



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**EVALUACIÓN DE CARACTERÍSTICAS DE INOCUIDAD
Y CALIDAD EN MIELES MEXICANAS**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIAS**

P R E S E N T A

AURORA XOLALPA AROCHE

**TUTOR
MARÍA SALUD RUBIO LOZANO**

**COMITÉ TUTORAL
OCTAVIO REYES SALAS
MIGUEL ARECHAULETA VELASCO**

MÉXICO, D.F.

2010



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.

DEDICATORIA

A mi madre como el dulce aire del bosque

Por regalarme su mente brillante, su inspiración por la vida, su lucha y su maravillosa manera de vivir y dejar vivir.

A mi abuela como el firme movimiento del mar

Por su fortaleza, su carácter y su gran deseo de verme triunfar a pesar de las adversidades del pasado y del presente.

A mi padre como el sereno sol que baña el campo

Por su paciencia, respeto y sensibilidad ante la búsqueda de los sueños que a veces se creen inalcanzables.

A Tere y Cary como las dulces palabras que hoy son mudas

Por su ternura, amistad y el cariño con que me acogieron mientras me prestaron sus brazos para volar.

PRESENTACIÓN

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Química Analítica de Facultad de Química, UNAM y en el Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal, UNAM y el laboratorio de Química en Alimentos Área de Microbiología Facultad de Química. UNAM

Departamento de Biología Vegetal y Ecología. Facultad de Biología. Universidad de Sevilla, España.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. María Salud Rubio Lozano por su invaluable participación, tiempo, apoyo y gran capacidad metodológica compartida para el desarrollo de este trabajo pero sobre todo por confiar en mí para la realización de este proyecto.

Al Dr. Octavio Reyes Salas por confiar en la oportunidad de llevar a cabo este proyecto en conjunto, su disposición, tiempo y compromiso permitiéndome la experiencia de trabajar en su espacio de investigación.

Al Dr. Miguel Arechavaleta por aceptar participar como miembro del comité académico contribuyendo al desarrollo de este trabajo y a los miembros del jurado por el tiempo empleado en la revisión y corrección de este documento incluyendo sus valiosos comentarios.

Se reconoce la enseñanza, apoyo y contribución a este trabajo durante las actividades realizadas en el laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Química del M en C. Daniel Juárez, pero sobre todo agradezco compartir su aprecio y amistad.

Se reconoce el trabajo y la gran contribución del M en C. Daniel Díaz Espinosa de los Monteros y del Dr. Víctor Manuel Xolalpa al compartir su experiencia y conocimientos en el análisis estadístico, su paciencia y perdurable amistad a través de los tiempos.

Se reconoce el apoyo e invaluable colaboración de la Dra. Olga Velázquez, la Q.F.B. Adriana Mejía, M. en C. Beatriz Serrano y las alumnas Nydia Guzmán, Claudia Pérez, Elizabeth Rodríguez y Verónica Torres al participar con gran entusiasmo y dedicación en el desarrollo de este proyecto en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Química.

Agradezco el apoyo y contribución de la M. en C. Guadalupe Mondragón quien representando la empresa 3M participo en el desarrollo de este trabajo durante la aplicación de métodos rápidos para la detección de patógenos en miel y facilito el empleo de Placas Petrifilm mediante la donación del material necesario para las pruebas.

A la Dra. María Josefa Díez Dapena y el Dr. Annas Terrab del Departamento de Biología Vegetal y Ecología en la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla, España por compartir sus conocimientos, tiempo y espacio durante la estancia realizada en su institución de investigación, contribuyendo de manera grata a mi formación profesional y regalándome la oportunidad de descubrir de manera agradable el mundo del polen además de convertirse en mi familia y amistad en el otro lado del mundo.

Agradezco a la Dra. Elia Ramírez y al Dr. Enrique Martínez del Instituto de Geología de la UNAM, por permitirme participar en el curso sobre melisopalinología, brindándome la oportunidad de adquirir herramientas útiles para mi formación profesional.

Reconozco el trabajo, apoyo y participación entusiasta del MVZ. Octavio Martínez, Coordinador del Programa para el Control de la Abeja Africana del Estado de México, la MVZ. María de los Ángeles Pérez González y el MVZ. Ángel García de la Coordinación

Estatal de Inocuidad Pecuaria del Comité de Fomento Pecuario del Estado de México S.C (CFPEM. S.C) por su amistad y tiempo dedicado en obtención de muestras y visita a los apiarios.

Agradezco la colaboración y gran trabajo en equipo de los Coordinadores para el Control de la Abeja Africana de los Estados de Yucatán el MVZ. Manuel Estrada, Oaxaca el MVZ. Manuel Andrés Guzmán, Chihuahua el Ing. José Luis González, Estado de México el MVZ. Octavio Martínez, Michoacán Ing. Zacarías González y Veracruz el MVZ. Mayolo Martínez, y de los productores Octaviano Vázquez, Patricia Vázquez, Madaleno Cen Poot, Jaime Fabela, Hermeregildo Colin y todos aquellos quienes participaron haciendo posible la obtención de las muestras.

A mis queridos amigos, Abel Muñoz, Ana Laura Solis, Cesar Enríquez, Carlos S. Yoval, Miguel Gómez, Daniel D. Espinosa de los Monteros, Antonio Fitz, Alberto Guzmán y Estela Monroy por tener la oportunidad de conocerles y compartir grandes instantes de cariño y diversión, por que sin su apoyo, paciencia y sinceridad este proceso no habría sido tan importante para mi vida.

A Francisco Jorge, Francisco Cruz, Claudia Tzompanzi, José Ignacio Santiago, Esmeralda Pérez, Claudio Marconi, Arnulfo Ordoñez, Fatima Doñan, Gemma Ibarra, Juan Carlos Becerril, Ernesto Hernandez y Andrés González por su cariño, momentos compartidos, instantes de reconstrucción, viajes inolvidables y lazos de trabajo entrañables que agradeceré por siempre.

A la Ing. Cristina Acevedo y al Ing. Guillermo Fernández de la Garza quienes formando parte de la Fundación México Estados Unidos para la Ciencia A.C me otorgaron las facilidades para continuar con mis estudios de posgrado y se mantuvieron al pendiente de los avances en este proyecto.

A Pepa Diéz y Carina Martin por su humildad, sinceridad, enseñanzas y días compartidos, su conversación, cariño y confianza me ayudaron a crecer y aprender que la vida es tan bella como un granito de polen pero tan fugaz como el mar revuelto de Almuñecar o el maravilloso atardecer de las dunas de Doñana.

A José Luis Silva por enseñarme, sus tradiciones, su fandango gastronómico, su hermoso e inolvidable jardín nostálgico, pero sobre todo porque sus palabras tocaron mis pasos y me enseñaron a ser libre como la libélula en la mano del otro lado del mundo.

Agradezco el cariño, amistad y tiempo compartido con todos los integrantes del laboratorio 114 de Química Analítica, en especial de la Dra. Dosal, la Maestra Selma Sosa, Sara Arvizu, Edgar Islas, Joaquín Preza, Demian Caballero y Gilberto Arreguin

A Eduardo, Lucía y Andrea por su apoyo y hermandad durante mis continuas ausencias manteniéndose al pendiente de mi hogar y de las personas que más amo.

A Rubén Omar por regalarme la magia de su sonrisa, la ilusión del mañana y el perdón del pasado, porque con su cariño, paciencia y tolerancia mantiene mi esencia y me permite vivir en libertad.

RESUMEN

México es internacionalmente reconocido como un país exportador de miel de excelente calidad, para mantener los niveles de exportación es importante la evaluación de los parámetros físico-químicos y microbiológicos que afectan las características del producto. El objetivo de este trabajo fue la evaluación físico-química en 79 muestras de miel procedentes de: Chihuahua (región Norte, $n = 10$) Estado de México (región Centro, $n = 39$), Michoacán (región Pacífico, $n = 10$), Tlaxcala (región Golfo, $n = 10$) y Yucatán (región Península, $n = 10$). Para la evaluación microbiológica se utilizaron 31 muestras de miel procedentes del Estado de México ($n = 11$), Michoacán ($n = 10$), y Yucatán ($n = 10$), representativas de las regiones Centro, Pacífico y Península, respectivamente. Los parámetros físico-químicos evaluados fueron Humedad, Azúcares Reductores Totales (ART), Cenizas, pH, Hidroximetilfurfural (HMF) y parámetros de color, también se determinó la cantidad de microorganismos indicadores especificados en la norma mexicana para miel NMX-F-036-NORMEX-2006 y en el estándar internacional publicado en el Codex Alimentarius (2001). Además, se determinó la cantidad de coliformes totales así como las bacterias esporuladas aerobias y anaerobias.

El 95% de las muestras evaluadas presentaron valores significativamente inferiores ($p < 0.005$) al 20% de humedad, los porcentajes de ceniza fueron significativamente por debajo del valor estipulado por la norma mexicana (0.6%, $p < 0.005$), los valores de pH presentan rangos que van de 2.6 a 6.5, los valores de HMF fueron más altos en las muestras de la región Sur (39.6 ± 5.62 ; $p < 0.05$) a diferencia de las de la región Golfo donde fueron los más bajos (7.0 ± 1.16 ; $p < 0.05$), los parámetros de color de las muestras de miel de acuerdo a la medición del espacio uniforme de color CIE $L^* a^* b^*$ presentan valores de $L^* 29.2-53.6$, $a^* 2.5-4.4$ y $b^* 3.9-19.9$.

Los conteos de microorganismos mesofílicos aerobios se encuentran significativamente ($p < 0.001$) por debajo de los valores permitidos a nivel nacional e internacional ($\log 1000$ UFC/g) para los tres estados. Los conteos de hongos y levaduras fueron inferiores al parámetro establecido a nivel nacional e internacional ($\log 100$ UFC/g; $p < 0.001$). El recuento de coliformes resultó negativo en todas las muestras.

Palabras clave: miel, calidad, inocuidad, microorganismos, características químicas

ABSTRACT

Mexico is globally recognized for exporting honey of excellent quality, to maintain levels of export is necessary the evaluation of physico-chemical parameters and microbiological that affect product features. The objective of this research was the physico-chemical evaluation in seventy-nine honey samples collected in Chihuahua (North, n = 10) Estado de Mexico (Centre n = 39), Michoacán (Pacific, n = 10), Tlaxcala (Gulf, n = 10) and Yucatán (Peninsula, n = 10). For the microbiological evaluation were used thirty-one honey samples collected in Estado de Mexico (n = 11), Michoacán (n = 10), and Yucatán (n = 10), representing the regions Centre, Pacific and Peninsula, respectively. The evaluated parameters physico-chemical were water content, Total Reducers Sugars (TRS), Ash by electrical conductivity, pH, Hidroxymethylfurfural (HMF) and parameters of color, also the amount of microorganisms was determined specified indicators in the Mexican standard for honey 036-2006 NMX-F-036-NORMEX-2006 and in the international standard published in the Codex Alimentarius (2001). In addition, the amount of total coliforms was determined as well as sporeformer aerobic and anaerobic microorganisms.

The 95% of samples evaluated were significantly inferior ($p < 0,005$) to 20% of water content, the ash values were significantly lower than mexican standar (0,6%, $p < 0,005$), the pH values, were between 2,6 and 6,5, the HMF values were high in the samples honey collected in South region ($39,6 \pm 5,62$; $p < 0,05$) and the Gulf region shows values lower ($7,0 \pm 1,16$; $p < 0,05$), the color parameter of samples evaluated according to the measurement of the uniform space of color CIE $L^* a^*b^*$ shows values of L^* 29,2-53,6, a^* 2,5-4,4 and b^* 3,9-19,9. The count of microorganisms mesofilic aerobes are found significantly ($p < 0,001$) lower than the limit permitted by national and international standard parameters ($\log 1000$ UFC/g) in the three States. The count of moulds and yeasts were lower than the national and international standard parameters ($\log 100$ CFU/g; $p < 0,001$). The recount of coliforms resulted negative in all samples of honey.

Keywords: honey, quality, food safety, microorganisms, physico-chemical characteristics.

CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	5
II.	JUSTIFICACIÓN.....	6
III.	OBJETIVOS	6
IV.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
A.	Producción Apícola Nacional.....	7
B.	Características Generales de la Miel.....	8
C.	Composición de la Miel.....	9
D.	Parámetros Físico-químicos de la Miel	10
1.	<i>Humedad</i>	10
2.	<i>Azúcares</i>	11
3.	<i>pH</i>	11
4.	<i>Conductividad eléctrica</i>	12
5.	<i>Índices de envejecimiento de la miel: Hidroximetilfurfural (HMF)</i>	12
E.	Parámetros Microbiológicos de la Miel.....	13
1.	<i>Mohos</i>	16
2.	<i>Levaduras</i>	16
3.	<i>Bacterias</i>	17
F.	Características de las regiones apícolas muestreadas.....	19
G.	Características de Calidad de la Miel en México y a Nivel Internacional.....	27
V.	MATERIAL Y MÉTODOS	31
A.	Origen de las muestras de Miel.....	31
B.	Evaluación de Parámetros Físico-químicos.....	31
1.	<i>Determinación de humedad</i>	31
*Estados considerados para el análisis físico-químico.....		32
2.	<i>Determinación de azúcares reductores totales</i>	33
3.	<i>Medición de pH y determinación de cenizas por conductividad eléctrica</i>	33
4.	<i>Medición de hidroximetilfurfural (HMF)</i>	34
5.	<i>Evaluación del color</i>	35
C.	Evaluación de Parámetros Microbiológicos.....	35
1.	<i>Métodos tradicionales para la detección de microorganismos indicadores</i>	35
2.	<i>Método rápido para la detección de microorganismos patógenos e indicadores</i>	35
D.	Adecuación de las Técnicas para la Preparación y Dilución de las Muestras.....	36
E.	Análisis Estadístico.....	40
VI.	DISCUSIÓN Y RESULTADOS.....	41
A.	Análisis Físico-químico.....	41
1.	<i>Humedad</i>	41

2.	<i>Azúcares reductores totales (ART)</i>	41
3.	<i>Cenizas</i>	42
4.	<i>pH</i>	42
5.	<i>Hidroxiacetilfurfural (HMF)</i>	45
6.	<i>Parámetros de color</i>	46
B.	Evaluación Microbiológica.....	48
1.	<i>Mesofílicos aerobios</i>	48
2.	<i>Hongos y levaduras</i>	50
3.	<i>Bacterias esporuladas aerobias y anaerobias</i>	52
4.	<i>Bacterias coliformes totales</i>	53
C.	Análisis de Correlación entre los Parámetros Evaluados.....	53
VII.	ESTUDIOS ADICIONALES EN MIEL.....	58
VIII.	CONCLUSIONES.....	61
IX.	BIBLIOGRAFÍA.....	64
X.	ANEXOS.....	70

LISTA DE CUADROS

- 1 Producción nacional de miel en los 10 principales estados.
- 2 Componentes de la miel.
- 3 Especificaciones microbiológicas para la compra de miel de abeja.
- 4 Parámetros de calidad de la miel de acuerdo al Codex Alimentarius STAN 12-1981 (2001), el consejo de la UE directiva 2001/110/CE y la NMX-F-036-NORMEX-2006
- 5 Regionalización de la producción estatal durante 2009.
- 6 Porcentaje de humedad en las muestras de miel de los diferentes estados.
- 7 Contenido de ART de las muestra de miel provenientes de los estados.
- 8 Porcentaje de cenizas contenidas en las muestras de miel.
- 9 Valores de pH de las muestras de miel de los diferentes estados.
- 10 Contenido de HMF en las muestras de miel provenientes de los estados.
- 11 Parámetros de color de las muestras de miel de acuerdo a la medición del espacio uniforme de color CIE L*a*b*
- 12 Comparación del promedio de cuenta aerobia por ambos métodos en contra de la NMX.
- 13 Comparación de los conteos de bacterias mesofílicas aerobias por cada tipo de método (tradicional ACE y placas Petrifilm).
- 14 Comparación del promedio de Hongos y Levaduras por ambos métodos en contra de la NMX (100 UFC/g).
- 15 Comparación de los valores promedio obtenidos vs la media hipotética de log 100 UFC/g (igual a 2) mediante la prueba de rangos con signo de Wilcoxon.
- 16 Comparación de los conteos de bacterias esporuladas aerobias considerando un método tradicional ACE y un método de detección rápida Petrifilm.
- 17 Comparación de los conteos de bacterias esporuladas anaerobias considerando un método tradicional ACE y un método de detección rápida Petrifilm.
- 18 Correlación entre parámetros físico-químicos para las muestras analizadas.
- 19 Correlación entre parámetros físico-químicos y bacterias esporuladas aerobias.
- 20 Correlación entre parámetros físico-químicos y bacterias esporuladas anaerobias.
- 21 Correlación entre parámetros físico-químicos y bacterias mesofílicas aerobia.
- 22 Correlación entre parámetros físico-químicos y Hongos-Levaduras.

I. INTRODUCCIÓN

México ha sido un país exportador de miel de excelente calidad reconocida en el mercado internacional. Durante el año 2009 la producción de miel fue de 52,778 toneladas que corresponden a 1006 millones de pesos; por concepto de exportación, la industria apícola nacional obtuvo 51 millones de dólares anuales y ocupó el tercer lugar en la exportación de productos pecuarios después según SIAP-SAGARPA, 2009.

La producción de miel en nuestro país representa una importante fuente de ingresos para el sector rural, pues tiene un fuerte impacto a nivel socioeconómico, en los apicultores del país. Por tal razón, con la intención de caracterizar y ayudar a mantener la calidad de exportación, la evaluación de parámetros físico-químicos y microbiológicos resulta de gran importancia dado que durante el proceso productivo un manejo inadecuado puede reducir la calidad e inocuidad del producto pues influye en sus características iniciales (Moguel *et al.*, 2005). Los cambios que puede presentar la miel van desde fermentación, formación de Hidroximetilfurfural (HFM), pérdida de la actividad enzimática, cambio de sabor, oscurecimiento y crecimiento de microorganismos, características que influyen negativamente sobre la calidad final del producto.

El objetivo principal de esta investigación es el de caracterizar la calidad de la miel en México a través de la evaluación de los parámetros físico-químicos como el Hidroximetilfurfural (HMF), humedad, azúcares reductores totales, conductividad eléctrica, pH y color; así como los microbiológicos como bacterias mesofílicas aeróbicas, mohos, levaduras, coliformes totales y bacterias esporuladas.

II. JUSTIFICACIÓN

Conocer los parámetros físico-químicos y microbiológicos que presentan las mieles de las distintas regiones apícolas resulta importante pues la miel mexicana representa una importante fuente de ingresos para el sector rural en México. Actualmente los trabajos que existen en este contexto resultan insuficientes pues no se ha documentado la variabilidad de las características que presentan las mieles de las distintas regiones productoras del país, y no se emplea un etiquetado con la información correcta sobre la calidad e inocuidad de la miel al que debe ser proporcionada al consumidor.

III. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo consistió en caracterizar y evaluar las mieles provenientes de distintas regiones productoras de miel en el país; con base en los parámetros físico-químicos y microbiológicos que presentan. Para cumplir con tal meta se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Realizar la caracterización físico-química de (79) muestras provenientes de diferentes regiones productoras de miel en México.
2. Evaluación microbiológica de (31) muestras de miel provenientes de tres Estados productores de miel.
3. Conocer las diferencias y similitudes entre los parámetros físico-químicos presentes en las mieles colectadas en distinta regiones geográficas.

IV. REVISIÓN DE LÍTERATURA

A. Producción Apícola Nacional

La apicultura es una de las pocas actividades del sector agropecuario, que presenta características deseables para coadyuvar a la conservación de los recursos naturales ya que no daña el medio ambiente (Rejón *et al.*, 2000). Sin embargo, el reducido mercado nacional ha obligado a los apicultores a depender en gran parte del mercado internacional, especialmente de Alemania y los Estados Unidos, con la desventaja de las fluctuaciones en los precios y de la competencia con otros países (Rejón *et al.*, 2000).

