



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS Y CLASIFICACIÓN DE MIELES DE ABEJAS MEXICANAS POR
RMN¹H Y MÉTODOS FÍSICOQUÍMICOS**

TESIS MANCOMUNADA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTAN

PAOLA KARIME PIMENTEL MEZA

DHAMAR ALEJANDRA ROSALES CONTRERAS



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MARIA ISABEL AGUILAR LAURENTS
VOCAL: GLORIA DIAZ RUIZ
SECRETARIO: JOSE FAUSTO RIVERO CRUZ
1er. SUPLENTE: MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDIVAR
2° SUPLENTE: BERENICE OVALLE MAGALLANES

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 111, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO E,
FACULTA DE QUIMICA, UNAM.
LURMN, INSTITUTO DE QUÍMICA.
LAB 4D, EDIFICIO A, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:
José Fausto Rivero Cruz

SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay):
Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero

SUSTENTANTE (S):

Paola Karime Pimentel Meza

Dhamar Alejandra Rosales Contreras

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirnos realizar nuestros estudios de Licenciatura en Química de Alimentos.

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz por su apoyo, asesoría y su valioso tiempo brindado para la realización de este trabajo.

A la Dra. Patricia Severiano por el apoyo, tiempo y asesoría brindada para la realización de la medición instrumental de color.

Al Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear (LURMN) por el registro de los espectros de este trabajo.

Al proyecto "Plataforma Nacional de Metabolómica Basada en Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)-OMICS para la solución de problemas nacionales del sector Agroalimentario SAGARPA-2017-6-292836" por los recursos económicos.

A los miembros del jurado por la revisión de este trabajo.

Al proyecto PAIP 5000-9138 otorgado por el Dr. José Fausto Rivero Cruz por los recursos económicos.

Este trabajo fue presentado en la modalidad de cartel en:



En homenaje a

Dr. Juan Rogelio Aguirre Rivera

Instituto de Investigación de Zonas Desérticas
Universidad Autónoma San Luis Potosí

SEDE: Antiguo Paraninfo Universitario Rafael Nieto

Análisis y clasificación de mieles mexicanas por resonancia magnética nuclear (RMN¹H)

Karol Carrillo-Jaimes*, Dhamar A. Rosales-Contreras*, Paola K. Pimentel-Meza*, Nuria Esturau-Escofet*, Martha E. García-Aguilera*, Eduardo Rodríguez de San Miguel-Guerrero*, Ángel López-Ramírez†, Adriana Correa-Benítez‡, Blanca Estela Rivero-Cruz*, José Fausto Rivero-Cruz*.

*Facultad de Química, †Facultad de Medicina Veterinaria e ‡Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Palabras clave: RMN, miel, *Apis mellifera*, PCA.

INTRODUCCIÓN

La miel se ha convertido en un producto muypreciado, no solo por sus múltiples usos y su agradable sabor, también, por su alto valor nutricional y sus actividades biológicas.¹ Estas razones han ocasionado que el consumo de miel haya incrementado y con ello su adulteración.² Las propiedades, composición, aroma y sabor de la miel varían según su origen geográfico y las condiciones climáticas de las flores donde las abejas recolectan el néctar. Las mieles monoflorales son de gran interés en la apicultura y su valor comercial es mayor. Una de las técnicas más importantes para certificar el origen monofloral de las mieles es el análisis melisopalinológico. Sin embargo, la evaluación de la calidad de la miel mediante este método requiere más tiempo y algunos adulterantes difícilmente pueden detectarse.³ Es por ello que se requieren métodos analíticos para la identificación del origen geográfico y posibles adulterantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de miel se recolectaron en apiarios ubicados en diferentes zonas melíferas de México. El pH se midió siguiendo la metodología descrita por Khalil.⁴ Las mediciones se realizaron por triplicado y se empleó una extracción con cloroformo.⁵ El análisis de las muestras de miel por RMN se realizó en el LURMN-IQ-UNAM. El procesado de la FID (Free Induction Decay) se realizó con el software MestReNova y el análisis quimiométrico utilizando Unscrambler X v. 1.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una de las determinaciones más importantes para conocer la calidad y el estado de conservación de las mieles es el pH. Los valores de pH para las mieles estudiadas se encontraron en un rango de 2.93 a 5.75. Los espectros de RMN¹H fueron obtenidos a partir de extractos clorofórmicos. Cada una de las muestras tuvo el mismo tratamiento y en los espectros se observó que las señales más intensas se encuentran en la región de los protones alifáticos. Otras señales de intensidad comparable se observaron en la región de los protones correspondientes a los azúcares y a los compuestos aromáticos. Es importante mencionar que en todas las regiones las señales se encuentran sobrepuestas. Específicamente, aquellas presentes

en las regiones de 0.75 - 2.5 y 6.9 - 8.0. Las señales en estas regiones presentan importantes diferencias en la RMN y pueden ser consideradas como las huellas digitales que caracterizan el origen de las mieles.

Un grupo de 35 mieles fue estudiado analizándose mediante análisis del componente principal (PCA). Este análisis permitió determinar que el comportamiento de todas las muestras se puede describir con solo dos componentes (95%). Con base en la elipse de Hotelling's T2 con un nivel de confianza del 95%, se identificaron dos muestras anómalas (M20 y M42), las cuales se excluyeron del grupo de datos utilizado para la construcción del modelo. El análisis del espectro de RMN de la muestra M20 permitió observar señales correspondientes al 5-HMF. El hallazgo de 5-HMF en la miel es relevante ya que es un marcador de frescura y se le ha reportado como un compuesto carcinógeno.⁶ Por otra parte, en el espectro de la muestra M42, que fue recolectada a partir de abejas silvestres en Zacatecas, se observaron las señales para una mezcla de ácidos grasos saturados e insaturados.

CONCLUSIONES

Se desarrolló un modelo quimiométrico que permite la distinción de las mieles de acuerdo con su origen geográfico. Este modelo podrá ser aplicado para conocer la calidad de las mieles producidas en México.

AGRADECIMIENTOS

Plataforma Nacional de Metabolómica Basada en Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)-OMICS para la solución de problemas nacionales del sector Agroalimentario SAGARPA-2017-6-292836.

REFERENCIAS

1. Jamróz *et al.*, *J. Sci. Food Agric.*, **2014**, 94, 246–255.
2. Oliveira *et al.*, *J. Food Engineering*, **2014**, 135, 39–43.
3. Ohmenhaeuser *et al.*, *ISRN Analytical Chemistry*, **2013**, 2013, 1–9.
4. Khalil, I., *et al.*, *Molecules*, **2012**, 17, 11199–11215.
5. Vit, P., *et al.*, *International Scholarly and Scientific Research & Innovation*, **2015**, 9, 494–497.
6. ALabdeen, S., *et al.*, *Pakistan Journal of Nutrition*, **2009**, 9, 1391–1396.

INDICE

ÍNDICE DE GRÁFICAS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS (CONTINUACIÓN)	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS (CONTINUACIÓN)	X
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 DEFINICIÓN	3
2.2 HISTORIA DE LA MIEL	3
2.2.1 Apis mellifera.....	4
2.3 PRODUCCIÓN NACIONAL	6
2.3.1 Regiones apícolas.....	7
2.3.1.1 Región norte	7
2.3.1.2 Región central	8
2.3.1.3 Región del Pacífico	8
2.3.1.4 Región del Golfo de México.....	8
2.3.1.5. Región de la península de Yucatán	9
2.4 COMERCIALIZACIÓN DE MIEL MEXICANA	9
2.5 PROCESAMIENTO Y ENVASADO DE LA MIEL	10
2.6 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA MIEL	14
2.6.1 Carbohidratos	15
2.6.2. Proteínas.....	16
2.6.3 Ácidos orgánicos	17
2.6.4. Vitaminas.....	18
2.6.5 Minerales	19
2.6.6 Compuestos fenólicos	19
2.6.7 Compuestos volátiles	20
2.7 PROPIEDADES FÍSICAS	21
2.8 PH.....	22
2.9 CALIDAD DE LA MIEL	23
2.10 ANÁLISIS INSTRUMENTAL DE COLOR	25
2.11 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES	28
2.12 ANÁLISIS DISCRIMINANTE CON MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (PLS-DA, PARTIAL LEAST SQUARES - DISCRIMINAT ANALYSIS)	28
3. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN.....	30
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	30
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	30
3.3 JUSTIFICACIÓN.....	30

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL	32
4.1 RECOLECCIÓN	32
4.2 EVALUACIÓN INSTRUMENTAL DEL COLOR	32
4.3 MEDICIÓN DE PH	33
4.4 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS CLOROFÓMICOS.....	34
4.6 PROCESAMIENTO DE ESPECTROS	34
4.7 ANÁLISIS MULTIVARIADO	35
4.7.1 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA).....	35
4.7.2 ANÁLISIS DISCRIMINANTE CON MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (PLS-DA PARTIAL LEAST SQUARES – DISCRIMINANT ANALYSIS)	35
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
5.1 RECOLECCIÓN	36
5.2 EVALUACIÓN INSTRUMENTAL DEL COLOR.....	41
5.3 MEDICIÓN DEL PH	47
5.4 PERFILES DE LOS ESPECTROS DE RMN- ¹ H	49
5.5 ANÁLISIS MULTIVARIADO	52
5.5.1 ANÁLISIS CLASIFICATORIO POR PCA	52
5.5.2 ANÁLISIS MULTIVARIADO POR PLS-DA	64
6. CONCLUSIONES	69
7. PERSPECTIVAS.....	71
8. BIBLIOGRAFÍA.....	72

Índice de Gráficas

Gráfica 1. Producción Nacional Anual de Miel.

Gráfico 2. Datos obtenidos experimentalmente de pH de las mieles recolectadas.

Índice de Figuras

Figura 1. Abeja de la especie *Apis mellifera*

Figura 2. Mapa de las regiones apícolas de México.

Figura 3. Diagrama de flujo del proceso de extracción y envasado de la miel.

Figura 4. Espacio de color CIELAB

Figura 5. Espectrofotómetro Minolta CM-3600d

Figura 6. Esquema de las partes de un espectrofotómetro.

Figura 7. Fotografía de los opérculos de un panal de abejas.

Figura 8. Análisis del componente principal (PCA) realizado con los datos de evaluación instrumental de color para 34 mieles.

Figura 9. Varianza de los datos de los componentes seleccionados.

Figura 10. Representación gráfica de las coordenadas CIE $L^*a^*b^*$.

Figura 11. Espectros de RMN¹H apilados de las mieles recolectadas.

Figura 12. Segmento del espectro de RMN¹H (0.0 A 10.0 ppm) de la muestra de miel M40 (700 MHz, CDCl₃, 298K).

Figura 13. Análisis del componente principal (PCA) realizado con los datos de RMN¹H para 47 muestras de miel.

Figura 14. Varianza de los datos de los dos componentes seleccionados.

