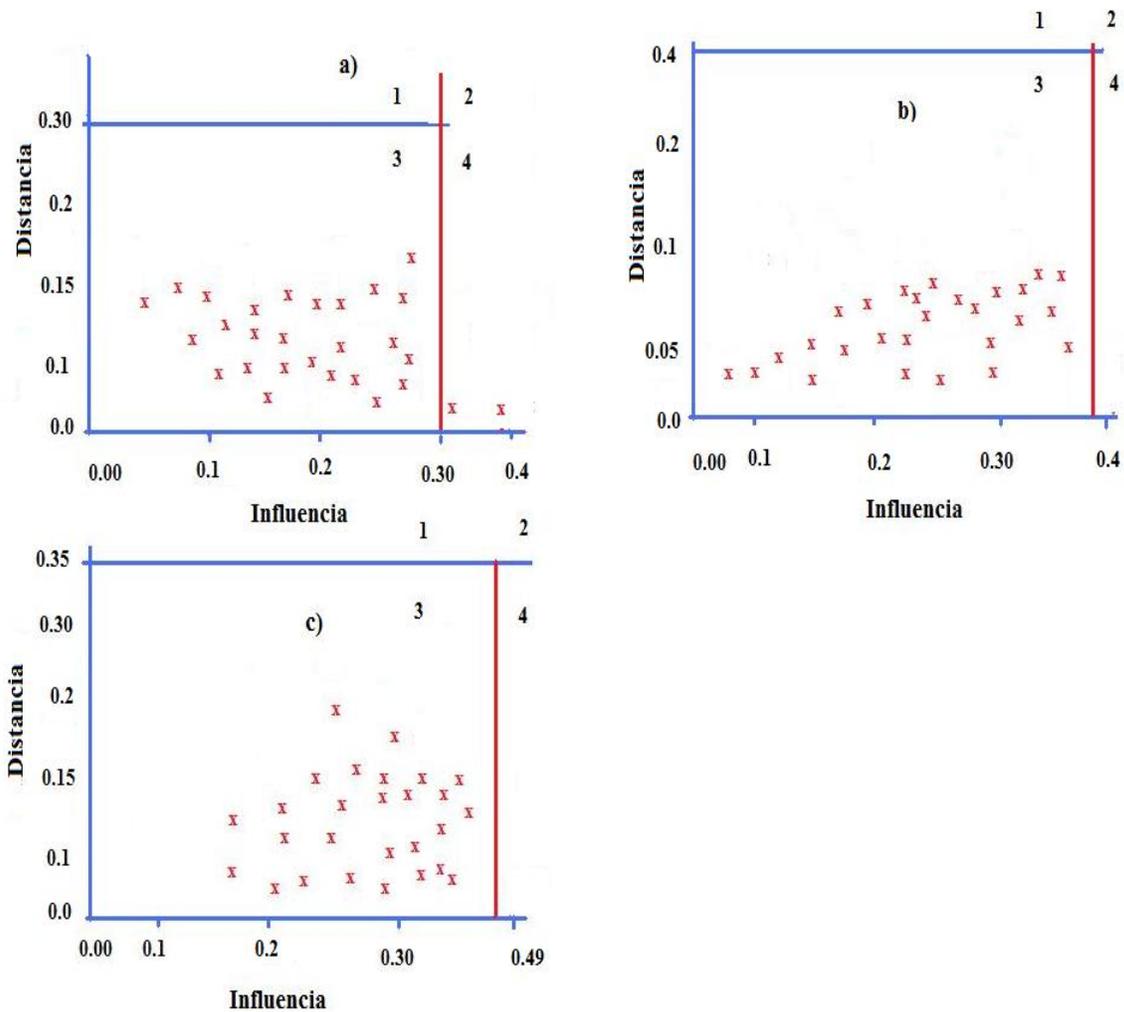


Figura 43. Indica la distancia de Mahalanobis para cada una de las muestras con el modelo a) PCR, b) PLS1 y c) PLS2 para muestras con diferentes concentraciones de oxitetraciclina.

7.2.3.2.1.2 Elección del número de componentes (factores), grafica de muestras atípicas y distancia de Mahalanobis para sulfatiazol

Se incluyen en las Figuras 44, 45, 46, los factores utilizados para la construcción de los modelos y las graficas de puntos outliners y distancia de mahalanobis para cada algoritmo

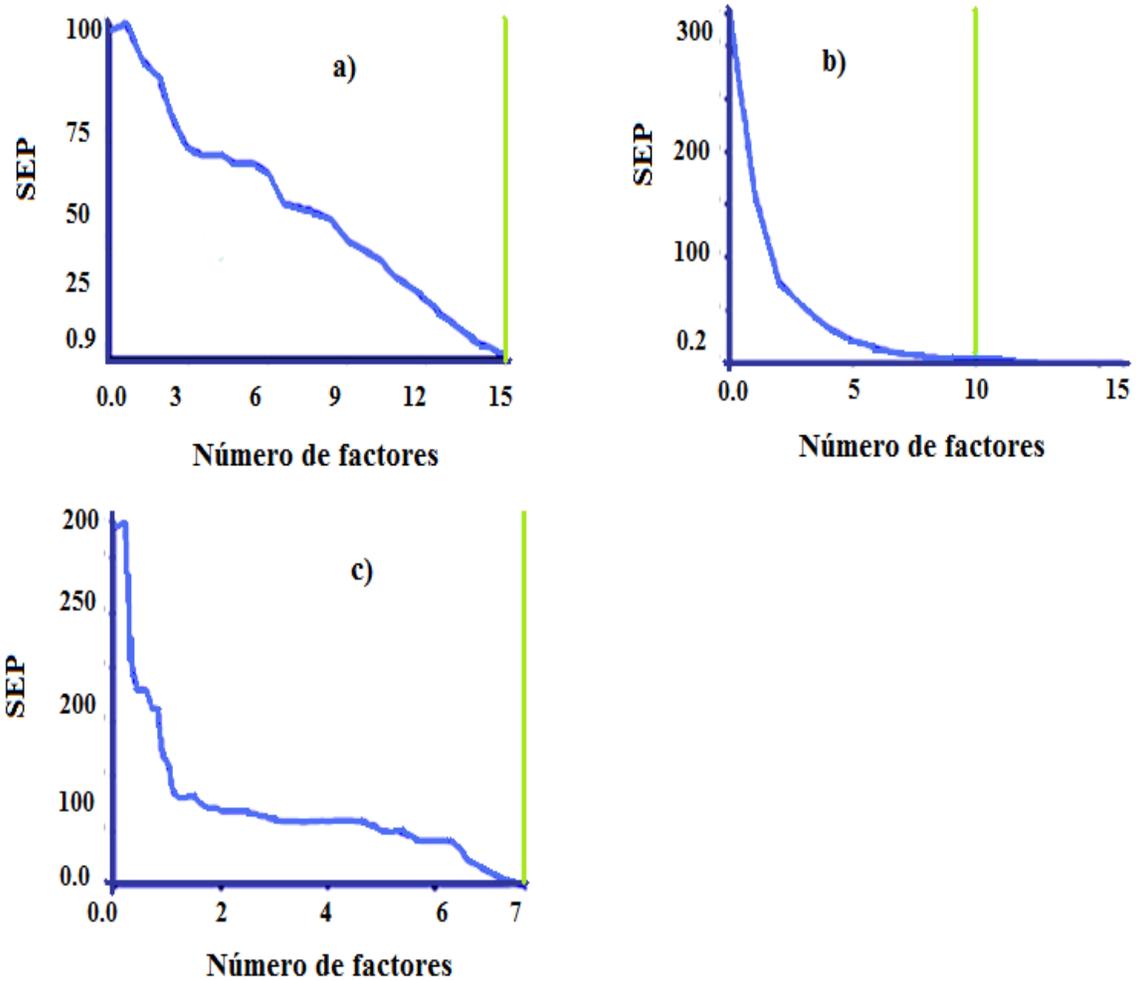


Figura 44. Comportamiento del número de componentes con respecto al SEP para los tres modelos creados para detectar sulfatiazol utilizando a)-PCR, b)-PLS1 y c)-PLS2 para muestras con diferentes concentraciones de sulfatiazol.

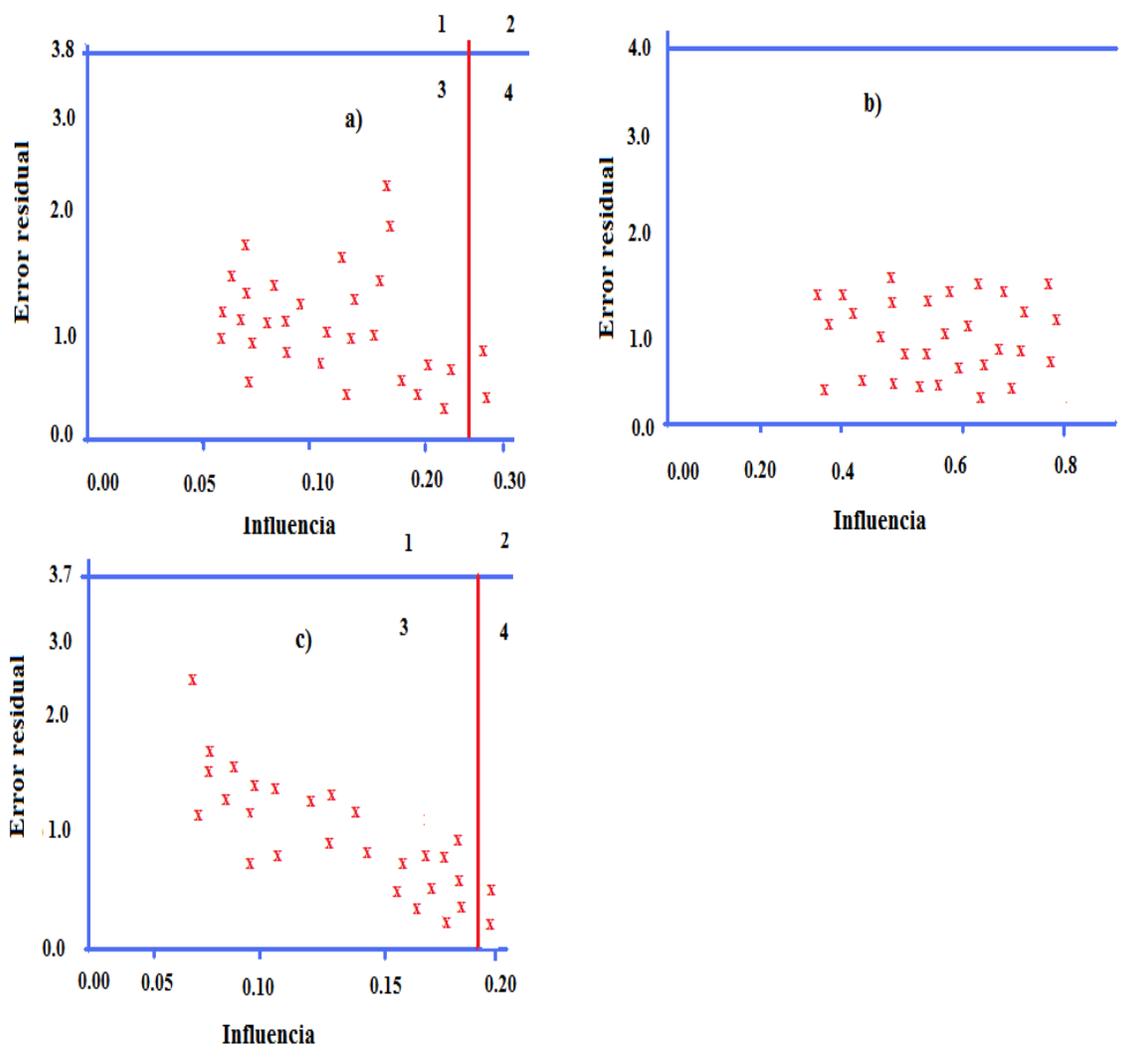


Figura 45. Indica cómo influye cada una de las muestras con respecto al error residual del modelo obtenido con a) PCR, b) PLS1 y c) PLS2 para muestras con diferentes concentraciones de sulfatiazol.

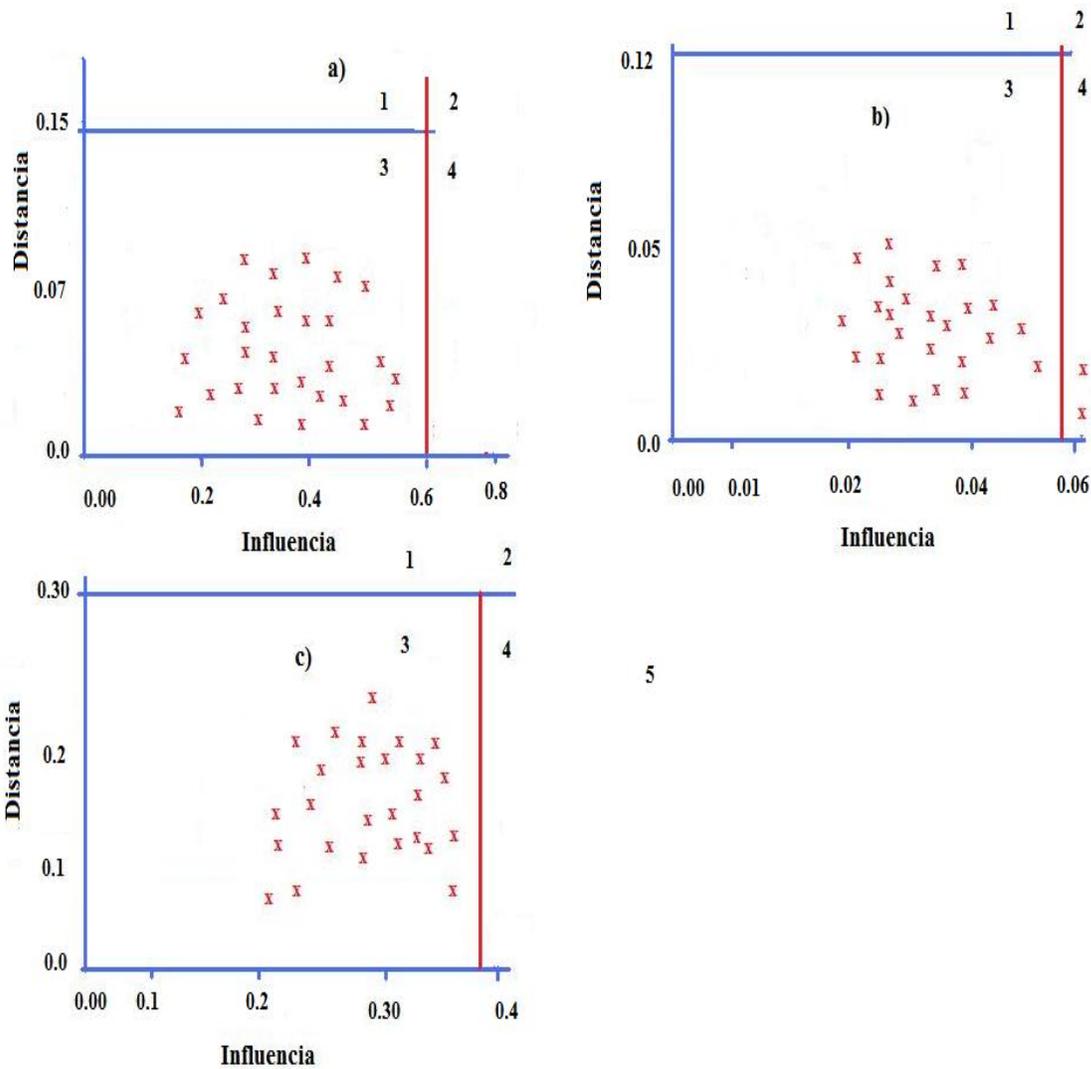


Figura 46. Indica la distancia de Mahalanobis para cada una de las muestras con el modelo obtenido con a) PCR, b) PLS1 y c) para PLS2.