Por otra parte, de acuerdo a información reportada por el Sistema de Información, Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) la producción de miel en México durante el año 2009 fue de 52,778 toneladas. La producción total pecuaria es de más de 134 mil millones de pesos. De este total, 1006 millones de pesos corresponden a la producción de miel y ocupa el tercer lugar en la exportación de productos pecuarios después del becerro y el cerdo. El alza en el precio internacional de la miel permitió que en el 2009 México alcanzara una cifra de más de 51 millones de dólares por concepto de exportación de miel. Además, en los últimos diez años, el consumo interno registró un crecimiento de 150 a 340 gramos por persona (SIAP- SAGARPA, 2009). En el Cuadro 1 se presentan los diez principales Estados productores a nivel nacional.

Con respecto al rendimiento de la colmena, Preza de la Vega (2007) reporto un promedio nacional estimado de 25 kg en 1995 y un aumento importante a 30 kg para el año de 2002. No obstante, al comparar estos valores con el rendimiento de 40 kg registrado en países europeos, se consideran relativamente bajos. Se deben considerar, además, las condiciones actuales de la comercialización nacional e internacional, estableciendo para ello un sistema de seguridad alimentaria como el señalado por Acosta (2004), donde se comercialicen productos inocuos que permitan ofrecer un amplio margen de confiabilidad para el consumidor.

Cuadro 1. Producción nacional de miel en los 10 principales estados.

<i>Estado</i>	<i>Producción (ton)</i>
Campeche	6,976
Yucatán	6,244
Jalisco	5,409
Chiapas	4,270
Veracruz	3,994
Guerrero	3,699
Oaxaca	3,492
Puebla	2,572
Quintana Roo	2,170
Michoacán	1,690

Fuente: SIAP-SAGARPA, 2009

B. Características Generales de la Miel

Se define a la miel como la sustancia dulce natural producida por las abejas a partir del néctar de las flores o de secreciones o de otras partes vivas de la planta que las abejas recogen, transforman, combinan con sustancias específicas propias y almacenan en panales de los cuales se extrae el producto sin ningún aditivo. La miel tiene coloraciones variables y puede ser blanca, extra blanca, blanca, extra clara ámbar, ámbar clara o ámbar y oscura (NMX-F-036-NORMEX-2006).

El proceso de elaboración de la miel inicia cuando la abeja recolectora de néctar lo guarda y al llegar a la colmena lo cede a otra regurgitándolo. Este paso se repite varias veces entre las abejas con lo cual el néctar se va enriqueciendo con sus secreciones; las abejas que reciben el néctar rellenan las celdillas del panal. La transformación del néctar a miel se debe a cambios físicos y químicos. Los primeros se deben principalmente a un proceso de evaporación en donde el néctar pierde hasta un tercio de su contenido de humedad durante su almacenamiento en la colmena, y los segundos se deben a la acción de enzimas que las obreras adicionan al

néctar como la invertasa (sacarasa), cuya función es hidrolizar la sacarosa presente en el néctar a glucosa y fructuosa (Pineda *et al.*, 2006).

De acuerdo a Belitz y Grosch (1997), para la elaboración de la miel es necesario cruzar por las siguientes etapas: Espesamiento del néctar, aumento del azúcar invertido); incorporación de sustancias proteicas de ácidos procedentes de insectos, agregación de minerales, vitaminas y sustancias aromáticas de los vegetales y de enzimas de las glándulas salivales y vesícula melífica de las abejas. Cuando la humedad de la masa de la miel ha disminuido, se cierran las celdillas con una película de cera (operculación); En las celdillas la miel experimenta transformaciones.

C. Composición de la Miel

La miel es una solución sobresaturada de azúcares simples donde predominan la fructuosa y la glucosa y en menor proporción, una mezcla compleja de otros carbohidratos, enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, minerales, sustancias aromáticas, pigmentos, sustancias volátiles, cera y granos de polen. Las características organolépticas y físico-químicas del producto están muy asociadas con su origen geográfico y botánico (Snowdon, 1999).

Es un alimento muy seguro respecto a los peligros y riesgos sanitarios comunes que rodean a los alimentos tradicionales artesanales, pero susceptible de alterarse debido a los posibles cambios ocurridos cuando han existido anomalías durante el proceso de envasado o conservación (Estupiñán *et al.*, 1998). De acuerdo a los datos publicados por Chávez *et al.*, (1992), los componentes de la miel presentados por el Instituto Nacional de la Nutrición se presentan en el Cuadro 2.

La miel presenta condiciones poco favorables para el crecimiento microbiano, entre las que destacan el pH ácido, humedad y actividad de agua (A_w) bajas, viscosidad elevada, concentración en azúcares, y presión osmótica alta que la hacen un sustrato poco apto para la supervivencia y el desarrollo microbiano (Nakano *et al.*, 1991, Snowdon, 1999).

Cuadro 2. Componentes de la miel.

Componente	En 100 g. de miel	Concentración
Energía	302 Kcal	
Carbohidratos	78 g	
Proteínas totales	2.2 g	
Agua	17 g	
Grasas totales	0	
Calcio	20 mg	200 ppm
Hierro	0.8 mg	8 ppm
Magnesio	3 mg	30 ppm
Sodio	5 mg	50 ppm
Potasio	51 mg	510 ppm
Ácido ascórbico	4 µg	0.04 ppm
Tiamina	0.01 µg	0.0001 ppm
Riboflavina	0.07 µg	0.0007 ppm
Niacina	0.2 µg	0.002 ppm

Instituto Nacional de la Nutrición (Chávez *et al.*, 1992)

D. Parámetros Físico-químicos de la Miel

1. Humedad

Este parámetro está relacionado con las condiciones del clima, la estación del año y el grado de maduración de la miel. De acuerdo a la NMX-F-036-NORMEX-2006 la humedad de la miel debe estar por debajo de 20%. Cuando el contenido de agua supera el 18%, la miel puede fermentar porque la concentración de azúcares ya no es suficiente para impedir la multiplicación de las levaduras, que comúnmente se desarrollan activamente a temperaturas comprendidas entre 15 y 25°C (Astiasarán y Martínez, 1999). El contenido de humedad de la miel puede ser determinado por el método Karl Fischer, (Swallow y Low,1990) ó por refractometría usando la tabla de Wedmore (NMX-F-036-NORMEX-2006 y Terrab *et al.*, 20031).

2. *Azúcares*

De acuerdo a White., (1979) referido por Swallow y Low., (1990), la miel es una de las más complejas mezclas de carbohidratos producidos en forma natural. Los carbohidratos que se encuentran en mayor cantidad son la glucosa y la fructosa, los cuales representan del 65 al 75% del total de los sólidos solubles en miel y del 85 al 95% de los carbohidratos de la miel, (Swallow y Low., 1990 y Terrab *et al.*, 2003¹). Mientras que el resto son una mezcla de al menos 11 disacáridos, 11 trisacáridos y diversos oligosacáridos de entre los cuales se pueden nombrar: neotrehalosa, melibiosa, isomaltosa, maltulosa, sucrosa, kojibiosa, turanosa, gentiobiosa, palatinosa, melezitosa, isomaltotriosa, nigerosa, maltosa, isopanososa, enlosa, panosa, maltotriosa entre otros.

Diversos métodos han sido utilizados para analizar el total de carbohidratos en la miel, actualmente el método más empleado para el análisis de carbohidratos estructuralmente similares es el Cromatografía de Gases-Líquidos (GLC); por la alta sensibilidad que presenta, con esta técnica los límites de detección para oligosacáridos es de 40 ppm (Swallow y Low., 1990).

3. *pH*

La medida del pH es de gran importancia durante la obtención y almacenamiento de los alimentos en general, sobre todo por la gran influencia que tiene este parámetro sobre el desarrollo de microorganismos y enzimas. El valor de pH es una referencia de la acidez del producto. Crane (1975), citado por Estupiñán *et al.*, 1998, señala que el pH se encuentra muy condicionado por el contenido en sales minerales, en especial de potasio, sodio y calcio. Mientras que Louveaux (1985), referenciado por Terrab *et al.*, 2003 reporta que el pH de las soluciones acuosas de la miel puede variar dependiendo de la procedencia botánica pero generalmente oscila entre 3,2 y 4,5 con una media de 3,9 coincidiendo con Frias y Hardisson (1992), quienes indican que esta medida es inferior o igual a 4 para mieles de tipo floral y superior a este valor para las mieles de mielada.

Sancho *et al.*, (1991) referido por Estupiñán *et al.*, (1998) reporta que el pH también influye en las propiedades físicas del producto como textura y estabilidad.

Cherchi *et al.*, (1994), citado por Estupiñán *et al.*, (1998) en un estudio realizado en mieles italianas, indica que el pH disminuye ligeramente con el tiempo, aunque según Jiménez *et al.*, (1994), este parámetro se puede considerar muy estable durante el almacenamiento.

4. *Conductividad eléctrica*

Estupiñán *et al.*, (1998) indica que la conductividad eléctrica de la miel está relacionada con el contenido en sales minerales, ácidos orgánicos, proteínas y polioles. Según Krauze y Krauze (1991) y Vorwohl (1964), citados por Estupiñán *et al.*, (1998), la conductividad eléctrica de la miel es un valor estable, que no varía significativamente durante el almacenamiento y que además indica si las abejas han sido alimentadas artificialmente con azúcares. Además, la conductividad eléctrica es un valor que presenta variabilidad de acuerdo al origen botánico, ya que se obtiene valores más altos en las mieles de bosque que en las florales (Pérez *et al.*, 1990). Así Estupiñán *et al.*, (1998) señalan que de acuerdo a datos publicados por Vorwohl en 1964, las mieles de un mismo origen floral tienen conductividades muy semejantes a pesar de tener orígenes geográficos y condiciones climatológicas diferentes.

5. *Índices de envejecimiento de la miel: Hidroximetilfurfural (HMF)*

El grado de frescura de la miel es valorado mediante la medida de dos índices: actividad diastásica y contenido de hidroximetilfurfural (HMF). Cualquiera de los dos puede ser usado como indicador de las condiciones del procesado y almacenamiento de la miel (Estupiñán *et al.*, 1998) aunque White (1992), señala que el contenido enzimático no es considerado de utilidad para evaluar la calidad de la miel en algunos países; sin embargo, en Europa la actividad diastásica y el HMF siguen siendo utilizados en la evaluación de la frescura de la miel.

Estupiñán *et al.*, (1998) señalan que el procesado de la miel lleva consigo tratamiento con calor, lo que hace disminuir las enzimas y aumentar el contenido de HMF por deshidratación de las hexosas, el cual a su vez se descompondrá en ácidos levulínico y fórmico, contribuyendo ambos a dar cifras de mayor acidez; los

tratamientos térmicos excesivos pueden llevar los índices fuera de los límites establecidos.

Por su parte, el HMF es un aldehído cíclico que se forma a temperatura ambiente por deshidratación de la fructosa en medio ácido (valor medio de pH 3,9), proceso que se acelera con el calentamiento o el almacenamiento a elevadas temperaturas (Estupiñán *et al.*, 1998). Su concentración esta en relación directa con el grado de calor al que ha sido sometida la miel y con su grado de envejecimiento (Bosch y Sierra, 1986 y Norma Mexicana NMX- F-036-NORMEX-2006).

En los últimos años la presencia de HMF en la miel ha tomado un valor de gran importancia durante los intercambios comerciales, por ello, en diversos países así como en México se ha trabajado en la implementación de métodos de análisis que permitan una correcta detección de esta sustancia con la intención de cuidar la calidad del producto pues el aumento del HMF es relacionado con las practicas de almacenamiento, calentamiento del producto o adulteración con azúcar invertido.

Estudios realizados por White *et al.*, 1964, coincidentes con los resultados obtenidos por Piro *et al.*, en 1996 y Juárez en el 2007 muestran que cuando la miel es almacenada por periodos de tiempo prolongados a temperaturas elevadas la acumulación del HMF en el producto tiene una relación lineal.

Jeuring y Koppers, (1980), referidos por Estupiñán *et al.*, (1998) señalan que la presencia del HMF, produce obscurecimiento por interrelaciones con compuestos aminados y azúcares, y que sufre polimerización y reordenación, tanto en presencia como en ausencia de oxígeno (Juárez en el 2007). La miel se obscurece con el envejecimiento y por la exposición a altas temperaturas; la magnitud de este proceso está influenciada por su origen botánico.

E. Parámetros Microbiológicos de la Miel

De acuerdo a Guilliam (1974), Guilliam y Morton (1974) y Snowdon (1999), las principales razones por las cuales existe crecimiento de microorganismos en la miel son la presencia de una flora bacteriana y fúngica en las abejas; el viento, los insectos y la posible contaminación producida durante el manejo en la cosecha, el proceso de extracción, almacenamiento y manipulaciones posteriores. Los

microorganismos generalmente no se multiplican en la miel debido a sus características físico-químicas, por lo tanto, esta tiene un riesgo mínimo en la causa de enfermedades (Snowdon, 1999).

La presencia de una sustancia antibacteriana sensible al calor y a la luz llamada inhibina fue descubierta en 1937, posteriormente White *et al.* (1962) y White y Subers (1963), identificaron esta inhibina como el peróxido de hidrógeno formado por la acción del sistema glucosa oxidasa. Lavie (1960) señala que el escaso desarrollo microbiano en la miel es debido a la presencia de componentes antimicrobianos derivados de la actividad enzimática, como el peróxido de hidrógeno, la participación de las catalasas y elementos termorresistentes con actividad antimicrobiana (Estupiñán *et al.*, 1998; Snowdon, 1999).

Estudios realizados por Molan y Russell (1989), señalan que las mieles con un alto contenido en sustancias antibacterianas no parafinadas proceden específicamente de algunas especies florales, lo que indica que estas sustancias se originan preferentemente en las flores más que en las abejas.

También es posible que el origen de las sustancias antibacterianas sean los propóleos utilizados por las abejas para llenar los orificios de las colmenas y prevenir la descomposición de los insectos atrapados por ellas, ya que estos contienen sustancias activas como la galangina, pinocembrin, ácido cafeico y ácido ferúlico, además son considerados agentes activos contra bacterias como *Streptococcus*, algunos *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium xerosis*, y levemente activos contra *Staphylococcus epidermidis*, *Clostridium spp* y *Candida albicans* (Lavie, 1960, Chernyak, 1973, Brumfitt *et al.*, 1990 y Russell *et al.*, 1990).

La miel presenta bajos conteos microbiológicos gracias a las características físico-químicas que posee, sin embargo; es indispensable reconocer los parámetros microbiológicos de este alimento no solo por la gran trascendencia que implican para la salud humana sino también por sus fines comerciales; el Cuadros 3 presenta las especificaciones de compra solicitadas en los años 1990's por 10 diferentes empresas industrializadoras de miel reportadas por Snowdon y Cliver (1996) y Snowdon (1999).

Cuadro 3. Especificaciones microbiológicas para la compra de miel.

Compañía.	Microorganismos Evaluados (UFC/g) ^a					
	Conteo estándar en placa	Coliformes.	<i>Escherichia coli</i>	Levaduras y mohos	<i>Staphylococcus</i>	<i>Salmonella</i>
A	1,000	10	Neg.	100	Neg.	Neg.
B	5,000	10	<10	100	100	
C^b	10,000	<3	<0.3	100	<3	Neg.
D	10,000	10	Neg.		Neg.	Neg.
E	10,000	10	Neg.	10	Neg.	Neg.
F	10,000	100	Neg.	200	Neg.	Neg.
G	1,000	10	10	100	100	
H	10,000	10	Neg.	100	Neg.	Neg.
I	10,000	10	Neg.	100	Neg.	Neg.
J^c	5,000	10	Neg.	10	Neg.	Neg.

^aUnidades Formadoras de colonias por gramo. ^bTambién negativas a *Clostridium botulinom* y *C. perfringens* . ^cTambién, 10 UFC/g de bacterias mesofílicas y termofílicas aerobias anaerobias

Unidad
Snowdon y Cliver en 1996 y Snowdon (1999).

1. Mohos

Jiménez *et al.* (1994) señalan que el crecimiento de mohos y levaduras es de gran importancia por las grandes pérdidas económicas que produce y por ser la causa de alteración más frecuente durante el almacenamiento de la miel de abeja. Los mohos son organismos multicelulares, se multiplican por esporas, existen a lo largo de una hilera o filamentos y crecen en forma de masas enredadas, se extienden rápidamente pudiendo cubrir varias pulgadas del área en dos o tres días, están asociados con el contenido intestinal de las abejas, la colmena y el medio ambiente en el cual las abejas liban ya que estos crecen en las áreas húmedas de colmenas y en el polen (Snowdon, 1999).

Estupiñán *et al.* (1998), señala que los mohos más frecuentemente encontrados en la miel pertenecen al género *Penicilium* y *Mucor*, estudios realizados por Snowdon (1999), reportan que de cada 50 muestras de mieles envasadas para la industrialización solo 10 de estas contienen mohos en niveles muy bajos (15 UFC/g), sin embargo, la presencia de altos conteos de mohos pueden ser un indicativo de circunstancias especiales ocasionadas durante la libación, el manejo de la colmena o el uso inadecuado del equipo utilizado en el lugar donde la miel es procesada.

De acuerdo a los datos señalados por Snowdon y Cliver (1996) y Snowdon (1999), los mohos principalmente encontrados en la miel son; *Aspergillus*, *Ayichia*, *Bettsia alvei*, *Cephalosporium*, *Chaetomium*, *Coniothecium*, *Hormiscium*, *Penicillium*, *Peronosporaceae*, *Peyronelia*, *Tripasporium*, *Uredinaceae* y *Ustilaginaceae*.

2. Levaduras

Las levaduras son organismos unicelulares, que pueden crecer en condiciones restrictivas para otros microorganismos, toleran la acidez y los altos niveles de sacarosa en la miel (Snowdon, 1999). El incremento de la humedad, las temperaturas moderadas, la granulación, un alto conteo de levaduras fomentan la fermentación en la miel generando la conversión del azúcar en alcohol, bióxido de carbono, ácidos orgánicos y otros compuestos con olores y sabores indeseables; el alcohol puede ser

convertido en ácido acético, adicionalmente el bióxido de carbono puede causar que la miel sea espumosa y turbia, además que tenga una vida de anaquel corta (Munitis *et al.*, 1976, Estupiñán *et al.*, 1998 y Snowdon, 1999).

De acuerdo a los datos señalados por Estupiñán *et al.* (1998), Snowdon y Cliver (1996) y Snowdon (1999), las levaduras principalmente encontradas en la miel son: *Ascosphaera*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Lipomyces*, *Nematospora*, *Oosporidium*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Schwanniomyces*, *Trichosporan*, *Torula*, *Torulopsis* y *Zybosaccharomices*.

3. Bacterias

Estupiñán *et al.* (1998) señalan que la miel presenta una flora bacteriana compuesta por microorganismos del género *Bacillus* generalmente esporulados, aunque en mieles frescas se pueden encontrar formas vegetativas, que se comportan como gérmenes inertes no alterantes y no toxigénicos, Snowdon (1999), reporta que en la miel se han encontrado diferentes tipos de bacterias y los conteos en placa son frecuentemente de 100 a 200 UFC/g; estos conteos están relacionados con el contenido de humedad de la miel, su edad, el tiempo de cosecha y la técnica analítica utilizada para su cálculo. Muchas de estas bacterias pueden ser introducidas en la miel durante la cosecha o el procesamiento y estos pueden sobrevivir en la miel por semanas o hasta que son removidas por algún tipo de tratamiento térmico.

La carga microbiana suele ser baja y va disminuyendo a medida que la miel envejece; sin embargo, se han detectado microorganismos peligrosos para la salud del hombre como *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo, *Bacillus cereus* o incluso *Clostridium botulinum* tipo G en mieles italianas (Estupiñán *et al.*, 1998). Recientemente se ha descubierto que esporas de *Clostridium botulinum* pueden germinar y crecer en abejas muertas coinfectadas por *Bacillus alvei* bajo condiciones anaeróbicas. Las esporas de *Clostridium botulinum* son principalmente estudiadas porque causan enfermedades asociadas con los alimentos; en los niños que aun no tienen un sistema de defensa maduro en los intestinos, las esporas de *Clostridium botulinum* atacan y crecen produciendo una toxina que causa parálisis muscular (Nakano *et al.*, 1991, y Snowdon, 1999).

