



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**PERFIL METABOLÓMICO BASADO EN RESONANCIA
MAGNÉTICA NUCLEAR PARA LA CLASIFICACIÓN DE
MIELES MEXICANAS POR ORIGEN FLORAL**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO

PRESENTA

JORGE ENRIQUE SÁNCHEZ SÁNCHEZ

Ciudad Univeritaria, CDMX, 2021





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: RODRIGUEZ DE SAN MIGUEL GUERRERO EDUARDO

VOCAL: ESTURAU ESCOFET NURIA

SECRETARIO: DIAZ FLORES LUIS ALEJANDRO

1er. SUPLENTE: REYES LOPEZ ELIZABETH

2° SUPLENTE: ROJO PORTILLO TANIA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL PROYECTO:

INSTITUTO DE QUÍMICA

LABORATORIO UNIVERSITARIO DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Nuria Esturau Escofet

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Martha Elena García Aguilera

SUSTENTANTE:

Jorge Enrique Sánchez Sánchez

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme las puertas de la ciencia y la cultura.

A la beca otorgada por el Proyecto SAGARPA- CONACYT 2017-06-292836 “Plataforma nacional de metabolómica basada en espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)-OMICS para la solución de problemas nacionales del sector agroalimentario”.

Al Instituto de Química de la UNAM por brindarme los medios necesarios para desarrollar este trabajo.

A los miembros del H. Jurado por sus valiosas observaciones y comentarios de este trabajo.

A la Técnica Académica Dra. Beatriz Quiroz del LURMN del IQ por el apoyo en la adquisición de algunos espectros.

A la Dra. Nuria Esturau por sus enseñanzas, confianza y tiempo.

A la Dra. Martha Elena García Aguilera por la dedicación, tiempo y amistad.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	2
3. OBJETIVOS	2
3.1. <i>OBJETIVO GENERAL</i>	2
3.2. <i>OBJETIVOS PARTICULARES</i>	2
4. ANTECEDENTES	3
4.1. <i>LA MIEL</i>	3
4.1.1. <i>LA MIEL EN MÉXICO</i>	3
4.1.2. <i>COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA MIEL</i>	4
4.1.3. <i>CLASIFICACIÓN DE LA MIEL</i>	6
4.1.4. <i>DETERMINACIÓN DEL ORIGEN FLORAL</i>	6
4.2. <i>METABOLÓMICA</i>	7
4.2.1. <i>METABOLÓMICA DE ALIMENTOS</i>	7
4.2.2. <i>PLATAFORMAS ANALÍTICAS</i>	7
4.2.1.1 <i>RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR</i>	8
4.3. <i>METABOLÓMICA POR RMN EN MIELES</i>	10
4.4. <i>QUIMIOMETRÍA</i>	11
5. METODOLOGÍA	13
5.1. <i>MUESTRAS</i>	13
5.2. <i>PREPARACIÓN DE MUESTRAS</i>	13
5.3. <i>ADQUISICIÓN DE EXPERIMENTOS DE RMN</i>	14
5.4. <i>PROCESAMIENTO DE ESPECTROS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO</i>	14
5.5. <i>IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS</i>	15
5.6. <i>RELACIÓN FRUCTOSA-GLUCOSA</i>	15
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS	16
6.1. <i>IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS EN LOS ESPECTROS DE ¹H-RMN</i>	16
6.2. <i>ANÁLISIS DE LOS ESPECTROS DE ¹H-RMN DE LAS MIELES ESTUDIADAS</i>	17
6.3. <i>ANÁLISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIANTE</i>	19
6.3.1. <i>METABOLITOS INVOLUCRADOS EN LA DIFERENCIACIÓN POR ORIGEN FLORAL</i>	22
6.4. <i>RELACIÓN FRUCTOSA-GLUCOSA</i>	23
7. CONCLUSIONES	25
8. BIBLIOGRAFÍA	26

Lista de abreviaturas, acrónimos y simbología

¹ H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de protón unidimensional
5-HMF	5-Hidroximetil-2-furancarbaldehído
δ	Desplazamiento químico
AQ	Tiempo de adquisición
ASGANAREN	Asociación Ganadera Nacional de Criadores de Abeja Reina y Núcleos
B ₀	Campo magnético
BTpH	Unidad de valoración y pH de Bruker
D1	Retardo entre pulsos
D ₂ O	Agua deuterada
DMSO	Dimetilsulfóxido
DS	Número de transientes ficticios
F/G	Relación Fructosa-Glucosa
FIDs	Decaimiento por inducción libre
J	Constante de acoplamiento
NS	Número de transientes
OPLS-DA	Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales
PCA	Análisis de Componentes Principales
PCs	Componentes principales
PLS-DA	Análisis Discriminante por mínimos cuadrados parciales
Q ²	Predictibilidad del modelo
R ²	Ajuste de los datos
rf	Radiofrecuencia
RG	Ganancia
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SW	Ventana espectral
TMS	Tetrametilsilano
TSP	Ácido trimetilsililpropanóico
VIP	Importancia de las variables en la proyección

1. INTRODUCCIÓN

La presente tesis tiene como finalidad realizar el estudio de muestras de miel de tres orígenes florales provenientes de distintos estados de la República Mexicana mediante espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y análisis multivariante para conocer las similitudes y/o las diferencias en su perfil metabolómico. Este trabajo, forma parte del proyecto SAGARPA-CONACYT No. 292836 “Plataforma nacional de metabolómica en espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)-OMICS para la solución de problemas nacionales del sector agroalimentario” que, entre sus objetivos está el crear una base de datos de huellas dactilares de RMN para mieles de México.

En la década de 1980, surgió el término “ómica”, que se acuñó para el conjunto de ciencias que permiten estudiar un gran número de moléculas implicadas en un sistema, como genes, proteínas y metabolitos, permitiendo así la creación de la genómica, proteómica y metabolómica, entre otras. La metabolómica es la disciplina dedicada al estudio del conjunto de metabolitos. Una de las técnicas analíticas que se usan es la RMN, que permite detectar varias clases de compuestos químicos simultáneamente, no necesita separación de la muestra, es altamente reproducible, no es destructiva y la preparación de la muestra es sencilla. Además, tiene la ventaja de que las señales son directamente proporcionales al número de núcleos que las generan, lo que brinda la posibilidad de hacer determinaciones cuantitativas.

Un reto relacionado con la calidad de los alimentos es la trazabilidad en la cadena de suministro, lo que exige un conocimiento preciso de la composición y el origen del producto alimenticio durante todas las etapas de fabricación a las que se somete. En el caso de la miel, su calidad y composición dependen de múltiples factores, entre ellos el origen floral.

El presente proyecto pretende clasificar mieles mexicanas de tres orígenes florales (mezquite, naranjo y mantequilla) mediante el análisis estadístico multivariable de su perfil espectral de RMN de protón (^1H -RMN) y conocer los metabolitos que hacen la diferenciación. Las mieles estudiadas fueron proporcionadas por la Asociación Ganadera Nacional de Criadores de Abeja Reina y Núcleos (ASGANAREN). Las muestras fueron recolectadas directamente de diferentes apiarios y el origen floral de cada una fue declarado por el apicultor.

2. HIPÓTESIS

Las muestras de miel de diferente origen floral presentan cambios en su perfil metabolómico que pueden ser detectados mediante ^1H -RMN y análisis estadístico multivariante.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Realizar el análisis de mieles de tres orígenes florales: mantequilla, mezquite y naranjo; mediante el perfil metabolómico basado en ^1H -RMN y análisis estadístico multivariante para su clasificación.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer el método de preparación y análisis de las muestras de miel para su estudio por ^1H -RMN.
- Determinar, mediante el análisis quimiométrico de los datos espectrales de ^1H -RMN, las similitudes y/o diferencias entre las muestras de mieles.
- Identificar los metabolitos responsables de la diferenciación de las muestras.

4. ANTECEDENTES

4.1. LA MIEL

La miel es un alimento producido a partir del néctar, secreciones de flores o de excreciones de insectos que las abejas recogen, transforman, combinan con sustancias específicas propias, almacenan y dejan en el panal para que madure. (1–3)

4.1.1. LA MIEL EN MÉXICO

La apicultura en México es una de las principales actividades pecuarias y es parte fundamental de las actividades económicas y sociales. Durante los siglos XVI, XVII y XVIII se practicaba únicamente la meliponicultura, ya que en el país sólo existía la abeja melipona o abeja sin aguijón. En el siglo XIX, se introdujo la apicultura con la abeja *Apis mellifera* que predomina hasta nuestros días.

México cuenta con más de 40,000 apicultores, es el sexto productor a nivel mundial y el tercer exportador de miel. Se estima que la producción en el país ronda en 57,000 toneladas al año, siendo en la Península de Yucatán donde se concentra más del 35% de esta producción. (4–6)

De acuerdo a los diferentes climas y floras de México, existen diversos grados de desarrollo de los grupos de apicultores, lo cual se refleja en la variedad de la producción de mieles en cuanto a sus características de humedad, color, aroma y sabor. Con el fin de clasificar algunas características semejantes, el país se divide en cinco regiones apícolas (Figura 1), las cuales son:

1. **Región Norte:** Su principal producción es la miel de mezquite, una miel extra clara color ámbar.
2. **Región del Golfo:** Gran producción de miel de cítricos, de colores ámbar clara a colores oscuros, producidos principalmente a partir de la flor del naranjo.
3. **Región de la Costa del Pacífico:** Producción de mieles principalmente oscuras, de origen multifloral y de mangle.
4. **Región del Altiplano:** Producción de miel ámbar, miel clara y de las denominadas mantequilla, siendo el principal origen miel multiflora, acahual y acetilla.
5. **Península de Yucatán:** la miel que se cosecha es reconocida a nivel internacional, se caracteriza por tener su origen en floraciones únicas como son la de Dzitzilché y Tajonal. (7)



Figura 1. Mapa de la República Mexicana dividido en las cinco regiones apícolas (2010), Recuperado de: <https://info.aserca.gob.mx/claridades/revistas/199/ca199-3.pdf>

4.1.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA MIEL

La composición de la miel es importante, ya que proporciona características organolépticas únicas como color, aroma, sabor, etc.(8,9) La composición depende de diversos factores, entre ellos: el origen floral (botánico) y geográfico del néctar recolectado por las abejas, las especies de abejas involucradas, y las condiciones climáticas y de almacenamiento.(8,10–12)

La miel se encuentra conformada principalmente por carbohidratos (fructosa, glucosa, maltosa y sacarosa), agua, aminoácidos libres, proteínas, enzimas, ácidos orgánicos, vitaminas, minerales, compuestos aromáticos, compuestos volátiles, más de 200 fitoquímicos y granos de polen.(1,13–17)