7.2.3.2.1.3. Elección del número de componentes (factores), grafica de muestras atípicas y distancia de Mahalanobis para estreptomicina

Se incluyen en las Figuras 47, 48, 49 los factores utilizados para la construcción de los modelos y las graficas de puntos outliers y distancia de Mahalanobis para cada algoritmo

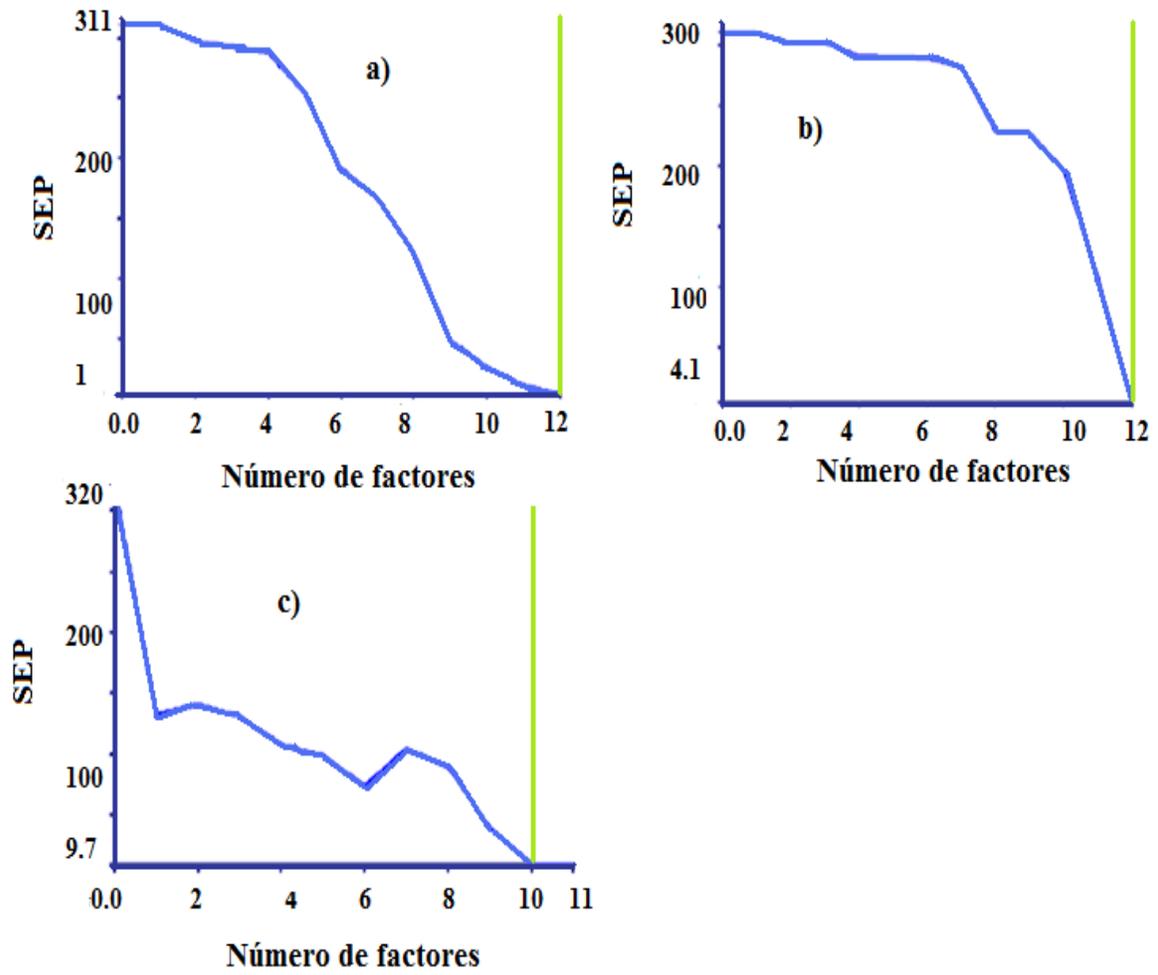


Figura 47. Comportamiento del número de componentes con respecto al SEP para los tres modelos creados para detectar estreptomicina utilizando a)-PCR, b)-PLS1 y c)-PLS2 para muestras con diferentes concentraciones de estreptomicina.

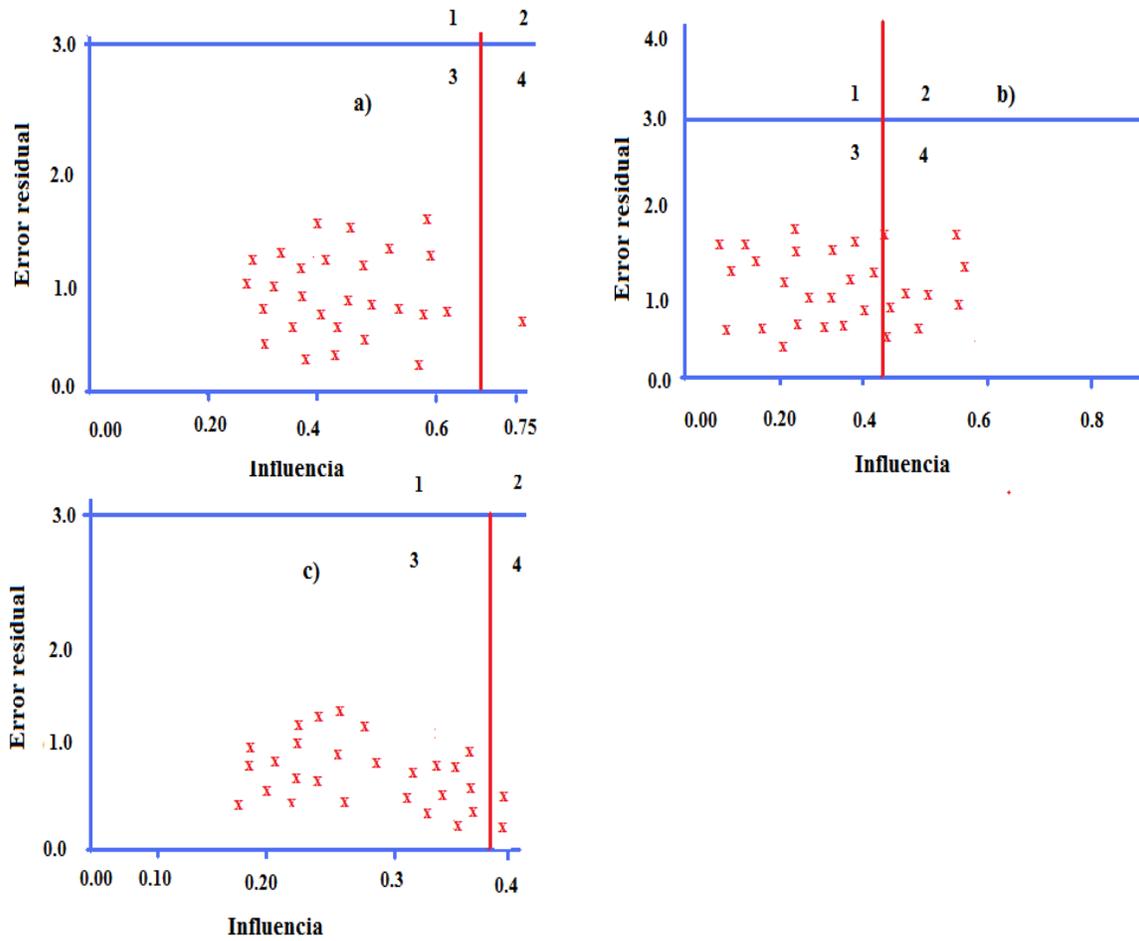


Figura 48. Indica cómo influye cada una de las muestras con el modelo a) PCR, b)- PLS1 y c) PLS2 para muestras con diferentes concentraciones de estreptomicina.

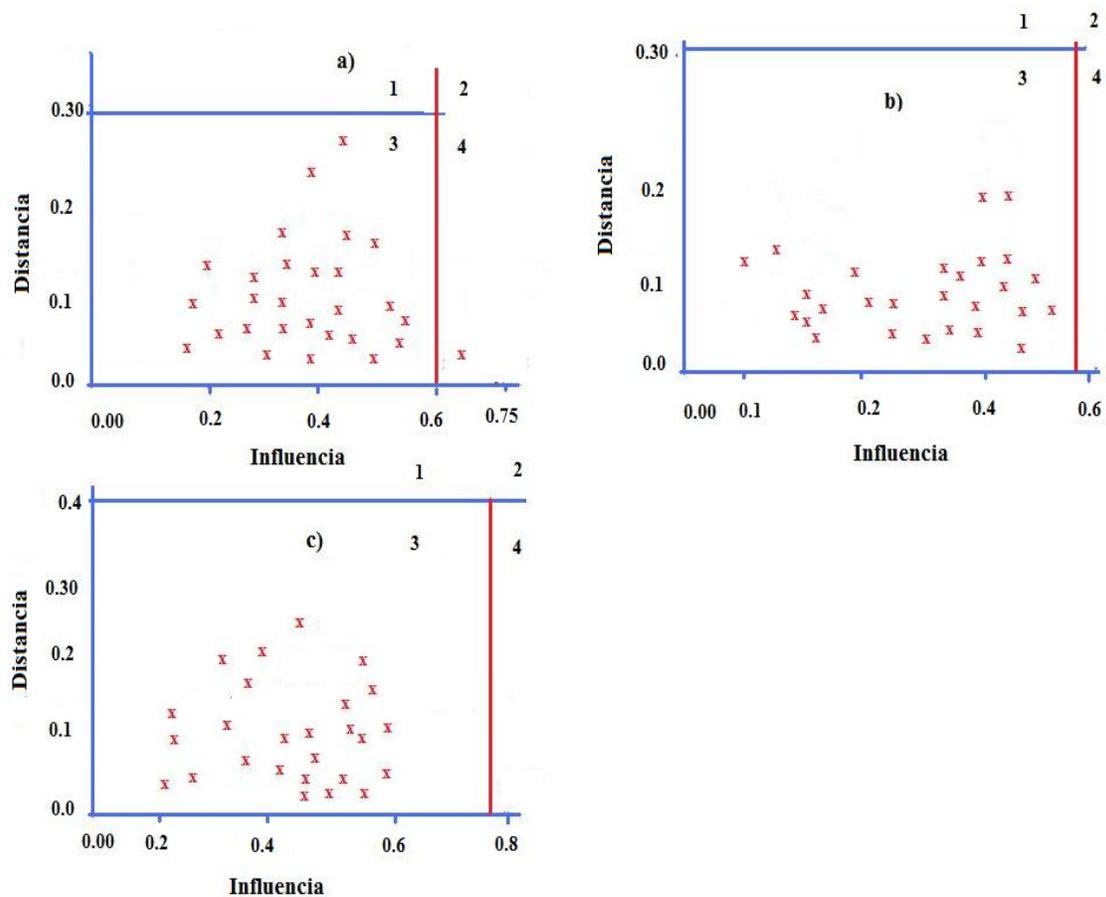


Figura 49. Indica la distancia de Mahalanobis para cada una de las muestras con el modelo a) PCR, b)-PLS1 y c)-PLS2 para estreptomicina.

7.2.3.3 Validación interna y externa de los modelos optimizados para las regiones MIR y NIR.

7.2.3.3.1 Validación interna de los modelos para oxitetraciclina (OTC), sulfatiazol (SFZ) y estreptomicina (ESM) para la región MIR

Este procedimiento consiste en considerar a cada una de las muestras de calibración como ajenas al sistema; de esta forma, se calcula con el modelo el valor para la muestra extraída del conjunto de calibración. Con los datos predichos por el modelo (“valores estimados”, eje y) y los datos reales de las muestras (eje x) se realiza una regresión lineal y se comprueba el ajuste real que

se está obteniendo con los modelos. En la Figura 50 se muestran las rectas de validación interna para el antibiótico oxitetraciclina (OTC).

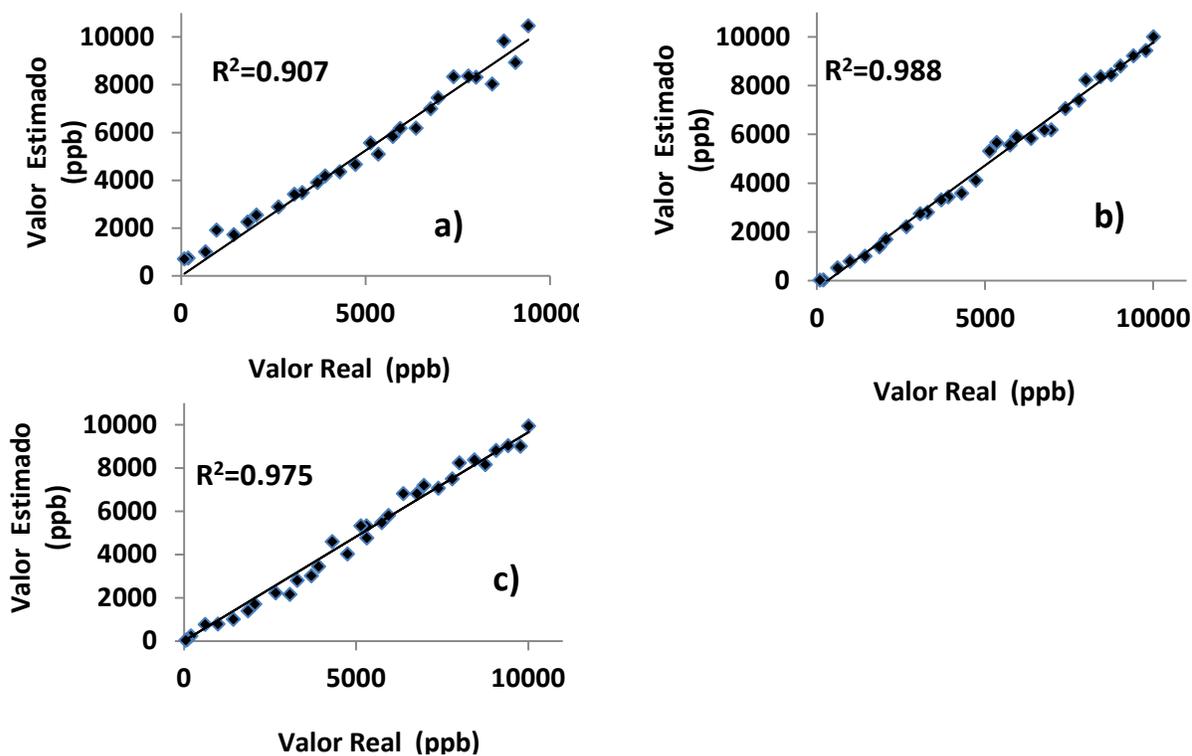


Figura 50. Rectas de validación para el antibiótico oxitetraciclina, a) indica la recta obtenida con el modelo PCR, b)- PLS1 y c)- para PLS2

En las Figuras 51 y 52 se presentan las graficas de validación que relacionan los valores predichos por los modelos y los valores que se tenían en las muestras para sulfatiazol (SFZ) y estreptomicina (ESM), obtenidas con los tres algoritmos que incluye el programa Quant (PCR, PLS1 y PLS2); también se indica su coeficiente de determinación.

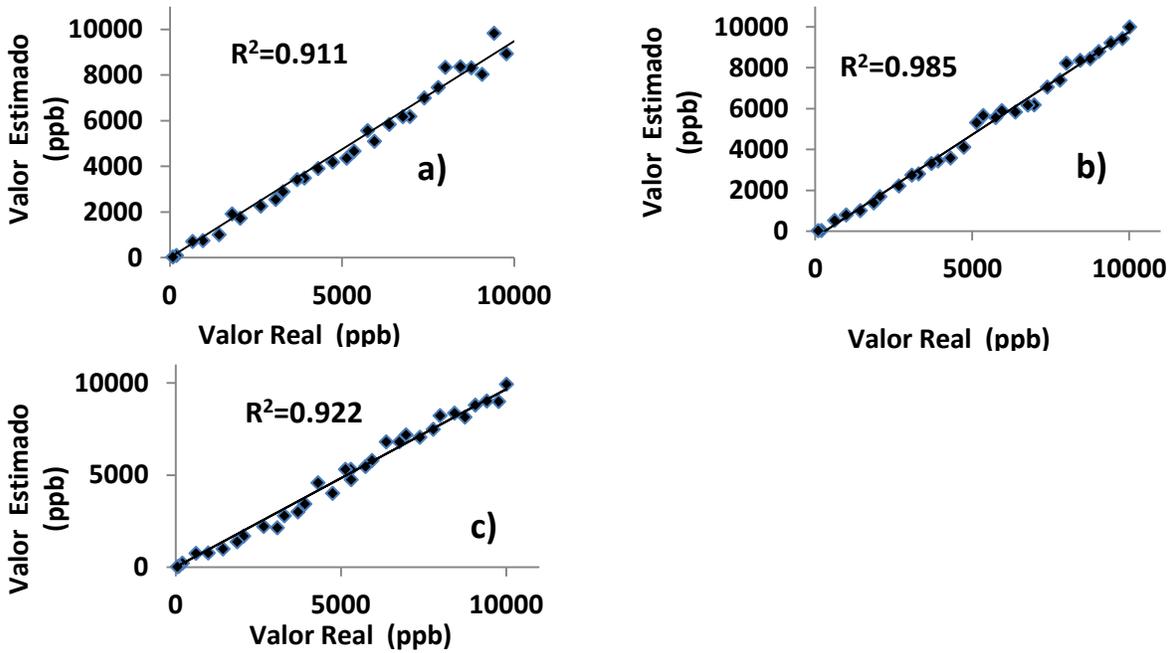


Figura 51. Rectas de validación para el antibiótico sulfatiazol, a) indica la recta obtenida con el modelo a) PCR, b)-PLS1 y c) para PLS2

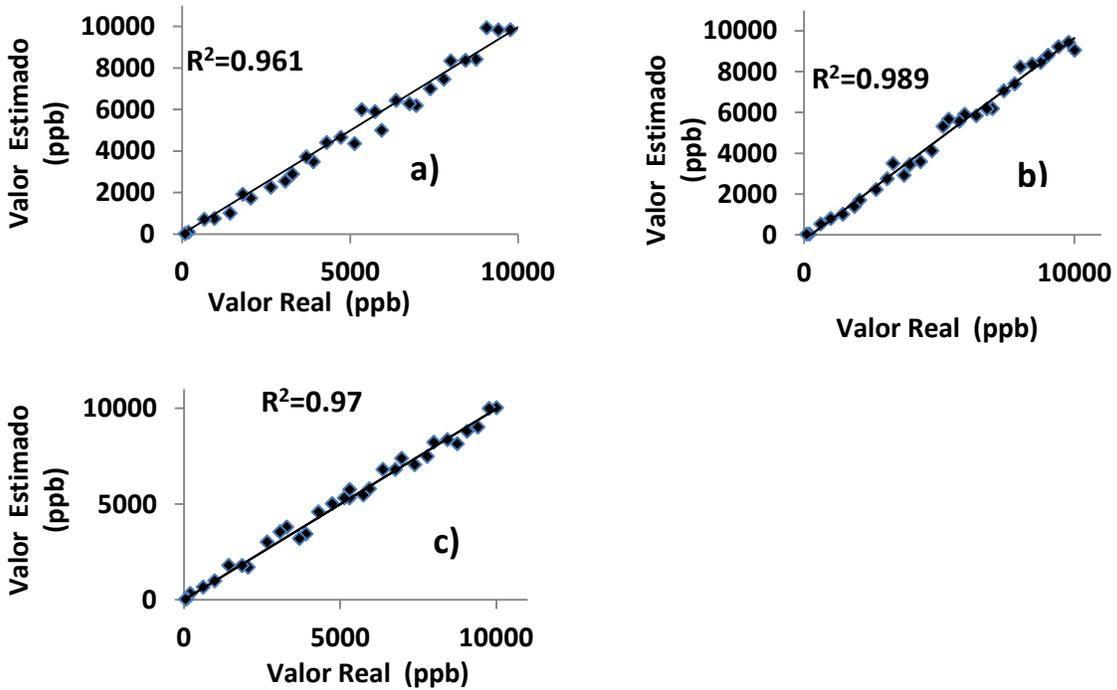


Figura 52. Rectas de validación para el antibiótico estreptomicina, a) indica la recta obtenida con el modelo PCR, b)-PLS1 y c)-para PLS2.