Nakano *et al.*, (1991), señalan que la contaminación de la miel de abeja con esporas de *Clostridium botulinum* se debe a que: 1) las esporas atacan y matan a las abejas o larvas en la colmena, 2) las condiciones de humedad y temperatura presentes en las colmenas favorecen la multiplicación y esporulación de la bacteria y pueden o no favorecer el crecimiento de *B. alvei*, el contenido de azúcar del néctar (20-30 %) y su pH 4.7–5.4 pueden producir algunos cambios en el crecimiento de esta bacteria durante la maduración de la miel, 3) la centrifugación o extracción de la miel inmadura con la presencia de abejas muertas que contienen muchas esporas de *C. botulinum* y 4) aunque con el filtrado sí se realiza la remoción de la materia extraña las esporas no son retenidas en los filtros (Nakano *et al.*, 1991).

Al estudiar la incidencia de *Bacillus* y esporas de *Clostridium* en la miel procesada en las plantas envasadoras y en los lugares de venta al detalle, Snowdon, (1999), reporta que el 94% de las mieles muestreadas contienen de 10–100 esporas por gramo, la mayoría de estas esporas pertenecen al género *Bacillus*, las especies predominantes fueron *Bacillus cereus*, seguidas por *Bacillus coagulans*, *Bacillus megaterium*, y *Bacillus alvei*. Mientras que el 76% de las muestras contenían esporas clostridiales.

De acuerdo a los datos señalados por Snowdon, (1999) las bacterias principalmente encontradas en la miel son: *Alcanigenes*, *Bacillus*, *Bacteridium*, *Bacterium*, *Brevibacterium*, *Clostridium botulinum*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Neisseria*, *Proteus*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*.

La única bacteria extensamente estudiada en la miel es *Clostridium botulinum* ya que las esporas de esta bacteria han sido encontradas en la miel y en las colmenas; sin embargo, se cree que el crecimiento de muchos microbios no sucede durante la conversión del néctar a miel debido al efecto antimicrobiano del sistema glucosa oxidasa (Snowdon, 1999). Se han generado muchos estudios sobre la sobrevivencia de las bacterias en la miel asociando los daños que implica la introducción de organismos vegetativos que causan enfermedades.

F. Características de las regiones apícolas muestreadas.

Debido a las diferentes climas y flora, que influye sobre la composición de recursos de néctar y polen, México se divide en cinco regiones apícolas bien definidas, con diferente grado de desarrollo y variedad de tipos de mieles en cuanto a sus características de humedad, color, aroma y sabor; estas regiones son: Norte, Pacífico, Golfo, Centro, Oriente y Península de Yucatán.

Las muestras con las que se trabajo en este estudio provienen de las siguientes regiones:

Región Norte. Caracterizada por la excelente miel que se produce, principalmente de mezquite, miel extra clara ámbar cuya producción en su mayoría se destina a un mercado fuertemente demandante como es el de los EE.UU (Foto 1 y 2). En general los apicultores de esta región y específicamente de aquellos ubicados en el estado de Chihuahua movilizan sus colmenas para diversos estados de otras regiones aunque en muchos casos solo se hace uso de los recursos naturales ahí existente (Claridades Agropecuarias ASERCA, 2010), en las zonas montañosas predomina el abro (*Abrus precatorius*), pino (*Pinus pinea*), oyamel (*Abies religiosa*), cedro blanco (*Calocedrus decurrens*) y encino (*Quercus ilex*), entre la montaña y la meseta, bosque templado y matorrales, en la meseta vegetación desértica con mezquites (*Prosopis laevigata*), agave lechuguilla, gobernadora (*Lantana camara*), guayule (*Parthenium argentatum*) y ocotillo (*Fouquieria splendens*) al centro y noroeste planicies de pastizales. En esta región las alzas con las colmenas se transportan en charolas salvamiel a lugares cerrados donde se extracta la miel y es envasada en tambores de 300 kg o en envases de 250 ml, 500 ml y/o 1litro cuando el productor no pretende vender para exportación.

Región de la costa del Pacífico. Se caracteriza por producir mieles de origen multifloral y de mangle, siendo principalmente oscuras, aunque también se obtienen las de color ámbar y ámbar clara (Claridades Agropecuarias ASERCA, 2010). En general los apicultores de esta región hacen uso de los recursos naturales que ahí se encuentran (foto 3), en el caso específico del Estado de Michoacán se observa un relieve muy accidentado, por lo que sus climas son muy variados,

templado con lluvias todo el año, templado con lluvias en verano, cálido con lluvias en verano y cálido con lluvias escasas durante el año. La flora es muy variada, presentado bosques mixtos de pino (*Pinus pinea*), encino (*Quercus ilex*), fresno (*Fraxinus americana*), oyamel (*Abies religiosa*), parota (*Enterolobium cyclocarpum*), ceiba (*Ceiba pentandra*), café (*Coffea arabica* L.), calabaza (*Cucurbita pepo*), cepillo (*Callistemon citrinus*), cocotero (*Cocos nucifera*), Chile (*Capsicum annum* L.), eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill), Gurrumina (*Antigonon leptopus*), mango (*Mangifera indica* L.), mange (*Rhizophora mangle* L.) acacia (*acacia dealbata*), mirasol (*Helianthus annuus*) además de extensos cultivos de aguacate Hass, durazno (*Prunus persica* L.), fresa (*Fragaria vesca* L.), guayabo (*Psidium guajava* L.) y jitomate (*Lycopersicon esculentum*) (SAGARPA-COTECOCA, 1999) Los productores de esta región transportan en charolas salvamiel a lugares cerrados donde se extrae la miel aunque en algunos de los casos la extracción se realiza en lugares que no son cerrados, la miel es envasada en tambores de 300 kg, cubetas de 19 litros o envases de 250 ml, 500 ml y/o 1 litro cuando el objetivo es el mercado regional.



Foto 1. Apiario característico de la región norte del México en época de cosecha.



Foto 2. Colocación de apiarios antes del comienzo de la floración.



Foto 3. Colocación de apiarios en el Estado de Michoacán.

Región del Golfo. Destaca por poseer una gran producción de miel de cítricos, miel ámbar clara producida principalmente a partir de la flor del naranjo y en algunos de los estados acahual (*Tinthonia tubeaformis*) siendo esta una miel muy apreciada en el mercado internacional. En general los apicultores de esta región hacen uso de los recursos naturales locales pero también movilizan sus colmenas a otras regiones del país (Claridades Agropecuarias ASERCA, 2010), en el caso puntual del Estado de Tlaxcala que de acuerdo a la regionalización de la Organización Nacional de los Apicultores (foto 4 y 5), La vegetación silvestre está construida por pino blanco (*Pinus pseudostrobus*), ocotes (*Pinus teocote*), encinos (*Quercus spp*) y cedro blanco (*Cupressus benthamii*). En las partes medias de los cerros existe abundante vegetación secundaria de tipo matorral, cuyas especies más comunes son: sabino (*Juniperus deppeana*), palo dulce (*Eysenhardtia polystachya*), nopal (*Opuntia spinulifera*), mala mujer (*Wigandia urens*) tepozán (*Buddleia cordata*) y tlaxistle (*Amelanchier denticulata*). En la parte llana de este territorio, las especies más notorias son: magueyes (*Agave spp.*), pirul (*Schinus molle*), tronadora (*Tecoma stans*), (*Cassia tomentosa*), tepozán (*Buddleia cordata*), chacalotes (*Argemone spp.*), colorín (*Erythrina spp.*), higuera (*Ricinus communis*), zapote blanco (*Casimiroa edulis*), nopal de castilla (*Opuntia ficus-indica*), tabaquillo (*Nicotiana glauca*), jacaranda (*Jacaranda mimosifolia*), cercano a ríos ailes (*Alnus acuminata*), ahuehuetes (*Taxodium mucronatum*), sauces (*Salix bonplandiana*) y fresnos (*Fraxinus uhdei*) (Enciclopedia de los municipios de México-Tlaxcala, 2008). El sistema de producción empleado en esta región consiste en visitar el apiario y durante las cosechas transportar las alzas sobre charolas salvamiel a una planta de extracción y envasado, igual que en las otras regiones la miel es envasada en tambores de 300 kg, cubetas de 19 litros o envases de 250 ml, 500 ml y/o 1litro cuando el objetivo es el mercado regional.

Región del Centro. Se distingue por tener mieles ámbar y ámbar clara, consistencia tipo mantequilla, que por su presentación tiene mucha demanda del mercado europeo, su origen floral es el acahual y la aceitilla. En general los apicultores de esta región emplean los recursos naturales locales pero algunos realizan la movilización de sus colmenas a otras regiones productoras del país (Claridades Agropecuarias

ASERCA, 2010), para este estudio se trabajo con muestras del Estado de México (foto 6 y 7) que se caracteriza por tener una amplia variedad de flora , el árbol que ha proliferado es el pirúl (*Schinus sp*), debido al clima y tipo de suelo es muy común las diversas variedades de nopal (*Opuntia sp*) y maguey (*Agave sp*), así como cactus órganos (*Pachycereus marginatus*), diversos tipos de biznagas, de las flores y otras plantas las más comunes son el girasol mexicano (*Tithonia rotundifolia*), el mirasol (*Helianthus annuus*), acahual (*Bidens sp*), nabo (*Brassica sp*), jaramao (*Erysimum officinale*) , en las sierras especies de Pino (*Pinus sp*) , encino (*Quercus ilex*), cedro blanco (*Calocedrus decurrens*), oyamel (*Abies religiosa*) en los valles diversas especies de Pastizales, ocotillo y huizaches (Enciclopedia de los municipios de México-Estado de México, 2008). El sistema de producción que se emplea en esta región consiste en realizar visitas al apiario y cuando se llega la hora de la cosecha el apicultor lleva sus alzas con miel alzas a lugares de extracción y envasado cerrados, la miel extractada se envasa regularmente en envases de 19 litros y de 250 ml, 500 ml y/o 1litro.



Foto 4. Revisión de apiario localizado en el Estado de Tlaxcala



Foto 5. Apiario localizado en el Estado de Tlaxcala



Foto 6. Apiario en Villa de Allende, Estado de México.



Foto 7. Revisión de Apiario en Estado de México.

Región Sureste o Península de Yucatán. Importante por su volumen de producción de miel y por ubicar a la mayor parte de los apicultores del país. La miel de esta zona goza de gran prestigio nacional e internacional, se caracteriza por tener su origen en floraciones únicas, como son la de dzidzilché y de tajonal (Claridades Agropecuarias ASERCA, 2010). La miel que se recolecta en la Península de Yucatán proviene de 40 especies melíferas distintas según investigaciones realizadas por Villanueva (2001) las principales especies visitadas según los resultados de estas investigaciones son: tahonal (*Viguiera dentata*), chechem (*Metopium brownei*), dzidzilché (*Gymnopodium floribundum*), chaká (*Bursera simaruba*), kaan-chunub (*Thoninia canescens*), sak-piixoy (*Trema micrantha*), tzalam (*Lysiloma latisiliquum*), entre otras. Pocos apicultores (menos del 6%) cambian sus apiarios para aprovechar floraciones diferentes, los apiarios están instalados a una distancia de más de los cinco kilómetros de la casa (más del 60%) (foto 8 y 9) esto porque el monte más cercano o sus milpas están allá (Echazarreta, 1999). En el mercado local es comúnmente seleccionada como miel clara y oscura aunque se considera con mayor demanda la miel ámbar clara de supuesta mejor calidad entre los consumidores la cual se

atribuye principalmente de origen al dzidzilché (*Gymnopodium floribundum*). Del mes de enero a marzo el tajonal (*Viguiera dentata*) es la especie más recurrida por las abejas. En este mismo mes la miel de dzidzilché (*Gymnopodium floribundum*) es registrada en la producción. De abril a mayo las arbóreas como el tzalam (*Lysiloma latisiliquum*) y Jabín (*Pisciria piscipula*) son las más visitadas por las abejas. La cosecha de miel de noviembre a diciembre es de origen de enredaderas. Se calcula que la producción en estos meses alcanza hasta los 500 kilogramos en promedio por año (Echazarreta, 1999). Los apicultores se encuentran organizados en grandes asociaciones, a diferencia del resto de la República, en que las asociaciones son muy pocas y dispersas y realizan el proceso de extracción en campo no en lugares cerrados, la miel es acopiada en centros de acopio donde se homogeniza y es envasada en tambores de 300 kg, que regularmente son para la exportación a países europeos.



Foto 8. Apiario típico localizado en el Estado de Yucatán.



Foto 9. Revisión de apiario en el Estado de Yucatán.

G. Características de Calidad de la Miel en México y a Nivel Internacional

Pineda (2006) señala que la miel es el resultado de la conjunción de dos factores: el trabajo de las abejas para producirla y la intervención del hombre para extraerla de la colmena y ponerla a disposición del consumidor. En consecuencia, el apicultor debe ser capaz de conservar íntegras las características del producto para ofrecerlo tal como lo ha obtenido de las abejas. En este sentido, la calidad de la miel se determina mediante la evaluación de características físico-químicas, sensoriales, microbiológicas y polínicas.

En México, como en otros países, la miel que se comercializa debe cumplir diversas normas de inocuidad y calidad mediante las cuales se compruebe que el producto no se encuentra contaminado con residuos tóxicos provenientes de antibióticos, plaguicidas, pesticidas, insecticidas o adulteraciones con otros azúcares como el jarabe de fructuosa; para el control de todo este tipo de sustancias el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) de

la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) desde 1998 ha llevado a cabo el Programa de Monitoreo y Control de Residuos tóxicos en miel en coordinación con el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA) dentro de los Servicios en Sanidad Agropecuaria; con este programa de control ha sido posible continuar con la exportación a países de la Unión Europea (UE) principalmente países como Alemania.

Por otro lado, existen diversas instituciones que trabajan de manera directa con el apicultor en busca de la mejora en prácticas de producción y manufactura de la miel, tales como, el programa Nacional para el Control de la Abeja Africana con sus respectivas coordinaciones estatales, los comités estatales de fomento y protección pecuaria, el sistema producto miel de orden nacional y estatal, el consejo nacional agropecuario y otras instituciones académicas o asociaciones civiles que trabajan de manera coordinada con la SAGARPA-SENASICA.

Actualmente, las disposiciones internacionales en materia de calidad e inocuidad alimentarias propuestas por la Organización de las Naciones Unidas (ONU) para la Organización de Agricultura y Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), a través del Codex Alimentarius y la Unión Europea (UE), recomiendan la aplicación de estrategias orientadas a lograr alimentos de mayor calidad sin riesgo para la población. Los esfuerzos que México ha estado haciendo para mejorar la producción de los alimentos y monitorear la calidad deben ser tomados en cuenta y continuar impulsándolos para ampliar la competitividad en este sector ante las posibilidades de intercambio comercial que se enfrentan y sobre todo por lo importante que es preservar la salud humana (Caballero, 2009).

Se sabe que desde hace 50 años la miel mexicana ha sido comercializada en los mercados de Europa, Estados Unidos, Arabia Saudita y Japón gracias a que es considerada una de las mieles con mayor calidad y de las mejor cotizadas en el mundo. Esto propició que el Gobierno Federal a través de SAGARPA-SENASICA implementara el Programa Nacional de Inocuidad y Calidad de la Miel, buscando el

empleo de las Buenas Prácticas de Producción y Manufactura de la miel para garantizar la calidad e inocuidad de la miel mexicana en el mercado mundial, por otro lado también se ha trabajado en el desarrollo del programa de trazabilidad mediante el cual los productores, envasadores, acopiadores y exportadores adquieren una Identificación de Registro mediante el cual se pueda contar con un padrón nacional y se cuente con información productiva que pueda ser presentada a los compradores mundiales de este producto ante la presencia de alertas sanitarias donde se requieran establecer procesos de rastreabilidad o recolección de productos contaminados.

La Comisión Internacional de la miel reporta que existen diversos criterios de calidad que se toman como estándares de control internacional para evaluar la calidad de la miel. El Cuadro 4 presenta de forma comparativa los parámetros permitidos por la Comisión de la Unión Europea, el Codex Alimentarius y regulación nacional presentada en la Norma Mexicana de Miel (NMX-F-036-NORMEX-2006).

Cuadro 4. Parámetros de calidad de la miel de acuerdo al Codex Alimentarius STAN 12-1981 (2001), el consejo de la UE directiva 2001/110/CE y la NMX-F-036-NORMEX-2006

CRITERIOS DE CALIDAD	Codex Alimentarius	Unión Europea	NMX-F-036 NORMEX-2006
Humedad (%/100 g)	≤ 21%/100 g	≤ 21%/100 g	20%/100 g
Contenido aparente de azúcar reductor (% de azúcar invertido en 100)	≥ 65%/100 g	≥ 65%/100 g	≤ 63.8%/100 g
Contenido aparente de sacarosa (g/100 g)	≤ 5/100 g	≤ 5g/100 g	≤ 5g/100 g
Sólidos insolubles en agua	≤ 0.1 g/100 g	≤ 0.1 g/100 g	≤ 0.3 g/100 g
Minerales (cenizas)	≤ 0.6 g/100 g	≤ 0.6 g/100 g	6 g/100 g
Conductividad eléctrica	≤ 8 mS/cm	≤ 8 mS/cm	No se especifica en la norma
Acidez	≤ 50 meq/Kg	≤ 40 meq/Kg	≤ 40 meq/Kg
Actividad de diastasa (de acuerdo a la escala de Schade) ¹	≥ 8	≥ 8	≥ 8
Hidroximetilfurfural ¹	≤ 60 mg/Kg	≤ 60 mgKg	≤ 40 mgKg ² ≤ 80 mgKg ³

¹ Se consideran después de procesar y mezclar, ² Para mieles envasadas de <6 meses y ³ Para mieles envasadas de >6 meses

V. MATERIAL Y MÉTODOS

A. Origen de las muestras de Miel

Para determinar el origen de las muestras se consideraron la producción de miel anual y las regiones productoras de miel en México. La clasificación por regiones productoras se hizo con base en la regionalización empleada por la Organización Nacional de Apicultores (ONA) y la información publicada por el Programa Nacional para el Control de la Abeja Africana. En el Cuadro 5 se presenta la producción estatal durante 2009 de acuerdo a la regionalización de la ONA de las zonas apícolas a nivel nacional: Norte, Pacífico, Oriente, Centro, Golfo y Península.

La evaluación físico-química se realizó en 79 muestras de miel procedentes de: Chihuahua (región Norte, $n = 10$) Estado de México (región Centro, $n = 39$), Michoacán (región Pacífico, $n = 10$), Tlaxcala (región Golfo, $n = 10$) y Yucatán (región Península, $n = 10$). Únicamente no se representa la región Oriente, debido a que las muestras no fueron entregadas en tiempo y forma. Para la evaluación microbiológica se utilizaron 31 muestras de miel procedentes de los siguientes estados: Estado de México ($n = 11$), Michoacán ($n = 10$) y Yucatán ($n = 10$), representativas de las regiones Centro, Pacífico y Península, respectivamente (Cuadro 5). Todas las muestras se entregaron directamente por el productor en su envase original de venta al consumidor. Además, todas las muestras se identificaron mediante los formatos incluidos en el Anexo I y II del documento.

B. Evaluación de Parámetros Físico-químicos

1. *Determinación de humedad*

El porcentaje de humedad de la miel se cuantificó utilizando el índice de refracción. Para ello se colocaron las muestras directamente sobre el prisma y se obtuvo la lectura, tomando en cuenta la corrección de temperatura. El refractómetro se calibró a 20°C y a partir del factor de corrección se sumó el valor obtenido directamente por la escala del instrumento, del resultado obtenido en °Brix se calculó la humedad de las mieles analizadas (Preza de la Vega, 2007 y Juárez, 2003).