Los monosacáridos son los carbohidratos más abundantes y llegan a más del 60% de la constitución de las mieles. La fructosa se encuentra generalmente en una mayor proporción, cerca de 38.5%; la glucosa aproximadamente en 31.0%, seguidos por disacáridos y trisacáridos. Estos dos últimos se hidrolizan enzimáticamente a monosacáridos.(1,12,18–20)

El agua es el segundo principal componente de la miel, la concentración puede variar del 15% al 21%, este valor se puede ver alterado ya que la miel es higroscópica.(15,21)

Las proteínas y los aminoácidos en las mieles se atribuyen al polen y a los líquidos o secreciones provenientes de las abejas. La cantidad de proteína depende de la especie de las abejas. La miel de *Apis mellifera* contiene entre 0.2% y 1.6%, y 1.0% de aminoácidos. Algunos de los aminoácidos presentes en la miel son: alanina,

glutamina, arginina, histidina, treonina, valina, leucina, fenilalanina y prolina; siendo esta última la más abundante.(22–26)

Los ácidos orgánicos se producen a partir de las azúcares por acción de las enzimas de las abejas y representan aproximadamente un 0.57% de la composición de la miel. Entre ellos se encuentran el ácido cítrico, acético, butírico y glucónico, que es el que está en mayor proporción.(12,14,27)

Las vitaminas y los minerales están presentes en la miel en muy pequeñas cantidades. El complejo B y la vitamina C se conservan en la miel gracias a su bajo pH. Minerales como el potasio, magnesio, calcio, sodio, zinc y selenio, representan de 0.04 a 0.2%.(28,29)

Los compuestos fenólicos (ácido cafeico, ácido hidroxibenzoico, ácido ferúlico, quercetina, pinocembrina, ácido gálico, etc.), son ampliamente estudiados debido a sus propiedades benéficas para la salud humana. A los flavonoides se les atribuye, en mayor medida, su poder antioxidante.(30–33)

Debido a la composición química, las condiciones de almacenamiento y calentamiento, son determinantes para la formación de productos indeseables en la miel producidos por diversas reacciones como la de *Maillard*. En esta se lleva a cabo la reacción del grupo carboxílico del azúcar reductor y el grupo amino libre de aminoácidos y proteínas dando como resultado principalmente furfural y 5-hidroximetilfurfural (5-HMF). Esto reduce el valor nutrimental de las mieles ya que consume los aminoácidos esenciales.(1,10,34–36)

La composición específica depende de cada miel, el CODEX y la legislación mexicana dictan ciertos valores que deben cumplir algunos compuestos (Tabla 1).(1,13)

Tabla 1. Concentraciones que deben cumplir los compuestos de acuerdo al CODEX o la legislación mexicana.

Compuesto	Concentración % (p/p) NOM-004-SAG/GAN-2018	Concentración % (p/p) CODEX
Fructosa+Glucosa	Mínimo 60	Mínimo 60
Sacarosa	Máximo 5	Máximo 15, 10 o 5 dependiendo del origen floral
Glucosa	Mínimo 38	No reporta
Humedad	Máximo 20	Máximo 20
Sólidos insolubles en agua	Máximo 0.3	Máximo 0.1
Hidroximetilfurfural (5-HMF)	Máximo 0.004 miel envasada menos de seis meses	Máximo 0.004 mieles después del procesamiento

	Máximo 0.008 miel envasada más de seis meses	Máximo 0.008 mieles de origen declarado (temperaturas tropicales)
--	--	---

4.1.3. CLASIFICACIÓN DE LA MIEL

El CODEX Alimentarius, es una colección de normas aceptadas por 189 países, entre ellos México. De acuerdo al CODEX, la miel puede ser clasificada según: su origen (flor, néctar o mielada), su método de elaboración (centrifugada, prensada o escurrida) y su presentación (líquida, cristalizada, mezclada, en panal, en trozos, cremosa o montada).(1)

Las normas y textos afines del CODEX son de carácter voluntario y sirven como referencia ya que cada país regula conforme a su propia legislación. La legislación mexicana define diferentes mieles: la miel del néctar de las flores, miel de mielada o mielatos, miel en panal, miel líquida, miel cristalizada y miel orgánica; y establece que la miel se puede encontrar de forma natural en estado líquido, con presencia parcial o total de cristales y en panal. También determina que la miel puede designarse con el nombre de la región geográfica o topográfica en la que ha sido producida; o bien, de acuerdo a su origen floral.(2,13) Hoy en día, la tendencia del mercado demuestra la preferencia de los consumidores en productos diferenciados por su origen floral.(37–39) Sin embargo, en México, la forma más común de comercialización de la miel es a granel, por lo que a menudo no se diferencian los orígenes, ya que las acopiadoras mezclan las mieles que llegan de distintos productores.(40)

4.1.4. DETERMINACIÓN DEL ORIGEN FLORAL

Para determinar el origen floral de la miel se hacen diferentes análisis, tales como sensoriales, fisicoquímicos y polínicos. Los resultados de los análisis melisopalinológicos son dependientes de las plantas de donde proviene la miel, ya que el análisis de polen consta de la identificación y recuento de los granos de polen, clasificándola como monofloral o multifloral (polifloral) dependiendo del porcentaje de granos de polen de cada clase. Por lo general, para ser monofloral, el polen predominante de una flor debe estar presente en más del 45%. Los análisis melisopalinológicos requieren de mucho tiempo y presentan ciertas limitaciones, por ejemplo, en las mieles que provienen de plantas cuyas flores son pobres en polen, como algunos cítricos, no es posible establecerlas como monoflorales.(1,8,13,41)

Es importante considerar que las abejas utilizan múltiples fuentes de néctar, esta variabilidad natural complica la caracterización de la miel y la determinación de su origen floral debido a que algunas características de una fuente de néctar pueden dominar sobre otras, aunque se encuentren presentes en proporciones bajas.(8,42,43)

Si bien, los análisis fisicoquímicos y los melisopalinológicos permiten una evaluación de la calidad y clasificación de acuerdo con el origen, tienen a menudo una alta variabilidad en los resultados y requieren mucho tiempo. Hoy en día se necesitan métodos rápidos y confiables de análisis razón por la cual la metabolómica representa una opción para la detección del origen de la miel. (3,44,45)

4.2. METABOLÓMICA

La metabolómica es la disciplina ómica de más reciente aparición, se encarga del estudio global de los metabolitos y su dinámica, composición, interacciones y respuestas a intervenciones ambientales, o cambios en una matriz biológica.(46,47)

La finalidad de la metabolómica es detectar si existe una diferencia significativa entre los grupos de muestras estudiadas mediante el uso de tecnologías analíticas. Esto con el objetivo de visualizar tendencias y correlaciones para construir modelos predictivos y así, clasificar nuevas muestras con la aplicación de métodos estadísticos multivariantes. (48,49)

La metabolómica puede ser abordada desde dos enfoques distintos de acuerdo al objetivo del estudio: metabolómica no dirigida, que es el análisis exhaustivo de todos los compuestos o de todo el perfil; y metabolómica dirigida, que involucra el análisis de metabolitos específicos.(47,50,51)

Para definir el flujo de trabajo en la metabolómica es necesario establecer el tipo de estudio (dirigido o no dirigido), la forma de la muestra (sólida o líquida), la instrumentación disponible, la detección, el procesamiento y el análisis de datos. (52)

4.2.1. METABOLÓMICA DE ALIMENTOS

La metabolómica de alimentos, también conocida como *foodomics*, se refiere a la aplicación de la metabolómica a sistemas alimentarios con diversos fines como el estudio de la nutrición y el efecto de los alimentos en la salud, por lo que recientemente se ha aplicado para analizar los componentes funcionales activos, (53–55) los ingredientes peligrosos,(56,57) en el control de calidad(58,59) y la autenticación.(60,61).

En los últimos años se ha incrementado el uso de la metabolómica para el estudio de los alimentos debido a la gran cantidad de información que el metaboloma proporciona acerca de la muestra.

4.2.2. PLATAFORMAS ANALÍTICAS

Los métodos analíticos más utilizados en metabolómica son: la espectrometría de masas (EM) y la espectroscopia de RMN. La EM es ampliamente utilizada acoplada a técnicas como la cromatografía líquida, la cromatografía de gases o, en menor medida, a la electroforesis capilar; tiene alta sensibilidad y selectividad. Sin

embargo, necesita de un tratamiento previo de la muestra y es una técnica destructiva. Por otra parte la RMN no es destructiva, no necesita pretratamiento de las muestras y es rápida, puede detectar y cuantificar simultáneamente decenas de componentes a través de un sólo experimento con alta repetibilidad y reproducibilidad.(62,63)

4.2.1.1 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

La RMN es una espectroscopia cuyo fundamento radica en la propiedad que poseen los núcleos atómicos con número impar de protones o neutrones, o de ambos (^1H , ^{13}C , ^{31}P , etc) de absorber energía electromagnética cuando son sometidos a un campo magnético externo (B_0) y a radiofrecuencias (rf). Estas absorciones dependen del tipo de núcleo y del ambiente químico en el que se encuentran. Este tipo de núcleos son magnéticamente activos, es decir, poseen espín diferente de cero y en ausencia de un campo magnético se orientan al azar (Figura 2A). Al colocar un B_0 (Figura 2B), se comportan como pequeños imanes y se orientan en un estado de mínima energía a favor de B_0 (estado α) o en un estado de mayor energía en contra de B_0 (estado β). Esta distribución está ligeramente a favor de B_0 y sigue una distribución de Boltzmann (Figura 2C). La diferencia entre los dos niveles de energía depende de la intensidad de B_0 y de la constante giromagnética, que es una propiedad intrínseca del núcleo.