Aunque el coeficiente de correlación es una medida conocida y que establece la relación lineal entre dos variables, se considera que el coeficiente de determinación es más significativo (Congelosi, 1983). Por ello, la validación se describe mediante el coeficiente de determinación R^2 ya que este estadístico se puede utilizar para interpretar de manera más adecuada los resultados; R^2 se define como el porcentaje de la variación de los valores de la variable dependiente (y) que puede ser "explicado" por las variaciones de la variable independiente (x) (Mason, 1983). Un R^2 igual a uno significa un ajuste lineal perfecto, esto es, la variación total de la variable (y), es explicada por el modelo de regresión (Rodríguez, 2005).

En la Cuadro 17 se resume los valores del error estándar de calibración SEC y el error estándar de predicción SEP, más bajos que se lograron obtener con los pretratamientos realizados y ya mencionados anteriormente, también se indican los coeficientes de correlación obtenidos para los tres antibióticos con las validaciones internas realizadas.

Cuadro 17. Resumen de los errores de calibración y predicción para los 3 algoritmos utilizados, así como sus respectivos coeficientes de determinación.

REGION	ANTIBIÓTICO	PCR			PLS1			PLS2		
		SEC	SEP	R^2	SEC	SEP	R^2	SEC	SEP	R^2
MIR	OXITETRACICLINA (OTC)	2.79	3.41	0.907	1.02	1.39	0.988	1.563	1.92	0.975
	SULFATIAZOL (SFZ)	2.851	3.96	0.911	1.24	1.79	0.985	1.727	1.930	0.92
	ESTREPTOMICINA (ESM)	3.943	4.01	0.961	1.89	2.51	0.989	1.91	2.97	0.97

Como se puede observar (Cuadro 17), los modelos obtenidos para ambos antibióticos con el algoritmo PLS1 indican los errores más bajos para la predicción de muestras. Sin embargo PCR, tienen errores de predicción (SEP) arriba de 3, lo cual indica un error por arriba de lo recomendado para este tipo de modelos de cuantificación (Meza *et al.*, 2012).

7.3.3.3.2 Validación externa de los modelos para oxitetraciclina (OTC), sulfatiazol (SFZ) y estreptomicina (ESM) para la región MIR

Una vez seleccionados los modelos, deben someterse a prueba con una muestra independiente de validación, que no debe formar parte del grupo de calibración. Al predecir un set de muestras externas para validación. Para la validación externa se utilizaron 6 muestras que se encontraban en el intervalo de construcción y optimización.

Originalmente se empezó a calibrar los modelos con concentraciones de 2 ppb (Meza *et al.*, 2011), sin embargo no fue posible optimizar los modelos y se incluyeron un conjunto nuevo de muestras con concentraciones por arriba de 2 ppb para determinar el límite de cuantificación en los modelos, para los tres antibióticos. Después de realizar las calibraciones necesarias, se encontró que los modelos podían ser calibrados y validados con muestras con una concentración entre 8 y 7 ppb para los 3 algoritmos PCR y PLS en sus dos versiones. En la Cuadro 18 se indican los valores calculados para las 6 muestras para los tres antibióticos en los que se realizó la validación externa, así como las muestras con las utilizadas para el determinar el límite de cuantificación.

Como se indica en el Cuadro 18, los valores más cercanos a las concentraciones de los dos antibióticos presentes en las muestras de validación externa son los obtenidos mediante el algoritmo PLS1.

Simultáneamente con las graficas de influencia, residuales y distancia de Mahalanobis, otra forma complementaria de evaluar los modelos es calculando los coeficientes de determinación R^2 , de las muestras de validación externa, los resultados obtenidos para este coeficiente se presentan a partir de la Figura 53.

Cuadro 18. Comparación de los valores obtenidos con los modelos con respecto a las concentraciones reales que se tenían en las muestras para las muestras de validación externa.

Antibiótico	Concentración en las muestras (ppb)	Valor calculado (modelo)		
		PCR	PLS1	PLS2
OXITETRACICLINA (OTC)	9082.61	9078.32	9079.34	9086.76
	5055.63	5060.26	5058.28	5049.98
	1212.56	1203.93	1205.38	1221.66
	604.68	594.16	610.78	614.42
	302.02	308.90	297.08	294.27
	155.85	150.62	157.23	151.27
	40.33	35.99	43.1	45.807
	20.67	15.936	18.88	14.65
	12.61	16.56	13.1	15.06
	7.14	10.79	8.31	4.65
SULFATIAZOL (SFZ)	9062.72	9056.54	9058.59	9057.52
	4919.01	4912.84	4925.94	4927.03
	1213.1	1219.45	1216.02	1218.81
	616.29	611.963	617.14	620.52
	411.81	406.97	409.03	407.62
	159.26	169.44	162.41	163.25
	38.98	35.99	43.1	45.807
	18.37	15.936	18.88	14.65
	12.89	16.56	13.1	15.06
	8.33	5.10	7.89	11.4
ESTREPTOMICINA (ESM)	9020.61	9015.26	9017.58	9024.42
	5050.63	5055.98	5047.57	5045.23
	1220.56	1213.29	1217.33	1224.98
	640.68	635.62	643.03	644.15
	320.02	324.02	317.69	316.81
	90.85	85.85	86.95	95.01
	36.1	35.99	43.1	45.807
	24.56	15.936	18.88	14.65
	12.33	16.56	13.1	15.06
	8.9	12.5	9.74	11.27

En la Figura 53 se presentan las graficas obtenidas para los tres modelos desarrollados con las muestras que contenían oxitetraciclina utilizando los algoritmos PCR, y PLS en sus dos versiones y con líneas punteadas se presenta el error del $\pm 10\%$ referente a los valores reales presentes en las muestras adicionadas con antibiótico. El mismo procedimiento se realizó para las muestras de validación externa adicionadas con sulfatiazol, en la Figura 54 (a,b,c) se presentan las graficas correspondientes a los tres modelos desarrollados, la Figura 55 presenta la grafica para estreptomicina con el coeficiente de determinación respectivo.

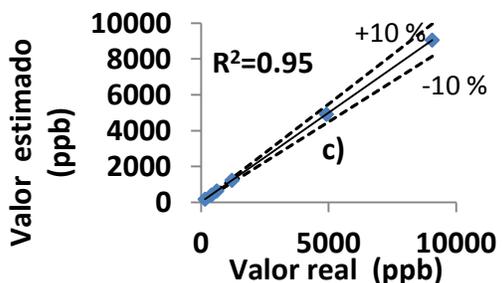
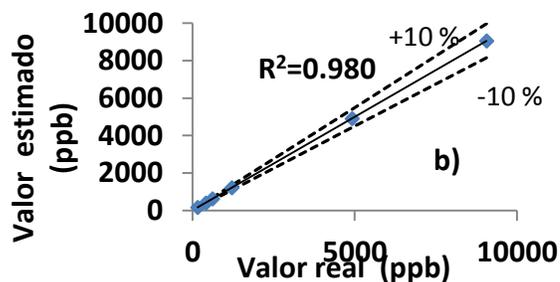
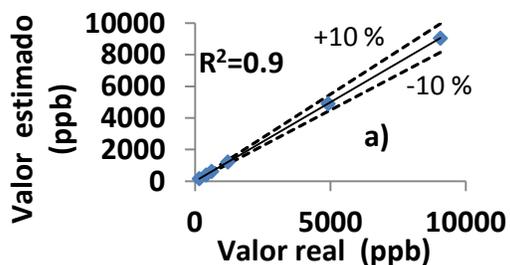


Figura 53. Coeficientes de determinación obtenidos para las muestras de validación para los tres modelos desarrollado para oxitetraciclina a) PCR, b) PLS1, c) PLS2, se muestra el porcentaje de error de 10 % con una línea punteada.

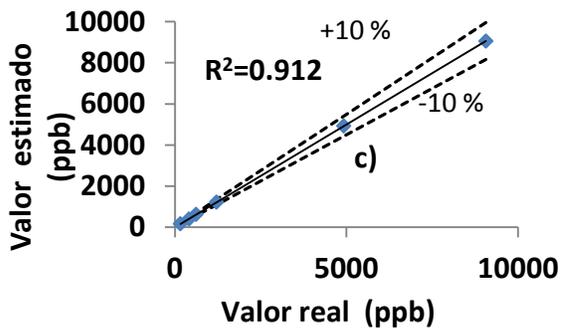
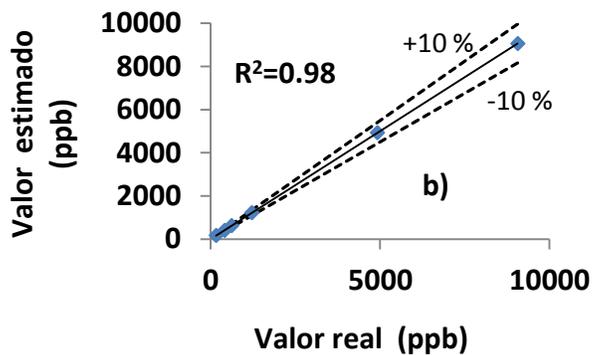
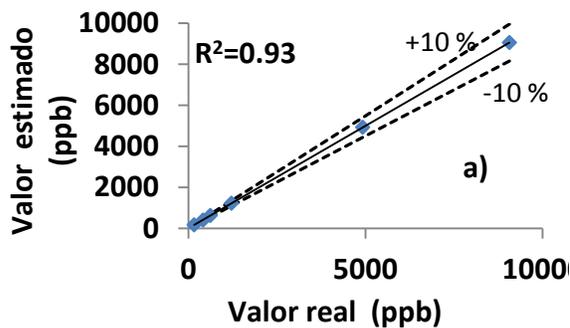


Figura 54. Coeficientes de determinación obtenidos para las muestras de validación para los tres modelos desarrollado para sulfatiazol a) PCR, b) PLS1, c) PLS2, se muestra el porcentaje de error de 10 % con una línea punteada.

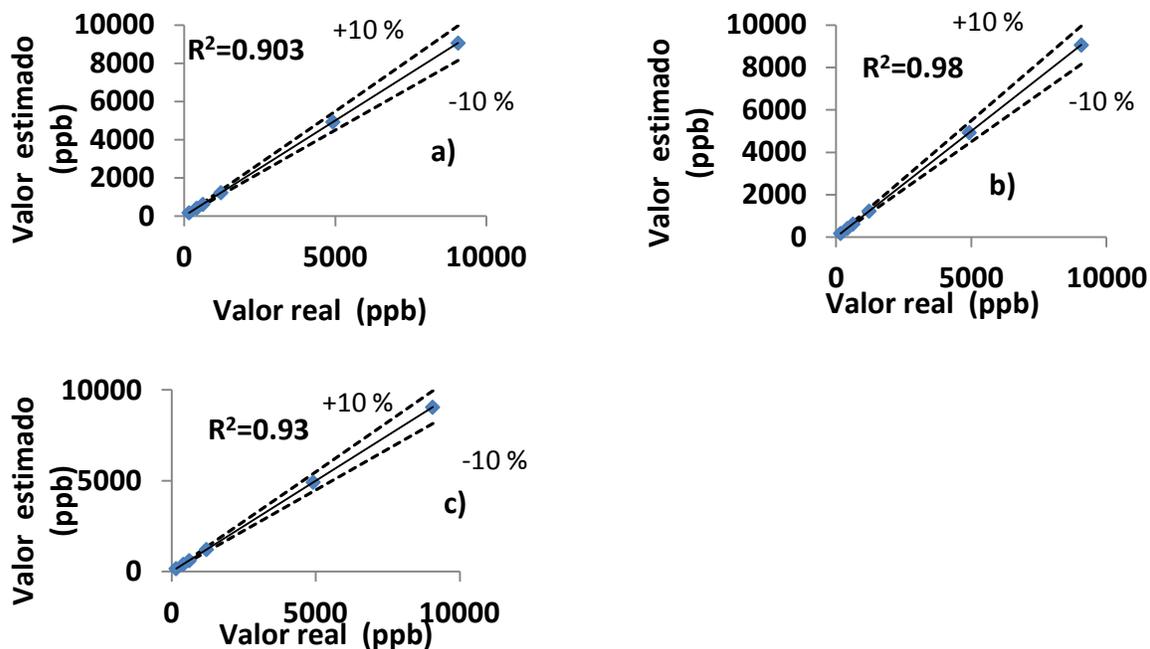


Figura 55. Coeficientes de determinación obtenidos para las muestras de validación para los tres modelos desarrollados para estreptomicina. a) PCR, b) PLS1, c) PLS2, se muestra el porcentaje de error de 10 % con una línea punteada

Como se puede observar (Figura 53, 54 y 55), los coeficientes de correlación más cercanos a la unidad son los obtenidos con el algoritmo PLS1 seguido de PLS2 y por último el más bajo fue el obtenido con PCR.

7.2.3.4 Validación interna y externa de los modelos optimizados para las regiones NIR

7.2.3.4.1 Validación interna de los modelos para oxitetraciclina (OTC), sulfatiazol (SFZ) y estreptomicina (ESM) para la región NIR

La validación para la región NIR se realizó siguiendo el mismo procedimiento mencionado para los modelos desarrollados en la región MIR, a continuación se presenta un Cuadro resumen de los modelos validados en la región NIR. Los datos en el Cuadro 19 correspondientes a los valores del error estándar de calibración SEC y el error estándar de predicción SEP más bajos, que se

obtuvieron con los pretratamientos realizados ya mencionados; también se indican los coeficientes de correlación de los antibióticos, en la calibración.

Cuadro 19. Resumen de los errores de calibración y predicción para los 3 algoritmos utilizados para la validación de los modelos, así como sus coeficientes de correlación.

REGION	ANTIBIÓTICO	PCR			PLS1			PLS2		
		SEC	SEP	R ²	SEC	SEP	R ²	SEC	SEP	R ²
NIR	OXITETRACICLINA (OTC)	3.31	3.98	0.89	1.22	2.01	0.980	2.76	3.11	0.976
	SULFATIAZOL (SFZ)	2.99	3.41	0.92	1.98	2.26	0.983	1.87	2.95	0.981
	ESTREPTOMICINA(EMS)	3.11	3.72	0.91	1.32	2.19	0.985	1.76	2.11	0.989

En las Figuras 56, 57, y 58 se muestran las rectas de validación interna para los antibióticos oxitetraciclina, sulfatiazol y estreptomicina, con los tres algoritmos de los modelos optimizados. En el caso de la región NIR, PLS1 tuvo mejor en los modelos calibrados para oxitetraciclina y sulfatiazol, por otra parte PLS2 tuvo mejor desempeño para estreptomicina; para los tres casos los errores estuvieron por debajo de 3, criterio adecuado para la predicción de los modelos desarrollados por quimiometría (Meza *et al.*, 2012).

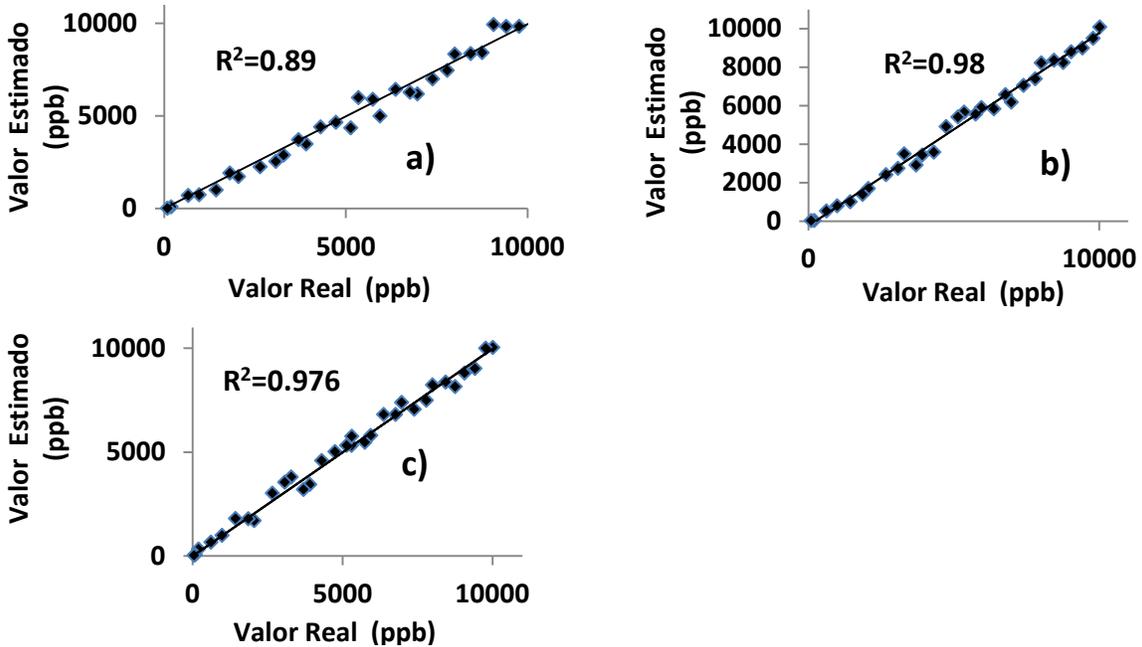


Figura 56. Rectas de validación para el antibiótico oxitetraciclina, a) indica la recta obtenida con el modelo a)- PCR, b) PLS1 y c) para PLS2.