Cuadro 5. Regionalización de la producción estatal durante 2009.

REGIÓN (<i>Estado y Producción en toneladas</i>)					
<i>NORTE 1,894 ton</i>		<i>PACIFICO 10,705 ton</i>		<i>ORIENTE 1,743 ton</i>	
Baja California Norte	132	Aguascalientes	460	Coahuila	232
Baja California Sur	272	Colima	346	Nuevo León	504
Sonora	340	Guanajuato	353	Tamaulipas	171
<i>Chihuahua *</i>	<i>578</i>	Nayarit	493	San Luis Potosí	836
Durango	572	Sinaloa	351		
		Zacatecas	1,603		
		<i>Michoacán *</i>	<i>1,690</i>		
		Jalisco	5,409		
<i>CENTRO 5,857 ton</i>		<i>GOLFO 12,168 ton</i>		<i>PENÍNSULA 19,817 ton</i>	
Distrito Federal	91	Morelos	1,010	Tabasco	157
Querétaro	91	<i>Tlaxcala *</i>	<i>1,100</i>	Quintana Roo	2,170
Hidalgo	841	Puebla	2,572	Chiapas	4,270
<i>Estado de México *</i>	<i>1,135</i>	Oaxaca	3,492	<i>Yucatán *</i>	<i>6,244</i>
Guerrero	3,699	Veracruz	3,994	Campeche	6,976

*Estados considerados para el análisis físico-químico

2. *Determinación de azúcares reductores totales*

Los azúcares reductores totales se determinaron a partir de una modificación del método de *Lane-Eynon*, el cual consiste en una titulación de cobre (II) por cada parte de una disolución de miel. El método consistió en mezclar 5 ml del reactivo A de Fehling (Sulfato de cobre (II) pentahidratado con una concentración de 0.27 M) y 5 ml del reactivo B de Fehling (Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado 1.1 M e hidróxido de sodio 2.5 M) sobre una parrilla caliente en agitación constante. Después, se preparó una disolución de miel con 0.5 g/200 ml de agua destilada, la cual se utilizó para realizar la titulación, utilizando para ello un potenciómetro con electrodo de cobre. Conforme la mezcla perdió la coloración azul se agregó azul de metileno para indicar el punto de equivalencia. Se controló en todo el proceso que la temperatura no variara más de 3 grados. Por último, para determinar con mayor precisión el punto de equivalencia se graficaron los datos obtenidos de las mediciones con el potenciómetro. Es importante resaltar la diferencias con otros métodos pues con este método se conocen las concentraciones de los reactivos, se controla la temperatura se registran los cambios en las curvas de valoración

3. *Medición de pH y determinación de cenizas por conductividad eléctrica*

La determinación de pH en la miel se realizó de forma directa empleando un medidor de pH calibrado con las soluciones amortiguadoras a pH 4 y 7. Para realizar las mediciones fue necesario disolver la miel en agua desionizada.

Con respecto al contenido de cenizas, se midió la conductancia en disoluciones (0.1 g/ml) de las muestras de miel mediante un conductímetro. La conductancia se transformó en conductividad específica y se relacionó directamente con el porcentaje de cenizas a través de una expresión matemática descrita en estudios realizados por Vorwohl G. (1964) y Piazza M. *et al.*, (1991). A cada una de las muestras de miel se les midió la conductancia a temperatura ambiente y al valor obtenido se le restó la conductancia del agua desionizada utilizada. A partir de esta conductancia y del valor de la constante de celda k_c se calculó la conductividad

específica de la miel, con la cual se obtuvo el porcentaje de cenizas por despeje de la fórmula matemática propuesta por Juárez (2003) y Caballero (2009).

4. *Medición de hidroximetilfurfural (HMF)*

Para las determinaciones de HMF se colocaron en una celda electrolítica: buffer de boratos como electrolito soporte, la disolución de miel y diferentes volúmenes del patrón de HMF. Para cada muestra de miel se trazaron los polarogramas correspondientes de acuerdo al método diferencial de impulsos. El cual consiste en agregar diferentes volúmenes de una disolución patrón de HMF a cierta cantidad de una muestra de miel de la que se quiere cuantificar el contenido de HMF. Para ello se trazó un polarograma de intensidad de corriente contra potencial con el método de polarografía diferencial de impulsos que incluye la señal de corriente residual, la señal de la muestra de miel y las señales de los distintos volúmenes del patrón de HMF.

El procedimiento consistió en burbujear nitrógeno gaseoso en la celda que contiene el electrolito soporte para eliminar el oxígeno disuelto en el electrolito y mantener la atmósfera libre de oxígeno en todo momento. Después, se trazó el polarograma correspondiente a la corriente residual dada por el electrolito soporte con los siguientes parámetros: barrido de potencial de -700 mV a -1500 mV, con una velocidad de barrido de 5 mV/s. El paso siguiente consistió en añadir a la celda un volumen de entre 1 y 2 ml de la disolución de miel y obtener el polarograma. Al final se agregaron a la celda distintos volúmenes de la disolución patrón de HMF y se obtuvieron los polarogramas correspondientes utilizando el mismo barrido de potencial del polarograma inicial pero a una velocidad de barrido de 2 mV/s. Una vez obtenidas todas las curvas (residual, miel y patrón HMF), se obtuvieron las corrientes máximas o de pico al potencial donde se presenta la señal de reducción del HMF de las curvas de la muestra y los volúmenes de la disolución patrón. A cada corriente máxima se le restó el valor de corriente residual a ese potencial para tener el valor real de corriente de las señales. A partir de los valores de corriente máxima corregidos se construyó la gráfica de corriente de pico contra

concentración, a esta gráfica se le conoce como curva de adiciones patrón de HMF, y de ella se obtuvo la ecuación de la recta. Mediante el cociente de la ordenada al origen y la pendiente de la recta se determinó la cantidad de HMF presente en las muestras de miel. Todo el proceso se realizó de acuerdo al método descrito previamente por Caballero (2009).

5. *Evaluación del color*

La medición objetiva del color se realizó mediante un colorímetro Minolta Chroma Meter CR-310 (Minolta, Osaka, Japón). De esta forma se evaluaron los valores de luminosidad (L^*), intensidad de rojo (a^*) e intensidad de amarillo (b^*).

C. Evaluación de Parámetros Microbiológicos

El análisis microbiológico contempló la comparación entre dos métodos de prueba; los tradicionales y un método rápido para la detección de microorganismos indicadores y patógenos.

1. *Métodos tradicionales para la detección de microorganismos indicadores*

Para la evaluación de las mieles se emplearon los métodos tradicionales que se describen en las siguientes normas: 1) NORMA Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa; 2) NORMA Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos y 3) NORMA Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes: Técnica del número más probable.

2. *Método rápido para la detección de microorganismos patógenos e indicadores*

Como método rápido para la detección de microorganismos indicadores y patógenos en las muestras miel se emplearon placas Petrifilm (3M, México) que son medios de cultivo en formato listo para la muestra. Estas placas han sido construidas con base en tecnologías de adhesivos con la finalidad de permitir el análisis microbiológico rápido de alimentos.

Para la determinación de la población total de *bacterias mesofílicas: aerobias y anaerobias* se utilizaron placas Petrifilm con un colorante indicador rojo Tricloruro de Trifenil Tetrazolium (TTC) que tiñe a todas las colonias. Los nutrientes del medio son los mismos que los empleados en otros métodos estándar además del empleo de Goma Guar. La incubación de estas placas se realizó entre 37°C durante 48 horas. Para esta evaluación se contaron todas las colonias rojas, independientemente de su tamaño o de la intensidad de su color.

Para determinar las poblaciones de *levaduras y hongos* se utilizó una cualidad de las placas Petrifilm que cuentan con antibióticos incorporados que inhiben el crecimiento bacteriano (Clorotetraciclina y Cloramfenicol). Las colonias de levaduras tiñen facilitando el contraste y el fácil recuento. Los nutrientes del medio son los mismos que los métodos estándar Saboraud modificado y Goma Guar. La incubación de estas placas se realizó entre 28°C de 5 a 7 días. Para esta evaluación se consideró que las levaduras fueran identificadas como colonias azul-verdosas.

Por otra parte, el recuento de *coliformes* se realizó mediante la coloración roja diferencial de la placa en todas las colonias, mientras que la capa superior atrapa al gas producido por los organismos de tipo coliforme. Es importante mencionar que los coliformes producen colonias rojas asociadas a burbujas de gas mientras que las colonias de bacterias no coliformes son rojas pero no están asociadas a burbujas de gas. Los nutrientes del medio son los mismos que en el método tradicional y Goma Guar. La placa cuenta con una almohadilla de hule espuma y un indicador Tricloruro de Trifenil Tetrazolium (TTC). La incubación de estas placas se realizó entre 37 °C por un período de 48 horas.

D. Adecuación de las Técnicas para la Preparación y Dilución de las Muestras

Para adecuar la técnica y asegurarse de que las bacterias, hongos y levaduras crecieran en las placas Petrifilm, se realizó un protocolo donde fueron inoculadas tres muestras de manera intencional con cepas puras de *Bacillus cereus* y *Clostridium spp* donadas amablemente por el cepario de la Facultad de Química de la UNAM. Esta inoculación contempló varias diluciones. La siembra se realizó empleando tanto los métodos tradicionales (NOM-092-SSA1-1992, NOM-111-SSA1-1994, NOM-112-

SSA1-1994 como las placas Petrifilm. El procedimiento se presenta de manera detallada a continuación:

El procedimiento utilizado para determinar el crecimiento microbiológico y para obtener la dilución óptima para la evaluación consistió en: **a)** la dilución de 10 mg de miel en 90 ml de agua peptonada, con un pH entre 6.7 y 7.2; **b)** la siembra por duplicado de las bacterias esporuladas, para ello se emplearon cultivos puros de cepas de *E. coli*, *Bacillus cereus* y *Clostridium spp* en medios de cultivo tradicionales Agar Cuenta Estándar (ACE) y en placas Petrifilm de acuerdo a las siguientes diluciones: *Bacillus cereus* (1ml) de 10^{-1} hasta 10^{-6} y *Clostridium spp* (1ml) de 10^{-1} hasta 10^{-4} ; **c)** siembra por duplicado de miel control 10^{-3} y 10^{-4} en métodos convencionales y en placas petrifilm para mesófilos aerobios; **d)** siembra por duplicado de miel control 10^{-4} + *E. coli* en métodos convencionales y en placas petrifilm para coliformes; **e)** incubación de cajas petri y placas Petrifilm sembradas con *Clostridium spp* en jarra de anaerobiosis a 37°C durante 48 horas y finalmente **f)** incubación de cajas petri y placas petrifilm sembradas con *Bacillus cereus* y levaduras a 28°C durante 48 horas.

Estos procedimientos nos permitieron determinar la recuperación de los microorganismos por ambos métodos. Para los casos particulares de *Clostridium spp* y *Bacillus cereus* en diluciones de 10^{-1} a 10^{-4} los resultados fueron incontables, mientras que para *Bacillus cereus* en diluciones de 10^{-5} se contaron 6 colonias en el medio tradicional ACE y 112 en las placas Petrifilm, a diferencia de la dilución de 10^{-6} para el mismo microorganismos, en el cual se contabilizaron 2 colonias en el medio tradicional ACE y 12 en las placas Petrifilm.

Para el caso de la siembra en miel control con diluciones 10^{-3} y 10^{-4} tanto en métodos convencionales como en placas petrifilm para mesófilos aerobios no se observó crecimiento. A diferencia de la siembra de miel control en dilución 10^{-4} + *E. coli*, pues tanto en métodos tradicionales como en placas petrifilm para coliformes se observó crecimiento aunque solo de una colonia por método. Corroborado el crecimiento microbiológico se empleo la metodología completa para el análisis de las 31 muestras de miel, el Diagrama 1 presenta el procedimiento empleado.

Diagrama 1.

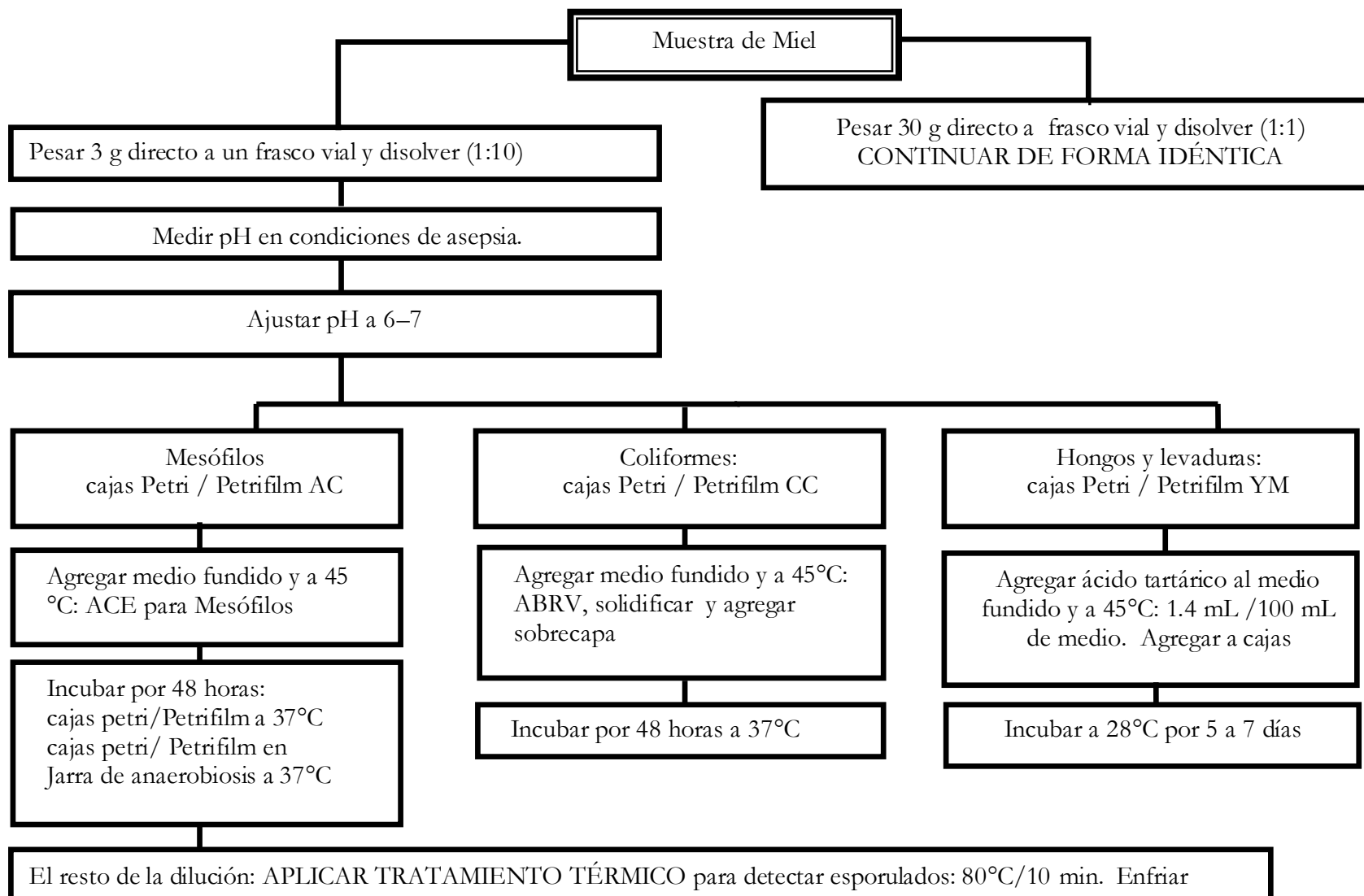
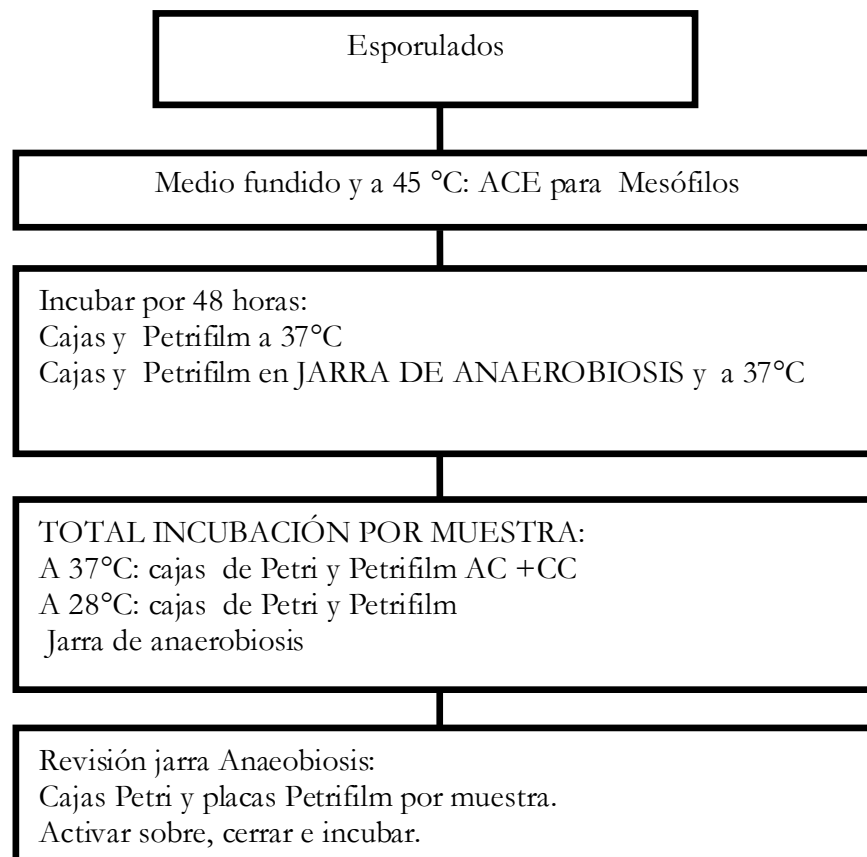


Diagrama 1.



E. Análisis Estadístico

Para realizar el análisis estadístico de los valores de humedad, pH, HMF, azúcares reductores totales, cenizas, Luminosidad, a^* (color rojo-verde) y b^* (color amarillo-azul), los datos fueron analizados mediante estadística no paramétrica, debido que las transformaciones no lograron homogeneizar la varianza, además de que los datos no se distribuyeron de forma normal. El análisis utilizado consistió en la prueba de Kruskal-Wallis. En caso de encontrarse diferencias significativas se aplicó la prueba de comparación múltiple de Dunn. Para el caso de la comparación del valor promedio de los parámetros físico-químicos con respecto al valor de las normas nacionales e internacionales se utilizó una prueba de rangos asignados de Wilcoxon.

Para comparar los valores obtenidos de cada método (ACE *vs* placas Petrifilm) se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para dos medias independientes, ya que los datos no superaron las pruebas de distribución normal y de homogeneidad de varianzas.

Para el caso de la evaluación de bacterias mesofílicas aerobias y hongos y Levaduras se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis. En caso de encontrarse diferencias significativas se aplicó la prueba de comparación múltiple de Dunn. A su vez para el caso de la comparación del valor promedio con respecto al valor de las normas nacionales e internacionales se utilizó la prueba de intervalos asignados de Wilcoxon. En todos los casos, los valores del conteo de los microorganismos se presenta como \log_{10} de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

El análisis de la correlación entre los parámetros físico-químicos y microbiológicos para las muestras evaluadas consistió en la prueba de correlación de intervalos ρ de Spearman.

En todos los casos se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. Todos los valores se presentan como el promedio \pm EE.

VI. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

A. Análisis Físico-químico

1. *Humedad*

En el Cuadro 6 se resumen los valores promedio del porcentaje de humedad. Se aprecia que las mieles de Yucatán presentan el mayor contenido de agua ($p < 0.05$) a diferencia del resto de los estados que tienen porcentajes similares de humedad ($p > 0.05$). Del total de muestras evaluadas, el 95% de las mismas presentaron valores significativamente inferiores ($p < 0.005$) al 20% de humedad establecido como límite máximo en las normas de calidad nacionales e internacionales. Por otra parte, el 41% de las muestras evaluadas son $<17\%$ de humedad que establecieron como límite Belitz y Grosch (1997). En general, los porcentajes de humedad indican que la madurez y el momento de extracción de la miel fueron adecuados, aun en aquellas muestras obtenidas de estados pertenecientes a regiones de clima tropical.