Figura 15. Hotelling's T² con un nivel de confianza del 91% para PCA con datos de RMN¹H.

Figura 16. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de la muestra M20 (700 MHz, CDCl₃, 298K).

Índice de Figuras (continuación)

Figura 17. Análisis del componente principal con datos de RMN¹H y origen floral para 47 muestras de miel.

Figura 18. Análisis del componente principal con datos de RMN¹H y año de recolección para 47 muestras de miel.

Figura 19. Análisis del componente principal con datos de RMN¹H y origen geográfico para 47 muestras de miel.

Figura 20. Análisis del componente principal con datos de RMN¹H y especie de abeja para 47 muestras de miel.

Figura 21. Hotelling's T² con un nivel de confianza del 99% para PCA con datos de evaluación instrumental de color.

Figura 22. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de la muestra M42 (700 MHz, CDCl₃, 298K).

Figura 23. Análisis del componente principal de datos con evaluación instrumental de color y origen geográfico para 34 muestras de mieles.

Figura 24. Análisis del componente principal con datos de evaluación instrumental de color y año de recolección.

Figura 25. Contribuciones de las variables de evaluación instrumental de color y RMN¹H para el análisis de PCA.

Figura 26. Contribuciones de las variables de RMN¹H para el análisis de PLS-DA.

Figura 27. Hotelling's T² con un nivel de confianza del 73.33% para PLS-DA con datos de RMN¹H.

Figura 28. Comparación de valores reales de clase (Gráfica A) y valores predichos por PLSA-DA (Gráfica B).

Figura 29. Importancia de la varianza en proyección PLS-DA

Índice de Cuadros

Cuadro A1. Listado de mieles recolectadas, origen floral, especie de abeja productora, clase de miel, coordenadas CIELAB y pH.

Cuadro 1. Rango de variabilidad de los componentes químicos de la miel

Cuadro 2. Condiciones de análisis instrumental de color.

Cuadro 3. Contribuciones de las variables del espacio de color CIELAB (%).

Cuadro 4. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) del parámetro L

Cuadro 5. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) del parámetro a*

Cuadro 6. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) del parámetro b*

Cuadro 7. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) del parámetro C

Cuadro 8. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) del parámetro h°

Cuadro 9. Contribuciones de las variables para PLS-DA (%).

Lista de abreviaturas

a. C.:	Antes de Cristo
AlCl ₃ :	cloruro de aluminio
a*:	coordenada cromática
b*:	coordenada cromática
CIE:	International Commission on Illumination
DDPH:	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
g:	gramo
h:	hora
H ₂ O:	agua
K:	Kelvin
Kg:	kilogramo
Km ² :	kilómetro cuadrado
L:	luminosidad
mg:	miligramos
MHz:	mega hertz
mL:	mililitros
mM:	milimol
mm ² :	milímetros cuadrados
nm:	nanómetros
Na ₂ CO ₃ :	carbonato de sodio
PCA:	análisis de componente principal
pH:	potencial de hidrógeno
ppm:	partes por millón
RMN:	resonancia magnética nuclear
RMN ¹ H:	resonancia magnética nuclear de un protón
rpm:	revoluciones por minuto
SAGARPA:	Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural
TMS:	tetrametilsilano
UV-Vis:	ultravioleta visible

Lista de abreviaturas (*continuación*)

5-HMF: 5-hidroximetilfurfuraldehído

°C: grados centígrados

% m/m: porcentaje masa/masa

% m/v: porcentaje masa/volumen

µg: microgramos

µL: microlitros

+a: plano rojo

+b: plano amarillo

-a: plano verde

-b: plano azul

1. INTRODUCCIÓN

Nuestro país es por tradición un productor de miel y se encuentra dentro de los primeros exportadores y productores a escala mundial gracias a que cuenta con una diversidad de flora de más de 12,000 especies de plantas. Sin embargo, con la introducción de la caña de azúcar y el desarrollo de grandes haciendas azucareras, la miel pasó a segundo lugar como endulzante.

De acuerdo con el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Argentina (2018), México es el tercer principal exportador de miel en el mundo, detrás de las naciones china y argentina.

En territorio mexicano, el sector apícola tiene un escaso apoyo en todos los sentidos. La miel de abeja es considerada como un producto generador de divisas para el país, con posibilidad de crecer en un futuro no muy lejano, permitiendo mantenerla entre los primeros lugares a nivel internacional.

La calidad es el conjunto de características de un elemento, producto o servicio, que le confieren la aptitud de satisfacer una necesidad implícita o explícita. Esto significa que la calidad de un producto o servicio, es equivalente al rango de satisfacción que le ofrece su consumidor, y está determinado por las características específicas del producto o servicio (Instituto Nacional de Economía Social, 2011).

La calidad de la miel depende, en buena medida, de los azúcares contenidos en ella, es decir, éstos deben corresponder a los de la miel y no a los del azúcar común (sacarosa). Los azúcares típicos de la miel de abeja son los que le dan sus características organolépticas. La fructosa, que es la que predomina en la mayoría de las mieles, es ligeramente más dulce que la sacarosa y la glucosa. Por otro lado, el contenido de agua (humedad) es un factor importante en la calidad de la miel: su presencia en exceso puede hacerla susceptible de fermentación. El contenido de humedad es atribuible

a ciertos factores ambientales; el agua presente en el néctar influye también en la viscosidad y color, lo que afecta, a su vez, las propiedades organolépticas y de conservación (Miel de abeja, Revista del Consumidor, 2015).

Los residuos de pesticidas usados en el tratamiento de plagas pueden comprometer la calidad. Por lo que, la determinación de estos contaminantes en la miel es esencial, ya que el uso de pesticidas ha incrementado significativamente en décadas recientes debido a la creciente demanda de la producción de alimentos. Los pesticidas presentes en la miel pueden ser un indicador de la contaminación ambiental, la concentración de estos componentes en la miel usualmente se encuentra en niveles traza (Souza *et al.*, 2016).

La miel constituye uno de los alimentos más primitivos que el hombre aprovechó para nutrirse. Aunque la apicultura es una actividad muy antigua, en la actualidad representa una actividad económica importante en muchos países que permite generar una importante cantidad de empleos, siendo en México la tercera fuente de divisas del sector ganadero (Ulloa *et al.*, 2010).

2. ANTECEDENTES

2.1 Definición

Se entiende por miel a la sustancia dulce natural producida por abejas *Apis mellifera* a partir del néctar de las plantas o de secreciones de partes vivas de éstas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de las mismas y que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, y depositan, deshidratan, almacenan y dejan en el panal para que madure y añeje. El color de la miel varía desde casi incoloro a pardo oscura. Su consistencia puede ser fluida, viscosa, total o parcialmente cristalizada. El sabor y el aroma varían, pero en general posee los de la planta de que procede (NOM-145-SCFI-2001).

2.2 Historia de la miel

La relación histórica entre los humanos y las abejas es larga y duradera. En América no existían las especies del género *Apis*, por lo que las culturas establecidas en las zonas tropicales y subtropicales utilizaron otro grupo de abejas de la familia *Meliponinae* o abejas sin aguijón. De éstas, las culturas mesoamericanas lograron cultivar diversas variedades de los géneros *Melipona* y *Trigona*, entre las que tuvo particular importancia la especie *Melipona beecheii*, que se utilizaba todavía en Yucatán y a la que en idioma maya se denomina "Xuna`an-Kab", "Kolel`Kab" o "Po`ol-Kab". A la actividad dedicada a la explotación de la abeja *Melipona* se le denomina meliponicultura. En la península de Yucatán, esta actividad se desarrolló con gran auge (Correa y Guzmán, 2013).

Los mayas llevaban a cabo la explotación de las meliponas robando la miel de las colonias silvestres. Años después, cortaban los troncos en los que existían los nidos, los transportaban al alero de su vivienda y eran cuidados hasta el momento de la cosecha. El documento más antiguo sobre aspectos relacionados con la meliponicultura en la península de Yucatán es el código Troano, el cual hace mención de las festividades religiosas de los

meliponicultores; durante los meses de noviembre y diciembre, los meliponicultores celebraron fiestas dedicadas principalmente al Dios "Ah-Muzen Kab" para asegurar un buen flujo de néctar (Correa y Guzmán, 2013).

La miel fue objeto de un intenso comercio que realizaban desde Tabasco por mar con Honduras (Úlua) y Nicaragua, así como el Imperio Mexica. A cambio de miel y cera, los mayas probablemente recibían semillas de cacao y piedras preciosas (Correa y Guzmán, 2013).

2.2.1 *Apis mellifera*

La introducción de la abeja europea a México no fue directa, existe evidencia que las abejas europeas de la raza *Apis mellifera* (se caracteriza por ser de color negro), fueron introducidas sin éxito productivo en Florida a fines del siglo XVII con fines económicos, cuando esta península era posesión española.

La abeja europea *Apis mellifera ligustica* (conocida como la abeja italiana) llegó a México después del año 1911, es la raza de abejas más difundida a nivel mundial por sus características, de docilidad, baja enjambrazón y productividad (Correa y Guzmán, 2013).

Apis mellifera precede al ser humano en la tierra por 10-20 millones de años. Las abejas son una de las formas animales más antiguas y existen desde la época neolítica. En la Era de Bronce las sociedades celebraban sus triunfos bebiendo agua miel, probablemente ésta fue la primera bebida alcohólica y era obtenida a partir de miel fermentada (Ericson *et al.*, 2009).



Figura 1. Abeja de la especie *Apis mellifera* (Angel López).

Los beneficios de la miel se conocen desde hace miles de años y ha sido utilizada en la antigüedad por su valor nutritivo y medicinal. Las primeras evidencias del consumo de la miel aparecen en pinturas rupestres del mesolítico, unos 6,000 años a.C., y su uso como medicamento unos 2,500 años a.C., por los sumerios en Mesopotamia. Entre los usos médicos, desde la antigüedad, la miel ha servido en el cuidado de las heridas (Schencke *et al.*, 2016).

La apicultura es una actividad muy antigua que se ha desarrollado en diferentes partes del mundo. Las culturas europeas utilizaban a la abeja *Apis mellifera*, en cambio en América, las civilizaciones mesoamericanas cultivaron diversas variedades de los géneros *Trigona* y *Mellipona*. La región y civilización que destacó en esta actividad fue la maya (Ulloa *et al.*, 2010). En esta cultura, la miel fue ampliamente utilizada para preparar el "balché", bebida compuesta por miel, corteza de balché y agua, que se ingería en las festividades religiosas (Calidad de la miel de abeja, Revista del Consumidor, 2001). La importancia de las abejas en esta civilización quedó expresada en edificaciones y documentos.