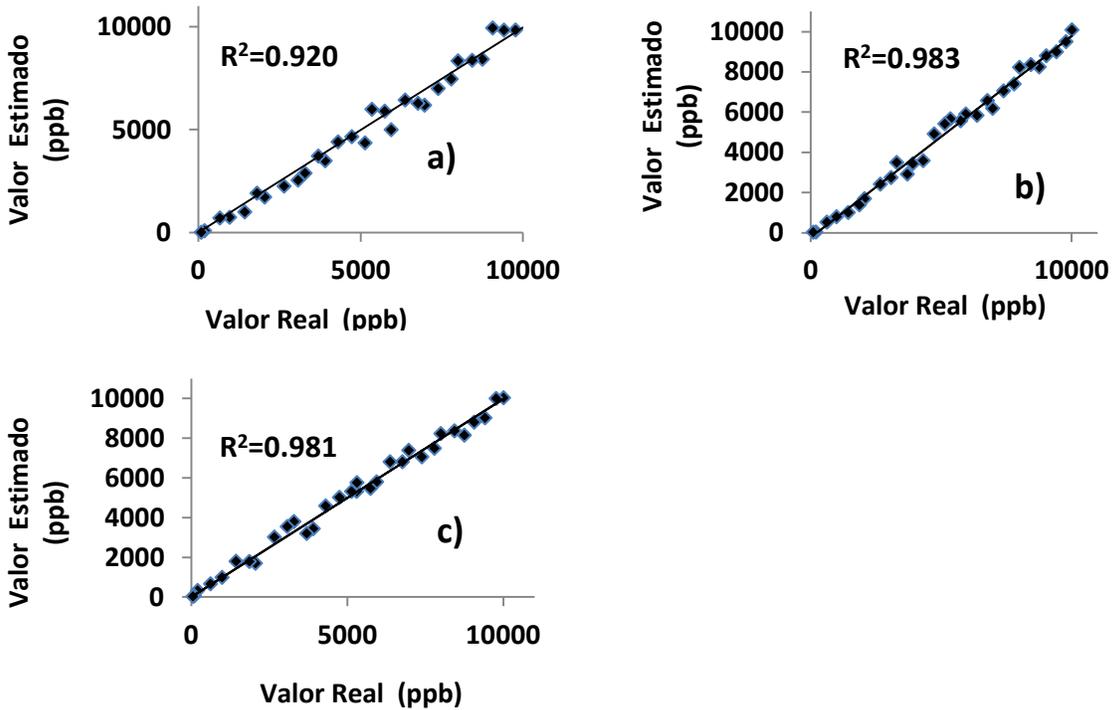


Figura 57. Rectas de validación para sulfatiazol; a)-indica la recta obtenida con el modelo a) PCR, b) PLS1 para y c) PLS2

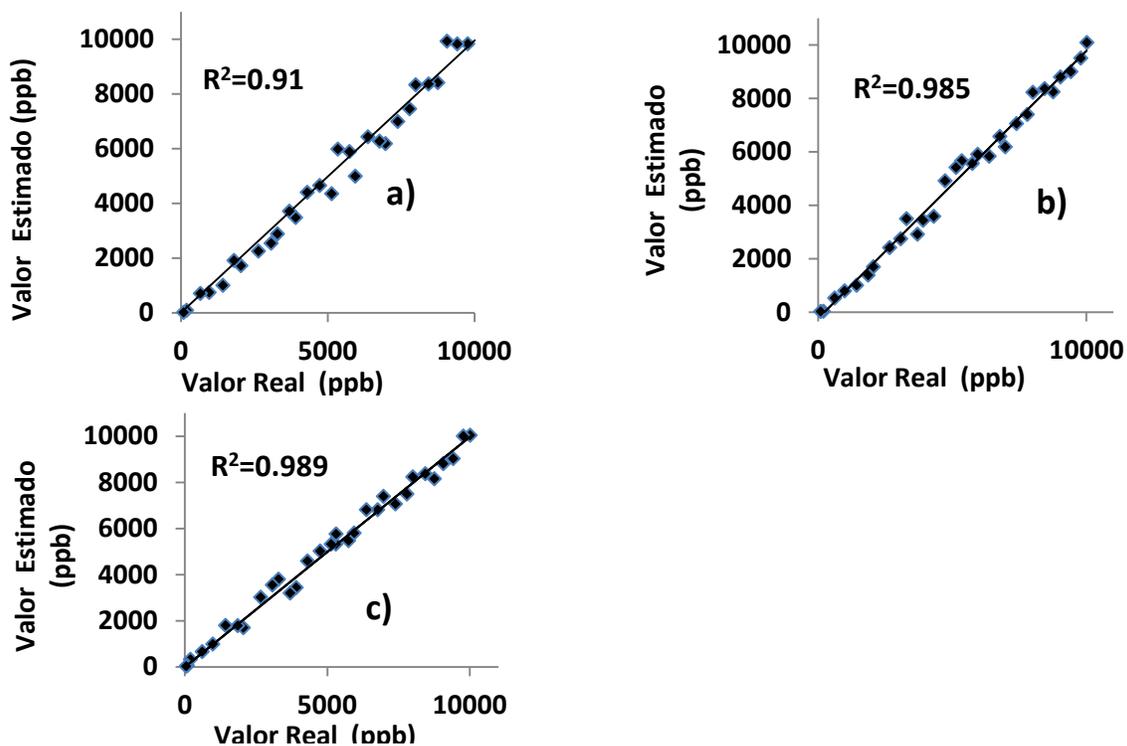


Figura 58. Rectas de validación para estreptomina: a-indica la recta obtenida con el modelo a) PCR, b) PLS1 y c) para PLS2.

7.3.3.4.2 Validación externa de los modelos para oxitetraciclina (OTC), sulfatiazol (SFZ) y estreptomina (ESM) para la región NIR

Para la validación externa se utilizaron 6 muestras que se encontraban en el intervalo de construcción y optimización de los modelos. Inicialmente se utilizó una concentración de 2 ppb como límite inferior para la optimización de los modelos, pero se encontró que fue posible calibrar y validar con límites de 9 ppb para el caso de oxitetraciclina y sulfatiazol y de 8 ppb para estreptomina.

En el Cuadro 20 se presentan las concentraciones obtenidas al probar los modelos, así como las muestras con las cuales se determinó el límite de cuantificación. Como se puede observar, los valores más cercanos a las concentraciones de los tres antibióticos presentes en las muestras de validación externa son los obtenidos mediante el algoritmo PLS1 y PLS2 para el caso de estreptomina.

Cuadro 20. Comparación de los valores obtenidos con los modelos con respecto a las concentraciones reales que se tenían en las muestras para validación externa.

Antibiótico	Concentración en las muestras (ppb)	Valor calculado (modelo)		
		PCR	PLS1	PLS2
OXITETRACICLINA (OTC)	9020.72	9025.62	9017.62	9015.72
	4990.01	4985.91	4989.91	4987.81
	1230.1	1235.79	1233	1226.1
	660.29	665.49	657.49	656.29
	410.81	405.31	407.51	406.31
	90.26	89.76	93.76	86.36
	38.12	33.22	40.31	42.07
	20.44	25.86	19.1	17.23
	11.89	7.4	11.1	14.63
	9.96	12.84	11.36	6.05
SULFATIAZOL (SFZ)	9020.72	9015.72	9018.72	9023.72
	4990.01	4985.01	4991.71	4994.71
	1230.1	1225.1	1229.4	1234.4
	660.29	655.29	657.79	656.79
	410.81	405.81	407.31	414.31
	90.26	81.36	86.36	85.26
	40.07	37.182	41.71	37.71
	22.34	25.37	22.95	23.33
	12.69	8.19	12.91	9.01
	9.31	6.01	10.66	10.4
ESTREPTOMICINA (ESM)	9020.72	9014.32	9014.12	9016.82
	4990.01	4984.11	4995.71	4989.51
	1230.1	1225.6	1234.1	1227.1
	660.29	650.29	655.29	663.29
	410.81	402.81	403.31	413.31
	90.26	98.76	86.11	93.76
	38.71	33.99	42.1	41.807
	19.83	15.936	14.88	18.65
	11.22	16.56	15.1	13.06
8.55	13.01	6.23	8.7	

En las Figuras 59, 60 y 61 se muestran las gráficas de validación externa de los modelos creados con los tres algoritmos, obtenidas de las muestras adicionadas con oxitetraciclina, sulfatiazol y estreptomicina. También se indica el coeficiente de determinación de los modelos para los tres antibióticos al compararlos con los valores de concentración que se tenían en las muestras.

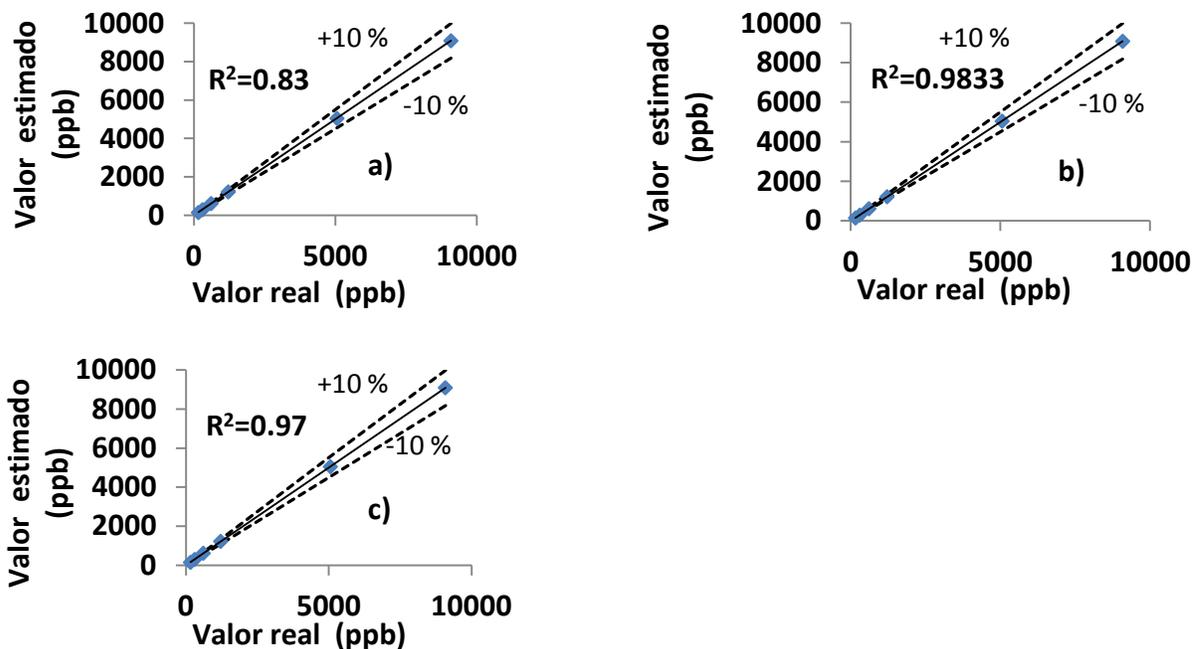


Figura 59. Coeficientes de determinación obtenidos para las muestras de validación para los tres modelos desarrollado para oxitetraciclina a) PCR, b) PLS1, c)PLS2, se muestra el porcentaje de error de 10 % con una línea punteada.

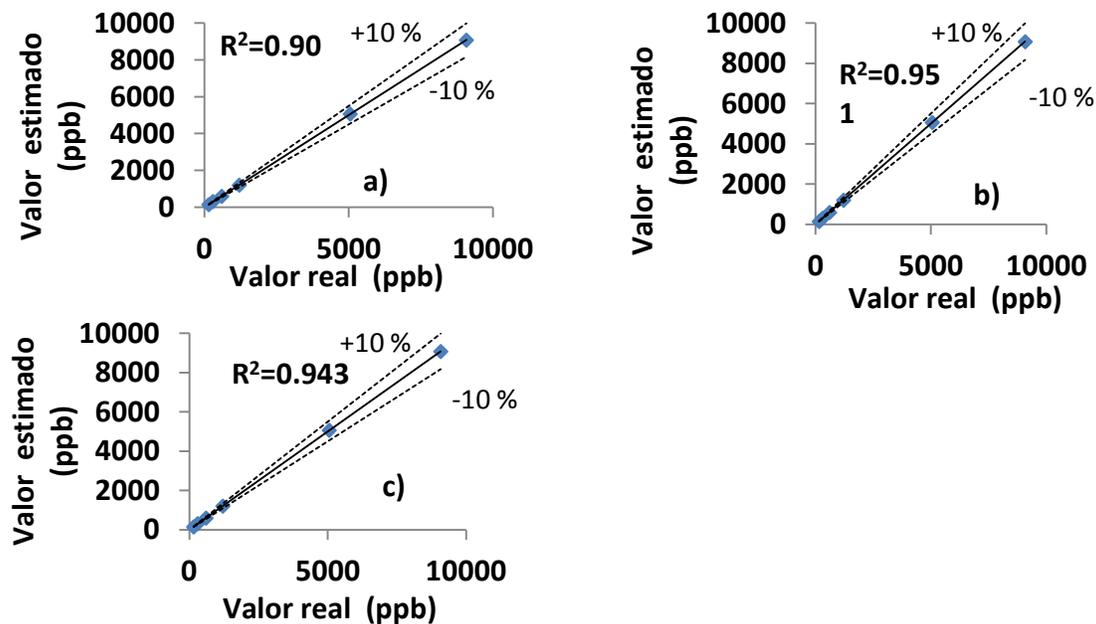


Figura 60. Coeficientes de determinación obtenidos para las muestras de validación para los tres modelos desarrollado para sulfatiazol a) PCR, b) PLS1, c)PLS2, se muestra el porcentaje de error de 10 % con una línea punteada.

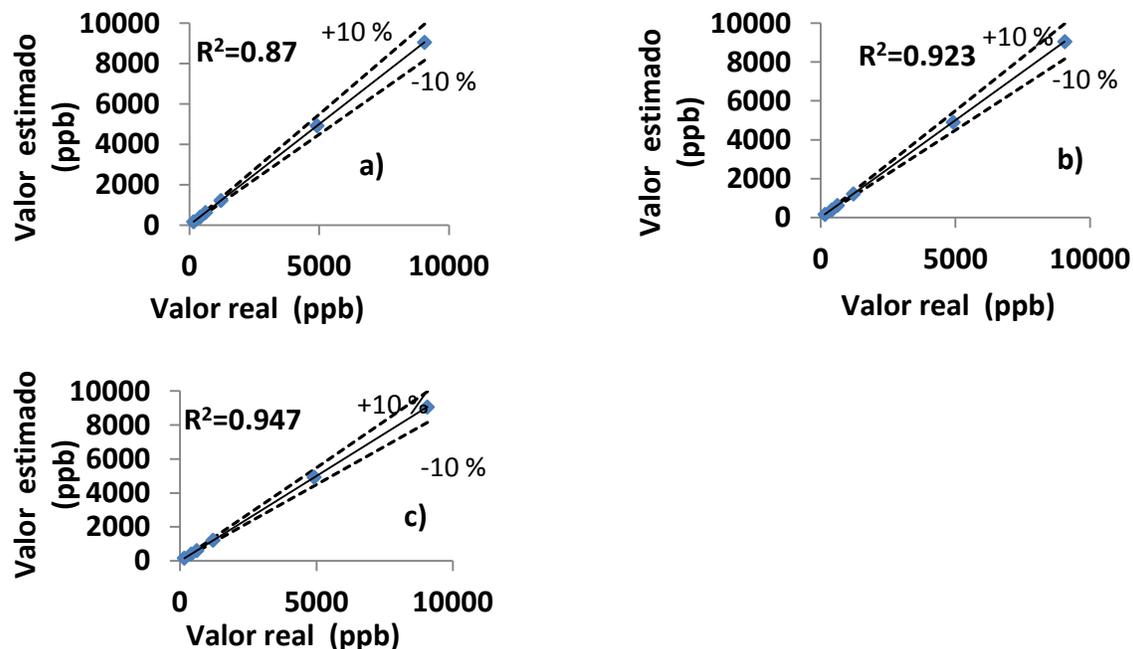


Figura 61. Coeficientes de determinación obtenidos para las muestras de validación para los tres modelos desarrollado para estreptomycin a) PCR, b) PLS1, c) PLS2, se muestra el porcentaje de error de 10 % con una línea punteada.

Los modelos creados en la región MIR y NIR tuvieron errores mayores cuando se utilizó el algoritmo PCR, esto se explica porque PLS desarrolla un número de componentes principales para llegar a la solución óptima debido a que la atención se centra en la predicción de la variable Y, PLS utiliza la información situada en X como Y para ajustar el modelo, es decir toma el cambio entre X e Y de forma iterativa para encontrar los componentes principales. Por otra parte PCR encuentra las combinaciones lineales de las variables iniciales que contribuyen a hacer las muestras diferentes unas de otras, explicado en términos estadísticos, PCR establece y enumera los componentes principales según la varianza explicada por cada uno de ellos lo que lo hace un poco menos preciso para el caso de modelos cuantitativos.