Bogdanov et al., 2004 señala que el contenido en agua de la miel es un factor determinante de su calidad, debido a que influye en la viscosidad, peso específico y sabor; condicionando la palatabilidad y el sabor. Por lo tanto, la humedad es un parámetro importante en la determinación de la vida útil del producto cuando la miel se encuentra cercana al 18% de agua, pues de acuerdo a los resultados de Tosi et al., (2004) la cristalización provoca el incremento del contenido de agua de la fase líquida y por tanto la a_w , que puede alcanzar fácilmente un nivel en el que puede ocurrir la fermentación por levaduras osmófilas. Sin embargo Terrab *et al.*, (2003a y c) muestran valores de entre 16 y 18.5% en miel de eucalipto y Terrab *et al.*, (2003b) señala intervalos de 15.4 a 19.3% de humedad, si presencia de fermentación.

2. *Azúcares reductores totales (ART)*

Los resultados de azúcares totales de la miel permiten observar que los valores son similares en los cinco estados, los resultados estadísticos muestran que los valores de azúcares reductores totales no presentan diferencias significativas entre las mieles de los estados (Cuadro 7; $p = 0.11$). Datos publicados por Swallow y

Low., (1990) y Terrab *et al.*, (2003a) reportan un porcentaje que va del 65 al 75% en este estudio los rangos van de 61.3 a 79.1%. De manera similar Zandamela (2008) encuentra en su trabajo sobre la caracterización físico-química y la evaluación sanitaria de mieles en Mozambique, que mieles provenientes de cuatro regiones diferentes de ese país presentan un valor aproximado al 71.5%.

3. Cenizas

El contenido de Cenizas en la miel evaluada presentó diferencias entre los estados de Michoacán y Yucatán que tuvieron los valores más altos de cenizas (Cuadro 8; $p < 0.05$), mientras que la miel proveniente de los estados de México y Tlaxcala presentan el menor contenido de cenizas ($p < 0.05$), mientras que el estado de Michoacán presentó valores intermedios de ceniza. Por otra parte, las muestras evaluadas presentaron porcentajes de ceniza significativamente por debajo del valor estipulado por la norma mexicana (0.6%, $p < 0.005$), excepto el estado de Michoacán que presentó valores similares de cenizas que la referencia establecida por la norma ($p > 0.05$).

4. pH

En el Cuadro 9 se presenta el análisis de los valores promedio de pH de las muestras de miel evaluadas indicaron la existencia de diferencias entre los estados de Chihuahua, Michoacán y Tlaxcala que tuvieron los valores más altos de pH ($p < 0.05$) y el estado de México que presentó el valor más bajo de pH ($p < 0.05$). Los valores de pH en las muestras analizadas del estado de Yucatán resultaron similares al resto de los estados. Aproximadamente 10% del total de las muestras presentaron valores superiores a pH 4.5, reportado por Frías y Hardisson, (1992), mientras que Balanza (2003), encontró diferencias significativas para el pH y un intervalo reducido de los valores. Por otra parte, Pérez-Arquillué *et al.*, (1990), encontró un valor de pH < 4 entre las mieles de frutales de romero, zadorija y sauce de Zaragoza. A este respecto, Frías y Hardisson (1992) mencionan que las mieles con pH > 4.5 pueden ser indicativas de su posible origen de mielada.

Cuadro 6. Porcentaje de humedad en las muestras de miel de los diferentes estados.

Estado	Humedad (%)	Intervalo	NMX (20% máx) ¹
Chihuahua	17.68 ± 0.54 ^B	14.7 – 19.0	< 0.005
México	18.43 ± 0.24 ^B	15.7 – 24.4	< 0.001
Michoacán	17.87 ± 0.33 ^B	16.5 – 19.5	< 0.001
Tlaxcala	17.69 ± 0.49 ^B	16.9 – 21.7	< 0.005
Yucatán	19.51 ± 0.13 ^A	18.7 – 19.7	< 0.005

¹ Se considera un valor de 20% de humedad como máximo aceptado por la NOM. Los valores de *p* indican la significancia al comparar los promedios obtenidos por estado contra el valor establecido por la norma.

^{A-B} Literales diferentes en la columna indican diferencias significativas (*p* < 0.05).

Cuadro 7. Contenido de ART de las muestra de miel provenientes de los estados.

Estado	ART (%) ¹	Intervalo	NMX (63.8 g/100g mín) ¹
Chihuahua	74.3 ± 1.03	70.7 – 79.2	< 0.0001
México	71.7 ± 0.52	61.3 – 76.6	< 0.001
Michoacán	70.2 ± 1.03	64.6 – 67.5	< 0.005
Tlaxcala	71.5 ± 2.23	70.2 – 79.2	< 0.01
Yucatán	72.0 ± 1.13	62.9 – 75.6	< 0.0001

¹ Se considera un valor mínimo de 63.8 g/100 g de ART en las mieles. Los valores de *p* resumen la significancia de la comparación del promedio de ART comparado con el valor publicado por la norma.

Cuadro 8. Porcentaje de cenizas contenidas en las muestras de miel.

Estado	Cenizas (%)	Intervalo	NMX (0.6% máx) ¹
Chihuahua	0.14 ± 0.031 ^{A-B}	0.07 – 0.44	< 0.005
México	0.11 ± 0.009 ^B	0.02 – 0.25	< 0.001
Michoacán	0.33 ± 0.062 ^A	0.03 – 0.77	0.07
Tlaxcala	0.06 ± 0.007 ^B	0.03 – 0.08	< 0.001
Yucatán	0.19 ± 0.005 ^A	0.15 – 0.21	< 0.005

¹ Se considera un valor de 0.6% de cenizas como máximo aceptado por la NOM. Se muestran los valores de significancia al comparar los promedios obtenidos por estado con respecto al valor de la norma.

^{A-B} Literales diferentes en la columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Cuadro 9. Valores de pH de las muestras de miel de los diferentes estados.

Estado	pH	Intervalo
Chihuahua	4.0 ± 0.11 ^A	3.6 – 4.5
México	3.6 ± 0.04 ^B	2.6 – 4.1
Michoacán	4.4 ± 0.25 ^A	3.6 – 6.5
Tlaxcala	4.1 ± 0.04 ^A	3.8 – 4.3
Yucatán	3.8 ± 0.07 ^{A-B}	3.7 – 4.4

^{A-B} Literales diferentes en la columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

5. *Hidroxicimetilfurfural (HMF)*

En el Cuadro 10 se resumen los valores promedio de HMF en las muestras evaluados indican una mayor cantidad de HMF en el estado de Yucatán (39.6 ± 5.62 ; $p < 0.05$), a diferencia del estado de Tlaxcala que presentó la menor cantidad de HMF en las muestras (7.0 ± 1.16 ; $p < 0.05$). Dos de las muestras estudiadas presentaron valores superiores al límite máximo de 40mg/kg de HMF establecido en las normas nacionales e internacionales. Sin embargo, ninguna de las muestras estudiadas superó los 80 mg/kg que se considera como el límite máximo permitido para mieles envasadas por más de 8 meses que se establece en las normas nacionales e internacionales. Los resultados muestran que únicamente las mieles procedentes de los estados de Chihuahua, México y Tlaxcala se encuentran significativamente por debajo de los valores que las regulaciones exigen (40 mg/kg; $p < 0.001$).

Considerando que la cantidad de HMF en la miel se utiliza como un indicador del grado de frescura (Terrab *et al.*, 2003a), se ha demostrado que la tasa de formación de HMF está relacionada directamente con la humedad y el contenido inicial del mismo en la miel (Shade *et al.*, 1958). Por otro lado, Hadom *et al.*, (1962), referenciados por Estupiñán *et al.*, (1998), señalan que la acidez ejerce un efecto positivo en la formación del HMF, tal como se ha comprobado previamente en mieles suizas calentadas con una baja tasa de HMF debido a su alto pH (4.5 a 5.0). Adicionalmente, Huidobro *et al.*, (1984) mencionan que la concentración de HMF también está relacionada con la actividad enzimática existente, de modo que aquellas mieles con un índice de diastasas bajo, posiblemente presentan valores altos de HMF, lo cual sería indicativo de una conservación inadecuada. No obstante, Serra y Gómez (1986), citados por Estupiñán *et al.*, (1998), reportan que la presencia de altos contenidos de HMF también pueden ser indicativos de la adición de azúcar invertido obtenido por hidrólisis química.

Bosch y Serra, (1986), reportan que el contenido de HMF aumenta espontáneamente con el transcurso del tiempo a temperatura ambiente, ya que se observó una diferencia importante en los valores de HMF de acuerdo a la procedencia de las muestras; zonas frías o cálidas. Siendo estas ultima, las que

presentan hasta un máximo de 40 mg/kg, coincidiendo con los datos señalados en el pliego de condiciones para la miel de abeja y la directiva 74/409 de la comunidad europea. Por ello es importante que la miel no esté expuesta al sol por mucho tiempo, ya que sufre transformaciones que disminuyen su calidad (Thun., 2005). Además, la miel no debe calentarse para su extracción o a la hora de envasarla, debido a que pierde muchas de sus propiedades (Coe P., 2008).

6. *Parámetros de color*

Los resultados de la medición del color se han realizado de acuerdo al espacio uniforme de color CIE L*a*b* y se presentan en el Cuadro 11. Todas las muestras presentaron valores de luminosidad positiva ya que los valores son >0 , de acuerdo a CIE L*a*b* (1976) el parámetro L* varía de 0 a 100 (0 es negro y 100 blanco). Los resultados indican que las muestras del estado de Tlaxcala son más oscuras, ya que el valor L* fue de 53.6 ± 2.2 ($p < 0.05$), en contraste las muestras de Yucatán son significativamente más claras ($p < 0.05$). El resto de los estados presenta mieles con tonalidades intermedias.

Los valores de a* (color rojo-verde) presentan diferencias entre los estados, ya que el valor de las muestras del estado de México presenta los valores significativamente más altos ($p < 0.05$), mientras que las muestras de Tlaxcala tienen los valores más bajos de a* ($p > 0.05$). En algunas muestras del estado de Chihuahua se presentaron muestras (<3%) con valor negativo de a*, indicativo de una tendencia a la coloración verde. En contraste, el resto de las muestras (97%) presentó valores con tendencia a una coloración roja. Ya que de acuerdo a los valores del espacio de color L* a* b* (CIE 1976), si el valor de a* es >0 el color es rojo y si es < 0 el color es verde.

Los valores promedio de b* (color amarillo-azul) muestran diferencias entre los estados ($p < 0.05$). Todas las muestras estudiadas presentaron color amarillo de acuerdo con los valores del espacio de color L* a* b* (CIE 1976). Si el valor de b* es >0 el color es amarillo y si el valor es < 0 el color es azul. Los resultados muestran que los valores de b* en la miel del estado de México son mayores al resto de las muestras estudiadas ($p < 0.05$).

Cuadro 10. Contenido de HMF en las muestras de miel provenientes de los estados.

Estado	HMF (mg/kg)	Intervalo	NMX (40 mg/kg máx) ¹
Chihuahua	17.1 ± 2.49 ^B	7.79 – 25.83	< 0.0001
México	12.1 ± 1.25 ^{B-C}	1.22 – 30.06	< 0.001
Michoacán	26.8 ± 7.05 ^{A-B}	4.14 – 68.24	0.095
Tlaxcala	7.0 ± 1.16 ^C	2.35 – 13.78	< 0.0001
Yucatán	39.6 ± 5.62 ^A	19.3 – 61.0	0.955

¹ Se considera un valor de 40 mg/kg de HMF como máximo aceptado por la NOM. Valores de *p* obtenidos de la comparación estadística de los promedios obtenidos por estado con respecto al valor de la norma.

^{A-B} Literales diferentes en la columna indican diferencias significativas (*p* < 0.05).

Cuadro 11. Parámetros de color de las muestras de miel de acuerdo a la medición del espacio uniforme de color CIE L*a*b*

Estado	Valor L*	Valor a*	Valor b*
Chihuahua	39.3 ± 1.6 ^{C-B}	3.1 ± 0.9 ^{B-C}	11.4 ± 2.0 ^{A-B}
México	43.2 ± 1.2 ^B	4.4 ± 0.4 ^A	19.9 ± 1.2 ^A
Michoacán	33.2 ± 1.2 ^{C-D}	4.0 ± 1.2 ^{A-B}	6.0 ± 1.0 ^B
Tlaxcala	53.6 ± 2.2 ^A	2.5 ± 0.2 ^C	19.0 ± 0.9 ^A
Yucatán	29.2 ± 1.1 ^D	4.1 ± 1.3 ^{A-B}	3.9 ± 1.9 ^B

^{A-B} Literales diferentes en las columnas indican diferencias significativas (*p* < 0.05).

B. Evaluación Microbiológica

1. *Mesofílicos aerobios*

El Cuadro 12 muestra que los resultados obtenidos de la evaluación realizada a las mieles de los estados de México, Yucatán y Michoacán empleando un método tradicional (medio ACE) y un método rápido (Petrifilm 3M) se encuentran significativamente ($p < 0.005$) por debajo de los valores permitidos por las regulaciones nacionales e internacionales (NMX-F-036-NORMEX-2006 y Codex Alimentarius de la miel). Por tanto, la baja contaminación por microorganismos mesófilicos aerobios es indicativo de un adecuado manejo microbiológico de la miel, aunque no existe relación con la posible presencia de gérmenes patógenos (Pascual, 1992). Los resultados del estado de Yucatán posiblemente se relacionan con los sistemas de extracción de la miel en Yucatán, en donde el 100% de los apicultores extrae en campo y transporta su producto en envases de segundo uso lo que puede ser una fuente de contaminación por manipulación inadecuada durante la recolección, procesamiento y almacenamiento de la miel, (Efem., *et al*, 1992).

La comparación por cada método se resume en el Cuadro 13 que demuestra diferencias significativas únicamente para el método tradicional entre los promedios de los tres estados, ya que los valores de las bacterias mesofílicas aerobias de Yucatán son significativamente más elevados ($p < 0.05$), aunque Michoacán presenta valores similares a los dos estados ($p > 0.05$), mientras que en México el conteo de estos microorganismos es el más bajo ($p < 0.05$). La comparación entre métodos nos muestra que no se presentaron diferencias en los conteos registrados por cada método ($p > 0.05$). Además, los conteos realizados en cada método presentaron una correlación alta ($r > 0.75$; $p < 0.05$), resultados que indican una alta consistencia entre los conteos realizados por ambos métodos.

Es importante considerar que los recuentos de bacterias mesófilicas aerobias en las mieles pueden variar de 0 a 1000 microorganismos por gramo dependiendo de la frescura de la miel, época de cosecha y técnicas utilizadas para esta (Snowdon y Cliver, 1996).

Cuadro 12. Comparación del promedio de cuenta aerobia por ambos métodos en contra de la NMX.

Estado	<i>ACE</i>		<i>placas Petrifilm</i>	
	Promedio \pm EE	<i>vs</i> NMX ¹	Promedio \pm EE	<i>vs</i> NMX ¹
México	0.63 \pm 0.23	$p = 0.0033$	0.11 \pm 0.20	$p = 0.0038$
Michoacán	0.93 \pm 0.23	$p = 0.0058$	1.30 \pm 0.30	$p = 0.0081$
Yucatán	1.59 \pm 0.24	$p = 0.0021$	1.85 \pm 0.16	$p = 0.0059$

¹ Se considera el valor de log 1000 UFC/g como parámetro de las normas para la comparación contra los promedios obtenidos de cada uno de los métodos.

Cuadro 13. Comparación de los conteos de bacterias mesofílicas aerobias por cada tipo de método (tradicional ACE y placas Petrifilm).

Estado	<i>Método¹</i>		<i>Comparación entre métodos</i>	
	ACE	Petrifilm	Mann-Withney	Correlación
México	0.63 \pm 0.23 ^B	0.11 \pm 0.20	$p = 0.62$	$r = 0.76$ ($p < 0.05$)
Michoacán	0.93 \pm 0.23 ^{A-B}	1.30 \pm 0.30	$p = 0.32$	$r = 0.78$ ($p < 0.05$)
Yucatán	1.59 \pm 0.24 ^A	1.85 \pm 0.16	$p = 0.51$	$r = 0.76$ ($p < 0.05$)
	$p < 0.05$	$p = 0.082$		

¹ Se considera el valor de log 1000 UFC/g como parámetro de las normas para la comparación contra los promedios obtenidos de cada uno de los métodos.

2. *Hongos y levaduras*

El cuadro 14 demuestra que los resultados obtenidos del conteo de hongos y levaduras en ambos métodos fue significativamente inferior al parámetro establecido por la norma (100 UFC/g; $p < 0.005$), excepto para el estado de México en los conteos realizados por el método de placas Petrifilm que presentó conteos nulos. Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con los datos reportados por Snowdon, (1999) y Pascual y Calderón (2000), donde por cada 50 muestras de miel envasadas para la industrialización, únicamente 10 contienen niveles detectables de levaduras, presentando conteos finales que no exceden las 100 UFC/g debido a un almacenamiento adecuado, evitando con ello la fermentación.

Por otra parte, los resultados del Cuadro 15 nos indican que los conteos obtenidos entre estados difieren significativamente sólo para el método de placas Petrifilm, en el cual Yucatán presenta los conteos más altos ($p < 0.05$). La comparación de los conteos entre métodos no resultaron significativas ($p > 0.05$), además solamente para Michoacán se presentó un coeficiente de correlación positivo ($r = 0.78$; $p < 0.05$) entre ambos métodos de conteo.

Los resultados obtenidos para el estado de Yucatán posiblemente se relacionan con los sistemas de extracción de la miel en Yucatán donde los apicultores extractan en campo transportando su producto en envases y la manipulación es inadecuada durante el procesamiento y almacenamiento de la miel, (Efem., *et al*, 1992). Por otro lado, considerando los estudios de Zandamela (2008) tenemos que tomar en cuenta las condiciones de producción y su relación con el clima, ya que la predominancia de climas tropicales y subtropicales húmedos podría favorecer al crecimiento de mohos y levaduras. También es importante considerar que a pesar de los valores bajos de pH y actividad de agua de la miel, los mohos y levaduras, al contrario que la mayor parte de los microorganismos, pueden desarrollarse utilizando los azúcares presentes como fuente de energía (Mossel et al., 2003).

Cuadro 14. Comparación del promedio de Hongos y Levaduras por ambos métodos en contra de la NMX (100 UFC/g).

Estado	<i>Saboraud</i>		<i>placas Petrifilm</i>	
	Promedio \pm EE	<i>vs</i> NMX	Promedio \pm EE	<i>vs</i> NMX
México	0.23 \pm 0.14	$p = 0.0048$	0.00 \pm 0.00	N/A
Michoacán	0.21 \pm 0.16	$p = 0.0036$	0.05 \pm 0.05	$p = 0.0027$
Yucatán	0.27 \pm 0.12	$p = 0.0025$	0.48 \pm 0.10	$p = 0.0048$

Cuadro 15. Comparación de los valores promedio obtenidos vs la media hipotética de log 100 UFC/g (igual a 2) mediante la prueba de rangos con signo de Wilcoxon.