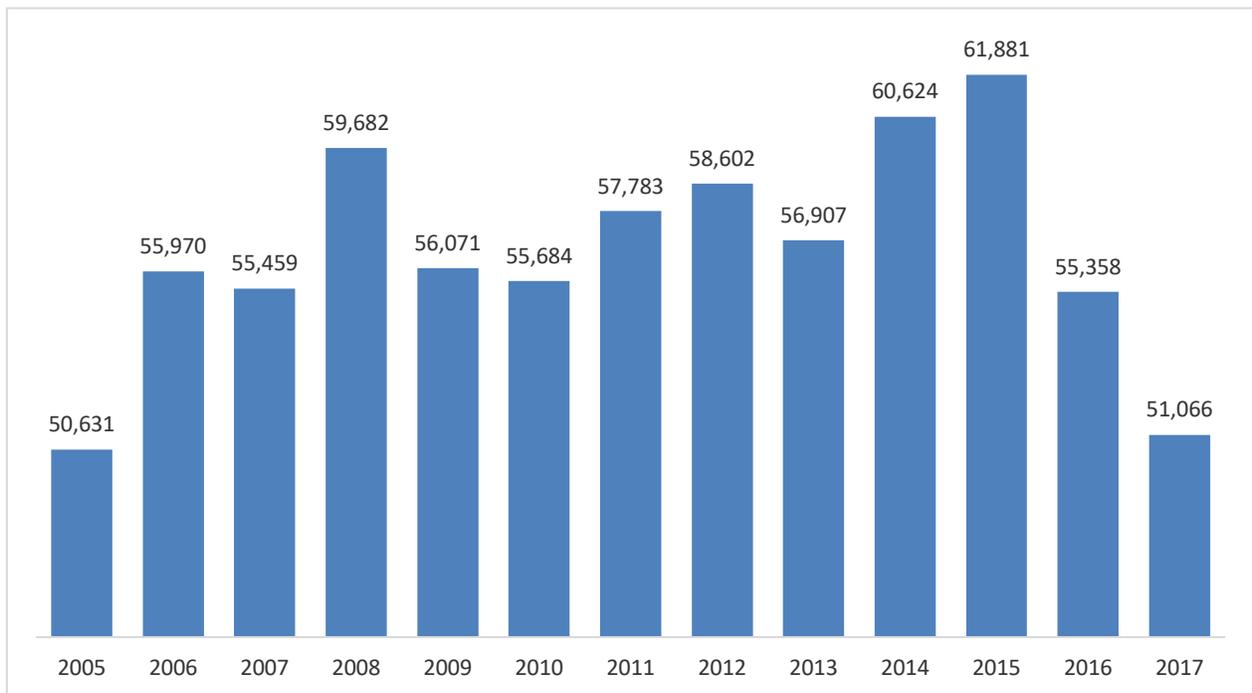
La introducción de la abeja europea *Apis mellifera* a nuestro país se dio durante la época colonial. Sin embargo, a pesar de las ventajas que ofreció la abeja europea como era la docilidad y resistencia a las enfermedades, las zonas de vital importancia para la apicultura como la península de Yucatán mantuvieron a la abeja nativa como preferida. No fue sino hasta la segunda mitad del siglo XX que se sustentó la apicultura y la industria apícola mexicana en la abeja europea. A partir de 1950, la apicultura mexicana mostró un importante desarrollo a través de las primeras exportaciones, iniciando con ello la etapa de una apicultura moderna y comercial que la ubicó en los años posteriores entre las primeras del mundo (Ulloa *et al.*, 2010).

En el siglo XXI, el número de abejas fue disminuyendo a un ritmo alarmante debido a una misteriosa condición conocida como “trastorno de colapso de colonias”. A medida que mueren más y más abejas en el mundo, se empieza a apreciar, no sólo cuán frágil es su supervivencia, sino también su importancia para la economía agrícola a nivel mundial (Stewart *et al.*, 2011).

2.3 Producción nacional

La apicultura en México es una actividad relevante del subsector pecuario, posición que adquiere tanto por su generación de empleos e ingresos en el medio rural, como por su aporte de divisas. La producción promedio anual de miel fue de 56.9 mil toneladas en el periodo 2000-2008 y ubicó al país como sexto productor mundial, superado por China, Argentina, Turquía, Ucrania y Estados Unidos (Magaña *et al.*, 2012).

Actualmente, el país se ubica como el octavo productor mundial, el cual aporta 60.6 mil toneladas de miel (Gráfica 1), siendo Jalisco, Chiapas, Veracruz y Yucatán los principales productores de miel del país (Resumen nacional agroalimentario, 2018).



Gráfica 1. Producción Nacional Anual de Miel, volumen en toneladas (Resumen Nacional Agroalimentario, 2019).

2.3.1 Regiones apícolas

México se divide en cinco grandes regiones apícolas (Figura 2), dependiendo del clima, suelo, vegetación predominante y las características generales de los sistemas de producción empleados en las abejas (Correa y Guzmán, 2013).

2.3.1.1 Región norte

Es la de mayor extensión con aproximadamente 930,000 kilómetros cuadrados; su vegetación es de tipo xerófila con importantes áreas de pastizal, bosque espinoso y coníferas. Se estima que en esta región existen un total de 156,498 colmenas, se obtienen anualmente alrededor de 3,571 toneladas de miel con un rendimiento promedio por colmena de 23 kilogramos y 157 toneladas de cera (Correa y Guzmán, 2013).

2.3.1.2 Región central

Comprende la denominada meseta central, con una superficie aproximada de 390,000 kilómetros cuadrados. La vegetación predominante en orden de importancia es: matorral serófilo, bosque espinoso, pastizal, bosque de coníferas y de encinos y bosque tropical caducifolio. Se estima que cuenta con 444,897 colmenas, que producen al año 12,392 toneladas de miel con un rendimiento promedio por colmena de 28 kilogramos y 643 toneladas de cera. El clima predominante es el subtropical de tierras altas (Correa y Guzmán, 2013).

2.3.1.3 Región del Pacífico

Comprende desde la vertiente de la Sierra Madre Occidental hasta el Océano Pacífico, y desde el estado de Sinaloa hasta la frontera con Guatemala; tiene una superficie aproximada de 260,000 kilómetros cuadrados y la vegetación predominante son los bosques tropicales caducifolios y subcaducifolios, aunque también presenta bosque espinoso y en algunas áreas con mayor altitud, bosque con coníferas y encinos. Se estima que cuenta con 377,276 colmenas, se obtienen 12,226 toneladas de miel con un rendimiento promedio por colmena de 32 kilogramos y 802 toneladas de cera (Correa y Guzmán, 2013).

2.3.1.4 Región del Golfo de México

Comprende desde la vertiente de la Sierra Madre Oriental hasta la Costa del Golfo de México, ocupando un área de 250,000 kilómetros cuadrados, su mayor extensión está cubierta por bosque tropical perennifolio, con áreas importantes de bosque tropical, con áreas de bosque tropical caducifolio. En su extremo norte presenta también vegetación xerófila y bosque espinoso. Se estima que existen 271,307 colmenas, con una producción de 10,148 toneladas de miel con un rendimiento promedio por colmena de 37 kilogramos y 548 toneladas de cera.

En esta región se producen las mieles más costosas, en especial la miel de azahar de los huertos del naranjo (Correa y Guzmán, 2013).

2.3.1.5. Región de la península de Yucatán

Comprende los estados de Yucatán, Campeche y Quintana Roo que son tradicionalmente productores de miel. Con una superficie aproximada de 140,000 kilómetros cuadrados, su vegetación original predominante en el noreste es el bosque tropical caducifolio, con amplias extensiones en el sur y en el este de bosque tropical perennifolio. Se cosechan 20,553 toneladas de miel al año con un rendimiento promedio por colmena de 41 kilogramos (Correa y Guzmán, 2013).



Figura 2. Mapa de las regiones apícolas de México (Correa y Guzmán, 2013).

2.4 Comercialización de miel mexicana

En México la producción apícola se ha desarrollado como una actividad relevante debido, básicamente, a que representa una importante fuente generadora de empleo en las zonas marginadas del país, así como una de las principales actividades captadoras de divisas dentro del subsector pecuario.

El canal comercial más extenso es el que incluye a la industria, que utiliza a la miel como ingrediente para la elaboración de alimentos como cereales, yogurts, dulces y panes; o bien, como materia prima para las industrias tabacalera y cosmetológica, que ocupan cada vez más productos como polen, propóleo y jalea real; en México, la miel se produce en casi todo el territorio nacional, con importantes diferencias en sus prácticas de acuerdo a la región (González *et al.*, 2014).

2.5 Procesamiento y envasado de la miel

Para la obtención de miel se deben cumplir con las Buenas Prácticas Pecuarias en el manejo y envasado de la miel en todas y cada una de las etapas del proceso, ya que permite que los productores locales fortalezcan sus actividades, dando certeza al consumidor nacional e internacional de ofrecer miel libre de algún tipo de contaminación (Sagarpa, 2012).

En la Figura 3 se observa el diagrama de flujo del proceso de extracción y envasado de la miel en México (Sagarpa, 2012). La descarga de alzas debe realizarse en áreas cerradas habilitadas para tal fin, se utilizarán charolas salva-miel limpias, de acero inoxidable grado alimenticio. El almacenamiento de las alzas con miel debe mantener las condiciones de humedad relativa menor al 50% y temperaturas entre 20° C y 35° C, esto evitará la alteración de las propiedades fisicoquímicas para facilitar su extracción, se debe evitar el almacenamiento de alzas con miel por más de dos días. El desoperculado consiste en la remoción de los opérculos con los que las abejas han sellado las celdas del panal una vez que la miel madura en la colmena. La separación miel-cera debe realizarse inmediatamente y en forma paralela al desoperculado, de esta manera se recupera miel y se facilita el proceso de recuperación de cera en menor tiempo. Se usan separadoras mecánicas o eléctricas de cera-miel, centrífugas que trabajan en frío para no afectar la calidad del producto. En el escurrido de bastidores

se deben tener precauciones con la exposición a posibles contaminaciones (Sagarpa, 2012).

Por otra parte, para que la extracción se lleve a cabo, se coloca una canastilla en la que se depositan los bastidores desoperculados para extraer la miel por fuerza centrífuga (Apicultors Gironins Associats, 2013). El colado es una práctica utilizada para eliminar los fragmentos de cera, de abejas u otras impurezas provenientes del proceso de extracción, se ocupa una malla cuya abertura máxima sea de 3 milímetros cuadrados (Sagarpa, 2012). La recepción se lleva a cabo en un tanque que se ubica después del proceso de extracción, deben utilizarse tanques de acero inoxidable y en algunos casos, de doble pared con regulador de temperatura y termómetro, esto con el fin de mantener la miel a 28° C. El bombeo y la tubería para el transporte de miel deberá ser un sistema de bombeo automático para evitar cualquier tipo de contaminación (Apicultors Gironins Associats, 2013). La sedimentación es el proceso en el cual se logra la separación de las partículas e impurezas presentes en la miel a través del reposo. El calentamiento se lleva a cabo cuando la miel se haya cristalizado en los tambores, se deberá someter a un proceso de calentamiento controlando la temperatura a un máximo de 50° C durante 24 horas, el calentamiento va a permitir una mayor fluidez, facilitando los procesos de filtrado, homogeneizado y envasado (Sagarpa, 2012). Para el filtrado se emplearán filtros con mallas de acero inoxidable con abertura de 100 µm, estos deberán ser reemplazables y lavables. El homogeneizado se realizará para cumplir con características solicitadas por el comprador (Apicultors Gironins Associats, 2013).