En el caso de las dos variantes del algoritmo PLS, a menudo se argumenta que PLS1 tiene mejor capacidad de predicción que PLS2. Esto suele ser cierto si hay una fuerte no linealidad en los datos. Por otro lado, si la(s) variable(s) Y es poco “ruidosa”, pero fuertemente correlacionada con X, PLS2 es la mejor manera de

modelar toda la información y dejar el “ruido” aparte, por ello en algunas ocasiones este algoritmo suele funcionar mejor que la versión PLS1, como sucedió para el antibiótico estreptomicina en la región NIR. Por otro lado, si hay más de una variable Y, PLS2 es generalmente el mejor método si desea para interpretar todas las variables al mismo tiempo (Jha, 2010).

7.3 DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS MEDIANTE LA TÉCNICA ELISA

7.3.1. Comparación de resultados obtenidos con los modelos quimiométricos PLS1 en la región MIR y la técnica de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas ELISA.

Con el fin de tener un método de referencia para comparar los resultados obtenidos con los modelos quimiométricos que tuvieron, los errores más bajos de calibración y validación (PLS1 y PLS2); se utilizaron kit's comerciales ELISA marca RIDASCREEN® para la detección y cuantificación de cada uno de los antibióticos estudiados.

La curva de calibración y resultados se obtuvieron mediante el software Ridasoft.winNet. Para llevar a cabo la comparación de las metodologías se utilizaron 5 muestras adicionadas para los tres antibióticos por triplicado. Los resultados se muestran a continuación en la Cuadro 21.

Debido a que el límite de detección del modelo quimiométricos estuvo por arriba de 7 ppb y a que la técnica Elisa incluye estándares que están por debajo de 18 ppb. Las muestras para comparar ambos métodos tuvieron concentraciones entre 9 y 17 ppb.

Cuadro 21. Resultados obtenidos al calcular las concentraciones de muestras problemas con el modelo quimiométrico y con la técnica ELISA en la región MIR.

No. De muestra	Concentración de la muestra (ppb)	Concentración obtenida ELISA (ppb)			Concentración obtenida PLS1 (ppb)		
		OTC	SFZ	ETM	OTC	SFZ	ETM
1	9.24	5.22	8.31	6.55	7.51	11.6	8.51
2	11.09	8.14	14.11	7.4	8.9	13.27	8.7
3	13.51	9.23	12.76	10.42	16.77	14.63	11.17
4	15.22	10.03	18.7	10.03	18.03	16.09	11.8
5	17.06	>18	19.2	14.02	15.4	15.56	14.9

En la Figura 62 se presentan los coeficientes de determinación R^2 calculados con la concentración real de cada muestra analizada, con respecto a los resultados obtenidos con la técnica ELISA y el algoritmo PLS1, en la región MIR. Se observa (Figura 62), que con ambas metodologías los resultados obtenidos tienen un ajuste adecuado a un modelo lineal. En el caso de la región MIR el coeficiente de determinación más cercano a la unidad se obtuvo con los resultados del modelo PLS1, estando los coeficientes de determinación por arriba de 0.85, para los tres antibióticos de interés.

En el cuadro 22 se presentan las diferencias en ppb de los resultados obtenidos con las metodologías ELISA y PLS1, con respecto a las concentraciones reales que presentaban las muestras analizadas. Se observa que el algoritmo PLS1 calcula valores más cercanos al presentar diferencias más pequeñas, haciendo de PLS1 una técnica con mayor exactitud.

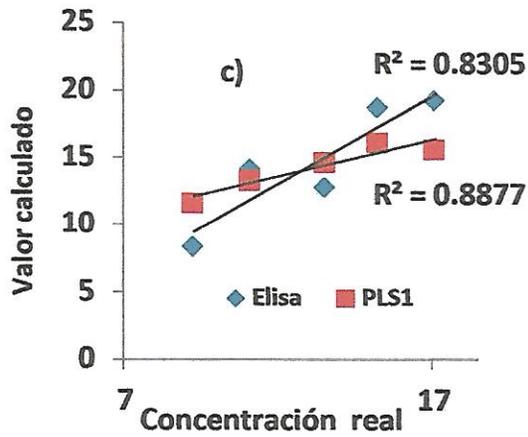
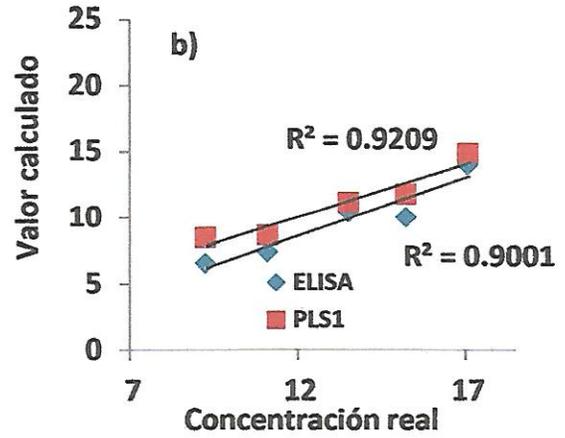
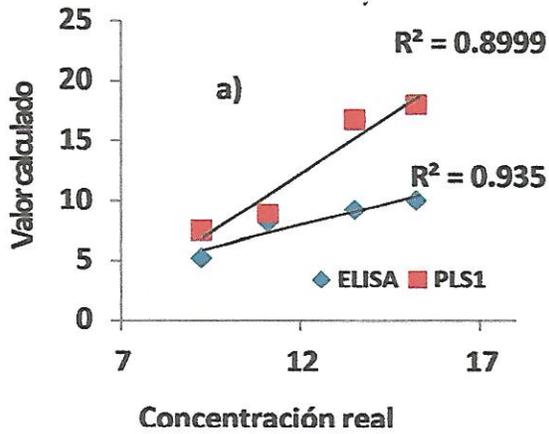


Figura 62. Coeficientes de determinación para ambas técnicas en la región MIR a) OTC, b) Sulfatiazol, c) Estreptomicina.

Cuadro 22. Diferencias obtenidas a comparar los resultados de PLS1 y ELISA con respecto a la concentración real en las muestras

Antibiótico	Diferencia en ppb					
	OTC		SFZ		ETM	
	ELISA	PLS1	ELISA	PLS1	ELISA	PLS1
Muestra 1	4.02	1.73	0.93	2.36	2.69	0.73
Muestra 2	2.95	2.19	3.02	2.18	3.69	2.39
Muestra 3	4.28	3.26	0.75	1.12	3.09	2.34
Muestra 4	5.19	2.81	3.48	0.87	5.19	3.42
Muestra 5	Sin dato	1.66	2.14	1.5	3.04	2.16

7.3.2 Comparación de resultados obtenidos con los modelos quimiométricos PLS1 y PLS2 en la región NIR y la técnica ELISA

Se realizó la comparación de los resultados obtenidos con la finalidad de tener un método de referencia para comparar los resultados obtenidos mediante los modelos quimiométricos en la región NIR con el algoritmo PLS1 y PLS2, los cuales presentaron menores errores de predicción. Se utilizaron 5 muestras adicionales para los tres antibióticos por triplicado. Los resultados se muestran a continuación en la Cuadro 23.

Cuadro 23. Resultados obtenidos al calcular las concentraciones de muestras problemas con el modelo quimiométrico y con la técnica ELISA en la región NIR.

No. De muestra	Concentración de la muestra (ppb)	Concentración obtenida ELISA (ppb)			Concentración obtenida (ppb)		
		OTC	SFZ	ETM	PLS1		PLS2
		OTC	SFZ	ETM	OTC	SFZ	ETM
1	9.1	5.4	7.01	7.15	7.11	8.11	11.65
2	10.11	7.8	6.1	7.64	7.9	11.1	12.8
3	12.72	9.8	16.92	10.42	15.41	11.4	12.89
4	15.9	11.31	19.7	10.03	18.03	16.99	17.8
5	16.91	>18	21.19	12.02	15.4	16.56	19.87

Debido a que el límite de detección del modelo quimiométrico está por arriba de 8 ppb y a que la técnica Elisa incluye estándares que están por debajo de 18 ppb. Las muestras para comparar ambos métodos incluían concentraciones entre 9 y 17 ppb. Se comprobó el comportamiento lineal de ambos métodos al calcular el coeficiente de correlación de los resultados obtenidos con ELISA, PLS1 y PLS2 con respecto al valor real de las muestras.

En la Figura 63 se presentan los coeficientes de correlación para los tres antibióticos, calculados con los datos calculados por los modelos y la técnica de ELISA. Al comparar los resultados obtenidos con ambas técnicas ambos presentan desviaciones de las concentraciones reales en las muestras, pero en general se puede observar que los modelos quimiométricos tienen coeficientes

más cercanos a uno, estando por arriba de 0.9, para los tres antibióticos analizados, ajustándose mejor a un modelo lineal con respecto a la técnica ELISA.

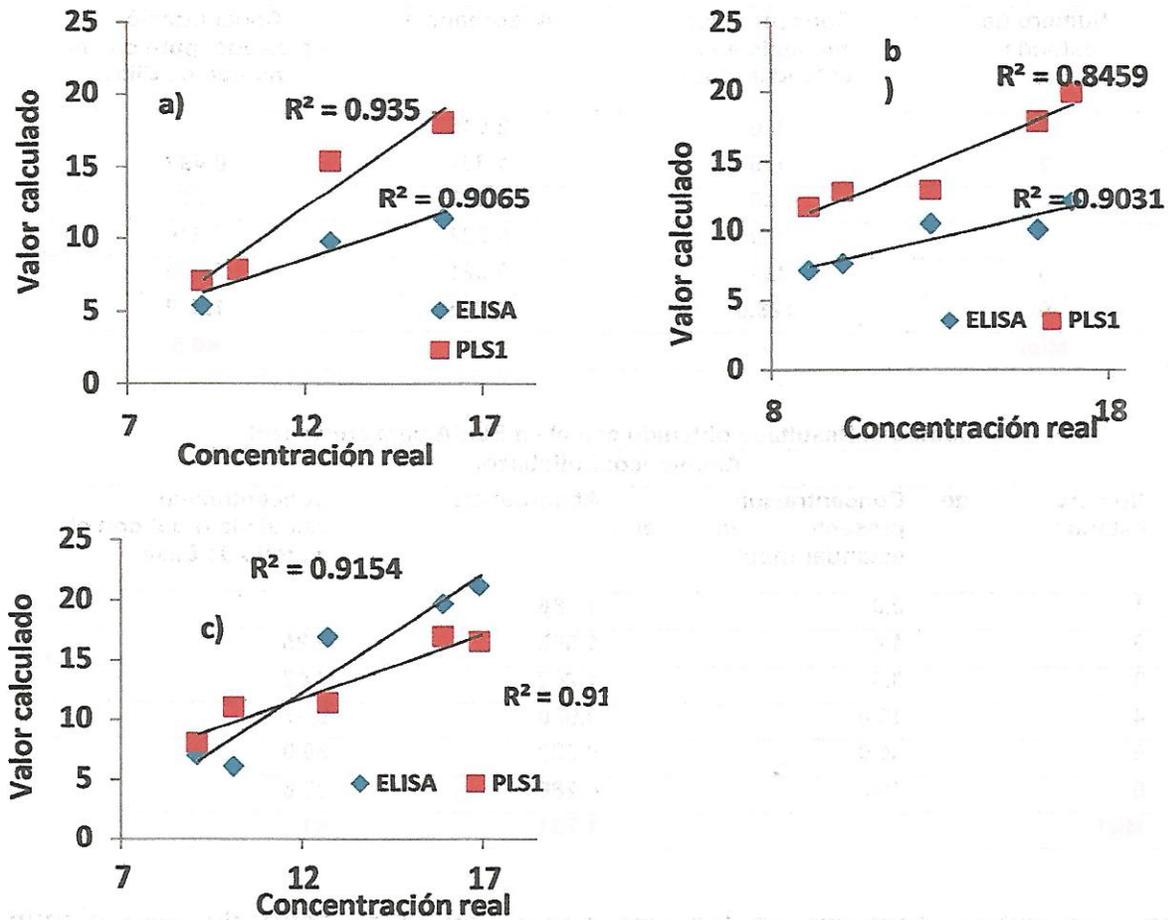


Figura 63. Coeficientes de determinación para ambas técnicas en región NIR a) OTC, b) Sulfatiazol, c) Estreptomina.

En la región NIR al igual que en la región MIR, los resultados obtenidos con los modelos desarrollados con PLS1 y PLS2, fueron más precisos al tener un menor error en los valores calculados, mostrando una diferencia menor con respecto a la concentración real de la muestras (Cuadro 24).

Cuadro 23. Diferencias obtenidas al comparar los resultados de PLS1 y ELISA con respecto a la concentración real de las muestras.

	Diferencia en ppb					
Antibiótico		OTC	SFZ		ESM	
Técnica	ELISA	PLS1	ELISA	PLS1	ELISA	PLS2
Muestra 1	3.7	1.99	2.09	0.99	1.95	2.55
Muestra 2	2.31	2.21	4.01	0.99	2.47	2.69
Muestra 3	2.92	2.69	4.2	1.32	2.3	0.17
Muestra 4	4.59	2.13	3.8	1.09	5.87	1.9
Muestra 5	Sin dato	1.51	4.28	0.35	4.89	2.96

Las ventajas que puede presentar un método quimiométrico como técnica de detección, con respecto a un método biológico como es ELISA pueden considerarse mayores. Primero los métodos quimiométricos pueden trabajar en rangos de concentración mayores; por otra parte al no ser métodos donde se involucran materiales biológicos como son las enzimas; no depende de temperaturas de activación de las enzimas, son menos vulnerables a errores por los analistas, y no se depende de un número reducido de ensayos que incluyen los kits comerciales.

7.4 DESARROLLO DE MODELO DE CLASIFICACIÓN SIMCA PARA GRUPOS DE MUESTRAS DE MIEL SIN ANTIBIÓTICO Y MUESTRAS ADICIONADAS CON OXITETRACICLINA, SULFATIAZOL, ESTREPTOMICINA EN LA REGIÓN MIR Y NIR.

7.4.1 Calibración del modelo SIMCA

La técnica de modelado SIMCA fue aplicada a los espectros de cuatro conjuntos de muestras (clases) obtenidas en ambas regiones del infrarrojo MIR y NIR, se realizó primero la matriz de datos espectrales para su posterior procesamiento. Los modelos fueron creados utilizando el 86% (30 muestras de cada clase) de las muestras como grupo de calibración y el 14% restante (5 muestras de cada clase) como grupo de validación, el modelo se validó con muestras externas con

un 99% de confiabilidad, obteniéndose los resultados que a continuación se describen.

7.4.1.1 Preprocesamiento de datos espectrales

En el desarrollo de la construcción de los modelos hay una etapa común a todos los tratamientos estadísticos mediante el procesamiento de datos, esto consiste en la aplicación de un conjunto de procedimientos que transforman los valores originales, de manera que se eviten los problemas que se producirían por las diferentes unidades de medida y magnitudes de las variables, con el fin de adecuar estos datos a los posteriores tratamientos matemáticos del reconocimiento de patrones (Martin, 2000).

Tomando toda la información antes mencionada, para la construcción de los modelos, se realizaron un conjunto “n” de calibraciones, modificando diferentes opciones de procesamiento de datos con los cuales cuenta el programa ASSURE ID desarrollado por Perkin Elmer, hasta realizar la optimización del modelo definitivo, es decir la obtención del modelo que mostrará una adecuada separación de los grupos y un correcto reconocimiento o clasificación de muestras de validación. Las condiciones que se utilizaron para obtener el modelo optimizado en la región MIR fueron las siguientes: se eligió un intervalo espectral entre 1450- 600 cm^{-1} ; se eliminó el ruido electrónico en los intervalo 4000-1450; se utilizó un filtro para eliminar el ruido causado por dióxido de carbono y humedad ambiental, se aplicó un suavizado de 5 puntos, se corrigió la línea base espectral mediante derivada de segundo orden y finalmente se utilizó una normalización MSC o corrección multiplicativa de la dispersión. Para el caso de los modelos obtenidos en la región NIR el intervalo de la región cercana abarco de 7200-4500 cm^{-1} , se utilizó el filtro para eliminar la información espectral proveniente del CO_2 y humedad del ambiente, el suavizado fue de 5 puntos así como también se utilizó una derivada de primer orden de 5 puntos para la corrección de la línea base del conjunto espectral.

Bajo las características mencionadas, se pudo observar después de realizar un conjunto de modelos, que las muestras de cada clase en la región MIR y NIR, se separaron adecuadamente. Lo que indica la alta probabilidad en primera instancia éxito en la realización de un modelo de clasificación (Figura 64).

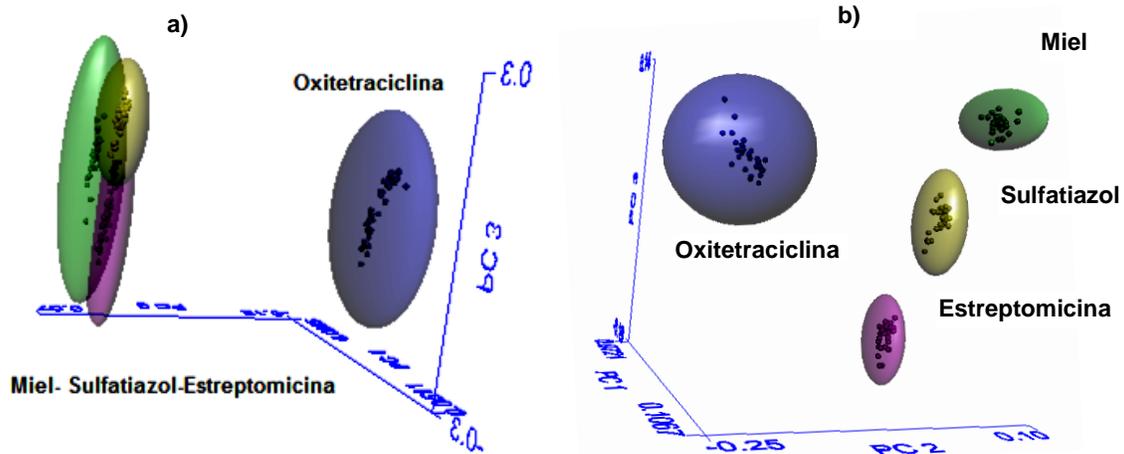


Figura 64. Las imágenes son representativas del mismo modelo realizado en la región MIR, la figura a) corresponde al modelo aun sin ser optimizado b) corresponde al modelo final optimizado.