Estado	Método		Comparación entre métodos	
	Saboraud	Petrifilm	Mann-Withney	Correlación
México	0.23 \pm 0.14	0.00 \pm 0.00 ^B	N/A	N/A
Michoacán	0.21 \pm 0.16	0.05 \pm 0.05 ^B	$p = 0.54$	$r = 0.78$ ($p < 0.05$)
Yucatán	0.27 \pm 0.12	0.48 \pm 0.10 ^A	$p = 0.21$	$r = -0.04$ ($p > 0.05$)
	$p = 0.67$	$p < 0.0001$		

N/A: no aplica

3. Bacterias esporuladas aerobias y anaerobias

El cuadro 16 muestra los conteos de esporulados aerobios. Para el método tradicional ACE no se encontraron diferencias significativas en los conteos de esporulados aerobios ($p > 0.05$). En contraste, para las placas Petrifilm la prueba encontró diferencias significativas para los conteos, ya que Yucatán presentó los valores más altos ($p < 0.05$). No se encontraron diferencias entre los conteos realizados por ambos métodos ($p > 0.05$), mientras que la consistencia entre los conteos del método tradicional y el método rápido presentó coeficientes de correlación altos para los conteos del estado de México y Yucatán ($r > 0.8$; $p < 0.005$). En las mieles de Michoacán no se presentó un coeficiente de correlación significativo ($r = 0.41$; $p > 0.05$).

Por otra parte, los conteos de esporulados anaerobios del Cuadro 17 indican que únicamente fueron diferentes para el método tradicional, en el cual los conteos más altos se ubicaron en el estado de Yucatán ($p < 0.05$), en contraste los valores más altos de organismos anaerobios se presentaron en el estado de México ($p < 0.05$). En general nuestros resultados demuestran que después de calentar las muestras a 80°C se presenta un recuento bajo de bacterias esporuladas anerobias. Sin embargo, esto no indica que no exista la posibilidad de encontrar *C. botulinum* en las mieles comercializadas en estos estados, ya que esta bacteria se encuentra en suelos. En este contexto, estudios similares llevados a cabo en España y Finlandia con un mayor número de muestras y usando las técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) resultaron efectivas en la recuperación de la bacteria (Martins., *et al*, 2003). La comparación de los conteos entre los métodos indicó la existencia de diferencias entre ambos métodos para el estado de México ($p < 0.05$), a diferencia de los estados de Michoacán y Yucatán que presentaron conteos similares ($p > 0.05$) entre los dos métodos utilizados en la evaluación. Con respecto a la correlación existente entre ambos métodos, el estado de México no mostró dicha tendencia, mientras que para el resto de los estados la correlación resultó alta y significativa ($r > 0.6$; $p < 0.05$).

4. *Bacterias coliformes totales*

En ninguna de las muestras analizadas se detectó la presencia de bacterias coliformes totales, resultado observado en la evaluación por el método tradicional y por el método de placas de Petrifilm.

C. Análisis de Correlación entre los Parámetros Evaluados

En el Cuadro 18 se presentan las correlaciones correspondientes a los parámetros físico-químicos evaluados en las muestras de miel provenientes de los cinco estados. Como se aprecia el contenido de cenizas está correlacionado positivamente con HMF y pH ($r > 0.4$; $p < 0.0001$), mientras que éste mismo parámetro se correlaciona negativamente con los valores de b^* y L^* ($r < -0.6$; $p < 0.0001$). Al parecer el contenido de HMF en las mieles de los estados afecta el color, ya que se determinó una correlación negativa ($r < -0.4$; $p < 0.0001$) entre este parámetro y los parámetros de color L^*b^* . De igual forma, el valor de pH se relaciona negativamente con los parámetros de color a^*b^* .

Por otra parte, en los Cuadros 19 (bacterias esporuladas aerobias), 20 (bacterias esporuladas anaerobias), 21 (bacterias mesófilas aerobias) y 22 (hongos y levaduras) se resumen únicamente las correlaciones significativas que se encontraron entre los parámetros físico-químicos y el crecimiento de los diferentes tipos de microorganismos mencionados.

En el Cuadro 9 se aprecia que el crecimiento de bacterias esporuladas aerobias está correlacionado positivamente con el contenido de HMF, el porcentaje de humedad y la cantidad de cenizas ($r > 0.35$; $p < 0.05$). En contraste, el crecimiento bacteriano afecta de forma negativa la coloración de la miel. Estos resultados únicamente se encontraron cuando las muestras de miel se evaluaron en placas Petrifilm. Resultados similares a los descritos previamente se presentaron para las bacterias esporuladas anaerobias, las bacterias mesófilas anaerobias y los hongos y levaduras (Cuadro 20, 21 y 22 respectivamente). Sin embargo, en algunos casos las bacterias que se cultivaron mediante el método tradicional tuvieron correlaciones similares con los parámetros físico-químicos que aquellos que se presentan en las placas Petrifilm.

Cuadro 16. Comparación de los conteos de bacterias esporuladas aerobias considerando un método tradicional ACE y un método de detección rápida Petrifilm.

Estado	Método		Comparación entre métodos	
	ACE	Petrifilm	Mann-Withney	Correlación
México	0.74 ± 0.19	1.05 ± 0.13^B	$p = 0.28$	$r = 0.41 (p > 0.05)$
Michoacán	0.74 ± 0.18	1.07 ± 0.24^B	$p = 0.37$	$r = 0.91 (p < 0.001)$
Yucatán	1.45 ± 0.26	1.7 ± 0.24^A	$p = 0.57$	$r = 0.81 (p < 0.005)$
	$p > 0.05$	$p < 0.001$		

Cuadro 17. Comparación de los conteos de bacterias esporuladas anaerobias considerando un método tradicional ACE y un método de detección rápida Petrifilm.

Estado	Método		Comparación entre métodos	
	ACE	Petrifilm	Mann- Withney	Correlación
México	0.39 ± 0.14^B	0.96 ± 0.16	$p < 0.05$	$r = 0.04 (p > 0.05)$
Michoacán	$0.85 \pm 0.23^{A-B}$	1.38 ± 0.33	$p = 0.22$	$r = 0.62 (p > 0.05)$
Yucatán	1.42 ± 0.24^A	1.63 ± 0.21	$p = 0.51$	$r = 0.86 (p < 0.005)$
	$p < 0.05$	$p = 0.0951$		

Cuadro 18. Correlación entre parámetros físico-químicos para las muestras analizadas.

Variable (log)	por Variable (log)	Coefficiente de correlación	Valor p
Cenizas	HMF	0.43	<0.0001
	pH	0.42	<0.0001
	L*	-0.70	<0.0001
	b*	-0.66	<0.0001
L*	HMF	-0.45	<0.0001
	b*	0.81	<0.0001
a*	pH	-0.31	<0.0207
	ART	-0.24	<0.0369
b*	HMF	-0.46	<0.0001
	pH	-0.44	<0.0001
	a*	0.40	<0.0005

Cuadro 19. Correlación entre parámetros físico-químicos y bacterias esporuladas aerobias.

log (UFC/g)	por Variable (log)	Coefficiente de correlación	Valor p
	Humedad	0.41	<0.0191
Esporulados aerobios (petrifilm)	HMF	0.35	<0.0492
	Cenizas	0.41	<0.0197
	L*	-0.51	<0.0031
	b*	-0.45	<0.0095
Esporulados aerobios (ACE)	L*	-0.41	<0.0193

Cuadro 20. Correlación entre parámetros físico-químicos y bacterias esporuladas anaerobias.

log (UFC/g)	por Variable (log)	Coefficiente de correlación	Valor p
	Humedad	0.39	<0.0285
Esporulados anaerobios (petrifilm)	HMF	0.45	<0.0093
	Cenizas	0.39	<0.0285
	L*	-0.45	<0.0093
	b*	-0.48	<0.0095
Esporulados anaerobios (ACE)	Humedad	0.46	<0.0092
	Cenizas	0.46	<0.0092
	L*	-0.53	<0.0017
	b*	-0.57	<0.0007

Cuadro 21. Correlación entre parámetros físico-químicos y bacterias mesofílicas aerobia.

log (UFC/g)	por Variable (log)	Coefficiente de correlación	Valor p
Cuenta aerobia (petrifilm)	Humedad	0.38	<0.0312
	Cenizas	0.39	<0.0213
	L*	-0.35	<0.0485
	b*	-0.37	<0.0430
Cuenta aerobia (ACE)	L*	-0.41	<0.0201
	b*	-0.38	<0.0344

Cuadro 22. Correlación entre parámetros físico-químicos y Hongos-Levaduras.

log (UFC/g)	por Variable (log)	Coefficiente de correlación	Valor p
Hongos y Levaduras (petrifilm)	Humedad	0.50	<0.0037
	HMF	0.45	<0.0093
	Cenizas	0.51	<0.0041
	L*	-0.65	<0.0001
	b*	-0.66	<0.0001
Hongos y Levaduras (ACE)	Humedad	0.35	<0.0471
	Cenizas	0.35	<0.0471

VII. ESTUDIOS ADICIONALES EN MIEL.

1) Curso sobre melisopalinología impartido por el instituto de Geología UNAM.

Como parte de la ampliación de los conocimientos en las características de calidad en las mieles, se asistió al curso sobre melisopalinología impartido en el Instituto de Geología de la UNAM donde fue posible conocer los métodos empleados para la identificación de polen en mieles, la forma en que deben ser procesadas estas para su posterior descripción e identificación.

La rama de la palinología que comprende el estudio de los granos de polen contenidos en la miel, las cargas de polen y el alimento larval, se conoce como melisopalinología, y contribuye a identificar los recursos florales-polen y néctar-explotados por las diferentes especies de abejas (Martínez Hernández., *et al* 1993)

Tradicionalmente la melisopalinología ha sido útil en la determinación del origen botánico y geográfico de las mieles y cargas de polen de interés comercial, con el fin de controlar la calidad, además de llegar a conocer las estrategias de pecoreo de las abejas, la melisopalinología contribuye a conocer la biología de las abejas y su papel como polinizadores de ciertas plantas proporcionándonos una idea global de las interacciones entre plantas y abejas sobre un período preciso, información de vital importancia para entender la dinámica de los ecosistemas terrestres (Martínez Hernández., *et al* 1993).

2) Estancia académica en el Departamento de Biología Vegetal y Ecología de la Facultad de Biología en la Universidad de Sevilla, España.

Durante la estancia en el Departamento de Biología Vegetal se realizó una evaluación melisopalinológica de mieles procedentes del Estado de México, los métodos empleados para este procedimiento se presentan en el Anexo I de este documento.

El análisis melisopalinológico considero muestras de miel procedentes de 7 Municipios del Estado de México; Municipio de Otzoloapan localidad El Calvario (1), Municipio de Ixtapan del Oro localidad La puerta(2), Municipio Villa de Allende

localidades de San Miguel, Cerro de Guadalupe, San Juan Buena Vista, Barrio de San Miguel (3), Municipio de Zacazonapan (4), Municipio de Santo Tomás localidad San Pedro el Grande (5), Municipio de Malinalco (6) y Municipio de Oztolotepec Localidad de Jilotzingo (7).

Para realizar estas prácticas se obtuvieron 25 muestras de miel que fueron proporcionadas directamente por los apicultores contactados y visitados mediante la Coordinación del Programa para con el Control de la Abeja Africana de Estado de México y la Coordinación Estatal de Inocuidad Pecuaria del Comité de Fomento Pecuario del Estado.

Previo al análisis en el laboratorio, cada muestra fue registrada anotando el municipio y localidad, considerando el geoposicionamiento (GPS) de cada uno de los apiarios, fecha de la cosecha en que fue obtenida la muestra, nombre del apicultor y el posible origen botánico de acuerdo a la opinión de éste, Anexo II.

Por otro lado, se elaboró una base de datos que contiene la información de la colecta de especies vegetales que se realizó en los alrededores de los apiarios de donde se obtuvieron las muestras, la base de datos considera el nombre del municipio y localidad, el nombre del apiario, la manera común en que se llama a las especies vegetales colectadas y una fotografía de cada una de ellas. Todas las muestras fueron obtenidas mediante extracción por centrifugado manual o eléctrico y colocadas en frascos PET de 250 gr.

Posterior a la colecta, las muestras fueron almacenadas a 4°C y se llevaron al laboratorio de Química Analítica, posteriormente fueron enviadas al Departamento de Biología Vegetal y Ecología de la Facultad de Biología en la Universidad de Sevilla España donde se realizaron las prácticas para el análisis melisopalinológico.

Después de la preparación de las muestras se procedió a la evaluación cualitativa; durante esta primera fase ha sido posible la identificación de los tipos de granos de polen predominantes en las muestras, el Anexo III presenta algunas imágenes obtenidas en este trabajo.

Como parte secuencial de esta primera fase, en estudios posteriores a esta tesis se presentará la cuantificación de los tipos polínicos por muestra con la finalidad de dar a conocer los resultados completos de la evaluación.

Este primer ejercicio permitió conocer la metodología y el tiempo requerido para la evaluación melisopalinológica de las muestras, pues en México así como en otros países es valioso considerar el empleo de este tipo de análisis pues permite la caracterización de las mieles de acuerdo a su origen botánico, representa una oportunidad de valor agregado al producto y provee información trascendental cuando se trabaja en el establecimiento de una denominación de origen.

VIII. CONCLUSIONES

Los valores medios de humedad de la miel muestran que son similares en 5 estados y con mayor variabilidad en Yucatán que presentó valores superiores al resto. Del total de muestras el 95% presentaron valores inferiores al 20% establecido como límite máximo general en las Normas de calidad nacional e internacional.

Los valores promedio de las cenizas de los diferentes estados muestran algunas diferencias entre ellos, Chihuahua, Michoacán y Yucatán presentan diferencias significativas a los valores encontrados en las mieles de Tlaxcala y Estado de México; sin embargo, El 98% de las muestras evaluadas presenta valores de Cenizas inferiores al 0.6% establecido como límite máximo general en las Normas de calidad nacional e internacional.

Los valores promedio de hidroximetilfurfural (HMF) en las muestras de los cinco estados evaluados muestran que los valores más altos los presenta el Estado de Yucatán. Del total de las muestras estudiadas, dos (5.12%) presentaron valores superiores al límite máximo de 40mg/kg de HMF para mieles en general, establecido en las normas nacionales e internacionales. Los valores de HMF de mieles procedentes de los estados de Tlaxcala, Chihuahua y Estado de México son significativamente diferentes de los valores que las regulaciones exigen (40 mg/kg) estando estos por debajo del valor establecido.

Los valores promedio de a^* de las mieles de los estados son poco diferentes y con mayor variabilidad en el estado de Chihuahua señalando una tendencia a coloración verde. Solo una muestra (2,56 %) del total de las muestras presentó valores negativos, el resto (97.43 %) indica una tendencia a coloración roja.

Los valores promedio de b^* de las mieles de los diferentes estados evaluados muestran alguna diferencia con mayor variabilidad en Yucatán. Todas las muestras

estudiadas presentaron color amarillo aunque las mieles del Estado de México son significativamente superiores al resto de las muestras estudiadas ($p < 0.05$).

Los conteos de microorganismos mesofílicos aerobios se encuentran significativamente ($p < 0.001$) por debajo de los valores permitidos a nivel nacional e internacional ($\log 1000$ UFC/g) para los tres estados. Sin embargo, en Yucatán se presentaron los conteos más altos entre los estados ($p < 0.05$).

La evaluación de hongos y levaduras presentó mayores conteos en las mieles provenientes del estado de Yucatán ($p < 0.05$). No obstante, los conteos obtenidos resultan inferiores al parámetro establecido a nivel nacional e internacionalmente ($\log 100$ UFC/g; $p < 0.001$), los resultados sugieren que los valores elevados de microorganismos de las mieles de Yucatán se relacionan con los métodos de extracción tradicionales que se utilizan en esa entidad.

Los valores de bacterias esporuladas anaerobias fueron similares para las mieles de los tres estados ($p > 0.05$). Y el recuento de coliformes resultó negativo en todas las muestras. Se encontró una correlación significativa entre el porcentaje de humedad y el crecimiento de los diferentes microorganismos estudiados, mientras que el valor de pH no se correlaciona con el crecimiento bacteriano.

Todas las muestras analizadas cumplen con las especificaciones microbiológicas nacionales e internacionales para mesofílicos aerobios, hongos y levaduras, lo cual permite considerar que tienen un manejo adecuado y bajo riesgo de presencia de patógenos. Debido a lo importante que resulta el manejo de este producto durante su producción, cosecha, extracción, envasado y almacenamiento es indispensable establecer programas de capacitación para la implementación de Buenas Prácticas de Producción, Manejo y envasado de la miel con la finalidad de asegurar la calidad e inocuidad del producto.

El empleo de nuevos métodos para la evaluación de parámetros físico-químicos como el HMF permite un análisis rápido del producto y puede hacer posible la reducción de costos por la evaluación.

El uso de métodos rápidos para la detección de microorganismos permite una buena recuperación, reducción de tiempos en el análisis además de la disminución de los recursos materiales y económicos.

Es importante promover el desarrollo y empleo de métodos de análisis que permitan al apicultor y envasador de miel obtener resultados confiables, rápidos y con costos accesibles pues esto permitirá la generación de información real que pueda ser empleada en los procesos de etiquetado.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta S. R.: Visión estratégica del Sistema de Inspección Federal: El nuevo paradigma. CARTANETIF. 9: 4-5 (2004).
- Alcalá. M. y Gómez. R.: Cálculo de la actividad de agua de la miel. Alimentación, Equipos y Tecnología, Abril: 99-100 (1990).
- Astiasarán A.I. y Martínez H. J. A.: Alimentos. Composición y propiedades, España: McGraw-Hill. 229 (1999).
- Balanza, M.E.: Parámetros físicos y químicos de relevancia para la tipificación de la miel producida en la provincia de Mendoza (Argentina). Tesis Doctoral, 24- 26 (2003).
- Belitz H.D. y Grosch W.: Química de los alimentos. 2ª Edic. España, Acribia, 946-953 (1997).
- Bogdanov, S., Ruoff, K. Y Persano Oddo, L.: Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys. Review. Apidologie 35: S4-S17 (2004).
- Bosch. J. y Serra. J.: Evaluación del contenido de hidroximetilfurfural en las mieles procesadas y situadas en el mercado español. Alimentaria. 179: 59 (1986).
- Brumfitt. W., Hamilton. M. J. M. T y Italia. F.: Antibiotic activity of natural products. 1. propolis. Microbios 62: 19-22 (1990).
- Caballero P.H.D.: Nuevos criterios de calidad para miel basados en procedimientos electroquímicos. Tesis: Químico en Alimentos. Facultad de Química, UNAM. México D.F,14 (2009)
- Chávez *et al.*, 1992. Instituto Nacional de la Nutrición; en Juárez. M.D.: Determinación electroquímica de HMF (5-(hidroximetil)-2-furoancarboxaldehído) en miel de abeja. Tesis para la obtención del título de Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. 12 -13 (2003).
- Chernyak. N. F.: On synergistic effects of propolis and some antimicrobial drugs. (In Russian). Antibiotikii. 18: 259 – 261 (1973).
- CIE LAB . Committee TC.1.3.CIE. Proposal for study of color spaces and color difference equations. Journal of Opt. Soc.Am. 64: 896-897 (1976).
- Claridades Agropecuarias. Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria (ASERCA-Secretaría de Agricultura Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA). Apicultura en México. 199:03-34 (2010).
- Codex Alimentarius STAN MIEL. 12-1981. 2001.
- Coe. P.: Medicine from the Hive. An introduction to apitherapy, LILIPOH, The Spirit in Lie 52. 13 United States: Summer, 12-17 (2008).
- CONABIO.: Mieles Peninsulares y diversidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México (2008).
- Consejo de la Unión Europea (UE) directiva 2001/110/CE.
- Consejo de la Unión Europea directiva 74/409/CE.