Después, se pasa al envasado, que cuenta con dos tipos: envasado en tambores y envasado en frascos; para esto hay una serie de cuidados que se deben seguir, descritos en el Manual de Buenas Prácticas en el Manejo y Envasado de la Miel (2012). El etiquetado se llevará a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-145-SCFI-2001. Por último, la miel

debe almacenarse en un ambiente fresco (15–20° C) para conservar sus propiedades físicas y químicas, debido a que los procesos enzimáticos se reducen al mínimo (Sagarpa, 2012).

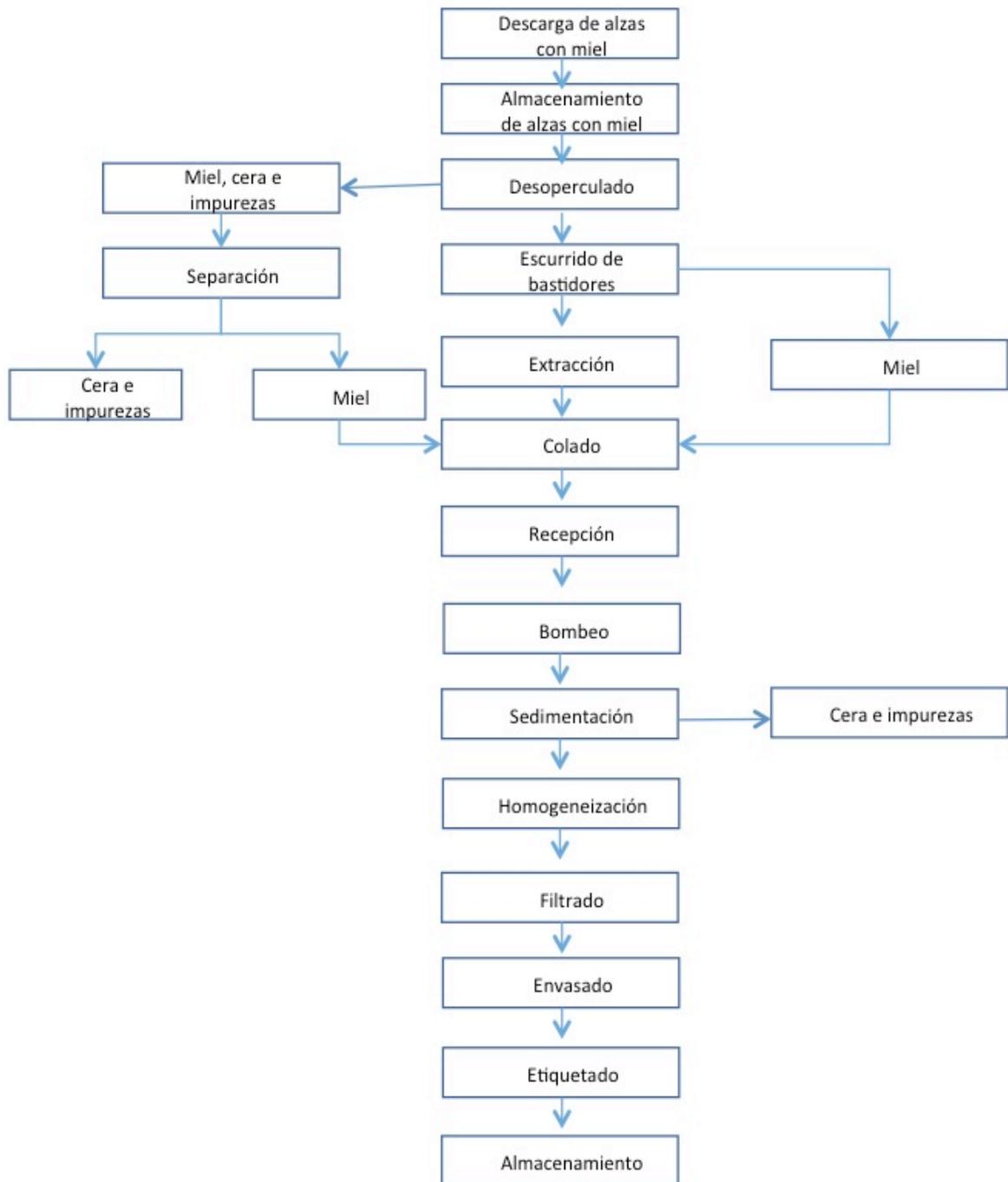


Figura 3. Diagrama de flujo del proceso de extracción y envasado de la miel (Sagarpa, 2012).

2.6 Composición química de la miel

La miel podría definirse como un alimento natural compuesto principalmente de azúcares y agua, junto con constituyentes menores como minerales, vitaminas, aminoácidos, ácidos orgánicos, flavonoides y otros compuestos fenólicos y sustancias aromáticas (Santos y González, 2017).

Sin embargo, Escuredo y colaboradores (2013) definen que la miel es un alimento que contiene alrededor de 200 sustancias y se compone principalmente de azúcares, agua y otros componentes como proteínas (enzimas), ácidos orgánicos, vitaminas (especialmente vitamina B6, tiamina, niacina, riboflavina y ácido pantoténico), minerales (incluyendo calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, potasio, sodio y zinc), pigmentos, compuestos fenólicos, una gran variedad de compuestos volátiles y partículas sólidas derivadas de la recolección de la miel (Cuadro 1). Es abundante en flavonoides y ácidos fenólicos que actúan como antioxidantes naturales (Missio *et al.*, 2016).

Además, Schneiter y colaboradores (2015) consideran a la miel como una dispersión acuosa de partículas de tamaños muy diferentes, desde iones inorgánicos y azúcares en disolución y macromoléculas de proteínas en dispersión coloidal hasta granos de polen procedentes de la flora.

La composición, en especial los componentes minoritarios, puede sufrir cambios significativos según el tiempo y las condiciones de almacenamiento.

La composición (en especial los componentes minoritarios), color, aroma y sabor de la miel depende medianamente de las flores, de las regiones geográficas, el clima y de la especie de abeja involucrada en la producción, también puede afectarse por las condiciones climatológicas, el proceso, la manipulación, el envasado y el tiempo de almacenamiento (Missio *et al.*, 2016; Santos y González, 2017).

La miel es un alimento que sufre muchos cambios en su composición durante el almacenamiento; estos cambios, generalmente ocurren debido a diferentes reacciones químicas, incluyendo la fermentación, la oxidación y el procesamiento térmico, modificando así los componentes de la miel (Missio *et al.*, 2016).

Cuadro 1. Rango de variabilidad de los componentes químicos de la miel

Componentes mayoritarios (99%)	g/100g
Fructosa	21.7 - 53.9
Glucosa	20.4 - 44.4
Sacarosa	0.0 - 7.6
Otros azúcares	0.1 - 16.0
Componentes minoritarios (1%)	g/100g
Minerales	0.02 - 1.03
Nitrógeno (proteínas)	0.00 - 0.13
Enzimas	>0.1 %
Aromas	>0.1 %
Otros	>0.1 %

Fuente: Codex Alimentarius, 2001

2.6.1 Carbohidratos

La miel es una solución acuosa concentrada compuesta de una mezcla de fructosa y glucosa, pero también contiene otros 30 azúcares complejos. Debido a su alto contenido de azúcar, en promedio 80-83%, la miel es una excelente fuente de energía (Missio *et al.*, 2016).

Los monosacáridos representan aproximadamente el 75% de los azúcares que se encuentran en la miel, junto con 10 a 15% de disacáridos y pequeñas cantidades de otros azúcares. Los azúcares presentes en la miel son responsables de propiedades tales como el valor energético, la viscosidad, la higroscopicidad y la granulación (Missio *et al.*, 2016).

La fructosa es, en general, el azúcar dominante en la mayoría de las mieles, pero en algunas mieles monoflorales particulares, como la colza (*Brassica napus*) o diente de león (*Taraxacum officinale*), la fracción de glucosa puede ser más alta que la fracción de fructosa, y en consecuencia las mieles, en general, tienen una rápida cristalización (Escuredo *et al.*, 2014). La concentración de fructosa y glucosa, así como la relación entre ellos, son indicadores útiles para la clasificación de las mieles monoflorales (Missio *et al.*, 2016).

Los disacáridos de miel están constituidos principalmente por regioisómeros de α -glucosil-glucosa y α -glucosil-fructosa; los disacáridos con enlaces α -glicosídicos están presentes en cantidades menores, mientras que las fructosil-fructosas son muy escasas (Santos y González, 2017).

El perfil de azúcar de la miel ha sido estudiado por científicos de todo el mundo. En estos perfiles, se detectaron muchos azúcares, tales como monosacáridos, glucosa y fructosa; seguidos por disacáridos, sacarosa, maltosa, turanosa, isomaltosa, maltosa, trehalosa, nigerosa, kojibiosa; y trisacáridos, maltotriosa y melezitosa. Disacáridos y trisacáridos como la sacarosa y la maltotriosa, respectivamente, se hidrolizan enzimáticamente a monosacáridos (Fuente *et al.*, 2011).

La producción de esta solución de azúcar supersaturada sólo es posible a la temperatura de la colmena (30° C) y mediante la adición de la enzima invertasa, segregada de las glándulas hipofaríngeas de las abejas, que invierte la sacarosa del néctar en glucosa y fructosa (Missio *et al.*, 2016).

2.6.2. Proteínas

El contenido de proteínas de la miel varía según las especies de las abejas. La miel de *Apis cerana* contiene de 0.1 a 3.3% de proteína, mientras que la miel de *Apis mellifera* contiene entre 0.2 y 1.6% de proteína (Won *et al.*, 2009).

Las proteínas y los aminoácidos en las mieles se atribuyen tanto a las fuentes animales como a las vegetales, incluidos los fluidos y las secreciones de néctar de las glándulas salivares y la faringe de las abejas (Escuredo *et al.*, 2013), pero la principal fuente de proteínas es el polen. Los aminoácidos son responsables del 1% (*m/m*) de los constituyentes de la miel y sus proporciones relativas dependen del origen de la miel (néctar o mielada) (Missio *et al.*, 2016).