Al irradiar la muestra con un pulso de rf, los espines nucleares en el estado de espín α son promovidos al estado de espín β (fenómeno de resonancia). Al detener la rf, vuelven a su estado inicial mediante un movimiento de precesión conocido como frecuencia de Larmor y emiten señales cuya frecuencia depende de la diferencia de energía entre los estados de espín α y β (Figura 2D). El espectrofotómetro de RMN detecta estas señales como una gráfica de tiempo frente a intensidad, generando un gráfico de decaimiento de inducción libre (FID, Figura 2E). Al aplicar la transformada de Fourier, la señal de tiempo se convierte en una señal de frecuencia, generando así el espectro de RMN (Figura 2F).(48,64)

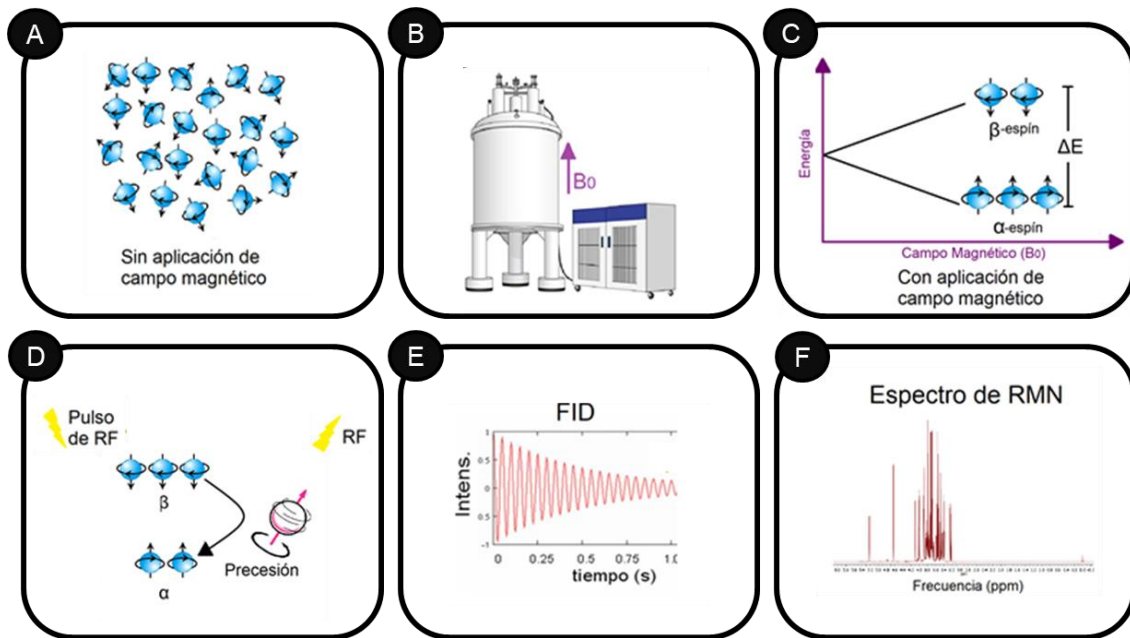


Figura 2. Esquema general del fundamento de RMN. A) Espines nucleares en ausencia de B_0 orientados al azar. B) Aplicación de B_0 en un equipo de RMN. C) Orientación de los espines a favor o en contra del B_0 . D) Irradiación por un pulso rf en el que los espines invierten su sentido E) Detección de la FID mientras los espines vuelven a su estado inicial. F) Generación del espectro de RMN con la transformada de Fourier.

Los componentes fundamentales del espectrómetro de RMN son:

1. Imán superconductor que genera el B_0 .
2. Sonda con bobinas para excitar y detectar los espines nucleares.
3. Transmisor de pulsos de rf que genera la frecuencia.
4. Detector para medir la absorción de energía de rf por parte de la muestra.
5. Amplificador para aumentar la respuesta detectada.
6. Filtro digital que convierte la señal.
7. Computadora para realizar las gráficas que forman el espectro de RMN.(48)

El espectro de RMN da información del número y tipo de núcleos no equivalentes en una muestra a través del desplazamiento químico (δ), el acoplamiento espín-espín y el área bajo la curva.(48)

El δ hace referencia a la posición del núcleo en el espectro, lo determina el entorno químico del núcleo y, por tanto, da información de los grupos funcionales a los que pertenece o que están cerca. Los núcleos que están protegidos o apantallados, debido a una nube electrónica de alta densidad, resuenan en δ más bajos (campo alto), mientras que los núcleos menos protegidos tienen señales en δ más altos (campo bajo). Los valores típicos del rango de δ para $^1\text{H-NMR}$ son de 0 a 12 ppm,

por lo regular el 0 ppm se establece con base en un estándar interno reconocido internacionalmente, el tetrametilsilano (TMS).(48,64,65)

El acoplamiento espín-espín se da cuando los espines magnéticos de dos tipos diferentes de protones interactúan ocasionando un desdoblamiento de las señales en multipletes. El número de señales que aparecen al acoplarse dos protones está dado por $n+1$, siendo n el número de núcleos que se acoplan al núcleo de interés. Las distancias entre picos de los multipletes, medida en Hz, dan información estructural y es denominada constante de acoplamiento (J). (48,65)

El área bajo la curva es proporcional al número de núcleos que generan esa señal, al integrarla, proporciona el número relativo de núcleos.(48,63)

Tomando en cuenta la naturaleza y la complejidad de gran parte de las matrices estudiadas en metabolómica, es necesaria la supresión de la señal del disolvente utilizado o del agua que contienen las muestras. Esto debido a que, al ser esta señal la más intensa en los espectros de RMN, impide la observación de las señales más pequeñas correspondientes a los metabolitos que están en menor concentración. Una de las formas más utilizadas para aminorar este efecto y obtener espectros interpretables es la presaturación de la señal del disolvente y/o del agua.(66)

4.3. METABOLÓMICA POR RMN EN MIELES

En los últimos años los estudios de mieles en metabolómica basada en RMN se han incrementado debido a las múltiples ventajas que esta técnica presenta en el análisis de muestras complejas. Existen diversas metodologías reportadas, algunos autores estudian los componentes minoritarios para encontrar biomarcadores en extractos orgánicos, mediante extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida.(8,67,68),(69) En la mayoría de los estudios se utiliza un mínimo pretratamiento de muestra para aprovechar las ventajas de la técnica, es decir se hacen análisis directos, se pesa una cantidad de miel en el orden de miligramos y se disuelven en agua o en DMSO, siendo en D_2O la metodología más empleada.(8,45,70,71) Es importante considerar que cualquier manipulación de la muestra representa una fuente potencial de errores experimentales, por lo tanto se debe mantener al mínimo posible con el fin de evitar la introducción de cualquier variabilidad no deseada, ya que esta podría superar la varianza biológica.(72)

La composición y la cuantificación de los compuestos en la miel, son de los aspectos más estudiados ya que se han incrementado las prácticas de adulteración, incluso la empresa Bruker tiene una herramienta comercial llamada “NMR Honey-Profilng” para la evaluación de calidad y la detección de adulteración de mieles.(73) También ha sido analizado el perfil de los carbohidratos presentes en esta matriz como glucosa, fructosa, turanosa, maltosa y panosa, entre otros.(74)

En la literatura se encuentra reportado el análisis de mieles monoflorales, multiflorales, de diferentes orígenes botánicos y geográficos, y se ha logrado

detectar adición de azúcares en porcentajes menores al 10%.(45) También, está reportada la comparación de mieles chinas auténticas con adulteradas.(70) (75)

La discriminación por su origen botánico ha sido ampliamente estudiada. Esta reportado el estudio de mieles brasileñas (flores silvestres, cítricos y eucalipto), (76) italianas (miel sulla, eneldo, limón, naranja y míspero), (77) y finlandesas (trigo sarraceno, arándano rojo, trébol, multifloral, etc.).(42) Se ha logrado discriminar mieles monoflorales por los componentes no azucarados (azufaifa, casta y algarrobo).(78) Se han establecido biomarcadores específicos para algunas mieles de determinados orígenes, por ejemplo metilglioxal, leptosperina y dihidroxiacetona para la miel de manuka de Nueva Zelanda y Australia.(79) La relación de los carbohidratos en la miel madura es estable, por ello sus señales de ^1H -RMN pueden ser consideradas como huella dactilar para la clasificación de muestras por su origen floral.(80,81) Algunos autores consideran que esto aplica en el caso de mieles monoflorales con una alta cantidad de un azúcar dominante.(82) Mientras que otros autores concluyen que los carbohidratos por sí solos no son suficientes para poder caracterizarlas por su origen.(83–86)

También se han clasificado las mieles de acuerdo a su origen geográfico. Por ejemplo, se analizaron muestras de miel chinas de ocho orígenes botánicos, tres orígenes geográficos y cinco fechas de producción.(80) Miel griega de pino y abeto se discriminaron en 8 regiones;(87) y mieles de Sudáfrica, Eslovaquia y Zambia que se agruparon de acuerdo a su origen.(71)

Respecto a mieles mexicanas utilizando RMN no se ha encontrado nada reportado en la literatura. Considerando el lugar que ocupa México como productor y exportador de miel a nivel mundial, es de suma importancia desarrollar proyectos de investigación como el presente estudio para mejorar el posicionamiento de la miel mexicana en el mercado internacional.

4.4. QUIMIOMETRÍA

La miel es un alimento muy complejo debido a su constitución, esto se refleja en el alto grado de solapamiento de las señales en los espectros de RMN sobre todo en la zona de los carbohidratos, lo que dificulta su interpretación.

Los espectros de RMN representan una gran cantidad de datos numéricos, por ello resulta necesario el uso de técnicas estadísticas multivariantes para evaluar la variabilidad entre las muestras y reconocer patrones químicos. A estos métodos analíticos se les conoce como métodos quimiométricos.(48)

La quimiometría se define como la disciplina química que utiliza matemáticas y estadística, entre otros métodos que emplean la lógica formal, para extraer la cantidad máxima de información significativa de los datos disponibles (espectros de RMN, o una matriz de datos).(88,89)

Existen dos enfoques en estadística multivariante para los métodos de reconocimiento de patrones:

- No supervisados: generalmente representan el primer paso en el análisis de datos, se realizan sin conocimiento previo de la muestra para resumir, explorar y descubrir grupos, ayudando a visualizar los datos y encontrar posibles valores atípicos. El método más representativo es el Análisis de Componentes Principales (PCA).(48,51)
- Supervisados: utilizan el conocimiento previo de las muestras para generar modelos que se centren en los efectos de interés, con el propósito de encontrar uno que pueda hacer predicciones en la clasificación de muestras futuras. El método más común es el Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA).(48,50,51)

El PCA reduce la dimensión de datos proyectándolos en un nuevo espacio utilizando pocas dimensiones. El gráfico de dispersión o *scores* proporciona una visión del agrupamiento y valores atípicos; y consta de dos o tres componentes principales (PCs) y puntos que representan las muestras. Los PCs son combinaciones lineales de las variables originales y explican una cierta cantidad de varianza. El gráfico de cargas o *loadings* muestra la importancia de las variables. (48,90)

El PLS-DA es una técnica en la que se tiene la información de la pertenencia de clase y se utiliza para optimizar la separación entre grupos de muestras. Relaciona la matriz de datos X la cual contiene observaciones y variables discretas (muestras y bins) con la matriz Y que contiene observaciones (muestras) y variables (clases, propiedades, etc). Tiene como objetivo maximizar la covarianza y debe usarse con precaución porque es una técnica supervisada y siempre conduce a una separación de las diferentes clases, incluso si no hay una diferencia real entre ellas. Los indicadores más comunes para la confiabilidad del modelo son R^2 (ajuste de los datos) y Q^2 (predictibilidad del modelo).(48,91) Esta técnica es actualmente la más utilizada para discriminar las muestras de acuerdo al origen.(92)

El análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA), otro método supervisado, es una actualización del PLS-DA eliminando la variación ortogonal sistemática de la respuesta.(70)

5. METODOLOGÍA

5.1. MUESTRAS

Se analizaron un total de 17 muestras de mieles mexicanas de diferentes orígenes botánicos y geográficos (Tabla 2) proporcionadas por la ASGANAREN. Las mieles fueron obtenidas directamente de diferentes apiarios y el origen floral de cada una fue declarado por el apicultor. Las muestras de miel se almacenaron en obscuridad en frascos de plástico con tapa de rosca a 20° C hasta su análisis.