- Echazarreta G.: Caracterización de la apicultura en la Península de Yucatán. En Memorias del Foro de proyectos integrales: Sistema Producto Miel. Sisiera/UADY. Mérida, Yucatán. México 29-43 (1999).
- Efem S, Udoh K, Iwara C.: The antimicrobial spectrum of honey and its clinical significance. *Infection*. 20:227-229 (1992).
- Enciclopedia de los municipios de México.: Estado de México. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Gobierno del Estado de México (2008).
<http://www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/mexico/mpios/15106a.htm>
- Enciclopedia de los municipios de México. Estado de Tlaxcala. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Gobierno del Estado de Tlaxcala (2008).
<http://www.elocal.gob.mx/work/templates/enciclo/tlaxcala/mpios/29033a.htm>
- Estupiñán. S, Sanjuán E. Millan. R. Y González. C. M. A.: Parámetros de calidad de la miel I. Microbiología, Caracteres fisicoquímicos y de envejecimiento: Revisión. *Alimentaria*. 296:89-94 (1998).
- Frías, I. Y Hardison, A.: Estudio de los parámetros analíticos de interés en la miel: humedad, acidez e índice de formol, hidroximetilfurfural e índice de diastasas. *Alimentaria*. Mayo, 71-74 (1992).
- Frías. I. y Hardisson, A.: Estudio comparativo entre mieles comerciales y artesanales de Santa Cruz de Tenerife. *Alimentación, Equipos y Tecnología*. Noviembre, 129–131 (1991).
- Gadbin, C. : L'intérêt de l'acétole en méliissopalynologie. *Apidologie* 10 (1): 23-28 (1979).
- Gómez. R, Cabezas. L, Alcalá. M y Fernández-Salguero. J.: Determinación y Calculo de la Actividad de agua en diferentes muestras de miel. *Alimentaria*. Marzo, 33-36 (1990).
- Guilliam. M.: Fungi Insolated from honey bees, *Apis mellifera*, fed 2,4-D and antibiotics. *J. Invertebr. Pathol*; 24, 213-217 (1974).
- Guilliam. M, y Morton, H.L. Enterobacteriaceae insolate from Honey bees fed 2,4D and antibiotics. *J. Invertebr. Phatol*. 23, 42-45 (1974).
- Huidobro. J.F. y Simal. J.: Parámetros de calidad de la miel V: índice de diastasas. *Offarm*. 3 (11), 705 (1984).
- Jiménez. M., Mateo J. J., Huerta. T., y Mateo. R.: Influence of the storage conditions on some physicochemical and mycological parameters of Honey. *Journal Science Food Agriculture*, 64, 67-74 (1994).
- Juárez. M. D.: Determinación electroquímica de HMF /5-(hidroximetil)-2-furancarboxialdehido) en miel de abeja. Tesis de Licenciatura, UNAM, 1-83. (2003).
- Labuza. T. P.: The effect of water activity on reaction kinetics of food deterioration. *Food Technology*. 20, 523 – 526 (1980).
- Laude. V. T. Naegel. L. y Horn. H.: The physicochemical properties of some Philippine honeys. *Apidologie*. 22 :4, 371 – 380 (1991).
- Lavie. P. : Les substances antibacteriennes dans la colonie d'abeilles (*Apis mellifera* L.) . *Ann. Abeille*. 3. 103 – 305 (1960).

- Martínez Hernández. E., Cuadriello-Aguilar. J.I., Téllez-Valdez O., Ramírez-Arriaga. E., Sosa-Nájera. M.S., Melchor-Sánchez. J.E.M., Medina-Camacho. M y Lozano-García M.S.: Atlas de las plantas y el polen utilizados por las cinco especies principales de abejas. Productoras de miel en la región de Tacana, Chiapas, México. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Geología. México D.F. 15-17 (1993).
- Martins H, Martins L, Bernardo F.: *Bacillaceae* spores, fungi and aflatoxins determination in honey. Revista Portuguesa de Ciencias Veterinarias. 98:86-88 (2003).
- Millan. R., Tudela. L., Estupiñán. S., Castelo. M. y Sanjuán. E.: Contribución al cálculo de la actividad de agua en la miel: modelo de predicción de A_w , en mieles de las Palmas, Alimentaria. 268, 77 – 79 (1995).
- Moguel O.Y.B, Echazarreta G.C. y Mora E.R.; Calidad fisicoquímica de la miel de ABEJA *Apis Mellifera* producida en el estado de Yucatán durante diferentes etapas del proceso de producción y tipos de floración. Técnica Pecuaria en México. 43(003): 323-334 (2005).
- Molan. P. C. y Russell. K. M.: Non peroxide antibacterial activity in some New Zeland Honeys. J. Apic. Res. 27, 62–67 (1989).
- Mossel, D.A.A., Moreno, B., Struijk, C.B.: Microbiología de los Alimentos. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la integridad (inocuidad y calidad) microbiología de los alimentos. Editora Acribia S.A., Zaragoza. 248, 251(2003).
- Mostafá. A. Ahmed. A. Y Mahmoud. M.: Studies of Libyan honeys. Journal of Food Quality. 4:18 –201(1982).
- Munitis. M. T., Cabrera E. y Rodríguez-Navarro A.: An Obligate Osmophile Yeast from Honey. Applied and Environmental Microbiology. 32:3, 320–323 (1976).
- Nakano. H. y Sakaguchi, G.: An unusual lyheavy contamination of honey products by *Clostridium botulinum* type F and *Bacillus alvei*. FEMS Microbiology Letters. 79: 171-178 (1991).
- NJ Department of Health and Senior Services. Communicable Disease Service Technical Information for Health Professionals. Communicable Disease Service Manual. *Clostridium botulinum*. Disponible en <http://www.state.nj.us/health/cd/manual/botulism.pdf>
- NMX-F-036-NORMEX-2006 .Alimentos- miel- Especificaciones y métodos de prueba.
- NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- NOM-112-SSA1-1994, Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.
- Ortíz, P. L.: Melitopalínología en Andalucía Occidental. Microfichas. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla. Sevilla (1991).

- Pascual A. M. R.: Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas. Díaz de Santos, Madrid (1992).
- Pascual, M.R., Calderón, V. y Pascual.: Microbiología Alimentaria. Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas. Ed. Díaz de Santos, S.A. Madrid (2000).
- PC-004-2002 MIEL. Pliego de Condiciones para el Uso de Marca Oficial México Calidad Suprema en Miel. SAGARPA-SE-BANCOMEX.
- Pérez. C., Conchello. P., Ariño. A., Ucar. A. y Herrera. A.: Estudio de algunos parámetros físico-químicos en mieles monoflorales de Zaragoza. Alimentaria. Junio, 59–61 (1990).
- Pérez. C., Conchillo. P., Ariño. A., Juan. T. y Herrera. A.: Quality evaluation of spanish rosemary (*Rosmarinus officinalis*) honey. Food Chemistry. 51, 207–210 (1994).
- Pérez-Arquillué, C., Conchello, P., Ariño, A., Ucar, A. Y Herrera, A.: Estudios de algunos parámetros físico-químicas en mieles monoflorales de Zaragoza. Alimentaria, junio, 59-61 (1990a).
- Piazza M., Accorti M.G y Oddo L.P.: Electrical conductivity, ash, color and specific rotatory power in Italian unifloral honeys. Apicultura. 7, 57-63 (1991).
- Pineda G.A. Calidad de la miel de abeja producida en zonas apícolas de Milpa Alta, Tlalpan y Xochimilco, D.F. informe de gestión de la Calidad e Inocuidad de los productos agrícolas. Universidad Autónoma Metropolitana. Diciembre: 3-5, 12 (2006).
- Preza de la Vega. J. Estudio electroquímico aplicado a la cuantificación de azúcares en mieles. Tesis para obtención del título Químico de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. 10-12 (2007).
- Rejón. A. M., Marrufo. O.J.C. y Morales. A. D.: Propuesta para el desarrollo de la producción apícola sustentable en el estado de Yucatán. Revista de la Universidad Autónoma de Yucatán. 2:212. 20-31 (2000).
- Ruegg, M. y Blanc. B.: The water activity of honey and related sugar solutions. Levensm Wiss Technol. 14, 1-6 (1981).
- Russell. K.M., Molan. P.C., Wilkins. A.L. y Holland. P.T.: Identificación of some antibacterial constituents of New Zeland manuka honey. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 38, 10 – 13 (1990).
- Sánchez, J.: Análisis polínico de mieles de la provincia de Salamanca. Universidad de Salamanca, Salamanca (1982).
- Sancho MT, Muniategui S, Hidobro F, Simal J.: Aging of Honey. J Agric Food Chem. 40: 134-138 (1992).
- Sanjuán. E., Estupiñán. S., Millán. R., Castelo. M., Pinedo. J. C. y Cardona. A.: Contribution to the quality evaluation and the water activity prediction of La Palma Island honey. Journal of Food Quality. 20, 225–234 (1997).
- Schoken-Iturrino R, Carneiro M, KatoE, Sorbara J, Rossi O, Garvasi L.: Study of the presence of the spores of *Clostridium botulinum* in honey in Breazil. 24(3): 379-382 (1999).

- Serra. J.: Determinación del antralinato de metilo en la miel de cítricos (*Citrus sp.*) del levante español y su influencia en la actividad diastásica de la miel. *Alimentaria*. 38 (1988).
- Shade. J. W., March. G. L. y Eckert. J. E.: Diastase activity and their usefulness in detesting heat alteration. *Food Res.* 23, 446–463 (1958).
- Sistema de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Producción de miel en México 1996-2002, 2002, 2004, 2007, 2009 (Toneladas). Secretaria de Agricultura Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA), Coordinación General de Ganadería (2004).
- Snowdon. J. A y Cliver D.O.: Microorganisms in Honey. *Int J Food Microbiology*.; 31:1–26 (1996).
- Snowdon. J. A.: The microbiology of Honey—Meeting Your Bugerrrs, specifications. (Why they do what they do). *American Bee Journal*. January 51 – 60 (1999).
- Swallow. K.W. y Low. N.H.: Analysis and Quantitation of the Carbohydrates in Money Using High–Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 38, 1824 – 1832 (1990).
- Terrab A, Díez. M. J y Heredia F.J. Palynologica, physico–chemical and colour characterization of Moroccan honeys: I. River red gum (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh) honey. *International Journal of Food Science and Technology*. 38, 379- 386. (2003¹).
- Terrab A, Díez. M. J y Heredia F.J.: Palynologica, physico– chemical and colour characterization of Moroccan honeys: II. Othet unifloral honey types. *International Journal of Food Science and Technology*. 38, 395- 402 (2003²).
- Terrab A, Díez. M. J y Heredia F.J.: Palynologica, physico–chemical and colour characterization of Moroccan honeys: II. Orange (*Citrus sp.*) honey. *International Journal of Food Science and Technology* 38, 387- 394 (2003³)
- Thun M.K.,: La abeja. Conducta y Cuidados. Argentina: Antroposófica, 231-232, 237-238, 264-265,287 (2005).
- Tosi, E.A., Ré, E., Lucero, H., Bulacio, L.,: Efect of honey high-temperature short-time heating on parameters related to quality, crystallisation phenomena and fungal inhibition. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 37 (6), 669-678 (2004).
- Vieitez, E.: Palynological observations on some Spanish honeys. *Bull. Torrey Bot. Club* 77 (6): 495-502 (1950).
- Villanueva, G. R.: Calidad Polinífera de las mieles en Quintana Roo. Ponencia presentada en el XIV Seminario Apícola de la Unión Nacional de Productores Apícolas de México. Tepic, Nayarit. México (2001).
- Vorwohl G.: Die Beziehung zwischen der elektrischen Leitfähigkeit der Honige und ihrer trachtmässigen Herkunft. *An de abeille* 7, 301-309 (1964).
- White. J. W. Jr.: Quality evaluation of honey: role of HMF and diastase assays. *American Bee Journal*. 132: 11/12, 737– 742, 792 – 794 (1992).
- White. J. W., Kushnir. I. y Subers. M.H.: Effect of storage and processing temperatures on honey quality. *Food Technology*. 18 (4), 555 (1964).

- White. J.W. y Subers M.H.: Studies on honey inhibine a chemical assay. J. Apic. Res. 2, 93 -100 (1963).
- White. J.W., Subers, M.H. y Shepartz. A.: The identification of inhibina. Am. Bee. J. 102, 430 – 431 (1962).
- Zandamela. M.E.M.F,: Caracterización físico-química y evaluación sanitaria de la miel de Mozambique. Tesis para obtención de Doctor en Veterinaria. Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. 143-186 (2008).

X. ANEXOS

Anexo I. Metodología empleada para realizar la preparación de muestras para su evaluación.

Para realizar la valoración de la importancia de la mielada frente al néctar como materias primas de la miel de las localidades estudiadas, en este trabajo se ha seguido la metodología empleada por Terrab *et al*, 2003¹ mediante la cual ha sido necesario elaborar preparaciones microscópicas en las que todos los elementos de origen botánico estén preservados.

Por tal razón a partir de las 25 muestras de miel se elaboraron preparaciones microscópicas al natural (sin acetólisis). Estas preparaciones no fosilizadas se emplearon para estimar con ayuda de un microscopio óptico (el número absoluto de granos de polen y de elementos indicadores de mielada contenidos en 10 g. de miel (análisis cuantitativo).

Para la identificación de los tipos polínicos se elaboraron preparaciones acetolizadas a partir de las 25 muestras de miel colectadas, estas preparaciones se emplean para identificar al microscopio óptico (MO) los tipos polínicos presentes y determinar respectivas frecuencias de aparición (análisis cualitativo). Siguiendo la metodología empleada por Terrab *et al*, 2003¹; si en una preparación acetolizada del sedimento de una miel aparecieron restos de exina o granos de polen colapsados hasta tal punto en que su identificación y recuento fue imposible, se recurrió a las preparaciones no fosilizadas ya mencionadas y con ello, detectar e identificar el tipo polínico en cuestión y se calculó su frecuencia.

Elaboración de muestras para su estudio microscópico

Para la evaluación de las muestras se han elaborado dos tipos de preparaciones microscópicas: con y sin acetólisis la misma muestra ha servido para ambas preparaciones. Se han montado primero los portaobjetos sin acetólisis y el sedimento que quedó tras el montaje se ha fosilizado.

Método natural

Material e instrumentos empleados: Microscopio Óptico (NIKON ALPHAPHOT-2 YS2), Baño maría (KOWELL N 5), Centrifuga (BECKMAN TJ-6 CENTRIFUGE), Placa calefactora (GIRALT PLAC. TRONIC S- 156/100), Vasos de Precipitado: 50 y 100 mL, Buretas: 500 y 1000 mL, Tubos de centrifugado graduados y de forma cónica, Varillas de vidrio, Micropipetas capilares de 10 µn, Portaobjetos, Cubreobjetos

Reactivos: Ácido Sulfúrico (*Panreac*), Etanol (*Panreac*), Glicerogelatina (*Panreac*) y Parafina.

Procedimiento

- 1) Mediante agitación se homogeneiza la muestra y si la miel está cristalizada se calienta previamente en un baño maría a 40°C.
- 2) En un vaso de precipitado de 50 mL se pesan 10 g de la muestra homogeneizada y/o calentada.

- 3) Con ayuda de una varilla de vidrio se disuelve la miel en 20 mL de agua acidulada (5 g de ácido sulfúrico en un litro de agua) a una temperatura de 40°C eliminándose la materia coloidal de la miel.
- 4) La solución anterior se reparte, lo más equitativamente posible, en dos tubos de centrifuga graduados de 15 mL y se centrifuga durante 10 minutos a 2500 rpm; el sobrenadante, que contiene disueltos los azúcares y coloides de la miel, se decanta.
- 5) Al sedimento que queda en cada tubo se le añade de nuevo agua acidulada (6 mL) y se resuspende con ayuda de un agitador mecánico. Se centrifuga (10 minutos a 2500 rpm.) y decanta de nuevo.
- 6) El sedimento se lava dos veces consecutivas con agua destilada, seguida cada una de ellas de agitación, centrifugado y decantado; su finalidad es eliminar los residuos de ácido sulfúrico.
- 7) El sedimento así obtenido se resuspende en un volumen determinado de agua:alcohol (proporción 1:1) para obtener una concentración adecuada de partículas en suspensión. Este volumen ha variado entre 0,5 y 15 mL según el sedimento resultante en las muestras. La suspensión se agita para homogeneizarla, e inmediatamente se toman 10 µL con una micropipeta capilar. Este volumen se deposita en un portaobjetos colocado sobre una placa calefactora a 70°C y se deja evaporar. Se ha usado alcohol:agua como medio de suspensión en lugar de agua porque el tiempo de evaporación es sensiblemente menor.
- 8) Una vez seco el sedimento sobre el portaobjetos se monta en glicerogelatina. Para ello, con una aguja enmangada, se toma un trocito de glicerogelatina y se hace un frotis mezclándola con el sedimento.
- 9) Para evitar que el cubreobjetos presione los granos de polen y modifique su volumen se colocan cuatro trocitos de plastilina alrededor del frotis y sobre ellos se coloca el cubreobjetos, presionando ligeramente hasta que éste entre en contacto con la glicerogelatina.
- 10) Por último las preparaciones se sellan con parafina y, tras retirarlas de la placa calefactora, se colocan invertidas en un soporte hasta que la parafina solidifique. Se montan dos preparaciones al natural “sin acetolisis” de cada uno de los tubos, es decir cuatro por muestra de miel.

Método acetolítico

La suspensión que ha quedado en tubos (punto 7 del método no acetolítico) se centrifuga y decanta. El sedimento así obtenido se acetoliza.

Material e instrumentos empleados: Microscopio Óptico (NIKON ALPHAPHOT-2 YS2), Centrifuga (BECKMAN TJ-6 CENTRIFUGE), Placa calefactora (GIRALT PLAC. TRONIC S- 156/100), Vasos de Precipitado: 50 y 100 mL

Buretas: 500 y 1000 mL, Tubos de centrifugado graduados y de forma cónica de 10 mL de capacidad, Varillas de vidrio, Aguja enmangada, Portaobjetos, Cubreobjetos.

Reactivos

Ácido acético glacial (*Panreac*), Ácido Sulfúrico (*Panreac*), Anhídrido acético (*Panreac*) Glicerina (*Panreac*), Etanol (*Panreac*), Glicerogelatina, Parafina.

Procedimiento

- 1) Antes de la acetólisis, el sedimento se lava con ácido acético glacial para evitar la reacción más o menos violenta de la mezcla acetolítica con restos de agua (Se centrifuga y decanta).
- 2) A cada tubo se añaden 6 mL de mezcla acetolítica (9 partes de anhídrido acético y 1 parte de ácido sulfúrico concentrado). El sedimento se redispersa con ayuda de una varilla de vidrio. Los tubos se introducen en agua a temperatura ambiente y se calientan hasta alcanzar la ebullición. Se mantienen en punto de ebullición durante 5 minutos, agitando constantemente con la varilla de vidrio.
- 3) Los tubos se dejan enfriar dentro del agua y, una vez fríos, se centrifugan y decantan.
- 4) El sedimento se lava dos veces con ácido acético glacial para eliminar los triacetatos de celulosa, no hidrosolubles, formados por acción de la acetólisis, y a continuación se lava con agua destilada. Cada lavado va seguido de centrifugación y decantación.
- 5) Al sedimento se añade agua destilada:glicerina (proporción 1:1), se agita y se deja reposar 10 minutos. Se centrifuga durante 15 minutos a 2500 rpm. Y se decanta, dejando los tubos boca abajo sobre un papel de filtro durante un periodo comprendido entre 30 minutos y 24 horas.
- 6) Con una aguja enmangada se remueve el sedimento de modo que todos los tipos polínicos presentes se mezclen entre ellos; éstos se distribuyen en el sedimento por capas según sus densidades. Posteriormente, con un trocito de glicerogelatina se extrae el material del fondo del tubo con ayuda de una aguja enmangada.
- 7) La glicerogelatina con el polen se coloca en un portaobjetos, previamente dispuesto sobre una placa calefactora a 70°C, y se hace un frotis.
- 8) A partir de paso el montaje de las preparaciones continúa del modo descrito en los pasos 9 y 10 del método no acetolítico. Se han montado dos preparaciones acetolizadas de cada tubo, es decir, cuatro por cada muestra.

Caracteres polínicos.

La utilidad del polen en los estudios melitopalínológicos se basa en la cantidad de microcaracteres morfológicos que éste proporciona que se resumen de la siguiente manera:

- Polaridad: apolar, isopolar, subisopolar y heteropolar.
- Simetría: radial, bilateral y asimétrico.
- Forma: peroblado, oblado, suboblado, oblado-esferoidal, esferoidal, Prolado-esferoidal, subprolado, prolado, perprolado.
- Tamaño: muy pequeño, pequeño, mediano, grande, muy grande y gigante.
- Exina: grosor, estructura y relación entre cepas.
- Ornamentación: psilado, verrugoso, granulado, gemado, baculado, pilado, clavado, equinado, pergorado y reticulado.