SIMCA determina la distancia de clases para cada modelo y la capacidad de clasificación (Brereton, 2003). Estos resultados de los modelos creados por SIMCA pueden ser visualizados en la Figura 64 y 65. La distancia entre clases (interclase) se puede entender como la distancia geométrica medida partir de los componentes principales de los modelos (Berrueta, 2007). Por ejemplo, en la **Figura 64b** se presentan 4 clases de objetos. Al aplicar PCA a cada clase, se obtiene un modelo de tres componentes, separado por la denominada distancia interclase. Por lo tanto, una grafica realizadas con el conjunto de calibración proporciona información acerca de los valores extremos, subgrupos y la estructura dentro de la clase.

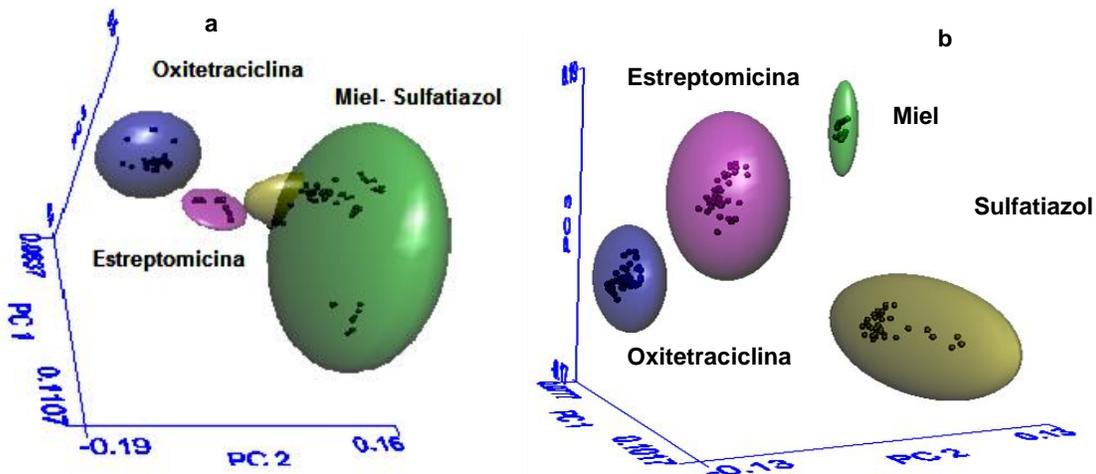


Figura 65. Ambas imágenes son representativas del mismo modelo realizado en la región NIR, la figura a) corresponde al modelo aun sin ser optimizado b) corresponde al modelo final optimizado.

Como se puede observa en la Figura 64b y 65b, cada clase está limitada por una región del espacio, que representa un porcentaje del nivel confianza (generalmente los modelos se construyen con un nivel entre un 95%-99%) de que un objeto particular pertenece a una clase y la asignación de los nuevos objetos se hace comprobando si estos están localizados en la región de confianza de alguno de los modelos (Berrueta et al., 2007).

7.4.1.1.1 Digramas de Coomans para los modelos de clasificación creados

Por otra parte, una herramienta útil para la interpretación de los resultados obtenidos con SIMCA es la denominada grafica de Coomans, que son representaciones bidimensionales de las distancias que presentan las muestras entre dos modelos (Berrueta *et al.*, 2007). La distancia del modelo para la clase 1 se representa contra la distancia del modelo 2. Las distancias críticas (generalmente en 95% de nivel de confianza) se indican en ambos ejes. Así, cuatro zonas se definen en la grafica de Commans: clase 1, clase 2, la superposición de las clases 1 y 2, además de la zona de valores atípicos (lejos de ambas clases). Al representar objetos (muestras) en esta grafica es fácil de

visualizar que tan adecuada es en la clasificación de los objetos (Massart *et al.*, 1997).

Se realizó el comparativo entre los diferentes modelos para cada una de las respectivas clases mediante los diagramas de Coomans que arrojó el programa ASSURE ID. En la Figura 66 y 67 se presentan las graficas para el modelo SIMCA optimizado.

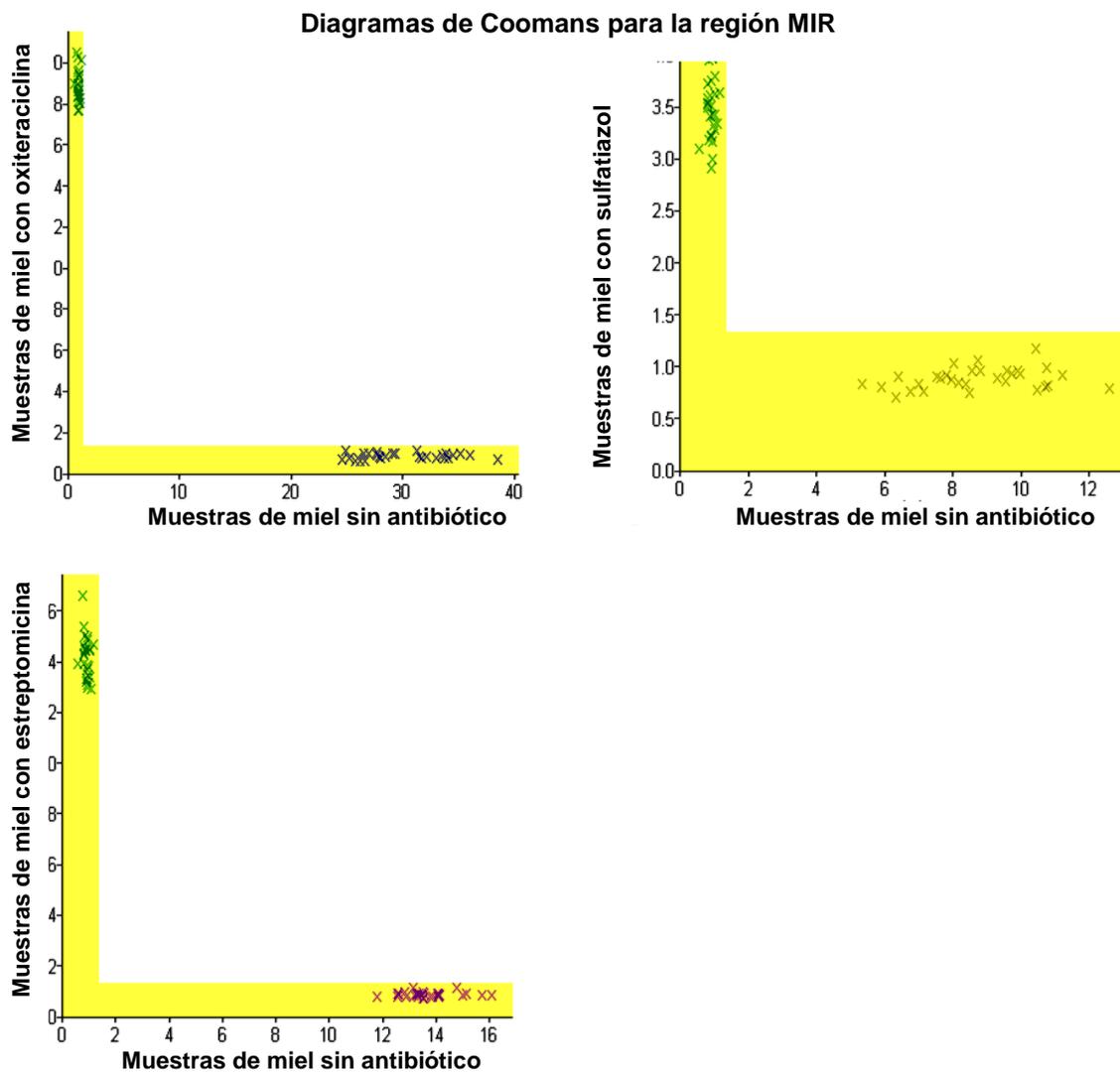


Figura 66. Diagramas de Coomans para los modelos optimizados obtenidos con SIMCA en la región del infrarrojo medio MIR

Diagramas de Coomans para la región NIR

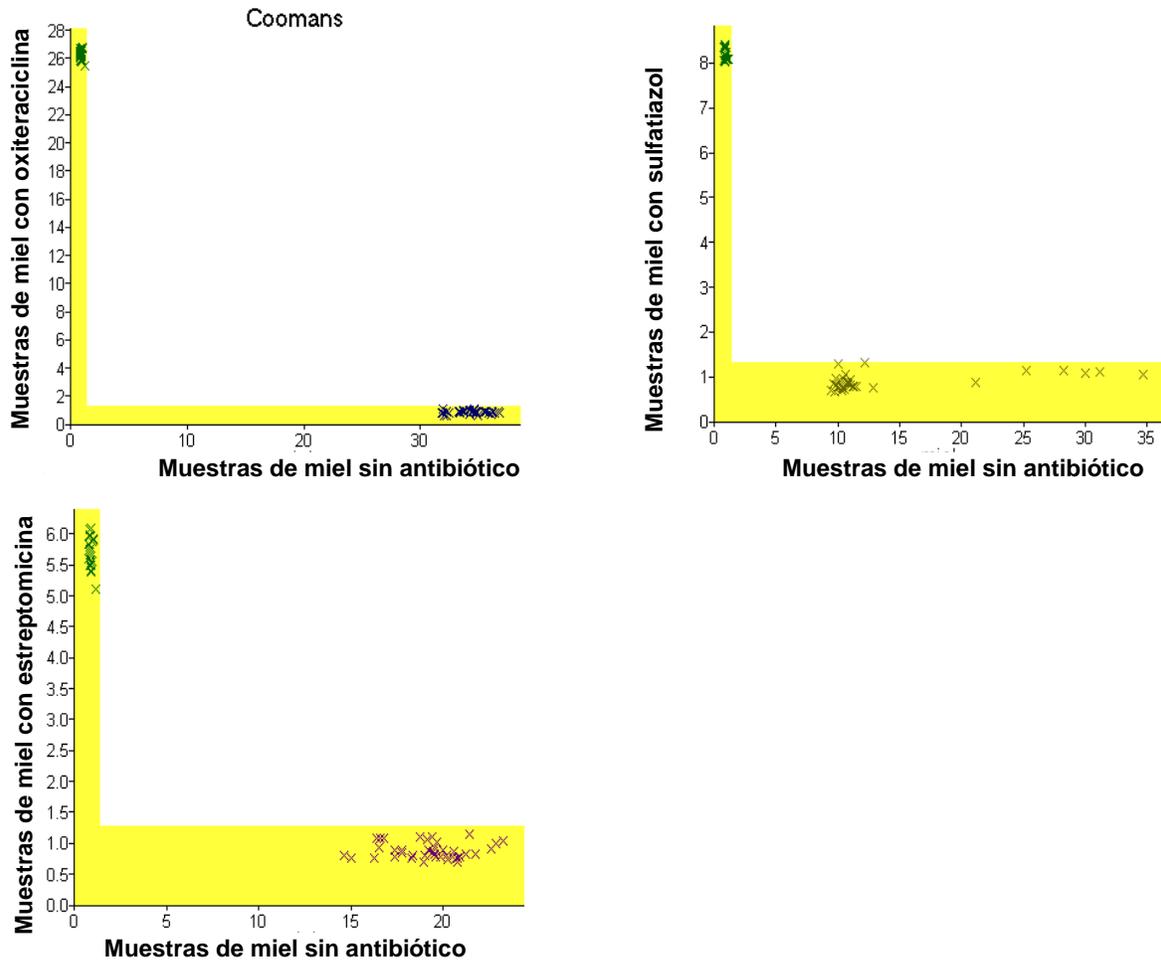


Figura 67. Diagramas de Coomans para los modelos optimizados obtenidos con SIMCA en la región del infrarrojo medio NIR

En la Figura 66 y 67 se observa que al comparar las clases formada por muestras conteniendo sulfatiazol, oxitetraciclina, estreptomina y miel sin antibiótico, cada una de ellas se ubica en su respectiva área de ajuste. Con los resultados obtenidos al realizar el comparativo entre clases, ninguna de ellas se mezcla con otra, ni sale del área de ajuste, es decir todas las muestras que componen cada modelo son incluidas en su área representativa, por lo tanto cada modelo rechaza el 100 % de las muestras pertenecientes a otras clases. Lo anterior se ve reflejado en los resultados para las distancias interclase generados por el programa ASSURE ID, para los modelos SIMCA optimizados (Cuadro 24 y 25).

Cuadro 24. Distancia interclase para muestras adicionadas con oxitetraciclina, sulfatiazol y estreptomycinina comparadas con miel sin antibiótico para la región MIR

Material	Distancia interclase			Estreptomycinina
	Miel	Oxitetraciclina	Sulfatiazol	
Miel		17	3.73	8.73
Oxitetraciclina			15.9	12.2
Sulfatiazol				5.98

Como se puede observar las distancias entre las clases para la construcción del modelo se encuentran por arriba de 6 y por debajo de 14, entre los tres grupos de muestras. La distancia interclase se define como la distancia geométrica de los modelos (hiperboxes) con un 99% de confianza de que el objeto particular pertenece a una clase. Como regla general, una distancia interclase > 3.0 indica que las muestras están adecuadamente separadas y por lo tanto pertenecen a clases diferentes (He *et al.*, 2007).

Cuadro 25. Distancia interclase para muestras adicionadas con oxitetraciclina, sulfatiazol y estreptomycinina comparadas con miel sin antibiótico para la región NIR

Material	Distancia interclase			Estreptomycinina
	Miel	Oxitetraciclina	Sulfatiazol	
Miel		27.4	9.11	14.2
Oxitetraciclina			10.2	4.08
Sulfatiazol				7.77

Para cada clase y su modelo correspondiente como los presentados en la Figura 64 y 65, se define la sensibilidad como el porcentaje de muestras que perteneciendo a esa clase son reconocidas correctamente por el modelo matemático. Análogamente se define la especificidad como el porcentaje de muestras que perteneciendo a otra clase son reconocidas como ajenas a los modelos (González *et al.*, 1999). Estos dos términos se ven reflejados como tasas de reconocimiento y rechazo. Para el modelo optimizado SIMCA desarrollado con el programa ASSURE ID se obtuvieron los resultados que se muestran en la Cuadro 26 y 27.

Cuadro 26. Tasas de reconocimiento y rechazo obtenidas con los modelos simca para muestras adicionadas con oxitetraciclina, sulfatiazol, estreptomycin y comparadas con miel sin adicionar antibiótico en la región MIR.

	% de reconocimiento	% de rechazo
Miel	100 (31/31)	100(90/90)
Oxitetraciclina (OTC)	100 (30/30)	100(91/91)
Sulfatiazol (SFZ)	100 (30/30)	100(91/91)
Estreptomycin (ETM)	100 (30/30)	100(91/91)

Cuadro 27. Tasas de reconocimiento y rechazo obtenidas con los modelos simca para muestras adicionadas con oxitetraciclina, sulfatiazol, estreptomycin y comparadas con miel sin adicionar antibiótico en la región NIR.

	% de reconocimiento	% de rechazo
Miel	100 (30/30)	100(90/90)
Oxitetraciclina (OTC)	100 (30/30)	100(90/90)
Sulfatiazol (SFZ)	100 (30/30)	100(90/90)
Estreptomycin (ETM)	100 (30/30)	100(90/90)

7.4.2 Validación de los modelos

Uno de los aspectos más importantes de reconocimiento de patrones es la validación de los modelos obtenidos mediante SIMCA. La validación del modelo implica la evaluación del número de muestras y establecer la capacidad de predicción del modelo para cada clase. El proceso de validación, permite demostrar que los modelos obtenidos por este tipo de técnica son lo suficientemente buenos para llevar a cabo la clasificación de muestras desconocidas. Esto se puede hacer por la observación del éxito en la clasificación de objetos conocidos, es decir, mediante la evaluación del reconocimiento y capacidades de predicción del modelo. Al probar los modelos desarrollados con su respectivo grupo de validación, cada una de las nueve muestras desconocidas para cada uno de los modelos, fue predicha correctamente con lo cual se tienen los resultados que se muestran en la Cuadro 28 y 29.

Cuadro 28. Distancia total y residual de las muestras utilizadas para de validacion del modelo SIMCA en la región MIR.

Material Especificado	Concentración de la muestras ppb	Material Identificado	Distancia total del material especificado	Distancia Residual
SFZ	4919.01	SFZ	0.6938	0.9320
SFZ	616.29	SFZ	0.8383	1.1262
SFZ	159.26	SFZ	0.7348	0.9872
SFZ	38.98	SFZ	0.7865	1.0565
SFZ	12.89	SFZ	0.7101	1.2022
Miel		Miel	0.8349	1.1595
Miel		Miel	0.6930	0.9623
Miel		Miel	0.6608	0.9177
Miel		Miel	0.7310	1.0153
Miel		Miel	0.6783	0.9420
OTC	9082.61	OTC	0.8949	1.2022
OTC	302.02	OTC	0.7154	0.9611
OTC	20.67	OTC	0.7287	0.9790
OTC	12.61	OTC	0.6336	0.8512
OTC	7.14	OTC	0.6844	0.9194
ETM	9020.61	ETM	0.6057	0.8137
ETM	5050.63	ETM	0.7585	1.0190
ETM	90.85	ETM	0.7844	1.0538
ETM	24.56	ETM	0.8022	1.0777
ETM	8.9	ETM	0.8570	1.1513

Como ya se mencionó, la capacidad de reconocimiento se define como el porcentaje de las muestras en el conjunto de calibración clasificadas correctamente durante la etapa de modelado y la capacidad de predicción (material identificado= material especificado), como el porcentaje de las muestras de validación correctamente clasificadas mediante el uso de los modelos desarrollados en la etapa de calibración. El término capacidad de "clasificación" se utiliza de manera ambigua, así que a veces se refiere a la capacidad antes mencionada y en otros casos al porcentaje de las muestras de calibración y validación correctamente clasificadas (Gonzalez *et al.*, 1999).