El aminoácido más abundante en la miel y el polen es la prolina (Iglesias *et al.*, 2006). Además de la prolina, están presentes otros aminoácidos en la miel incluyendo, ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina, histidina, glicina, treonina, alanina, arginina, ácido aminobutírico, tirosina, valina, metionina, cisteína, isoleucina, leucina, triptófano, fenilalanina, ornitina, lisina, serina y asparagina (Missio *et al.*, 2016).

La prolina se origina principalmente a partir de las secreciones salivales de las abejas (*Apis mellifera* L.) durante la conversión del néctar en miel. En la miel, la prolina representa un total de 50 a 85% de aminoácidos (Iglesias *et al.*, 2006; Truzzi *et al.*, 2014). La prolina se ha utilizado como criterio para evaluar la maduración de la miel y, en algunos casos, la adulteración con azúcar.

Una pequeña fracción de las proteínas presentes en la miel son enzimas como la invertasa, la α y β -glucosidasa, catalasa, fosfatasa ácida, diastasa y glucosa oxidasa (Missio *et al.*, 2016).

2.6.3 Ácidos orgánicos

Según muchos autores, todas las mieles tienen una ligera acidez, como resultado de aproximadamente un 0.57% de ácidos orgánicos. Estos ácidos orgánicos se derivan de los azúcares por las enzimas secretadas por las abejas cuando transforman el néctar en miel o cuando se obtienen directamente del néctar (Missio *et al.*, 2016).

Los ácidos orgánicos también se utilizan para discriminar las mieles según su origen botánico y/o geográfico. Estos ácidos están relacionados con el color y el sabor de la miel y sus propiedades químicas como la acidez, el pH y la conductividad eléctrica (Missio *et al.*, 2016).

Algunos ácidos orgánicos de diferentes regiones del mundo presentes en la miel son: ácido aspártico, butírico, cítrico, acético, fórmico, fumárico, galacturónico, fórmico, glucónico, glutámico, glutárico, butírico, glioxílico, 2-hidroxi-butírico, α -hidroxiglutarico, isocítrico, α -cetoglutarico, láctico, málico, malónico, metilmalónico, 2-oxopentanoico, propiónico, pirúvico, quínico, siquímico, succínico, tartárico, oxálico y otros (Missio *et al.*, 2016). El ácido predominante en la miel es el ácido glucónico. Su presencia en la miel proviene de la glucosa oxidasa, que las abejas proporcionan durante la maduración (Karabagias *et al.*, 2014).

Los ácidos levulínicos y fórmicos también están presentes en la miel. Se pueden derivar del 5-HMF en reacciones sucesivas, luego se unen con dos moléculas de agua, produciendo una molécula de ácido levulínico y una molécula de ácido fórmico, aumentando así la concentración de acidez libre en la miel (Missio *et al.*, 2016).

2.6.4. Vitaminas

La miel contiene pequeñas cantidades de vitaminas, especialmente el complejo de vitamina B, que proviene de los granos de polen en suspensión. Las vitaminas que se encuentran en la miel incluyen tiamina (B1), riboflavina (B2), ácido nicotínico (B3), ácido pantoténico (B5), piridoxina (B6), biotina (B8 o H) y ácido fólico (B9). La vitamina C también está presente. Las vitaminas presentes en la miel se conservan debido al bajo pH de la miel (Missio *et al.*, 2016).

La vitamina C se encuentra en casi todos los tipos de miel y se ha evaluado principalmente por su efecto antioxidante. La determinación de la vitamina C es un indicador de inestabilidad, ya que es muy vulnerable a la oxidación

química y enzimática y tiene una tasa de cambio acelerada debido a diversos factores como la luz, el oxígeno o el calor (Missio *et al.*, 2016).

2.6.5 Minerales

Se han detectado diversos grupos de compuestos químicos en diferentes tipos de miel. Estos grupos químicos incluyen macro y microelementos minerales como potasio, magnesio, calcio, hierro, fósforo, sodio, manganeso, yodo, zinc, litio, cobalto, níquel, cadmio, cobre, bario, cromo, selenio, arsénico y plata que se encuentran en diferentes mieles. El potasio es el elemento más abundante, que en general corresponde a un tercio del contenido mineral total encontrado en la miel.

El contenido de minerales en la miel oscila entre el 0.04% en las mieles claras y el 0.2% en las mieles oscuras (Alqarni *et al.*, 2012). La miel refleja los componentes químicos de las plantas de las cuales las abejas recolectan su alimento, por lo que el contenido de oligoelementos presentes en la miel depende del tipo de suelo en el que se encontraron la planta y el néctar (Escuredo *et al.*, 2013) y puede indicar el origen botánico de una miel específica (Alqarni *et al.*, 2012). Algunos estudios clasifican las mieles botánicamente basándose en la estimación de su contenido mineral.

Los elementos minerales, a diferencia de las vitaminas y los aminoácidos, no están sujetos a degradación por exposición al calor, la luz, los agentes oxidantes, el pH extremo u otros factores que afectan los nutrientes orgánicos. En esencia, los minerales son indestructibles lo que lo hace un hecho muy importante, porque estos minerales son componentes de enzimas esenciales para una serie de reacciones metabólicas en el cuerpo humano y también desempeñan un papel importante en las funciones corporales (Missio *et al.*, 2016).

2.6.6 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son un grupo químicamente heterogéneo con aproximadamente 10,000 compuestos, los cuales están agrupados en

diferentes clases conforme a su estructura química. Se dividen en no-flavonoides (ácido fenólico) y flavonoides (flavonoles, flavonas, flavanonas, antocianidina, isoflavonas y chalconas). Estos compuestos tienen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo en su estructura (Missio *et al.*, 2016).

Los ácidos fenólicos constituyen una importante clase de compuestos fenólicos con funciones bioactivas típicamente encontradas en alimentos y productos vegetales. Son compuestos que actúan como antioxidantes, eliminando los radicales libres e inhiben la oxidación lipídica. Éstos pueden dividirse en dos subgrupos conforme a su estructura: los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos (Challacombe *et al.*, 2012).

Los compuestos fenólicos presentes en la miel se han usado como marcadores florales, también se ha visto en aumento el interés dirigido al estudio de actividad antioxidante atribuido a la habilidad de reducir la formación de radicales libres de dichos compuestos (Missio *et al.*, 2016).

Los componentes mayormente funcionales de la miel son los flavonoides, que contribuyen significativamente a la actividad antioxidante de la miel, brindando efectos benéficos para la salud humana. La actividad antioxidante de los flavonoides en la mayor parte de los casos depende del número y posición de sus grupos hidroxilo (Missio *et al.*, 2016).

2.6.7 Compuestos volátiles

El sabor de la miel se produce por mezclas complejas de compuestos volátiles, las cuales pueden diferir dependiendo del néctar, condiciones de procesamiento, origen y almacenamiento. Las mieles monoflorales tienen el sabor distintivo de la planta, debido a la presencia de ciertos compuestos orgánicos volátiles de néctares. Por otra parte, las abejas también pueden convertir los constituyentes de la planta en otros compuestos con propiedades volátiles. Estos compuestos pueden verse afectados por el procesamiento o la presencia de microorganismos (Missio *et al.*, 2016).

Algunos estudios han reportado la modificación en el perfil de compuestos volátiles durante el almacenamiento de la miel, en donde se ha demostrado que éstos cambian dependiendo del tiempo de almacenamiento, es importante entender cómo se comporta la miel durante dicho periodo (Missio *et al.*, 2016).

A través de dichos procesos, así como enzimas específicas presentes en la miel, temperaturas altas y un largo periodo de almacenamiento, pueden ocasionar que la miel se degrade en productos nuevos, también pueden producirse reacciones secundarias como las reacciones de Maillard (Missio *et al.*, 2016).

2.7 Propiedades físicas

La consistencia de la miel podrá ser fluida, viscosa o sólida, cristalizada total o parcialmente. La cristalización es una de las modificaciones más importantes que se producen en la miel. La mayoría de las mieles naturales cristalizan totalmente, en menor o mayor tiempo, con tamaño grueso o fino de cristales. El hecho de que la miel cristalice totalmente en poco tiempo se justifica, ya que es una solución sobresaturada de azúcares. Los tiempos de este cambio, así como la proporción de miel que cristalizará, dependen de varios factores, los principales son la proporción de los dos azúcares que en mayor cantidad se encuentran en la miel (glucosa y fructosa), el contenido de agua y la temperatura de almacenamiento (Schneiter *et al.*, 2015).

Las características organolépticas (color, sabor, olor y viscosidad) y químicas del producto están muy asociadas con su origen geográfico y botánico. Su olor y sabor deben ser los característicos, de acuerdo a su origen floral y maduración. Asimismo, la miel no debe tener sabor o aroma desagradables que hayan sido adquiridos de materias extrañas durante su extracción, sedimentación, filtración y/o almacenamiento, ni signos de fermentación.

El color es uno de los atributos más variables y es un criterio de clasificación para las mieles. Desde el punto de vista comercial tiene gran importancia, ya que su precio y el grado de aceptación por el consumidor dependen del mismo. Por ejemplo, consumidores de Norteamérica prefieren mieles claras, de tonos agua, extra blanco y blanco, mientras que los europeos consumen mieles más oscuras, con tonos ámbar extra claro, ámbar claro, ámbar y ámbar oscuro.

Por otro lado, el color está relacionado con el origen botánico y la composición del néctar con el proceso de obtención, la temperatura y el tiempo de almacenamiento (Missio *et al.*, 2016).

Su color es variable por lo que puede ser (NMX-F-036-NORMEX-2006):

- Blanca agua
- Extra blanca
- Blanca
- Extra clara ámbar
- Ámbar clara
- Ámbar
- Oscura

La miel se oscurece con el envejecimiento y por la exposición a altas temperaturas. Esta característica está influenciada por el tipo de planta de la que se obtuvo (Buenas prácticas pecuarias en la producción primaria de la miel, 2018).

2.8 pH

Generalmente, la miel es medianamente ácida con un pH promedio de 3.9. Esta acidez es debido al contenido de aminoácidos y ácidos orgánicos, los cuales son responsables del sabor característico de la miel. Es importante mencionar que la miel de ciudades tropicales se caracteriza por una acidez menor. Esto se debe al contenido de agua en estas muestras, lo cual da como resultado un incremento en la fermentación con un decremento en

el valor de pH. Relativamente, los valores más ácidos ($\text{pH} < 3.24$) indican almacenamiento inadecuado o muestras contaminadas (Aljohar *et al.*, 2018). El *Codex Alimentarius* reporta un rango de miel natural entre 3.24 - 6.1 (CAC, 2001).

2.9 Calidad de la miel

Los parámetros más importantes para evaluar la calidad de la miel son la ausencia de contaminantes (antibióticos, pesticidas y metales pesados) y la frescura de la miel. Los índices más utilizados para medir la frescura de dicho alimento son el 5-HMF y la actividad diastásica. El HMF es un aldehído cíclico que se origina espontáneamente a partir de la fructosa en un medio ácido y es un proceso lento. Algunas comisiones internacionales establecieron que el contenido máximo de HMF debería ser 40 mg/Kg, con excepciones para mieles de origen tropical, en cuyo caso se admiten 80 mg/Kg como máximo. Sin embargo, algunos países como Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda no han considerado este parámetro para evaluar la calidad de la miel (Ulloa *et al.*, 2010; Shapla *et al.*, 2018).