Tabla 2. Información de las mieles analizadas.

Clave	Ciudad	Estado	Tipo de miel
01-007-03-01	Rincón de Romos	Aguascalientes	Mezquite
01-007-03-02	Rincón de Romos	Aguascalientes	Mezquite
01-007-03-03	Rincón de Romos	Aguascalientes	Mezquite
01-007-03-04	Rincón de Romos	Aguascalientes	Mezquite
01-007-03-05	Rincón de Romos	Aguascalientes	Mezquite
01-011-02-02	San Fco. de los Romo	Aguascalientes	Mezquite
19-124-28-03	Zapotlanejo	Jalisco	Mezquite
29-013-01-01	Huamantla	Tlaxcala	Mantequilla
29-013-01-19	Huamantla	Tlaxcala	Mantequilla
29-013-01-20	Huamantla	Tlaxcala	Mantequilla
29-013-01-21	Huamantla	Tlaxcala	Mantequilla
30-102-01-03	Mtz. De la Torre	Veracruz	Naranja
30-102-01-06	Mtz. De la Torre	Veracruz	Naranja
30-102-01-07	Mtz. De la Torre	Veracruz	Naranja
30-102-01-08	Mtz. De la Torre	Veracruz	Naranja
30-102-01-17	Mtz. De la Torre	Veracruz	Naranja
30-102-01-18	Mtz. De la Torre	Veracruz	Naranja

5.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de miel se colocaron en un baño de agua durante 15 min a una temperatura máxima de 40 °C, después de ello se homogenizó durante 1 min con un agitador de vidrio. Se pesaron 5 g de cada muestra y se disolvieron a 50 mL con agua destilada. La mezcla se agitó manualmente durante 40 minutos y se centrifugó a 3500 rpm durante 30 min a 15°C. Se tomaron 450 µL del sobrenadante y se diluyeron en un criovial de 2 mL con 450 µL de agua destilada para llegar a concentración de 50 mg/mL. Se colocó en un vórtex durante 30 s. Posteriormente, se adicionó 100 µL de buffer de fosfatos (pH 3.10, 1M, en D₂O con 0.1% de ácido trimetilsililpropanóico (TSP) como referencia interna) y se ajustó el pH de la muestra con ácido clorhídrico [1M] e hidróxido de sodio [1M] utilizando el BTpH (Bruker). La mezcla se agitó en el vórtex durante 30 s más. Finalmente, se transfirió una alícuota

de 600 μL de cada muestra con pH ajustado a un tubo de RMN de 5 mm para la adquisición de los experimentos.

5.3. ADQUISICIÓN DE EXPERIMENTOS DE RMN

Los experimentos de RMN se realizaron a 300 K en un espectrómetro Bruker Avance III HD de 16.44 Teslas (frecuencia para ^1H 699.96 MHz) equipado con una sonda criogénica de triple sintonía de 5 mm y un automuestreador "Sample Jet" (Figura 3).

Todos los espectros de ^1H -RMN se adquirieron con la secuencia de pulsos NOESYPR1D con presaturación de la señal del agua y con los siguientes parámetros: retardo entre pulsos (D1): 4s, tiempo de adquisición (AQ): 2.3243 s, número de transientes (NS): 32, número de transientes ficticios (DS): 4, ventana espectral (SW): 14097.7 Hz y ganancia (RG): 16. La adquisición de los espectros se llevó a cabo de manera automática con el software IconNMR (Bruker). Las FIDs fueron multiplicadas por una función exponencial con un ancho de línea de 0.3 Hz antes de aplicar la Transformada de Fourier.



Figura 3. Espectrómetro Bruker Avance III de 16.44 Tesla (700 MHz para ^1H).

5.4. PROCESAMIENTO DE ESPECTROS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El procesamiento de espectros se realizó con el software TopSpin 3.5 (Bruker, Alemania). La corrección de fase se hizo de manera manual y la de línea base se

hizo de manera automática. Los desplazamientos químicos se referenciaron a la señal de TSP (0.0 ppm).

Utilizando el software Chenomx 8.4 (Chenomx NMR Suite, Canadá) se realizó una reducción de dimensionalidad por generación de cajas homogéneas (binning) con un tamaño de 0.04 ppm en la región de -0.02 - 10.02 ppm, dando un total de 239 cajas. Se normalizó al total de área excluyendo la región de la señal residual del H₂O (4.58 - 5.02 ppm) y la del TSP (-0.02 - 0.02 ppm).

La matriz se exportó al programa SIMCA 16.0 (Unimetrics, Suecia) y se incluyó una columna con la clasificación de las muestras de acuerdo con su origen floral. Se realizó análisis estadístico multivariado, PCA y PLS-DA. Para todos los modelos realizados se utilizó escalado Pareto.

5.5. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS

Para la identificación de metabolitos se utilizó el software de reconocimiento de patrones Chenomx, el MestReNova 12.0.0 (Mestrelab Research S.L. 2017) y datos reportados en la literatura considerando los desplazamientos químicos, las constantes de acoplamiento y la multiplicidad.

5.6. RELACIÓN FRUCTOSA-GLUCOSA

Los espectros procesados con el TopSpin se exportaron al Chenomx, en donde se realizó la cuantificación de la fructosa y la glucosa utilizando el TSP como estándar interno. El área de las señales se ajustó manualmente y, posteriormente se calculó la relación entre ambos metabolitos.

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS EN LOS ESPECTROS DE ¹H-RMN

Se obtuvieron los espectros de ¹H-RMN de las 17 muestras de miel: 7 de mezquite, 4 de mantequilla y 6 de naranjo. En la Figura 4 se muestran los espectros superpuestos junto con la asignación de algunos de los 28 metabolitos identificados y en la Tabla 3 se enlistan junto con el δ , la multiplicidad, la asignación y la *J* de las señales utilizadas para su identificación. Se puede observar que las señales más intensas son las de fructosa y glucosa (δ 3.0–5.5 ppm). Otros carbohidratos encontrados son la xilosa, rafinosa, kojibiosa, trehalosa, nigerosa, sacarosa y maltosa. Los ácidos orgánicos presentes en las muestras de miel analizadas son fórmico, cítrico, succínico, acético y láctico. Se identificaron algunos aminoácidos como tirosina, prolina, fenilalanina, alanina y valina. También se encontraron otros compuestos como cafeína, colina, etilenglicol y etanol.

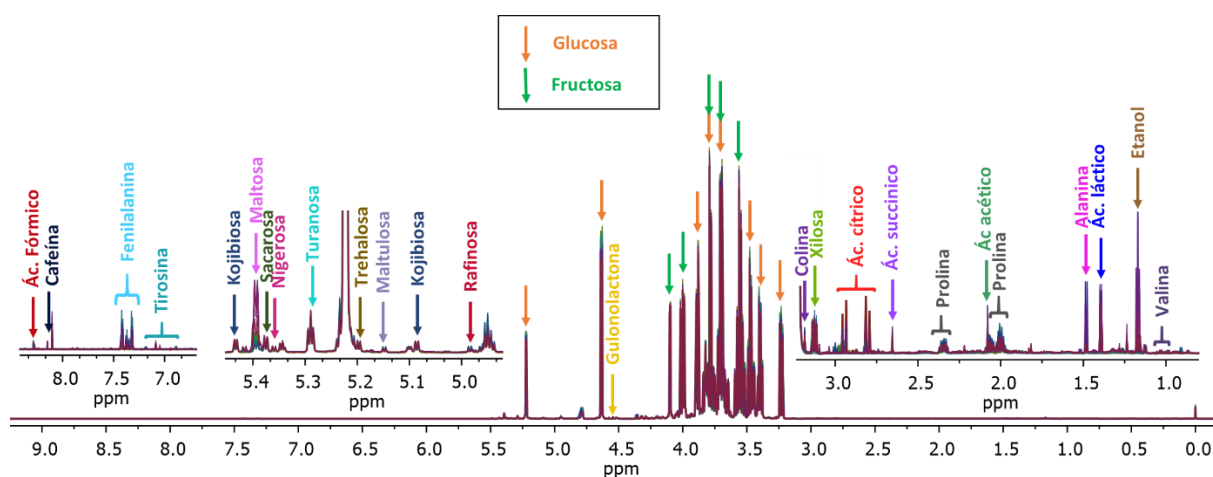


Figura 4. Espectros superpuestos de ¹H-RMN (700 MHz, H₂O/D₂O, 300 K) de las 17 muestras de mieles mexicanas de diferente origen botánico con la identificación de algunos metabolitos.

Tabla 3. Tabla de los metabolitos identificados en las muestras de miel.

Compuesto	Desplazamiento químico δ ppm (multiplicidad, asignación, <i>J</i> = Hz)
Ácido acético	2.08 (s, CH ₃)
Ácido cítrico	2.95 (d, CH ₂ ,15.7), 2.81 (d, CH ₂ ,15.7)
Ácido fórmico	8.29 (s, CH)
Ácido láctico	1.40 (d, CH ₃ , 7.0)
Ácido succínico	2.66 (s, CH ₂)
Alanina	1.49 (d, CH ₃ , 7.3)

Cafeína	8.15 (s, CH)
Colina	3.88 (s, CH ₃)
Etanol	1.17(t, CH ₃ , 7.1)
Etilenglicol	3.65 (s, CH ₂)
Fenilalanina	7.32 (m, H ₂ , H ₆), 7.37 (m, H ₄), 7.42 (m, H ₃ , H ₅)
Fructosa	4.10 (dd, 3.4, 0.9), 4.01(dd,12.8, 1.4), 3.79 (d, 10.0), 3.59 (d, 12.1), 3.56 (d, 11.7)
Glucosa	5.22 (d, αH ₁ , 3.8), 4.63 (d, βH ₁ , 8.0), 3.52 (dd, αH ₂ , 9.9, 3.8), 3.48 (t, βH ₃ , 9.2), 3.45 (m, βH ₅), 3.40 (m, α-βH ₄), 3.24 (dd, βH ₂ , 9.4,8.0),
Gulonolactona	4.55 (s, H ₁), 4.52 (s, H ₂)
Kojibiosa	5.43 (d, βH ₁ , 3.5), 5.09 (d, αH ₁ , 3.8)
Maltosa	5.40 (d, H ₁ , 3.9), 3.27 (dd, H ₄ , 9.6, 7.9)
Maltulosa	5.15 (d, H ₁ , 3.8), 4.32 (d, H ₇ , 7.3), 4.28 (d, H ₉ , 7.5)
Nigerosa	5.20 (d, H ₁ , 3.7)
Prolina	2.01 (m, CH ₂), 2.35 (m, CH)
Rafinosa	4.98 (d, H ₁ , 3.7)
Sacarosa	5.42 (d, H ₁ , 3.9)
Tirosina	6.89(d, H ₃ , H ₅ , 8.5), 7.17(d, H ₂ , H ₆ , 8.5)
Trehalosa	5.20 (d, H ₁ , 3.7)
Turanosa	5.29 (d, H ₁), 4.25 (H ₁₄ ,d, 5.1)
Valina	0.99 (d, CH ₃ , 7.0), 1.04 (d, γCH ₃ , 7.0)
Xilosa	3.13 (dd, H ₁ , 9.4, 8.0)
5-HMF	9.45 (s, H ₁)

6.2. ANÁLISIS DE LOS ESPECTROS DE ¹H-RMN DE LAS MIELES ESTUDIADAS

En la Figura 5 se muestran los espectros superpuestos de las muestras de miel de cada uno de los 3 orígenes florales estudiados. En las mieles de naranja la mayoría de las señales de la región alifática (δ 0.0–3.0 ppm) son más intensas, como las de alanina, ácido láctico, ácido acético y ácido succínico. Mientras que las muestras de mezquite, presentan una mayor intensidad en las señales del ácido cítrico y no tienen etanol. En la región de los carbohidratos (δ 3.0–5.5 ppm) todos los espectros son similares, a excepción del incremento de maltosa observado en las muestras de miel de naranja. En la región correspondiente a las señales aromáticas (δ 6.5–8.5 ppm), sólo las mieles de naranja tienen cafeína.