Cuadro 29. Distancia total y residual de las muestras utilizadas para de validacion del modelo SIMCA en la región NIR

Material Especificado		Material Identificado	Distancia total del material especificado	Distancia Residual
SFZ	9020.72	SFZ	0.8506	1.1428
SFZ	4990.01	SFZ	0.4964	0.6669
SFZ	22.34	SFZ	0.6615	0.8886
SFZ	12.69	SFZ	0.6503	0.8736
SFZ	9.31	SFZ	0.9495	1.2756
Miel		Miel	0.6856	0.9997
Miel		Miel	0.6728	0.9809
Miel		Miel	0.7485	1.0913
Miel		Miel	0.6218	0.9065
Miel		Miel	0.7556	1.0580
OTC	9020.72	OTC	0.7810	1.0230
OTC	410.81	OTC	0.7099	0.9306
OTC	90.26	OTC	0.7597	0.9960
OTC	20.44	OTC	0.8129	1,0657
OTC	11.89	OTC	0.7735	1.0141
ETM	4990.01	ETM	0.8772	1.1317
ETM	1230.1	ETM	0.9076	1.171
ETM	90.26	ETM	0.7959	1.0269
ETM	11.22	ETM	0.7697	0.9931
ETM	8.55	ETM	0.7274	0.9385

Se considera que este tipo de modelo de clasificacion están validados adecuadamente cuando las muestras presentan una distancia total menor a 1, lo que indica que la muestra fue clasificada correctamente, la distancia residual debe ser tan bajo como sea posible ya que una gran distancia residual indica que la muestra contiene una fuente de variación que no ha sido previamente encontrado (Meza *et al.*, 2011). Estos resultados demuestran la capacidad del modelo SIMCA para clasificar correctamente los tres grupos estudiados con un límite de confianza del 99%.

8. CONCLUSIONES

- De los modelos desarrollados en la región MIR, el algoritmo que obtuvo menores errores de predicción y calibración fue PLS1, en un intervalo de concentraciones entre 7-10000 ppb para oxiteraciclina y 8-10000 ppb, para sulfatiazol y estreptomicina.
- De los modelos desarrollados en la región NIR, el algoritmo que tuvo menores errores de calibración (SEC) y predicción (SEP), fue PLS1 para sulfatiazol y oxitetraciclina en un intervalo de concentraciones entre de 9-10000 y para el caso de estreptomicina fue el algoritmo PLS2, a un nivel entre 8-10000 ppb .
- De las dos regiones utilizadas para el desarrollo de modelos de cuantificación. Los modelos creados en MIR mostraron una mayor sensibilidad al detectar los niveles más bajos de antibióticos.
- La comparación de los modelos creados en MIR para los 3 antibióticos con ELISA, dieron en la mayoría de los casos valores más cercanos a la concentración real de las muestras.
- Utilizando la herramienta SIMCA se desarrollaron modelos de clasificación para ambas regiones del infrarrojo MIR y NIR. Estableciendo en la región NIR, una mayor separación de los diferentes grupos de muestras.

8.1 CONCLUSIÓN GENERAL

Las abejas melíferas además de ser polinizadores universales, integran la industria apícola, siendo la miel, el producto más importante por su relevancia económica. Sin embargo, algunas actividades llevadas a cabo por los apicultores, están favoreciendo la disminución de las abejas, cuando los apicultores utilizan antibióticos y otros productos químicos para tratar enfermedades, a corto plazo se contamina la miel, a mediano plazo implica la diseminación de enfermedades y a largo plazo se crean organismos resistentes a los tratamientos.

Por lo tanto, las metodologías que permitan medir cualitativamente o cuantitativamente, compuestos que resultan tóxicos o que favorecen la resistencia a enfermedades son de vital importancia.

En base a lo anterior se utilizaron herramientas estadísticas como PCR, PLS1, PLS2 y SIMCA para la detección de tres antibióticos (OTC, SFZ y ETM), de uso común en apicultura. Fue posible desarrollar modelos quimiométricos que mostraron mejor desempeño en la cuantificación de residuos a niveles de ppb, obteniendo resultado más exacto al ser comparados con la técnica ELISA. Comprobando que la quimiometría aplicada a espectroscopia infrarroja es una opción viable, entre las técnicas para la cuantificación de los antibióticos ya mencionados. La ventajas que presenta el desarrollo de modelos quimiométricos para el análisis de diferentes matrices y determinación de diversos compuestos, abre un número de posibilidades para el análisis de residuos veterinarios no solo en miel, en todos aquellos productos agropecuarios expuestos a este tipo de contaminación, permitiendo el ahorro de recursos y la disminución de tiempo en la obtención de resultados.

9. BIBLIOGRAFIA

- Alcalá BM. Utilización de la Espectroscopia NIR en el Control Analítico de la Industria Farmacéutica. Desarrollos iniciales en PAT. Tesis de doctorado. Universidad de Barcelona, España. (2006).
- Alippi AM, Lopez AC, Reynaldi FJ, Grasso DH, Aguilar OM. Evidence for plasmid-mediated tetracycline resistance in *Paenibacillus Larvae*, the causal agent of American Foulbrood (AFB) Disease in honeybees. *Vet. Microbio.* 125 (2007), 290-303.
- Alvarez SJM, Tulipani S, Romandini S, Bertoli E, & Battino, M. Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Med J Nutrition Metab.* 3(1), (2010), 15-23.
- Al-Waili N, Salom K, Al-Ghamdi A, & Ansari MJ. Antibiotic, pesticide, and microbial contaminants of honey: human health hazards. *Sci. World J.* 2012 (2012), 1-9.
- Anderson DL, & Trueman JWH. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Exp. Appl. Acarol.* 24(3), (2000). 165-189.
- Arvanitoyannis I, Houwelingen KM. Implementation of Chemometrics for Quality Control and Authentication of Meat and Meat Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 43(2), (2003), 173–218.
- Arvanitoyannis I, Tsitsika EV, Panagiotaki P. Implementation of quality control methods (physicochemical, microbiological and sensory) in conjunction with multivariate analysis towards fish authenticity. *International J. of Food Sci. Tech.* 40 (2005), 237–263.
- Bargańska Z, Slebioda M, Namiesnik J. Determination of antibiotic residues in honey. *Trends Anal. Chem.* 30(7), (2011), 1035-1041.
- Barreto CC. Espectroscopia de imagen en el infrarrojo próximo: caracterización instrumental y aplicación al análisis de productos sólidos. Tesis de doctorado. Universidad de Barcelona, España. (2010).
- Becerra GFJ, Contreras EF. La importancia de la apicultura en México. *Imagen veterinaria.* 4(1), (2014), 10-16.
- Beebe KR, Pell RJ, Seasholtz MB. *Chemometrics. A Practical Guide.* John Wiley and Sons Inc, New York. (1998).

- Berrueta LA, Alonso SRM, & Héberger K. Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A*. 1158(1), (2007), 196-214.
- Bienefeld K, Aubert M, Berthoud H, Imdorf A, Haueter M, Charriere JD, Garrido C, & Gauthier L. Impact of virus infections in honey-bees. EurBee3. 3rd european conference of apidology. Belfast 8-11 September (2008).
- Bogdanov S. Current status of analytical methods for the detection of residues in bee products. *Apiacta*. 38, (2003), 190-197.
- Bogdanov S. Contaminants of bee products. *Apidologie*. 37, (2005), 1-18.
- Bogdonov S. Honey Control, Bee Product Science, (2006). Retrieved from www.bee-hexagon
- Brand D. The honey bee in New Spain and Mexico. *J. Cult. Geogr*. 9(1), (1988), 71-82.
- Brereton RG. *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*, Wiley, Chichester. (2003).
- Calderon PRV. Curso de inmunología general1. Introducción al sistema inmune (2007) <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/inmunoquimica.pdf>
- Carbonaro M. & Nucara A. Secondary structure of food proteins by Fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region. *Amino acids*.38(3), (2010), 679-690.
- Chen H, Ying J, Chen H, Huang J, Liao LC. Determination of Chloramphenicol in Honey Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction. *Chromatographia*. 68, (2008), 629-634.
- Che MYB, Syahariza ZA, Mirghani ME, Jinap S. Analysis of potential lard adulteration in chocolate and chocolate products using Fourier transform infrared spectroscopy *Food Chem*. 90(4), (2005), 815–819.
- Cho HJ. Hong SH. Acacia honey quality measurement by near-infrared spectroscopy. *J. Near Infrared Spectrosc*. 6, (1998), 329-331.
- Chow J Probiotics and prebiotics: a brief overview. *J Ren. Nutr*.12, (2002), 76–86
- Coates, J. Interpretation of infrared spectra, a practical approach. *Encyclopedia of analytical chemistry* R.A. Meyers (Ed.) John Wiley & Sons Ltd, Chichester. (2000).
- REVISED CODEX STANDARD FOR HONEY CODEX STAN 12-1981, Rev.1 (1987), Rev.2 (2001). <http://www.ihc-platform.net/codex2001.pdf>
- Commission Regulation (EC) No. 1430/94 of 22 June 1994 amending Annexes I, II, III and IV of Council Regulation (EEC) No. 2377/90 (1990) laying down a Community

procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. Off. J. Eur. Comm. L156 (1994), 6–8.

CONASA. Consejo tecnico consultivo nacional de sanidad animal
<http://www.conasamexico.org.mx/mesa7Residuos%20Toxicos%20en%20miel%20Q.pdf>
<http://www.conasamexico.org.mx/mesa7USO%20ADECUADO%20DE%20GERMICIDAS>

Congelosi VE, Taylor PE, Rice PF: Basic Statistics: A Real World Approach, ed 3. St. Paul: West Publishing Co. (1983).

Conzen JP. Multivariate Calibration: A Practical Guide for the Method Development in the Analytical Chemistry. Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany. (2003).

Cooper KM, Samsonova JV, Plumpton L, Elliott CT, & Kennedy DG. (2007). Enzyme immunoassay for semicarbazide—the nitrofurantoin metabolite and food contaminant. Anal. Chim. Acta. 592 (1), (2007) 64-71.

Cozzolino D, Corbella E. Determination of honey quality components by near- infrared reflectance spectroscopy. J. Apic. Res. 42(1-2), (2003), 16-20.

Crane E The archaeology of beekeeping. Gerald Duckworth & Co, London. (1983).

Crane E History of honey. In: Crane E (ed) Honey, a comprehensive survey. William Heinemann, London. (1975).

CRS Antibiotic Use in Agriculture: Background and Legislation. January 7, 2010
<http://nationalaglawcenter.org/wp-content/uploads/assets/crs/R40739.pdf>

Dardenne P, Agneessens R. & Sinnaeve G. Fresh forage analysis by near infrared Spectroscopy. Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves. Proceedings of the 7th International Conference on Near Infrared Spectroscopy, Montreal, Canada, 6-11 August 1995. NIR Publications, Chichester, UK. (1996).

Di EV, Sinelli N, Giovanelli G, Moles A, Casiraghi E. NIR and MIR spectroscopy as rapid methods to monitor red wine fermentation. European Food Research and Technology. 230(6), (2010), 947-955.

Dimitrova B, Gevrenova R, Anklam E. Analysis of phenolic acids in honeys of different floral origin by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. Phytochem Anal. 18, (2007), 24–32.

- Dračková M, Navrátilová P, Hadra L, Vorlová L, Lenka H. Determination Residues of Penicillin G and Cloxacillin in Raw Cow Milk Using Fourier Transform Near Infrared Spectroscopy. *Acta Vet. Brno.* 78, (2009), 685-690.
- Doner LW. The sugars of honey a review. *J. Sci. Food Agric.* 28(5), (1977), 443-456.
- Dunn WB & Ellis DI. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 24, (2005), 285–294.
- Duque OsorioLJ. Cualificación por infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) del polietileno producido en Ecopetrol SA. Tesis de Licenciatura, Universidad de Pereira, Colombia. (2010).
- DuPraw EJ. The recognition and handling of honeybee specimens in non-Linnean taxonomy. *Journal of Apicultural Research.* 4(2), (1964), 71-84.
- EC Comisión Europea. 2010. La Salud de las Abejas Melíferas. http://ec.europa.eu/environment/news/efe/articles/2015/03/article_20150306_01_es.htm
- Edder P, Corvi C, Cominoli A. Dosage de résidus de streptomycine dans le miel par HPLC avec postdérivatisation et détection fluorimétrique, *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene.* 89, (1998), 369-382.
- Edder P, Ortelli D, Corvi C. Survey of antibiotics residues in honey on the Swiss market. Poster presented at the 4th International Symposium on Veterinary Hormones and Drug Residue Analysis. 2002.
- Edder P, Corvi C. Utilisation du Charm II por le dépistage des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale. *Mitt. Lebensm. Hyg.* 92, (2001), 218-228.
- Ellis DI, Brewster VL, Dunn WB, Allwood JW, Golovanov AP, & Goodacre R. Fingerprinting food: current technologies for the detection of food adulteration and contamination. *Chem. Soc. Rev.* 41(17), (2012). 5706-5727.
- Martínez GI. La Gestión de la Innovación en la Producción de Miel en el Trópico Húmedo de México. Congreso y Foro Mexicano de Apicultura San Andrés Tuxtla, Veracruz Noviembre, 2014. Universidad autónoma chapingo CIESTAAM.
- FAO. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. http://www.fao.org/agriculture/crops/noticias-eventos-boletines/detail/es/item/211886/icode/?no_cache=1
- FAOSTAT. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>

- FEDESA. European Federation of Animal Health Antibiotics and Animals. FEDESA/FEFANA Press release. 8 September. Brussels, Belgium, (1997). <http://www.ifaheurope.org/ifah-media/publications.html>
- FEDESA. European Federation of Animal Health Antibiotic Use in Farm Animals does not threaten Human Health. FEDESA/ FEFANA Press release. 13 July. Brussels, Belgium. (2001). <http://www.ifaheurope.org/ifah-media/publications.html>
- Ferguson JP, Baxter GA, McEvoy JDG, Stead S, Rawlings E, Sharman M. Detection of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in milk, honey and meat samples using an optical biosensor. *Analyst*. 127(7), (2002), 951–956.
- Fuselli SR, Gende LB, García De La Rosa SB, Eguaras MJ, Fritz R. Inhibition of *Paenibacillus* Larvae Subsp Larvae by the essential oils of two wild plants and their emulsifying agents. *Span. J. Agri. Res.* 3(2), (2005), 220-224.
- Gallardo VT, Osorio RG, Cárdenas BF, Beltrán OMC. Determination of ternary solutions concentration in liquid–liquid extraction by the use of attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate data analysis. *Can. J. Chem. Eng.* 86(1), (2008), 77–83.
- Gallardo VT, Revilla OG, Zúñiga de Loa M, Rivera EY. Application of FTIR-HATR spectroscopy and multivariate analysis to the quantification of adulterants in mexican honeys. *Food Res. Int.* 42, (2009), 313-318.
- Garcia AM, Huidobro JF, Hermida M, Rodriguez-Otero JL. Major components of honey analysis by near-infrared transfectance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 48(11), (2000), 5154-5158.
- García CAM, del Olmo IM, Gámiz GL, & Cruces BC. Applications of capillary electrophoresis to the determination of antibiotics in food and environmental samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 395(4), (2009), 967-986.
- García BT. Tema 4. Aplicaciones y criterios de uso de la espectroscopia de absorción molecular: Espectroscopia IR. Apuntes de química analítica. Facultad de ciencias experimentales. Campus de el Carmen. (2015)
<http://www.uhu.es/tamara.garcia/quiml/apuntes/TEMA%204.pdf>
- Garrido A, Guerrero JE, & Gomez CA. Posibilidades y limitaciones de la aplicación de la técnica NIRS en la evaluación nutricional de alimentos para el ganado. En: *Nuevas Fuentes de Alimentos para la Producción Animal IV*, Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca. (1993).

- Geladi P, MacDougall D, Martens H. Linearization and scatter-correction for near-infrared reflectance spectra of meat. *Appl. Spectrosc.* 39(3), (1985), 491-500.
- Gemperline P. *Practical Guide to Chemometrics, Second Edition*, CRC Press, Boca Raton FL. (2006).
- Gonzalez A, Blanco MM, & Serrano D. Identification and quantitation assays for intact tablets of two related pharmaceutical preparations by reflectance near-infrared spectroscopy: validation of the procedure. *J. pharm. Biom. Ana.* 22(1), (1999), 139-148.
- González SA, Rivas J; Sauri E; Zumarraga C. Análisis de antibióticos en miel. XV Seminario Americano de Apicultura. Agosto (2001), Tepic, Nay.
- Grande BC, Falcón MG, & Gándara JS. El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual the use of antibiotics in animal feeds: an actual perspective o uso dos antibióticos na alimentação animal: perspectiva actual. *CYTA-J. Food.* 3(1), (2000). 39-47.
- Greenpeace. Alimentos bajo amenaza Valor económico de la polinización y vulnerabilidad de la agricultura española ante el declive de las abejas y otros polinizadores. España, (2014)
<http://www.greenpeace.org/espana/Global/espana/2014/Report/abejas/alimentos%20bajo%20amenaza%20BR.pdf>
- Groenewald,T. and Koster,H. Espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS) la técnica de análisis rápidos del futuro. (2006).
<https://www.engormix.com/MA-balanceados/formulacion/articulos/espectroscopia-infrarrojo-cercano-nirs-t577/800-p0.htm>
- He Y, Cen H. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends in Food Sci. Tech.*18(2), (2007), 72-83.
- Heering W, Usleber E, Dietrich R, Märtilbauer E. Immunochemical screening for antimicrobial drug residues in commercial honey. *The Analyst.* 123, (1998), 2759-2762.
- Hemmateenejad B, Akhond M, & Samari FA. Comparative study between PCR and PLS in simultaneous spectrophotometric determination of diphenylamine, aniline, and phenol: effect of wavelength selection. *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* 67(3), (2007). 958-965.