En México la normatividad establece como criterios de calidad de la miel los límites de ciertos parámetros fisicoquímicos, dentro de los que destacan el contenido aparente de azúcares reductores y los contenidos de sacarosa, glucosa, humedad, sólidos insolubles en agua, cenizas, acidez, HMF a menos y más de 6 meses y el índice de diastasa (Ulloa *et al.*, 2010).

Algunas variaciones en la composición generalmente ocurren debido a diferentes procesos químicos y bioquímicos, como la fermentación, oxidación o deshidratación de los azúcares, lo que lleva a cambios en la acidez y formación de compuestos como 5-HMF que dan lugar a modificaciones en las propiedades sensoriales y reducen la calidad de la miel (Santos y González, 2017).

Cuando la miel se calienta o se almacena durante mucho tiempo, las pentosas y hexosas se descomponen en una enolización lenta y una rápida

eliminación de tres moléculas de agua para formar compuestos indeseables, como los furanos. Los principales furanos formados son furfural, que se deriva de pentosas y 5-hidroximetilfurfural, derivado de hexosas como la glucosa y la fructosa. Estos son los principales productos de degradación de los azúcares y su presencia en los alimentos generalmente está relacionada con reacciones de pardeamiento no enzimático, es decir, la reacción de Maillard, la degradación del azúcar en un medio ácido y la caramelización. En realidad, estos furanos se han utilizado como marcadores para el tratamiento térmico de los alimentos. El alcohol furfurílico también es un indicador del tratamiento térmico y las condiciones de almacenamiento. Por lo tanto, estos compuestos no se consideran buenos marcadores de la miel floral, aunque pueden indicar una posible pérdida de frescura debido a la exposición a altas temperaturas o al almacenamiento prolongado. Además de los compuestos mencionados anteriormente, otros productos de degradación del azúcar, como el 2-acetilfurano, isomaltol, etc. se forman cuando se someten al calor en presencia de aminoácidos, lo que contribuye al cambio en el color, el sabor y el olor de la miel (Missio *et al.*, 2016). Los compuestos de Amadori se derivan de los aminoácidos lisina, prolina, ácido aminobutírico y arginina (Iglesias *et al.*, 2006). Estos aminoácidos están presentes en la miel y, por lo tanto, pueden desencadenar la reacción de Maillard (Missio *et al.*, 2016). Al almacenar alimentos, el tratamiento térmico debe ser eficiente para garantizar la seguridad de los alimentos, ya que, si se produce contaminación, el resultado de la fermentación del azúcar es la formación de ácidos volátiles (C2 - C12), que pueden dañar la calidad de algunos productos. Además, los ácidos orgánicos contribuyen a propiedades sensoriales tales como el color y el sabor que son componentes de los alimentos (Missio *et al.*, 2016).

La filtración comercial de la miel puede causar una reducción en el contenido de vitaminas debido a la eliminación casi completa del polen.

Otro factor que causa la pérdida de vitaminas en la miel es la oxidación del ácido ascórbico por el peróxido de hidrógeno producido por la glucosa oxidasa (Missio *et al.*, 2016).

En la mayoría de los casos se observó una mayor concentración de oligoelementos en muestras de miel cerca de áreas industriales. Por lo tanto, la cuantificación de trazas de elementos minerales tóxicos en mieles se vuelve importante para los efectos de la salud humana, la seguridad y el biomonitoreo ambiental (Missio *et al.*, 2016).

2.10 Análisis instrumental de color

En la calidad de los alimentos, una característica muy importante es su aspecto o apariencia y el atributo más sobresaliente es el color. El color de un objeto en términos físicos, se ha definido como un parámetro tridimensional y en términos fisiológicos, se debe al efecto de un estímulo de radiaciones lumínicas sobre la retina que el nervio óptico transmite al cerebro donde se integran. Generalmente, el estímulo consiste en una luz reflejada o transmitida por el objeto a partir de una iluminación incidental (Espinoza, 2014).

El color tiene 3 características:

1. **Tono.** Esta determinado por el valor exacto de la longitud de onda de la luz reflejada. Unos cuantos nanómetros de diferencia significan una mezcla con otro color por lo tanto un tono diferente.
2. **Intensidad.** Depende de la concentración de las sustancias colorantes dentro del objeto o alimento.
3. **Brillo.** Depende de la cantidad de la luz que es reflejada por el cuerpo en comparación con la luz que incide sobre él.

En la industria alimenticia, el método de medición de color más utilizado es el L*a*b o también conocido como el sistema CIELAB, originalmente definido por el CIE en 1976.

El método CIELAB es un espacio tridimensional, definido por las coordenadas L^* , a^* y b^* . Este sistema de expresión se basa en la teoría de percepción de colores opuestos que establece que un color no puede ser verde y rojo al mismo tiempo ni azul ni amarillo a la vez.

De esta manera, el atributo L^* describe el componente de claridad o luminosidad de un color, con base a las tonalidades de blanco (100) hasta negro (0). Las coordenadas a^* y b^* forman un plano horizontal, la coordenada "a" indica valores en las tonalidades de rojo (+a) hasta verde (-a), mientras que la coordenada "b" indica tonalidades de amarillo (+b) hasta azul (-b); h° es el tono o matiz que expresa las variaciones cualitativas del color y puede variar entre 0 y 360° ; C^* croma que define la intensidad o pureza espectral del color que va desde los tonos grises, pálidos, apagados a los más fuertes y vivos. Es el grado de color. (Espinoza & Reyes, 2014; Hui, *et al.*, 2006; Mathias-Rettig & Ah-Hen, 2014).

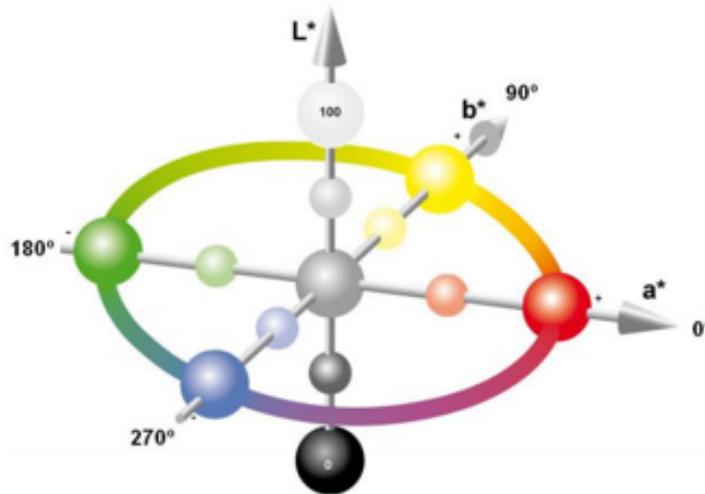


Figura 4. Espacio de color CIELAB.

La colorimetría es la ciencia que tiene por objeto la medida del color y dado que el color no es propiedad intrínseca de los objetos sino que depende del estado físico, del iluminador utilizado y de la sensibilidad del ojo, obliga a establecer una serie de condicionantes para la correcta interpretación de las medidas realizadas.

Los instrumentos de medición del color buscan simular la manera en la cual los ojos humanos captan el color de un objeto, bajo determinadas condiciones de iluminación, para proporcionar una medida cuantitativa reproducible.

El instrumento que se utiliza para llevar a cabo la evaluación del color de los alimentos es el espectrofotómetro Minolta CM-3600d (Figura 5), el cual mide los factores de reflectancia y de transmitancia espectrales, teniendo como objetivo, comparar a cada longitud de onda, el flujo radiante reflejado o transmitido por el objeto, con el de un patrón en caso de que exista.



Figura 5. Espectrofotómetro Minolta CM-3600d.

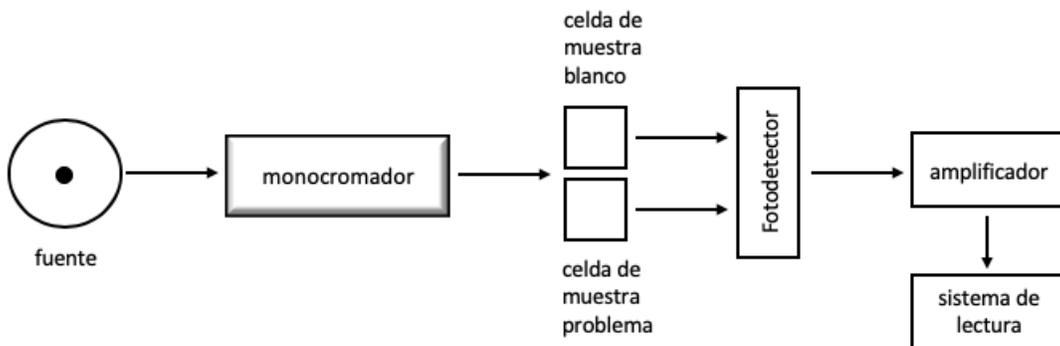


Figura 6. Esquema de las partes de un espectrofotómetro.

2.11 Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales conocido como PCA, por sus siglas en inglés (Principal Component Analysis), es una técnica utilizada para reducir las dimensiones de un conjunto de datos, la técnica sirve para hallar las causas de la variabilidad de un conjunto de datos y ordenarlas por importancia (Shlens, 2009).

En el PCA existe la opción de usar la matriz de correlaciones, o bien, la matriz de covarianzas. En la primera opción se le está dando la misma importancia a todas y cada una de las variables; la segunda opción se puede utilizar cuando todas las variables tengan las mismas unidades de medida. En esta investigación se utilizó la matriz de correlaciones para realizar el análisis.

El objetivo principal de PCA es la explicación de gran parte de la variabilidad de los datos originales, con el menor número de estos componentes principales, como sea posible.

El PCA busca la proyección en la cual los datos queden mejor representados en términos de mínimos cuadrados, se emplea sobre todo en análisis exploratorio de datos y para construir modelos predictivos; construye una transformación lineal que escoge un nuevo sistema de coordenadas para el conjunto original de datos, en el cual la varianza de mayor tamaño del conjunto de datos es capturada en el primer eje (llamado el primer componente principal), la segunda varianza más grande es el segundo eje y así sucesivamente (Shlens, 2009).