De los compuestos identificados, en la Tabla 4, se indica cuáles están presentes o ausentes en las muestras de miel de los tres orígenes florales.

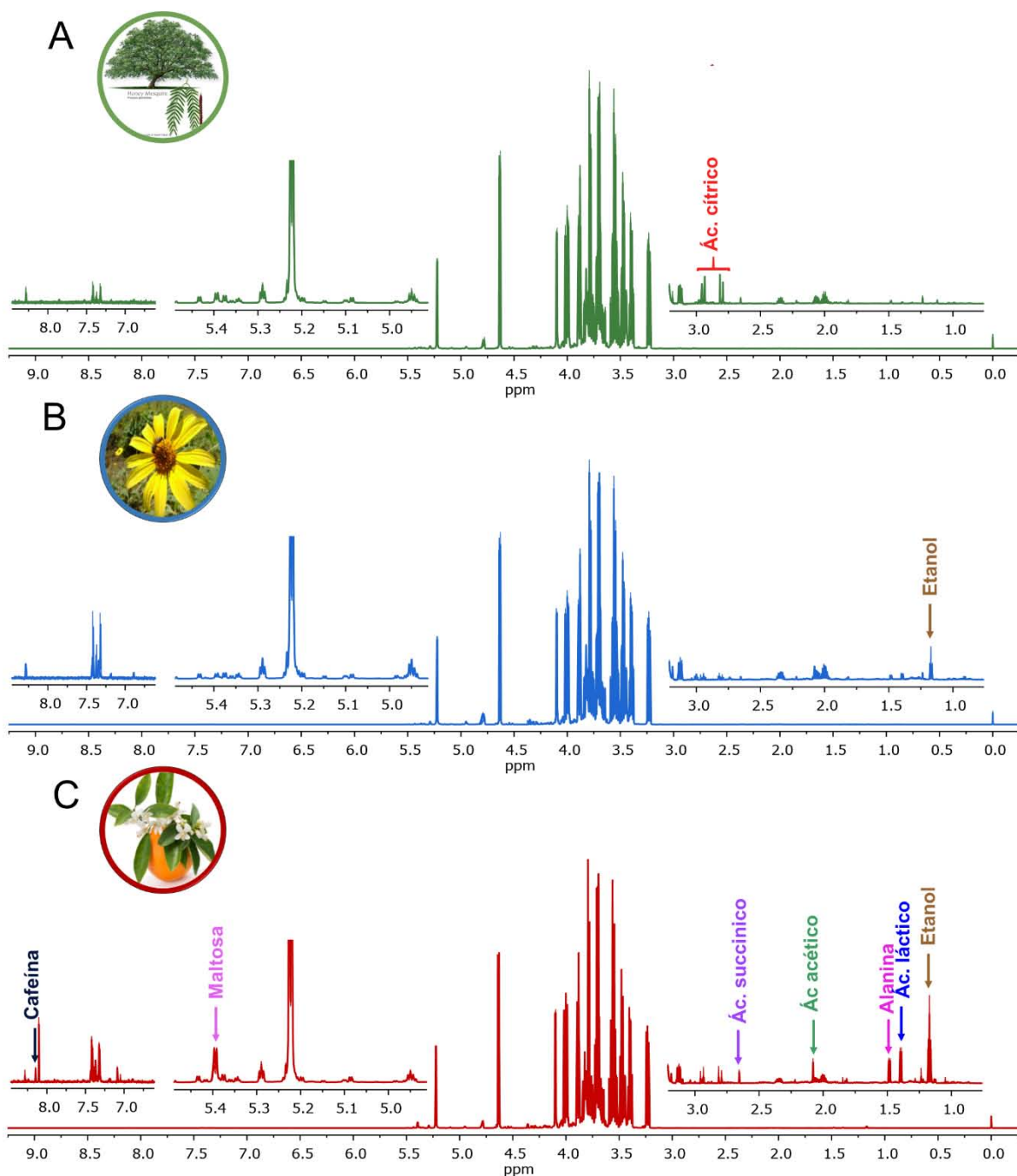


Figura 5. Espectros ¹H-RMN (700 MHz, H₂O/D₂O, 300 K) superpuestos y con las ampliaciones de ciertas regiones de: A) siete muestras de miel de mezquite, B) cuatro muestras de miel de mantequilla y C) seis muestras de miel de naranja.

Tabla 4. Tabla con metabolitos presentes en las muestras de miel.

Compuesto	Naranja	Mantequilla	Mezquite
Ácido acético	✓	✓	✓
Ácido cítrico	✓	✓	✓
Ácido fórmico	✓	✓	✓
Ácido láctico	✓	✓	✓
Ácido succinico	✓	✓	✓
Alanina	✓	✓	✓
Cafeína	✓	X	X
Colina	✓	✓	✓
Etanol	✓	✓	X
Etilenglicol	✓	✓	✓
Fenilalanina	✓	✓	✓
Fructosa	✓	✓	✓
Glucosa	✓	✓	✓
Kojibiosa	✓	✓	✓
Gulonolactona	✓	✓	✓
Maltosa	✓	✓	✓
Maltulosa	✓	✓	✓
Nigerosa	✓	✓	✓
Prolina	✓	✓	✓
Rafinosa	✓	✓	✓
Sacarosa	✓	✓	✓
Tirosina	✓	✓	✓
Trehalosa	✓	✓	✓
Turanosa	✓	✓	✓
Valina	✓	✓	✓
Turanosa	✓	✓	✓
Xilosa	✓	✓	✓
5-HMF	✓	X	✓

6.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIANTE

Los 17 espectros de ¹H-RMN de las muestras de miel fueron sometidos a análisis no supervisado PCA para explorar y visualizar variaciones y posibles patrones en los datos (Figura 6). El modelo resultante tiene valores de ajuste $R^2X = 0.862$ y de predicción $Q^2 = 0.82$, con 2 PCs; donde el PC1 describe el 68% de la variación espectral, mientras que el PC2 describe el 18%. El resultado muestra que el modelo permite la discriminación entre las muestras, las cuales se separan en tres grupos distintos, agrupándose de acuerdo con su origen floral.

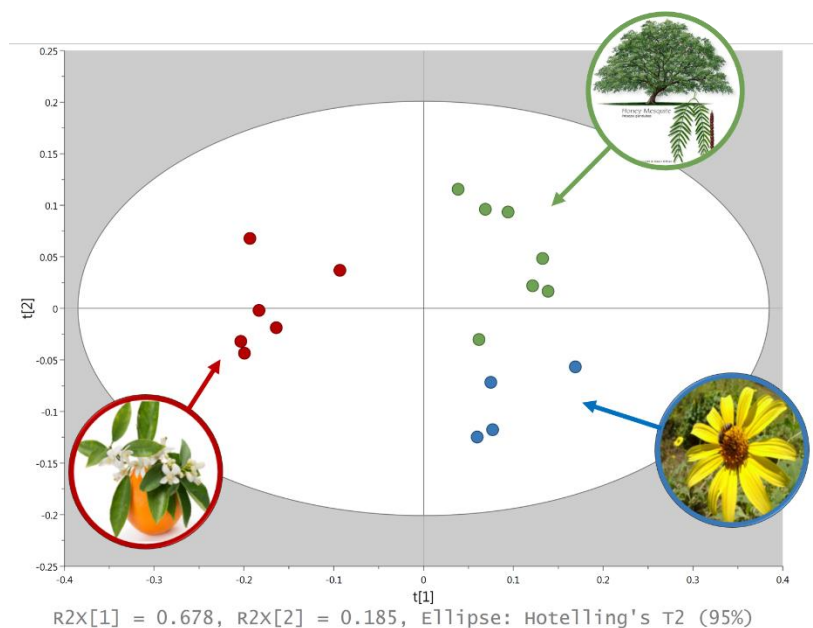


Figura 6. Gráfico PCA de mieles mexicanas: mezquite (verde), naranjo (rojo) y mantequilla (azul). Se muestra la elipse de confianza o Hotelling T², donde se observa que no hay valores atípicos a un nivel de significancia de $p = 0.05$.

Después del PCA, se evaluó la correlación entre los datos espectrales de las muestras analizadas y la variación de los 3 grupos en estudio utilizando el método supervisado PLS-DA (Figura 7). El PC1 y el PC2 explican el 48% y el 35% de la varianza, respectivamente. El PLS-DA modela la variación espectral con $R^2X = 0.951$, la variación por grupo con $R^2Y = 0.983$ y la bondad de predicción con $Q^2 = 0.917$. En este modelo se seleccionaron los bins responsables de la discriminación entre las mieles de naranjo, mezquite y mantequilla a partir de la importancia de las variables en la proyección (VIP), considerando un punto de corte de $VIP > 1$ (Figura 8). Posteriormente se identificaron los metabolitos relacionados a dichos bins (Tabla 5). Los metabolitos responsables de la diferenciación de las muestras por origen floral identificados son principalmente carbohidratos: fructosa, glucosa, maltosa, sacarosa y maltulosa; y otros compuestos como cafeína y prolina.