- Hendriks MM, Cruz JL, Bont DD, Hall RD. Preprocessing and exploratory analysis of chromatographic profiles of plant extracts. *Anal. Chim. Acta.* 545, (2005), 53-64.
- Hernández HJM. Utilización de la tecnología NIRS con sonda de fibra óptica para el control de calidad de alfalfa. Tesis de doctorado, Universidad de Salamanca España. (2008).
- Hollas JM. *Modern Spectroscopy*, John Wiley and Sons, 2nd ed. Chichester, England. (1992).
- ISI. NIRS 3. Routine operation, Calibration and Network system Management Software for Near Infrared Instruments. Infrasoft International. Perstoin Analytical Inc, Silver Spring, MD 20904. (1992).
- INCA RURAL. Instituto Nacional para el Desarrollo de Capacidades del Sector Rural <http://www.inca.gob.mx/?page=english>
- JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives). Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Food Additives. Series 39. (1997).
- Jadon N, Johnson S. Antibiotic residues in honey. Centre for science and environment (2010).
- Jha SN. *Nondestructive evaluation of food quality*. Heidelberg: Springer. 375, (2010).
- Jiménez TPA. Identificación de harinas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) con alto contenido proteico mediante espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS). Tesis de doctorado, Universidad Nacional de Colombia. (2007).
- Johnson S, Jadon N, Mathur HB, & Agarwal HC. Antibiotic residues in honey. Report September (2010) Centre for Science and Environment, New Delhi, India.
- Klein AM, Vaissiere BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, & Tscharntke T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences.* 274, (1608), (2007), 303-313.
- Kocher U. Nachweis von Streptomycin-Rückständen in Honig mittels Charm II-Test und Absicherung der Befunde durch HPLC mit Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion. *Lebensmittelchemie.* 50, (1996), 115-117.
- Kümmerer K. Significance of antibiotics in the environment *J. Antimicrob. Chemother.* 52(1), (2003). 5-7.
- Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment –A review– Part I *Chemosphere.* 75, (2009), 417-434.

- Lachenmeier DW. Rapid quality control of spirit drinks and beer using multivariate data analysis of Fourier transform infrared spectra. *Food Chemistry*. 101(2), (2007), 825–832.
- Le Conte Y, Ellis M, & Ritter W. Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses?. *Apidologie*. 41(3), (2010), 353-363.
- Lefkovits I, & Pernis P.. *Immunological Methods*. Academic Press, Ed. Harlow, David Lane, *Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, USA. (1988).
- Lin L. Quantifying lunar soil composition with partial least squares modeling of reflectance. *Space Research*. 42, (2008), 267–274.
- Lullman C. Control efectivo de la miel. Conferencia Magistral. I Encuentro Latinoamericano de Apicultores y II Congreso Cubano de Apicultura. Enero (2007). La Habana, Cuba.
- Macho AS. Metodologías analíticas basadas en la espectroscopía de infrarrojo y calibración multivariable. Aplicación a la industria petroquímica. Tesis doctoral. Universidad Rovira Virgili, Tarragona, España. (2002).
- Maggio MR, Kaufman ST, Del Carlo M, Cerretani BL, Cichelli A, Compagnone DA. Monitoring of fatty acid composition in virgin olive oil by Fourier transformed infrared spectroscopy coupled with partial least squares. *Food Chem*. 114, (4), (2009), 1549–1554.
- Martínez GEG La producción de miel en el trópico húmedo de México: avances y retos en la gestión de la innovación. Universidad autónoma Chapingo. (2014).
- Martos I, Ferreres F, Yao L. Flavonoids in monospecific. *Eucalyptus* honeys from Australia. *J Agric Food Chem*. 48, (2000), 4744–4748
- Mason RO, Lind DA, Marchal WG: *Statistics: An Introduction*. New York: Harcourt Brace Jovanovich, Inc, (1983).
- Massart DL, Vandeginste BG, Buydens LM, Lewi PJ, Smeyers-Verbeke J, Jong SD. (1997). *Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part A*. Elsevier Science Inc.
- Matej LA. Master Beekeeper Certification Course: Category #7. Date: 1 May 2004 Name: Honey composition, sources and marketable forms. From wasba.org. <http://sg-arvin.com/pdf/master-beekeeper-certification-course-category-7-560586/>

- Martens RY, Chalus P, Maurer L, Lema MC, Edmond A, & Jent N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *J. pharm. Biom. Anal.* 44(3), (2007), 683-700.
- Martens H. *Multivariate calibration*. John Wiley & Sons. New York (1992).
- Martín DRD. Aportaciones al conocimiento del estado medioambiental de hidrosistemas de interés internacional situados en Castilla-La Mancha. 105. Univ de Castilla La Mancha. (2000).
- Murray I. Forage Analysis by Near Infra-Red Reflectance Spectroscopy. In: Davies, Baker, Grant and Laidlaw (Eds.), *Sward Measurement Handbook*, Second Ed., British Grassland Soc. (1993).
- McGorin RJ. Food analysis techniques: Introduction. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (2006).
- Meza MO, Gallardo VT, Osorio RG. Application of mid-infrared spectroscopy with multivariate analysis and soft independent modeling of class analogies (SIMCA) for the detection of adulterants in minced beef. *Meat Sci.* 86, (2011), 511–519.
- Meza MO, Gallardo VT, Dorantes ÁL, Osorio RG, de la Rosa Arana JL. FT-MIR and Raman spectroscopy coupled to multivariate analysis for the detection of clenbuterol in murine model. *Analyst.* 136(16), (2012), 3355-65.
- Miller CE. Sources of non-linearity in near infrared methods. *NIR news.* 4(6), (1993), 3-5.
- Miyagi T, Peng CYS, Chuang RY, Mussen EC, Spivak MS, Doi RH. Verification of oxytetracycline-resistant American fowlbrood pathogen *Paenibacillus Larvae* in The United States. *J. Invert. Path.* 75, (2000), 95-96.
- Moeller N, Mueller-Seitz E, Scholz O, Hillen W, Bergwerff AM. A new strategy for the analysis of tetracycline residues in foodstuffs by a surface plasmon resonance biosensor. *Eur. Food Res. Technol.* 224, (2007), 285-299.
- Molan PC, Betts JA. Clinical usage of honey as a wound dressing: an update. *J Wound Care.* 13, (2004), 353–356
- Molino F, Lázaro R, Pérez C, Herrera A. Puesta a punto de un método para la determinación de residuos de tetraciclinas en miel mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución. VIII Congreso Iberoamericano de Apicultura. Marzo (2006), Guadalajara, España.

- Mondragón CPM y Ulloa JA. Identificación de alimentos adulterados mediante espectroscopia de infrarojo. *Revista Fuente*. 3(6), (2011), 1-8.
<http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/02-06/1.pdf>
- Montoya, N. Análisis de residuos de cloranfenicol y nitrofuranos. *Cenaim informa Boletín informativo*. 70, (2004). 2002b. Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas Edgar Arellano M. Ecuador. Línea: <http://www.cenaim.espol.edu.ec/publicaciones/quincenal/bquinc70.pdf>, 19-02.
- Morlot M, Beaune P. An experience with charm II System. *Apiacta*. 38, (2003) 226-234.
- Mutinelli F. Practical application of antibacterial drugs for the control of honey bee diseases. *Apiacta* 38, (2003) 149–155.
- Mutinelli F, & Gallina A. Programa de la unión europea para el control de residuos en miel. Experiencia de un laboratorio nacional de referencia apicola en italia. *Agro sur*. 35(1), (2007). 30-34.
- Nicolson SW, Human H. Bees get a head start on honey production, *Biol. Lett.* 4, (2008), 299–301.
- Núñez CO, Talavera BI, Porro MD, Hernández FN, & Bustio ML. Experiencias en el uso del software Quimiometrix para el procesamiento multivariado de datos químicos y bioquímicos. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 42(1), (2011).3-16.
- Olivier B. & Combeaud L. Enfoque el mercado mundial de la miel. *Mayazine*. 20, (2011), 1-12.
- Osborne, B. G.; Fearn, T.; Hindle, P. H. *Practical Near Infrared Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis*; Longman Scientific & Technical: Harlow, U.K., (1993); 28-33.
- Padilla AF, Flores SJM. Estratégias de conservação de abelhas nativas. Congreso :ZOOTEC 2008, Joao Pessoa (Brasil) 26 a 30 de maio de 2008.
- Pensante DG. INPE 4016. Capítulo II. Abejas melíferas utilizadas en la apicultura. UPRM. <http://academic.uprm.edu/dpesante/cursos-dictados.htm>
- Pérez RA. Analysis of volatiles from Spanish honeys by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 50, (2002), 2633–2637
- Pérez AR, Iglesias MT, Pueyo E. Amino acid composition and antioxidant capacity of Spanish honeys. *J Agric Food Chem*. 55, (2007) 360–3651.

- Perkin Elmer. Manual Quant.doc. (2000).
- Piro R, & Mutinelli F. The EU legislation for honey residue control. *Apiacta J.* 38 (2003). 5-20.
- Qiu PY, Ding HB, Tang YK, Xu RJ. Determination of chemical composition of commercial honey by near-infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 47(7), (1999), 2760-2765.
- Ramírez GS, Carranza CPH, Gutiérrez SJ, García OL, & Hernández RS. Aplicación en medicina de la espectroscopia de infrarrojo cercano. *Medicina Interna de México.* 28(4), (2012). 366-372.
- Ramis RG, Garcia ACM. *Quimiometría.* España: Ed Síntesis S.A. (2001).
http://www.cenatav.co.cu/doc/RTecnicos/RT%20SerieAzul_002web.pdf
- Reybroeck W, Ooghe S, Brabander HD, & Daeseleire E. Validation of the tetrasensor honey test kit for the screening of tetracyclines in honey. *J. Agric. Food Chem.* 55(21), (2007). 8359-8366.
- Reybroeck W, van Veen JW, & Gupta A. *Beekeeping for Poverty Alleviation and Livelihood Security.* Springer. (2014).
- RIDASCREEN® Manual Tetracyclin. Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of Tetracycline Art. No.: R3503 R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany
- Ruoff K, Iglesias MT, Luginbühl W, Bosset JO, Bogdanov S, Amado R. Quantitative analysis of physical and chemical measurands in honey by mid-infrared spectrometry. *Eur. Food Res. Technol.* 223, (2006), 22-29.
- Ruttner F. *Natural history of honey bees.* Ehrenwirth Verlag.(1992).
- SAGARPA-ASERCA. Situación actual y perspectiva de la apicultura en México. *Claridades Agropecuarias,* (199). (2010).
<http://www.infoaserca3we2uo90.gob.mx/claridades/revistas/199/ca199-3.pdf>
- SAGARPA. Monografía de la miel. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
[http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADaMiel\(Ene11\)vf.pdf](http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADaMiel(Ene11)vf.pdf)
- Savitzky A, & Golay MJ. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Anal. Chem.* 36(8), (1964). 1627-1639.
- Schwedt, Georg. *The Essential Guide to Analytical Chemistry.* Brooks Haderlie, trans.. Chichester, NY: Wiley. (1997)

- Seeley TD, & Visscher P. Survival of honeybees in cold climates: the critical timing of colony growth and reproduction. *Ecol. Entom.* 10(1), (1985). 81-88.
- SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. <http://sistemas2.senasica.gob.mx/miel/static/principal.html>
- Serrano MJL. Curso: instrumentación y métodos de análisis químico Tema: espectroscopía infrarroja 1-Fundamentos. Posgrado en ingeniería del agua y del terreno. . http://www.upct.es/~minaees/espectroscopia_infrarroja.pdf
- Service de Protection de la Consommation, 22 Quai Ernest-Ansermet, CH-1211 Genève 4, Switzerland. Survey of antibiotics residues in honey on the swiss market. 2000.
- SIAP-SAGARPA 2015 <http://www.siap.gob.mx/siaprendes/contenidos/1/04-miel/contexto-5.html>
- SIFUPRO. Estudio epidemiológico sobre las principales enfermedades que afectan la producción apícola. http://www.sifupro.org.mx/agendas/001386-001834-estudio_epidemiologico_enfermedades_ap%C3%ADcolas.pdf
- Sivakesava S, Irudayaraj J. Prediction of inverted cane sugar adulteration of honey by Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Food Sci.* 66(7), (2001), 972-978.
- Sivakesava, S., & Irudayaraj, J. Rapid determination of tetracycline in milk by FT-MIR and FT-NIR spectroscopy. *J. dairy sci.* 85(3), (2002). 487-493.
- Skoog DA, Leary JJ. Introduction to Instrumental Analysis, 4th ed, Saunders College Publishing, New York. (1992).
- Spraggs RA. IR Spectrometers, Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry, G. Tranten, J. Holmes, J. Lindon (Eds.), Academic Press. (1999),
- Stuart B. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. JohnWiley & Sons, Ltd. (2004).
- Stuart, B. Biological Applications of Infrared Spectroscopy, John Wiley & Sons, Chichester, (1997).
- Sun, D. W. (Ed.). (2009). Infrared spectroscopy for food quality analysis and control. Academic Press.
- Syahriza ZA, Che Man YB, Selamat J. Detection of lard adulteration in cake formulation by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Food Chem.* 92(2), (2005), 365–371.

- Talavera I, Rodríguez JL. Estado del Arte del Reconocimiento de Patrones en la Quimiometría. RT_002, Serie Azul. Reconocimiento de Patrones. Versión digital. RNPS_ 2142 ISSN 2072-6287. CENATAV
- Tewari J, Irudayaraj J. Quantification of saccharides in multiple floral honeys using Fourier transform infrared microattenuated total reflectance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 52(11), (2004), 3237-3243.
- Tillotson GS, Doern GV, Blondeau JM. Optimal antimicrobial therapy: the balance of potency and exposure. *Exp. Opi. Invest. Drugs.* 15, (2006), 335-337.
- Terrab A, González AG, Díez MJ, & Heredia FJ. Characterisation of Moroccan unifloral honeys using multivariate analysis. *Eur Food Res Technol.* 218(1), (2003), 88-95.
- Todeschini R. *Introduzione alla chimimetria.* Ed. SES, Napoli, Italy. (1998).
- Toldrá F, Reig M. Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. *Trends Food Sci. Tech.* 17,(2006), 482-489.
- TRADE MAP. Trade statistics for international business development
http://www.trademap.org/Country_SelProduct.aspx?nvpm=3||||0409|||4|1|1|2|1|1|2|1|1
- Tzouros NE, Arvanitoyannis IS. Agricultural produces: Synopsis of employed quality control methods for the authentication of foods and application of chemometrics for the classification of foods according to their variety or geographical origin. *Critical Reviews in Food Sci. and Nutrition.* 41, (2001), 287–319.
- USDA Nutrient Data Laboratory Honey. (2007).
<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search>
- Uslieber E, Dietrich R, Märtilbauer E, Unglaub, W. Chapter 6. Immunochemical Detection of Streptomycin in Honey. *Immunoassays for Residue Analysis.* Munich, Germany. ACS Symposium Series, American Chemical Society. 621, (1996) 74–81.
- Valdés QP. Situación mundial del Síndrome de Colapso de las Abejas. Ministerio de Agricultura, Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (Odepa), Santiago de Chile
http://www.agrimundo.cl/wp-content/uploads/130826_reporte_apicultura_n22.pdf

- Vandeginste BGM, Deming SN, & Kaufman L. Chemometrics: a textbook. Elsevier. (1988).
- Vázquez HL. Tipificación y caracterización de café comercial mediante métodos instrumentales y quimiometría. Tesis de maestría. Universidad autónoma Chapingo, Mexico. (2011).
- Ventura GJF. Desarrollo de métodos analíticos medioambientalmente sostenibles por espectrometría FTIR. Tesis doctoral. Universidad de Valencia, España. (2007). <http://roderic.uv.es/bitstream/handle/10550/14964/ventura.pdf?sequence=1>
- Wold H. Estimation of principal components and related models by iterative least squares. *Multivariate anal.* 1, (1966). 391-420.
- Wold KS, Esbensen PG. *Chemometr.Intell.Lab.* 2 (1987), 37–52.
- Zhao C, Liu W, Ling H, Lu S, Zhang Y, Liu J, & Xi R. (2007). Preparation of anti-gatifloxacin antibody and development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of gatifloxacin residue in milk. *J. Agric.Food Chem.* 55 (17), (2007)6879-6884.

<http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbasees/mod3.html>

<http://www.quimicaorganica.net/espectroscopia-de-infrarrojo.html>

http://luz.izt.uam.mx/mediawiki/index.php/Firmas_espectroscopicas

<http://www.chromacademy.com/lms/sco533/15-infrared-spectroscopy-attenuated-total-reflectance.html?fChannel=14&fCourse=77&fSco=533&fPath=sco533/15-infrared-spectroscopy-attenuated-total-reflectance.html>