2.12 Análisis discriminante con mínimos cuadrados parciales (PLS-DA, Partial Least Squares - Discriminat Analysis)

El análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) se utiliza para encontrar las relaciones fundamentales entre las variables independientes y clases codificadas como números enteros, las cuales son modeladas simultáneamente teniendo en cuenta la varianza y covarianza entre variables y clases (Lucio *et al.*, 2012). Por otra parte, es importante

mencionar que el PLS-DA es una técnica de reducción dimensional, una variante de la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS-R) y se utiliza cuando la respuesta variable es categórica. Bajo ciertas circunstancias, el PLS-DA arroja resultados similares a los obtenidos en la aproximación clásica de la distancia Euclidiana a los centroides (EDC) y bajo otras circunstancias el mismo que el análisis discriminador lineal (LDA) (Fordellone *et al.*, 2018). Las variables independientes (X) pueden ser el espectro de cada muestra, mientras que la variable dependiente Y es una variable categórica, definida por el analista, que codifica cada clase de manera numérica (Bereton, 2007). El resultado de la regresión son valores de Y cercanos a los que indican cada categoría. Una muestra del conjunto de predicción se considera que está correctamente categorizada si cumple dos criterios: debe tener un perfil espectral que no sea significativamente diferente de los perfiles de las muestras que forman el conjunto de calibración y el valor calculado de la variable categórica debe estar dentro de un intervalo de valores alrededor del número con el que se codifica la categoría (Lucio *et al.*, 2012).

3. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

3.1 Objetivo general

Desarrollar un modelo con la capacidad para clasificar a las mieles mexicanas de diferentes orígenes a partir del análisis de sus espectros de RMN y la evaluación instrumental de color en conjunto con un análisis quimiométrico.

3.2 Objetivos particulares

1. Realizar la recolección de las muestras de miel de la República Mexicana.
2. Preparar los extractos de las mieles con la finalidad de analizar cada uno de ellos utilizando RMN¹H.
3. Realizar la evaluación instrumental del color de las muestras de miel de diferentes orígenes de la República Mexicana.
4. Determinar el pH de las muestras recolectadas.
5. Construir los modelos quimiométricos que permitan diferenciar las mieles.

3.3 Justificación

El consumo de miel ha experimentado en los últimos años un incremento considerable. Los dos principales canales de comercialización de la miel son: la venta directa de los productores al consumidor y a través de la industria de alimentos. Muchos productores envasan su producción de miel y realizan su venta en su región (Ulloa *et al.*, 2010).

La principal preocupación de los productores para seguir manteniendo la aceptación de la miel en el mercado nacional e internacional es garantizar su autenticidad, dado que es posible la práctica de su adulteración o deterioro por su inadecuado manejo y almacenamiento (Ulloa *et al.*, 2010).

En México, la mayor parte del conocimiento de la flora apícola se basa en observaciones de campo y entrevistas con apicultores, lo cual sobreestima el valor real de la flora melífera dado el carácter subjetivo de cada observador. Para conocer el origen botánico no son suficientes las observaciones de campo, ya que dificulta mucho la validación de que una miel pueda provenir de una especie u otra, o bien de algún cultivo en específico, simplemente porque éstos se encuentren próximos al apiario (Castellanos *et al.*, 2012).

Hoy en día, las técnicas analíticas más utilizadas para el análisis de la miel implican algún tipo de pretratamiento de muestra. Por otra parte, la elección de métodos y protocolos a menudo depende del tipo de compuesto bajo investigación, realizando el proceso de caracterización global laborioso, lento y no completamente reproducible. Las principales ventajas de la RMN con respecto a otros métodos analíticos son: el enfoque no invasivo, la relativamente fácil preparación de las muestras, la adquisición rápida de datos y la posibilidad de proporcionar información sobre una amplia gama de metabolitos en un solo experimento. Además, la RMN es una poderosa técnica utilizada para obtener información estructural y, por lo tanto, puede ayudar a comprender la estructura de los componentes en sistemas complejos, como los alimentos (Boffo *et al.*, 2012). La resonancia magnética nuclear (RMN) en combinación con quimiometría representa una metodología muy útil en la industria alimentaria para el descubrimiento de biomarcadores y la discriminación de origen de productos como la miel (Olaxode *et al.*, 2018).

Con base en lo anterior, resulta evidente la necesidad de desarrollar en México estudios conducentes a clasificar y determinar las propiedades de las mieles que se producen. Con este proyecto se pretende establecer un método que clasificará las mieles, además de autenticar y comprobar la calidad, mediante el análisis de sus espectros de RMN en conjunto con el modelado quimiométrico.

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 Recolección

Se visitaron apiarios de la zona de Milpa Alta en CDMX y con ayuda de los apicultores Valentín Guadalupe García Rodríguez, Samuel García Torres, Alfonso Chavez Saavedra, José Luis González Osorio y Lucina Pérez Gómez se recolectaron algunas muestras. Las muestras de otras zonas melíferas de la República Mexicana fueron proporcionadas por apicultores de dichos estados y enviadas por correo en condiciones de temperatura controlada.

4.2 Evaluación instrumental del color

Se determinó el color de 35 muestras de miel. La evaluación instrumental de color se realizó mediante una dilución al 75% m/v con agua destilada. En cada determinación se utilizaron 10 mL de dilución, las determinaciones se realizaron por triplicado.

Debido a la naturaleza de la muestra, la evaluación de color se llevó a cabo en Transmitancia con incidencia de luz solar o luz de día (D65) y el componente especular incluido (SCI).

El colorímetro está conectado a una computadora, la cual cuenta con el software *On Color*, al leer las muestras, se obtienen resultados de forma gráfica y numérica. Las condiciones de análisis se basaron en lo descrito por Escamilla en 2016 (Cuadro 2).

Cuadro 2. Condiciones de análisis instrumental de color (Escamilla, 2016).

Parámetro	Condición y/o Valor
No. de disparos o flashes	1
Estándar	Nulo
Energía UV	Incluido
Componente especular (SC)	Incluido
Lente o área de visión	Mediano
Iluminante	D65 (Luz de día, natural 6,500 K)
Detector	10°
Sistema de reporte de color	CIE L*a*b*
Número de mediciones por muestra	3

Antes de llevar a cabo cualquier evaluación, el instrumento es calibrado con un negro y un blanco (suministrados por el proveedor). Dentro de la calibración se indica al equipo cuáles son las condiciones de trabajo, éstas, mostradas en el Cuadro 2. Las mediciones se realizan utilizando una celda de plástico que se introduce en una cavidad interior del colorímetro diseñada para esta (Rivas, 2014).

4.3 Medición de pH

Se realizaron diluciones al 10% m/v, con agua desionizada, de cada muestra de miel y el pH se determinó utilizando un potenciómetro (Thermo Scientific Orion 3 Star, pH Benchtop), previamente calibrado con los estándares correspondientes, siguiendo la metodología descrita por Khalil (2012). Las mediciones se realizaron por triplicado para cada muestra.

4.4 Preparación de los extractos clorofórmicos

La preparación de los extractos clorofórmicos se llevó a cabo utilizando el método descrito por Vit y colaboradores (2015). Esta determinación se realizó para 47 muestras de miel. Se pesaron 6 g de cada muestra de miel, se colocaron en un tubo de centrifuga (Falcon) y posteriormente se agregaron 15 mL de agua desionizada y se agitó durante 10 minutos con un Vortex (Vortex-Genie 2) para homogeneizar. Después se agregaron 15 mL de cloroformo, se agitó nuevamente por 10 minutos con Vortex. Como paso siguiente, la mezcla bifásica se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos en una centrifuga (Thermo Scientific STI6R). Por último, la mezcla se colocó en un embudo de separación y se recolectó la fase clorofórmica en un vial. Las fases resultantes se dejaron evaporar y se conservaron protegidas hasta su análisis.

4.5 Análisis de mieles por RMN

A los extractos obtenidos, se les adicionaron 0.7 mL de cloroformo y se transfirieron a tubos de RMN. Los espectros se adquirieron a 298 K, a una frecuencia de 700 MHz.

4.6 Procesamiento de espectros

El procesamiento de los espectros se realizó con el programa TopSpin (versión 4.06, Bruker 2018). Se realizó la corrección de fase y se ajustó la línea base, todo esto de forma manual y se referenciaron a la señal del TMS (tetrametil silano).

Se realizó la alineación y la normalización al 100% de área de los espectros. Posteriormente, se llevó a cabo *binning* con tamaño de caja de 0.04 ppm y, finalmente se obtuvieron archivos con formato .cvs para la generación de matrices con las intensidades en función de los desplazamientos químicos.

4.7 Análisis multivariado

4.7.1 Análisis de componentes principales (PCA)

Los datos de resonancia magnética nuclear de las muestras analizadas se procesaron como se mencionó previamente y se exportaron para construir la matriz. El análisis del componente principal (PCA) se realizó utilizando el programa Unscrambler X v. 1.1 (Camo, Oslo, Noruega).

4.7.2 Análisis discriminante con mínimos cuadrados parciales (PLS-DA Partial Least Squares – Discriminant Analysis)

Posteriormente, se realizó un PLS-DA mediante un pretratamiento de los datos con corrección ortogonal de señal y centrado en la media para X y solo centrado en la media para Y, utilizando el programa PLS_Toolbox 8.7 (2019).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Recolección

En la Tabla A1, se resumen las mieles recolectadas en diferentes zonas melíferas de México, además de los datos obtenidos de pH y color. La mayor parte de las mieles analizadas tienen como origen geográfico la zona melífera del Altiplano y fueron proporcionadas por los apicultores de esta zona. Estas mieles cumplieron con los criterios de inclusión que se establecieron dentro del marco del proyecto SAGARPA “Plataforma Nacional de Metabolómica basada en espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)-OMICS para la solución de problemas nacionales del sector Agroalimentario SAGARPA-2017-6-292836”. Estos criterios fueron: el tipo de abeja, si las colmenas eran medicadas, método de extracción de la miel, etc. Las mieles una vez recolectadas se conservaron en la oscuridad a una temperatura de 4 °C hasta su análisis. Otras muestras se obtuvieron de fuentes comerciales y se conservaron en las mismas condiciones que se mencionan previamente.



Figura 7. Fotografía de los opérculos de un panal de abejas (Angel López).

Cuadro A1. Listado de mieles recolectadas, origen floral, especie de abeja productora, clase de miel, coordenadas CIELAB y pH.