Sistema apertural: número de aberturas (0, 1, 2, 3, ...); Tipo (simples, compuestas, simples más compuestas; alargadas y redondas); Posición (en un polo, en ambos polos, en el ecuador y alrededor de todo el polen).

La combinación de todos estos caracteres proporciona una gran cantidad de tipos polínicos, permitiendo en general la identificación a nivel genérico, a veces a nivel específico y raras veces tan solo es posible identificarlos a nivel de familia.

Análisis microscópico de las muestras de miel.

En el análisis microscópico de una muestra de miel se distinguen dos partes bien diferenciadas: análisis cuantitativo y análisis cualitativo. Ambos análisis ayudarán a la interpretación de los resultados.

Análisis cuantitativo

Consiste en la estimación del número de granos de polen (NGP) y de elementos indicadores de mielada (NEIM) contenidos en 1 ó 10 g de miel, mediante el cálculo del número de estas partículas presentes en las preparaciones montadas por el método no acetolítico.

A M.O., a 400 aumentos, y con ayuda de un micrómetro ocular, se cuenta el número de elementos botánicos presentes en tres de las cuatro preparaciones elaboradas al natural. Si las cifras obtenidas en estos tres conteos no eran demasiado homogéneas se efectuaba el conteo de la cuarta preparación. Se contaron por separado NGP y NEIM.

En los resultados de estos tres o cuatro conteos se calcularon las medias aritméticas, tanto para NGP, como para el NEIM, y a partir de ellas se calculó el contenido absoluto de unos y otros en 10 g de miel. Este cálculo se hizo mediante la siguiente fórmula:

$$N=A \times B \times 200$$

Donde:

N= NGP o NEIM contenidos en 10g de miel

A= Media del NGP o NEIM en una preparación

B= Volumen en mL en que se dispersó el sedimento para elaborar las preparaciones. Sumando los dos valores de N obtenidos en cada muestra se calculó el número total de elementos de origen botánico (NEB) contenidos a 10 g de miel.

Siguiendo las indicaciones de la I.C.B.B. of I.U.B.S (1970, 1978) citadas por Terrab, et al 2003¹, una hifa pluricelular o un complejo de esporas se ha contado como un único elemento indicador de mielada. Así mismo, los elementos céreos no se cuentan como elementos de mielada, ya que debido a su fragilidad su número puede aumentar por su ruptura, y debido a su baja densidad, no siempre aparecen en el sedimento.

Análisis cualitativo

Consiste en la identificación y conteo de los granos de polen y otras partículas microscópicas de la miel para establecer su frecuencia de aparición. En este trabajo solo se han identificado los granos de polen, para lo cual se examinaron las preparaciones acetolizadas usando el M.O. a 400-1.000 aumentos.

Anexo II. Ejemplo de Formato de registro para evaluación melisopalinológica, microbiológica y físico-química de la miel.

Estado de procedencia: Estado de México
 Persona Remitente: MVZ. Ángel García
 Fecha de envío: Marzo 2009

No de muestra	Municipio	Localidad	Nombre del productor	Dirección completa del apiario y planta extractora	Fecha de obtención	GPS	Región a la que pertenece
1	Otzoloapan	El Calvario	Emilio Villafaña Vargas	Apiario Palo Verde (28 cajas)	6 nov. 08	N 19°06.299' W 100°19.216' 4150 pies rumbo NW	Sur
2	Villa Allende	San Miguel	Hermerejildo Colin Colin	Apiario San Miguel (65 cajas)	24 oct. 08	N 19°23.350' W 100°09.563' 8150 pies rumbo W	Sur
3	Sto. Tomas	San Pedro el Grande	Alberto Zarco Zaragoza	Apiario el Ocote (27 cajas)	13 oct. 08	N 19°12.965' W 100°18.122' 5363 pies rumbo W	Sur
4	Zacazonapan	Zacazonapan	Zenón Lujano Ponce	Apiario San Andrés (19 cajas)	6 nov. 08	N 19°05.293' W 100°14.244' 4995 pies rumbo W	Sur
5	Zacazonapan	Zacazonapan	José Lujano Ponce	Apiario la Loma (25 cajas)	6 nov. 08	N 19°05.368' W 100°14.291' 5103 pies rumbo SE	Sur
6	Villa Allende	Cerro de Guadalupe	Jaime Favila Valdez	Apiario El Encino (64 cajas)	24 oct. 08	N 19°20.216' W 100°04.386' 8437 pies rumbo W	Sur
7	Zacazonapan	Zacazonapan	Hugo Lino López Mejía	Apiario Cerro del Sombrero (18 cajas)	6 nov. 08	N 19°02.354' W 100°15.354' 4226 pies rumbo S	Sur
8	Villa Allende	San Juan Buena Vista	Ramiro Salvador G	Apiario Agua Bendita (25 cajas)	24 oct. 08	N 19°27.187' W 100°09.203' 9308 pies rumbo W	Sur
9	Otzoloapan	Otzoloapan	Emilio Villafaña Vargas	Apiario el Cántaro (35 cajas)	6 nov. 08	N 19°04.799' W 100°21.183' 3560 pies rumbo S	Sur
10	Sto. Tomás	San Pedro el Grande	Pantaleón Zarco Zaragoza	Apiario el Encinito (15 cajas)	13 oct. 08	N 19°13.273' W 100°18.339' 5863 pies rumbo NW	Sur

Elaboró: M VZ. Aurora Xolalpa

Continua ejemplo de Formato de registro para evaluación melisopalinológica, microbiológica y físico-química de la miel.

Estado de procedencia: Estado de México
 Persona Remitente: MVZ. Ángel García
 Fecha de envío: Marzo 2009

No de muestra	Municipio	Localidad	Nombre del productor	Dirección completa del apiario y planta extractora	Fecha de obtención	GPS	Región a la que pertenece
11	Sto. Tomás	San Pedro el Grande	Amado Zarco Zaragoza	Apiario las Huasimitas (27 cajas)	13 oct. 08	N 19°12.981' W 100°18.277' 5233 pies rumbo W	Sur
12	Sto. Tomás	San Pedro el Grande	Maurilo Zarco Barcenas	Apiario Agua Zarca (24 cajas)	13 oct. 08	N 19°12.992' W 100°17.969' 5430 pies rumbo NE	Sur
13	Villa Allende	Barrio se San Miguel	Hermenegildo Colin Colin	Apiario las Dalias (45 cajas)	24 oct. 08	N 19°26.532' W 100°09.361' 9323 pies rumbo W	Sur
14	Villa Allende	Barrio se San Miguel	Hermilo Colin González	Apiario Sn Miguel (25 cajas)	24 oct. 08	N 19°23.350' W 100°09.563' 8150 pies rumbo W	Sur
15	Villa Allende	Barrio se San Miguel	Manuel Colin González	Apiario El Monte (35 cajas)	24 oct. 08	N 19°21.466' W 100°07.969' 8143 pies rumbo W	Sur
16	Malinalco	Malinalco	Alfonso González Malagón	Apiario El Borracho (38 cajas)	20 ene. 09	N 18°58.551' W 099°29.411' 6583 pies rumbo SE	Centro
17	Malinalco	Malinalco	David Delgado Sánchez	Apiario Malinalco (55 cajas)	20 ene. 09		Centro
18	Sto. Tomas	San Pedro el Grande	Margarito Carbajal Gómez	Apiario la Vuelta (23 cajas)	5 dic. 08	N 19°13.460' W 100°17.373' 4810 pies rumbo W	Sur
19	Sto. Tomas	San Pedro el Grande	Nemesio Zarco Vera	Apiario El Encino (25 cajas)	5 dic. 08	N 19°12.821' W 100°17.976' 5320 pies rumbo W	Sur
20	Sto. Tomas	San Pedro el Grande	Francisco Mercado Zarco	Apiario el Tepehuaje (35 cajas)	5 dic. 08	N 19°13.172' W 100°18.434' 5891 pies rumbo NW	Sur

Elaboró: M VZ. Aurora Xolalpa

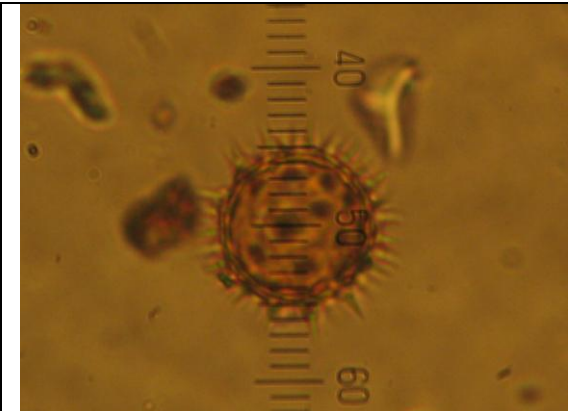
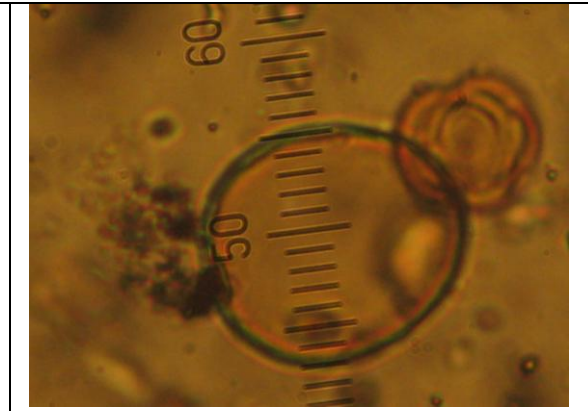
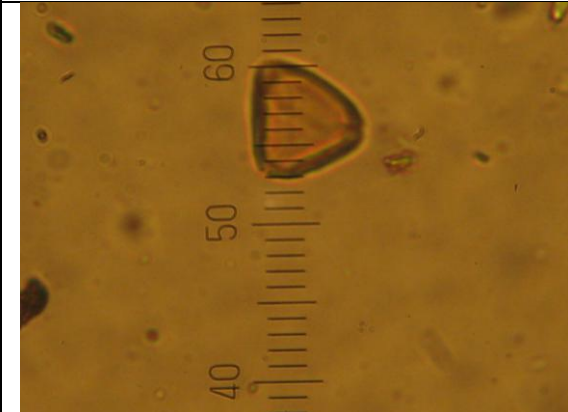
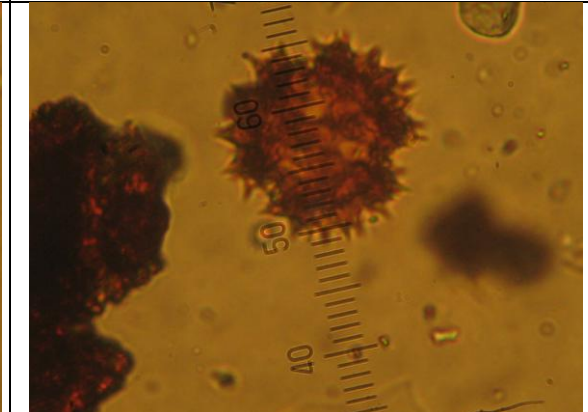
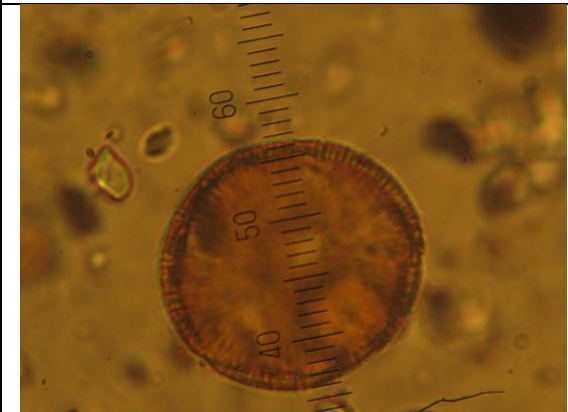
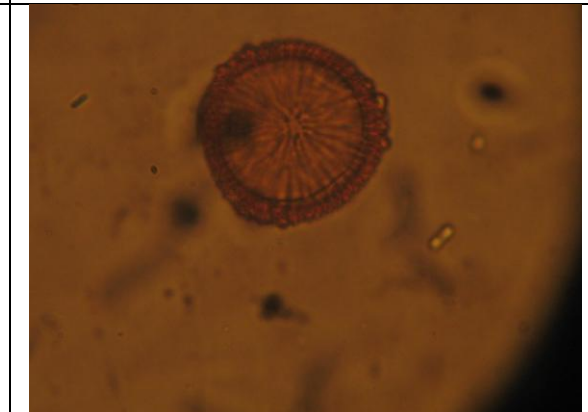
Continua ejemplo de Formato de registro para evaluación melisopalinológica, microbiológica y físico-química de la miel.

Estado de procedencia: Estado de México
 Persona Remitente: MVZ. Ángel García
 Fecha de envío: Marzo 2009

No de muestra	Municipio	Localidad	Nombre del productor	Dirección completa del apiario y planta extractora	Fecha de obtención	GPS	Región a la que pertenece
21	Sto. Tomás	San Pedro el Grande	Porfirio Carbajal Robles	Apiario el Filo (35 cajas)	5 dic. 08	N 19°13.317' W 100°17.409' 4917 pies rumbo W	Sur
22	Sto. Tomás	San Pedro el Grande	Maximino Vera Paniagua	Apiario Granadillo (55 cajas)	5 dic. 08	N 19°13.224' W 100°17.756' 5162 pies rumbo W	Sur
23	Ixtapan del oro	La Puerta	Ricardo Vera Paniagua	Apiario El Zapote (53 cajas)	5 dic. 08	N 19°13.433' W 100°17.901' 5492 pies rumbo N	Sur
24	Otzolotepec	Jilotzingo	Narciso Fernández Pichardo	Apiario La Huerta (54 cajas)	20 ene. 09	N 19°27.448' W 099°29.839' 9009 pies rumbo N E	Centro
25	Malinalco	Malinalco	J. Natividad Delgado Rebollar	Apiario Malinalco 2 (55 cajas)	20 ene. 09		Centro
26							
27							
28							
29							
30							

Elaboró: M VZ. Aurora Xolalpa


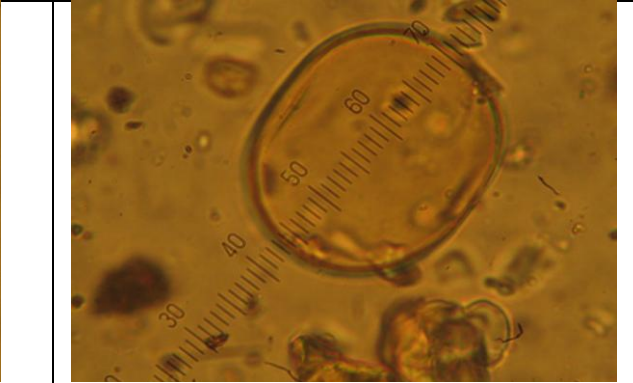
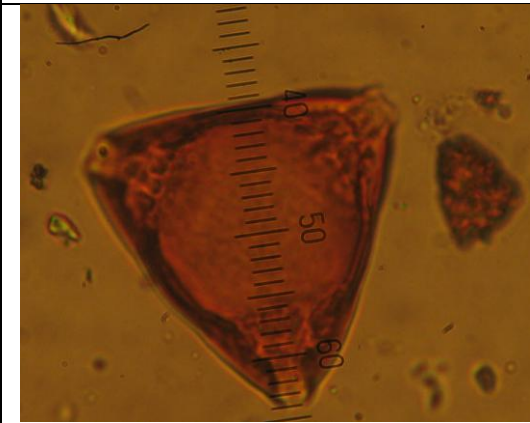
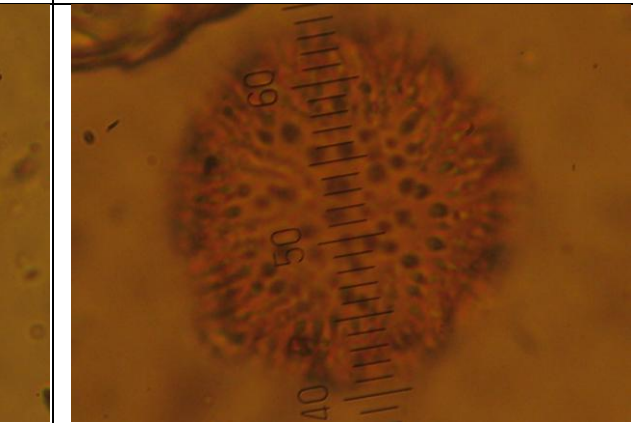


Anexo III. Imágenes de los granos de polen predominantes en las muestras de miel procesadas para el análisis melisopolinológico.

	
<i>Asteraceae tipo A</i>	<i>Zea mays L.</i>
	
<i>Eucalyptus sp. Vista polar</i>	<i>Asteraceae tipo B</i>
	
<i>Tillandsia sp. Tipo A</i>	<i>Tillandsia sp. Tipo B</i>


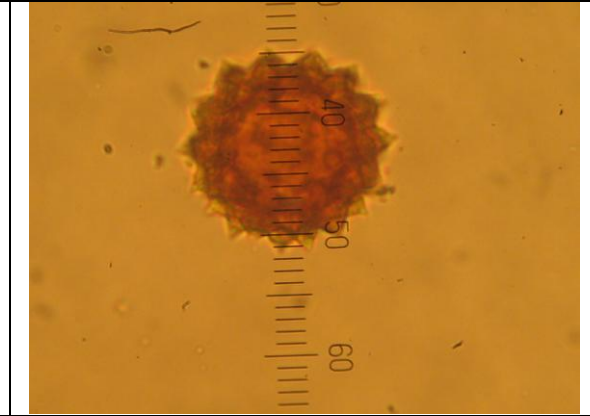



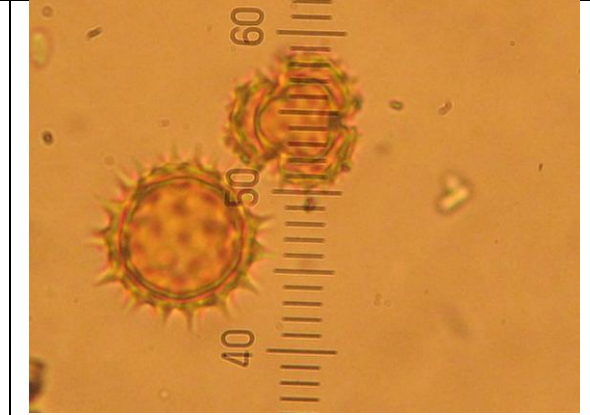
Anexo III. Imágenes de los granos de polen predominantes en las muestras de miel procesadas para el análisis melisopalinológico.

<p><i>Brassica sp</i></p>	<p><i>Microsechium hellei (peyr) Cogn</i></p>
<p><i>Lamiaceae sp.</i></p>	<p><i>Pinaceae sp. tipo A</i></p>
<p><i>Astericeae tipo C</i></p>	<p><i>Eucalyptus sp</i></p>

Anexo III. Imágenes de los granos de polen predominantes en las muestras de miel procesadas para el análisis melisopalinológico.

	
<p><i>Acacia sp. tipo A</i></p>	<p><i>Zea may s. L</i></p>
	
<p><i>Lopezia sp.</i></p>	<p><i>Microsechium hellei (peyr) Cogn</i></p>
	
<p><i>Pinaceae sp. tipo B</i></p>	<p><i>Acacia sp. tipo B</i></p>

Anexo III. Imágenes de los granos de polen predominantes en las muestras de miel procesadas para el análisis melisopalinológico.

	
<i>Shinus molle</i>	<i>Asteraceae tipo D</i>
	
<i>Pinaceae sp. tipo C</i>	Leguminosa papilionidae
	
<i>Acacia sp. tipo C</i>	<i>Asteraceae tipo C</i>