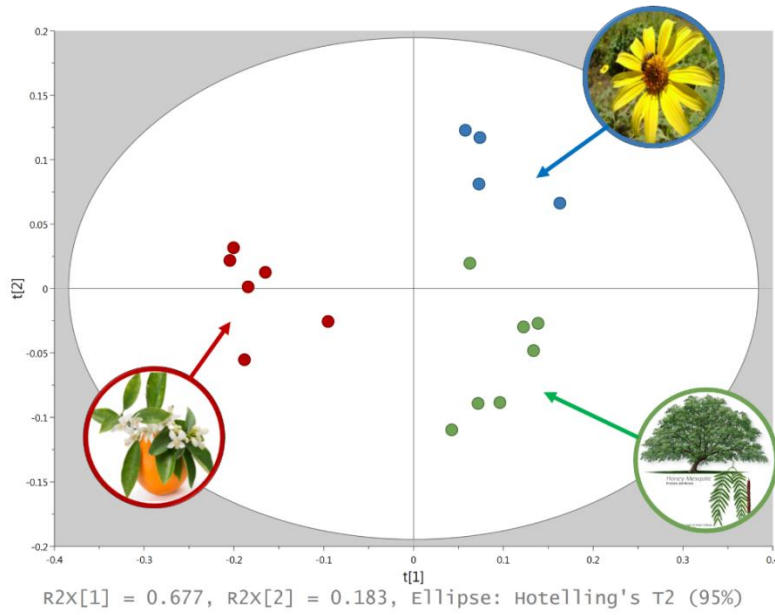


Figura 7. Gráfico PLS-DA de mieles mexicanas: mezquite (verde), naranja (rojo) y mantequilla (azul).

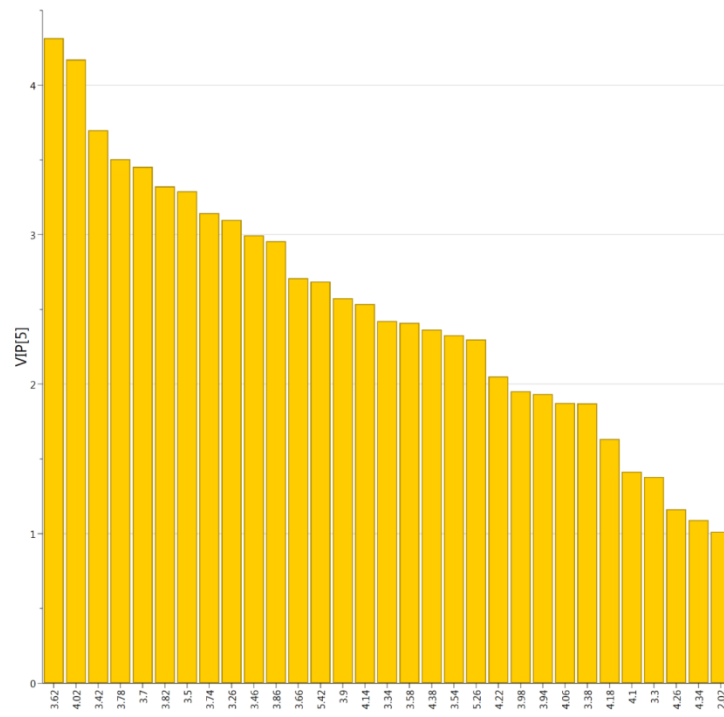


Figura 8. VIP>1 del modelo PLS-DA.

Tabla 5. Metabolitos identificados en los VIP como señales potenciales para la discriminación de mieles por su origen floral.

Metabolito	Bin
Fructosa	3.54, 3.58, 3.62, 3.66, 3.7, 3.74, 3.78, 3.82, 3.86, 3.9, 4.02, 4.06, 4.1, 4.14
Maltosa	3.26, 3.3, 3.42, 3.58, 3.62, 3.66, 3.7, 3.74, 3.78, 3.82, 3.86, 3.94, 3.98, 5.26, 5.42
Glucosa	3.26, 3.38, 3.42, 3.46, 3.5, 3.54, 3.7, 3.74, 3.78, 3.82, 3.86, 3.9, 3.94, 5.26
Prolina	2.02, 3.34, 3.38, 3.42, 3.46, 4.14
NI	3.7
NI	3.86
NI	3.66
Sacarosa	4.06, 4.22, 5.42
NI	3.9
NI	4.14
NI	3.34
Cafeína	3.34, 3.38
NI	4.38
NI	4.22
NI	3.98
NI	3.94
NI	4.06
NI	3.38
NI	4.18
NI	4.1
NI	3.3
NI	4.26
Maltulosa	4.34

*Los metabolitos están ordenados en orden de importancia de acuerdo a los VIP.

6.3.1. METABOLITOS INVOLUCRADOS EN LA DIFERENCIACIÓN POR ORIGEN FLORAL

Al ser los carbohidratos (fructosa, glucosa, maltosa, sacarosa y maltulosa) los principales metabolitos responsables de la diferenciación de las muestras por origen floral se analizaron sus señales en los espectros de ¹H-RMN y se observó que su intensidad tiene variaciones de acuerdo con los diferentes orígenes florales estudiados. Las señales de la maltosa son más intensas en las mieles de naranjo, comparadas con las de mezquite, y en estas últimas son más grandes que en las mieles de mantequilla (Figura 9B). En las mieles de naranjo, el contenido de sacarosa y de fructosa es mayor (Figura 9E y Figura 9A, respectivamente); y el de

glucosa es menor comparado con las de mantequilla y de mezquite (Figura 9C). En la miel de mantequilla se observa un mayor contenido de maltulosa (Figura 9G).

Otro de los metabolitos identificados como importante en la discriminación fue la prolina, la cual es el aminoácido mayoritario en la miel, se origina a partir de las secreciones salivales de las abejas (*Apis mellifera*) durante la transformación del néctar y se encuentra presente en el polen. Este aminoácido es utilizado como criterio para evaluar la maduración y la adulteración con azúcares.(93–95) Las mieles de mantequilla presentaron una mayor cantidad de este aminoácido, seguidas de las de naranja y mezquite (Figura 9D).

La cafeína (Figura 9F) se encontró solamente en las mieles de naranjo. Se ha reportado en la literatura que es un biomarcador en las mieles de cítricos,(96,97) ya que se encuentra en el néctar y en el polen de varias especies florales de cítricos.(98,99)

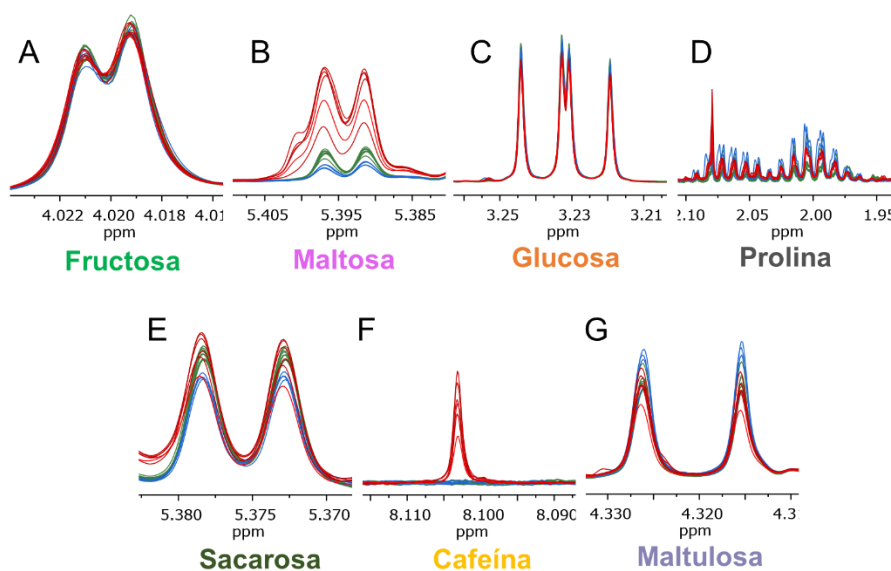


Figura 9. Ampliaciones de los espectros superpuestos de ^1H -RMN (700 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, 300 K) de los tres tipos de mieles: mezquite (verde), naranja (rojo) y mantequilla (azul). A) Fructosa, B) Maltosa, C) Glucosa, D) Prolina, E) Sacarosa, F) Cafeína y G) Maltulosa.

6.4. RELACIÓN FRUCTOSA-GLUCOSA

Con las concentraciones de la fructosa y de la glucosa obtenidas en el Chenomx, se calculó la relación entre ambos metabolitos (F/G) (Tabla 6). La fructosa suele ser el componente principal de la mayoría de las mieles, tal es el caso de las mieles de naranja estudiadas, en las que el contenido de fructosa es mayor al de glucosa. Sin embargo, existen mieles de ciertos orígenes florales en las que la glucosa supera la cantidad de fructosa, como en las mieles mantequilla o acahual.(10,100,101)

Tabla 6. Tabla de la relación F/G en las muestras de miel analizadas.

Muestra	Relación F/G
01-007-03-01_Mezquite	0.97
01-007-03-02_Mezquite	0.94
01-007-03-03_Mezquite	1.00
01-007-03-04_Mezquite	0.98
01-007-03-05_Mezquite	0.89
01-011-02-02_Mezquite	0.99
19-124-28-03_Mezquite	0.94
29-013-01-01_Mantequilla	0.95
29-013-01-19_Mantequilla	0.93
29-013-01-20_Mantequilla	0.93
29-013-01-21_Mantequilla	0.93
30-102-01-03_Naranja	1.06
30-102-01-06_Naranja	1.04
30-102-01-07_Naranja	1.05
30-102-01-08_Naranja	1.04
30-102-01-17_Naranja	1.08
30-102-01-18_Naranja	1.01

La relación F/G se ha propuesto como método de discriminación por origen floral. Sin embargo, los datos publicados (Tabla 7) son en su mayoría para un número limitado de muestras y se han reportado solamente para algunos orígenes florales o mezclas.(84,102–104) Tal es el caso de la miel de mezquite, en el que la relación $F/G = 1.1 \pm 0.10$ está calculada con tan sólo tres muestras de miel.(10) A diferencia de lo calculado en el presente estudio (0.96 ± 0.08) con más del doble de muestras. Por esta razón puede existir diferencia entre lo determinado en el presente estudio y lo reportado en la literatura. La relación F/G en la miel de mantequilla calculada coincide con lo reportado previamente.(101)

Tabla 7. Relación F/G experimental vs la reportada en la literatura.

Miel	Relación F/G experimental	Relación F/G literatura	Bibliografía
Mezquite	0.96 ± 0.08	1.1 ± 0.10	(10)
Mantequilla o acahual	0.94 ± 0.02	0.93	(101)
Naranja	1.05 ± 0.05	1.3 ± 0.03	(105)
Naranja		1.21 ± 0.05	(104)
Naranja		1.23 ± 0.19	(10)

7. CONCLUSIONES

Los resultados demostraron que la espectroscopia de ^1H -RMN combinada con análisis estadístico multivariado es una herramienta efectiva para la discriminación por origen botánico de las mieles mexicanas analizadas (mezquite, mantequilla y naranjo).

Los metabolitos responsables de la diferenciación de las mieles de acuerdo con los tres orígenes floral estudiados son fructosa, glucosa, maltosa, sacarosa, maltulosa, cafeína y prolina. La cafeína es un biomarcador para las mieles de naranjo.

A nuestro conocimiento es el primer estudio de clasificación por origen floral (mezquite, naranjo y mantequilla) de mieles mexicanas basado en ^1H -RMN. A pesar del número limitado de muestras, este proyecto sienta las bases para determinar en un futuro la huella dactilar de las mieles mexicanas, y así poder garantizar el origen a un producto tan importante como lo es la miel.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. FAO/OMS. Codex Alimentarius Committee on Sugars reached. Codex Stand Honey Stand Stand Methods. 2001;11:1–7.
2. DOF - Diario Oficial de la Federación. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-145-SCFI-2001. INFORMACIÓN COMERCIAL- ETIQUETADO DE MIEL EN SUS DIFERENTES PRESENTACIONES. 2001;1–6.
3. Razali MTA, Zainal ZA, Maulidiani M, Shaari K, Zamri Z, Idrus MZM, et al. Classification of raw stingless bee honeys by bee species origins using the NMR- and LC-MS-based metabolomics approach. *Molecules*. 2018;23(9):1–18.
4. Martínez-Puc JF, Cetzal-Ix W, González-Valdivia NA, Casanova-Lugo F, Saikat-Kumar B. Caracterización de la actividad apícola en los principales municipios productores de miel en Campeche, México. *J Selva Andin Anim Sci*. 2018;5(1):44–53.
5. Güemes F, González E, Villanueva C, Pat R, Manuel J, Álvarez R. La apicultura en la península de Yucatán. Actividad de subsistencia en un entorno globalizado. *Rev Mex del Caribe*. 2003;VIII(16):117–32.
6. Delegación SADER Quintana Ro-Boletín. Emite Agricultura Norma Oficial para impulsar el desarrollo de la apicultura e impedir fraude al consumidor de miel [Internet]. [citado el 25 de febrero de 2021]. Disponible en: <https://www.gob.mx/agricultura%7Cquintanaroo/articulos/95899>
7. SAGARPA; Coordinación General de Ganadería. Situación Actual y Perspectiva de la Apicultura en México. *Claridades Agropecu*. 2010;(199):3–34.
8. Schievano E, Stocchero M, Zuccato V, Conti I, Piana L. NMR assessment of European acacia honey origin and composition of EU-blend based on geographical floral markers. *Food Chem*. 2019;288:96–101.
9. Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P. Honey for nutrition and health: A review. *J Am Coll Nutr*. 2008;27(6):677–89.
10. White BJW, Riethof ML, Subers MH. Composition of American Honeys. *Agric Res Serv United States Dep Agric*. 1962;(1261):16–124.
11. Moreira RFA, De Maria CAB, Pietroluongo M, Trugo LC. Chemical changes in the volatile fractions of Brazilian honeys during storage under tropical conditions. *Food Chem*. 2010;121(3):697–704.
12. Tornuk F, Karaman S, Ozturk I, Toker OS, Tastemur B, Sagdic O, et al. Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. *Ind Crops Prod*. 2013;46:124–31.

13. DOF - Diario Oficial de la Federación. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-004-SAG/GAN-2018. PRODUCCIÓN DE MIEL Y SUS ESPECIFICACIONES. 2020;1–17.
14. Da Silva PM, Gauche C, Gonzaga LV, Costa ACO, Fett R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem.* 2016;196:309–23.
15. Karabagias IK, Badeka A, Kontakos S, Karabournioti S, Kontominas MG. Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics. *Food Chem.* 2014;146:548–57.
16. Castro-Vázquez L, Díaz-Maroto MC, Pérez-Coello MS. Aroma composition and new chemical markers of Spanish citrus honeys. *Food Chem.* 2007;103(2):601–6.
17. Radovic BS, Careri M, Mangia A, Musci M, Gerboles M, Anklam E. Contribution of dynamic headspace GC-MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey. *Food Chem.* 2001;72(4):511–20.
18. Escuredo O, Dobre I, Fernández-González M, Seijo MC. Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chem.* 2014;149:84–90.
19. De La Fuente E, Ruiz-Matute AI, Valencia-Barrera RM, Sanz J, Martínez Castro I. Carbohydrate composition of Spanish unifloral honeys. *Food Chem.* 2011;129(4):1483–9.
20. Soldatkin OO, Peshkova VM, Saiapina OY, Kucherenko IS, Dudchenko OY, Melnyk VG, et al. Development of conductometric biosensor array for simultaneous determination of maltose, lactose, sucrose and glucose. *Talanta.* 2013;115:200–7.
21. Yücel Y, Sultanoğlu P. Characterization of honeys from Hatay Region by their physicochemical properties combined with chemometrics. *Food Biosci.* 2013;1:16–25.
22. Sak-Bosnar M, Sakač N. Direct potentiometric determination of diastase activity in honey. *Food Chem.* 2012;135(2):827–31.
23. Won SR, Li CY, Kim JW, Rhee HI. Immunological characterization of honey major protein and its application. *Food Chem.* 2009;113(4):1334–8.
24. Lee, D, Lee, S, Choi, Y, Rhee H. Discrimination of Native Bee-Honey and Foreign Bee-Honey by SDS-PAGE. *Korean J Food Sci Technol.* 1998;30(1):1–5.
25. Hermosín I, Chicón RM, Cabezudo MD. Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chem.* 2003;83(2):263–8.
26. Anklam E. A review of the analytical methods to determine the geographical

- and botanical origin of honey. *Food Chem.* 1998;63(4):549–62.
27. Cherchi A, Spanedda L, Tuberoso C, Cabras P. Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of organic acids in honey. *J Chromatogr A.* 1994;669(1–2):59–64.
 28. Bonté F, Desmoulière A. Le miel: origine et composition. *Actual Pharm.* 2013;52(531):18–21.
 29. Alqarni AS, Owayss AA, Mahmoud AA, Hannan MA. Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. *J Saudi Chem Soc.* 2014;18(5):618–25.
 30. Alvarez-Suarez JM, Giampieri F, González-Paramás AM, Damiani E, Astolfi P, Martínez-Sánchez G, et al. Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(5):1508–16.
 31. Trautvetter S, Koelling-Speer I, Speer K. Confirmation of phenolic acids and flavonoids in honeys by UPLC-MS. *Apidologie.* 2009;40(2):140–50.
 32. Gheldof N, Engeseth NJ. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *J Agric Food Chem.* 2002;50(10):3050–5.
 33. Blasa M, Candiracci M, Accorsi A, Piacentini MP, Albertini MC, Piatti E. Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chem.* 2006;97(2):217–22.
 34. Tomlinson AJ, Landers JP, Lewis IAS, Naylor S. Buffer conditions affecting the separation of Maillard reaction products by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A.* 1993;652(1):171–7.
 35. Martins SIFS, Jongen WMF, Boekel MAJS Van. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends Food Sci Technol.* 2001;11:364–73.
 36. Ajlouni S, Sujirapinyokul P. Hydroxymethylfurfuraldehyde and amylase contents in Australian honey. *Food Chem.* 2010;119(3):1000–5.
 37. Abu-Tarboush HM, Al-Kahtani HA, El-Sarrage MS. Floral-type identification and quality evaluation of some honey types. *Food Chem.* 1993;46(1):13–7.
 38. Andrade PB, Amaral MT, Isabel P, Carvalho JCMF, Seabra RM, Proença Da Cunha A. Physicochemical attributes and pollen spectrum of Portuguese heather honeys. *Food Chem.* 1999;66(4):503–10.
 39. Perez-Arquillué C, Conchello P, Ariño A, Juan T, Herrera A. Quality evaluation of Spanish rosemary (*Rosmarinus officinalis*) honey. *Food Chem.* 1994;51(2):207–10.

40. Hernández E. Una denominación de origen para las mieles de la península de Yucatán. *Rev Ciencias*. 2016;118:106–14.
41. Louveaux J, Maurizio A, Vorwohl G. Methods of Melissopalynology. *Bee World*. 1978;59(4):139–57.
42. Kortensniemi M, Slupsky CM, Ollikka T, Kauko L, Spevacek AR, Sjövall O, et al. NMR profiling clarifies the characterization of Finnish honeys of different botanical origins. *Food Res Int*. 2016;86:83–92.
43. Soares S, Amaral JS, Oliveira MBPP, Mafra I. A Comprehensive Review on the Main Honey Authentication Issues: Production and Origin. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2017;16(5):1072–100.
44. Puścion-Jakubik A, Borawska MH, Socha K. Modern methods for assessing the quality of Bee Honey and botanical origin identification. *Foods*. 2020;9(8):1–21.
45. Spiteri M, Jamin E, Thomas F, Rebours A, Lees M, Rogers KM, et al. Fast and global authenticity screening of honey using ¹H-NMR profiling. *Food Chem*. 2015;189:60–6.
46. Aretz I, Meierhofer D. Advantages and pitfalls of mass spectrometry based metabolome profiling in systems biology. *Int J Mol Sci*. 2016;17(5).
47. Vignoli A, Ghini V, Meoni G, Licari C, Takis PG, Tenori L, et al. High-Throughput Metabolomics by 1D NMR. *Angew Chemie - Int Ed*. 2019;58(4):968–94.
48. Hatzakis E. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy in Food Science: A Comprehensive Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2019;18(1):189–220.
49. Bartel J, Krumsiek J, Theis FJ. Statistical methods for the analysis of high-throughput metabolomics data. *Comput Struct Biotechnol J*. 2013;4(5):e201301009.
50. Blekherman G, Laubenbacher R, Cortes DF, Mendes P, Torti FM, Akman S, et al. Bioinformatics tools for cancer metabolomics. *Metabolomics*. 2011;7(3):329–43.
51. Shulaev V. Metabolomics technology and bioinformatics. *Brief Bioinform*. 2006;7(2):128–39.
52. Cevallos-cevallos JM, Etxeberria E, Danyluk MD, Rodrick GE. Metabolomic analysis in food science : a review. *Trends Food Sci Technol*. 2009;20(11–12):557–66.
53. Azizan A, Lee AX, Hamid NAA, Maulidiani M, Mediani A, Ghafar SZA, et al. Potentially bioactive metabolites from pineapple waste extracts and their antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities by ¹H NMR. *Foods*.

- 2020;9(2).
54. Di Nunzio M, Picone G, Pasini F, Chiarello E, Caboni MF, Capozzi F, et al. Olive oil by-product as functional ingredient in bakery products. Influence of processing and evaluation of biological effects. *Food Res Int*. 2020;131:108940.
 55. Richardson AT, Cho J, McGhie TK, Larsen DS, Schaffer RJ, Espley R V., et al. Discovery of a stable vitamin C glycoside in crab apples (*Malus sylvestris*). *Phytochemistry*. 2020;173:112297.
 56. Cappello T, Giannetto A, Parrino V, De Marco G, Mauceri A, Maisano M. Food safety using NMR-based metabolomics: Assessment of the Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus*, from the Mediterranean Sea. *Food Chem Toxicol*. 2018;115:391–7.
 57. Wu L, Du B, Vander Heyden Y, Chen L, Zhao L, Wang M, et al. Recent advancements in detecting sugar-based adulterants in honey – A challenge. *TrAC - Trends Anal Chem*. 2017;86:25–38.
 58. Wang X, Jiang G, Kebreab E, Li J, Feng X, Li C, et al. ¹H NMR-based metabolomics study of breast meat from Pekin and Linwu duck of different ages and relation to meat quality. *Food Res Int*. 2020;133:109126.
 59. Rubel Mozumder NHM, Lee YR, Hwang KH, Lee MS, Kim EH, Hong YS. Characterization of tea leaf metabolites dependent on tea (*Camellia sinensis*) plant age through ¹H NMR-based metabolomics. *Appl Biol Chem*. 2020;63(10):1–8.
 60. Wang T, Liu Q, Wang M, Zhang L. Metabolomics reveals discrimination of Chinese propolis from different climatic regions. *Foods*. 2020;9(4):1–14.
 61. Shumilina E, Møller IA, Dikiy A. Differentiation of fresh and thawed Atlantic salmon using NMR metabolomics. *Food Chem*. 2020;314:126227.
 62. Emwas AH, Roy R, McKay RT, Tenori L, Saccenti E, Nagana Gowda GA, et al. Nmr spectroscopy for metabolomics research. *Metabolites*. 2019;9(7):1–39.
 63. Bharti SK, Roy R. Quantitative ¹H NMR spectroscopy. *TrAC - Trends Anal Chem*. 2012;35:5–26.
 64. Laurella SL. Resonancia magnética nuclear: una herramienta para la elucidación de estructuras moleculares. *EduLup*. Universidad Nacional de La Plata. 2017. 16–92 p.
 65. Keeler J. *Understanding NMR Spectroscopy*. 2a ed. John Wiley and Sons; 2011. 7–21 p.
 66. Marcone MF, Wang S, Albabish W, Nie S, Somnarain D, Hill A. Diverse food-based applications of nuclear magnetic resonance (NMR) technology.

- FRIN. 2013;51(2):729–47.
67. Schievano E, Peggion E, Mammi S. ¹H nuclear magnetic resonance spectra of chloroform extracts of honey for chemometric determination of its botanical origin. *J Agric Food Chem.* 2010;58(1):57–65.
 68. Zuccato V, Finotello C, Menegazzo I, Peccolo G, Schievano E. Entomological authentication of stingless bee honey by ¹H NMR-based metabolomics approach. *Food Control.* 2017;82:145–53.
 69. Beretta G, Caneva E, Regazzoni L, Bakhtyari NG, Maffei Facino R. A solid-phase extraction procedure coupled to ¹H NMR, with chemometric analysis, to seek reliable markers of the botanical origin of honey. *Anal Chim Acta.* 2008;620(1–2):176–82.
 70. He C, Liu Y, Liu H, Zheng X, Shen G, Feng J. Compositional identification and authentication of Chinese honeys by ¹H NMR combined with multivariate analysis. *Food Res Int.* 2020;130:108936.
 71. Olawode EO, Tandlich R, Cambray G. ¹H-NMR profiling and chemometric analysis of selected honeys from South Africa, Zambia, and Slovakia. *Molecules.* 2018;23(3).
 72. Adebo, O., Njobeh P. *Food Metabolomics: A New Frontier in Food Analysis and its Application to Understanding Fermented Foods.* 2nd ed. Functional Food - Improve Health through Adequate Food Reference. 2017. 211–234 p.
 73. Sobolev AP, Thomas F, Donarski J, Ingallina C, Circi S, Cesare Marincola F, et al. Use of NMR applications to tackle future food fraud issues. *Trends Food Sci Technol.* 2019;91:347–53.
 74. Schievano E, Tonoli M, Rastrelli F. NMR Quantification of Carbohydrates in Complex Mixtures. A Challenge on Honey. *Anal Chem.* 2017;89(24):13405–14.
 75. Song X, She S, Xin M, Chen L, Li Y, Heyden Y Vander, et al. Detection of adulteration in Chinese monofloral honey using ¹H nuclear magnetic resonance and chemometrics. *J Food Compos Anal.* 2020;86:103390.
 76. Boffo EF, Tavares LA, Tobias ACT, Ferreira MMC, Ferreira AG. Identification of components of Brazilian honey by ¹H NMR and classification of its botanical origin by chemometric methods. *LWT - Food Sci Technol.* 2012;49(1):55–63.
 77. Mannina L, Sobolev AP, Di Lorenzo A, Vista S, Tenore GC, Daglia M. Chemical Composition of Different Botanical Origin Honeys Produced by Sicilian Black Honeybees (*Apis mellifera* ssp. *sicula*). *J Agric Food Chem.* 2015;63(25):5864–74.
 78. Ren H, Yue J, Wang D, Fan J, An L. HPLC and ¹H-NMR combined with chemometrics analysis for rapid discrimination of floral origin of honey. *J*

- Food Meas Charact. 2019;13(2):1195–204.
79. Spiteri M, Rogers KM, Jamin E, Thomas F, Guyader S, Lees M, et al. Combination of ¹H NMR and chemometrics to discriminate manuka honey from other floral honey types from Oceania. *Food Chem.* 2017;217:766–72.
 80. Zheng X, Zhao Y, Wu H, Dong J, Feng J. Origin Identification and Quantitative Analysis of Honeys by Nuclear Magnetic Resonance and Chemometric Techniques. *Food Anal Methods.* 2016;9(6):1470–9.
 81. Zhang J, Chen H, Fan C, Gao S, Zhang Z, Bo L. Classification of the botanical and geographical origins of Chinese honey based on ¹H NMR profile with chemometrics. *Food Res Int.* 2020;137:109714.
 82. Kaškonienė V, Venskutonis PR. Floral Markers in Honey of Various Botanical and Geographic Origins: A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2010;9(6):620–34.
 83. Kaškonienė V, Venskutonis PR, Čeksteryte V. Carbohydrate composition and electrical conductivity of different origin honeys from Lithuania. *LWT - Food Sci Technol.* 2010;43(5):801–7.
 84. Cotte JF, Casabianca H, Chardon S, Lheritier J, Grenier-Loustalot MF. Chromatographic analysis of sugars applied to the characterisation of monofloral honey. *Anal Bioanal Chem.* 2004;380(4):698–705.
 85. Santos-Buelga C, González-Paramás AM. Bee Products -Chemical and biological properties. *Bee Products - Chemical and Biological Properties.* 2017. 99–111 p.
 86. Spiteri C, Lia F, Farrugia C. Determination of the geographical origin of maltese honey using ¹H NMR fingerprinting. *Foods.* 2020;9(10):1–18.
 87. Karabagias IK, Vlasiou M, Kontakos S, Drouza C, Kontominas MG, Keramidias AD. Geographical discrimination of pine and fir honeys using multivariate analyses of major and minor honey components identified by ¹H NMR and HPLC along with physicochemical data. *Eur Food Res Technol.* 2018;244(7):1249–59.
 88. D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, S.N. Deming, Y. Michotte LK. Data Handling in Science and Technology. En: *Chemometrics: a textbook.* 2003. p. 5–11.
 89. Monakhova YB, Kuballa T, Lachenmeier DW. Chemometric methods in NMR spectroscopic analysis of food products. *J Anal Chem.* 2013;68(9):755–66.
 90. Wold S, Esbensen K, Geladi P. Principal Component Analysis. *Chemom Intell Lab Syst.* 1987;2(1–3):37–52.
 91. Wold S, Sjöström M, Eriksson L. PLS-regression: A basic tool of chemometrics. *Chemom Intell Lab Syst.* 2001;58(2):109–30.

92. Girelli CR, Schiavone R, Vilella S, Fanizzi FP. Salento honey (Apulia, South-East Italy): A preliminary characterization by ¹H-NMR metabolomic fingerprinting. *Sustain.* 2020;12(12):1–18.
93. White JW, Rudyj ON. The protein content of honey. *J Apic Res.* 1978;17(4):234–8.
94. Iglesias MT, Martín-Álvarez PJ, Polo MC, De Lorenzo C, González M, Pueyo E. Changes in the free amino acid contents of honeys during storage at ambient temperature. *J Agric Food Chem.* 2006;54(24):9099–104.
95. Villacrés-Granda I, Coello D, Proaño A, Ballesteros I, Roubik DW, Jijón G, et al. Honey quality parameters, chemical composition and antimicrobial activity in twelve Ecuadorian stingless bees (Apidae: Apinae: Meliponini) tested against multiresistant human pathogens. *Lwt-Food Sci Technol.* 2021;140:110737.
96. Schievano E, Morelato E, Facchin C, Mammi S. Characterization of markers of botanical origin and other compounds extracted from unifloral honeys. *J Agric Food Chem.* 2013;61(8):1747–55.
97. Schievano E, Stocchero M, Morelato E, Facchin C, Mammi S. An NMR-based metabolomic approach to identify the botanical origin of honey. *Metabolomics.* 2012;8(4):679–90.
98. Kretschmar JA, Baumann TW. Caffeine in Citrus Flowers. *Phytochemistry.* 1999;52:19–23.
99. Jerković I, Tuberoso CIG, Kuš PM, Marijanović Z, Kranjac M. Screening of *Coffea* spp. honey by different methodologies: Theobromine and caffeine as chemical markers. *RSC Adv.* 2014;4(105):60557–62.
100. Persano, L., Piro R. Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie.* 2004;35:S38–81.
101. Zavala-Olalde A, Colomo-González I, Matalí-Pérez N, Piana L, Olivier B, Vandame R. Characterization of four typical honeys from highly diverse tropical ecosystems. *J Apic Res.* 2013;52(2):24–34.
102. Consonni R, Cagliani LR. Geographical characterization of polyfloral and acacia honeys by nuclear magnetic resonance and chemometrics. *J Agric Food Chem.* 2008;56(16):6873–80.
103. Nozal MJ, Bernal JL, Toribio L, Alamo M, Diego JC, Tapia J. The use of carbohydrate profiles and chemometrics in the characterization of natural honeys of identical geographical origin. *J Agric Food Chem.* 2005;53(8):3095–100.
104. Mateo R, Bosch-Reig F. Sugar profiles of Spanish unifloral honeys. *Food Chem.* 1997;60(1):33–41.

105. Khalafi R, Goli SAH, Behjatian M. Characterization and classification of several monofloral iranian honeys based on physicochemical properties and antioxidant activity. *Int J Food Prop.* 2016;19(5):1065–79.