Muestra	Origen geográfico	Origen floral	Melipona	Europea	Clase de miel	L	a	b	H°	pH
M0	Cuetzalan, Puebla 2016	multifloral	X		melipona	84.9263	2.3562	46.9426	87.1266	2.93
M2	Martínez de la Torre, Veracruz, 2016	monofloral		X	flor de lis	91.9035	-0.6503	25.5119	91.4603	3.02
M8	Chihuahua, Creel 2017	monofloral		X	aguacate	53.9819	31.3288	85.1043	69.7902	4.77
M10	Veracruz 2017	monofloral		X	flor de lis	93.7559	-0.5400	30.1756	91.0252	3.06
M11	Acuexcomatl, Ciudad de México 2017	multifloral		X	mantequilla	88.7087	1.8540	54.3952	88.0479	3.40
M12	Acuexcomatl, Ciudad de México 2017	multifloral		X	mantequilla	85.7026	2.0308	47.7124	87.5628	3.65
M13	Topilejo Altiplano Ciudad de México 2017	multifloral		X	mantequilla	46.6197	37.2229	77.9815	64.4834	3.51
M15	Zacatecas 2017	monofloral		X	mezquite	95.7560	-1.4859	15.7860	95.3775	3.27
M18	Melipona comercial 2017	multifloral	X		melipona	92.8433	-0.2556	40.7321	90.3596	2.81
M20	Michoacán 2017	monofloral		X	aguacate	9.5413	32.4030	16.1992	26.5619	3.51

Cuadro A1. Listado de mieles recolectadas, origen floral, especie de abeja productora, clase de miel, coordenadas CIELAB y pH (*continuación*).

Muestra	Origen geográfico	Origen floral	Melipona	Europea	Clase de miel	L	a	b	H°	pH
M21	Veracruz 2017	monofloral		X	flor de lis	93.9566	-0.4998	29.1568	90.9820	3.39
M26	Milpa Alta, Ciudad de México 2018	multifloral		X	mantequilla	85.5902	1.9427	41.4605	87.3173	3.15
M27	Milpa Alta, Ciudad de México 2017	multifloral		X	mantequilla	88.2127	0.7089	35.3792	88.8521	3.52
M28	San Pedro Atocpan, Milpa Alta, CDMX 2018	multifloral		X	mantequilla	98.3283	-0.7012	13.3466	93.0071	3.44
M29	San Pablo Oztotepec, Ciudad de México 2018	multifloral		X	mantequilla	97.2947	-0.8787	14.8717	93.3812	3.02
M31	Uruapan, Michoacán 2017	multifloral		X	mantequilla	93.8185	-1.8268	24.6322	94.2414	3.95
M33	Michoacán, 2018	monofloral		X	aguacate	37.6729	39.4827	64.0325	58.3418	5.75
M34	San Pedro Atocpan, Milpa Alta, CDMX 2018	multifloral		X	mantequilla	95.5003	-0.3891	21.9742	91.0144	3.63
M37	Huejutla, Hidalgo 2018	multifloral		X	comercial	83.7832	2.8244	60.7070	87.3362	4.23

Cuadro A1. Listado de mieles recolectadas, origen floral, especie de abeja productora, clase de miel, coordenadas CIELAB y pH (*continuación*).

Muestra	Origen geográfico	Origen floral	Melipona	Europea	Clase de miel	L	a	b	H°	pH
M38	Milpa Alta, CDMX. 2018	multifloral		X	mantequilla	98.2801	-0.6219	13.4669	92.6441	3.68
M39	Michoacán 2018	monofloral		X	aguacate	70.1733	14.1956	68.5459	78.2997	4.10
M40	Huejutla, Hidalgo 2018	multifloral		X	comercial	79.9161	6.3746	66.2454	84.5034	3.75
M41	Milpa Alta, CDMX 2018	multifloral		X	mantequilla	86.9419	1.3807	38.3322	87.9373	3.47
M42	Zacatecas 2018	multifloral		X	miel de abeja silvestre	26.3007	21.3501	44.4341	64.3355	3.66
M43	San Pedro Atocpan, Milpa Alta 2018	multifloral		X	mantequilla	99.8026	-0.4736	7.2336	93.7460	3.36
M44	Tepoztlán, Morelos 2018	multifloral		X	comercial	88.6209	-1.5994	61.4268	91.4915	3.17
M45	Zacatlán, Puebla 2018	multifloral		X	comercial	89.2161	1.4812	49.0876	88.2717	3.28
M46	San Bartolomé Xicomulco, Milpa Alta, CDMX. 2018	multifloral		X	mantequilla	96.1444	-0.8014	18.6288	92.4634	3.05
M48	Puebla 2018	multifloral		X	mantequilla	94.0417	-1.3323	34.0471	92.2409	3.03

Cuadro A1. Listado de mieles recolectadas, origen floral, especie de abeja productora, clase de miel, coordenadas CIELAB y pH (*continuación*).

Muestra	Origen geográfico	Origen floral	Melipona	Europea	Clase de miel	L	a	b	H°	pH
M49	Zacatecas 2018	monofloral		X	mezquite	97.9299	-1.3180	10.7360	96.9990	3.25
M50	Yucatán 2018	multifloral		X	tajonal	90.5743	-0.7299	36.7893	91.1367	3.09
M51	Veracruz 2018	monofloral		X	flor de lis	95.0571	-0.9012	24.0082	92.1497	3.34
M52	Michoacán 2018	monofloral		X	aguacate	75.2393	10.1104	66.5807	81.3655	4.59
M53	Barrio Xaltocan, Xochimilco, CDMX 2018	multifloral		X	mantequilla	90.3715	0.0091	34.89	89.9851	3.79
M54	Cepra miel 2018	multifloral		X	comercial	83.1753	3.6856	55.3859	86.1845	3.90

5.2 Evaluación instrumental del color

Se le aplicó un análisis por PCA a un grupo de 34 mieles (Figura 8). Este análisis fue construido con todos los datos colorimétricos obtenidos (L^* , a^* , b^* , C^* y H^0). Como resultado se obtuvo que, con dos componentes se describe el 99% del comportamiento de las muestras [F1 (72%) y F2(27%)].

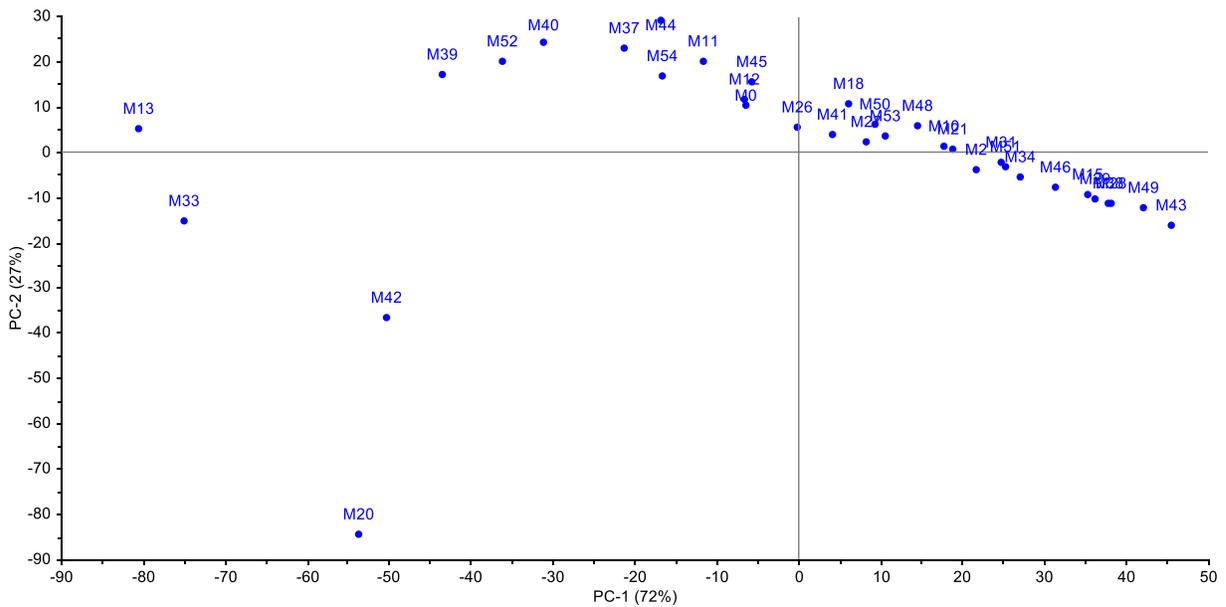


Figura 8. Análisis del componente principal (PCA) realizado con los datos de evaluación instrumental de color para 34 mieles.

En la Figura 9 se ilustra la varianza X en función de los componentes encontrados. Así, se seleccionó utilizar dos componentes principales para explicar la variación (varianza) que presentan los datos. La curva azul representa el modelo matemático y la roja su validación.

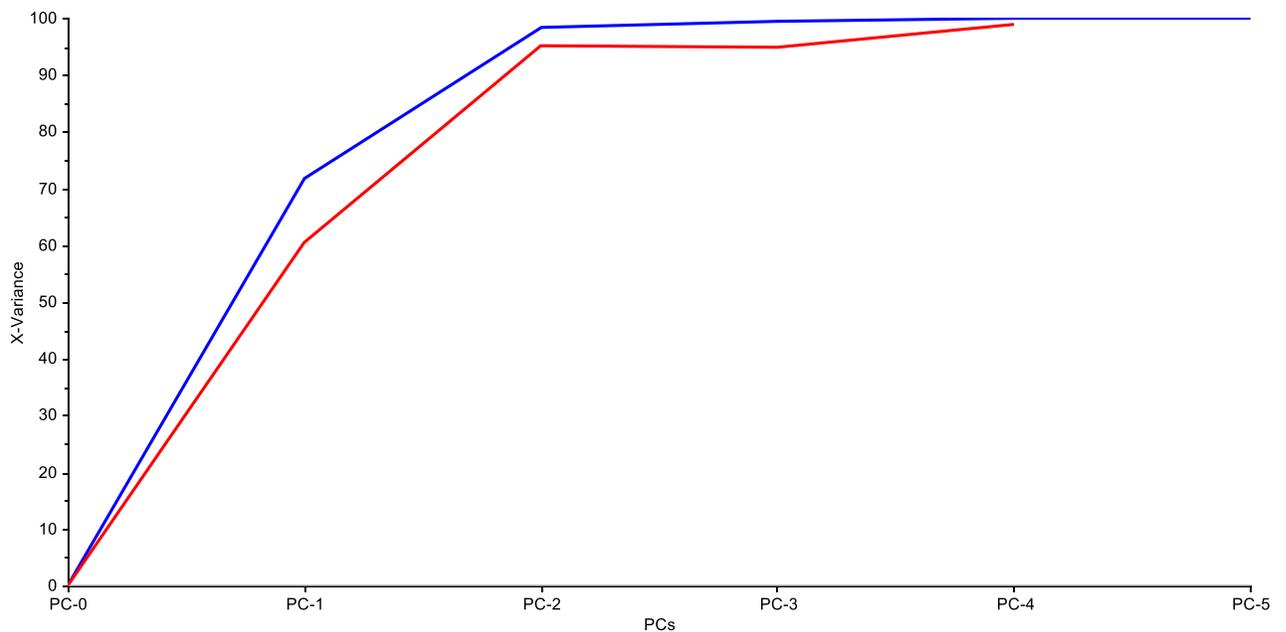


Figura 9. Varianza de los datos de los dos componentes seleccionados

Las contribuciones de cada variable se observan en el Cuadro 3, a^* es la variable con mayor aportación para el componente F1 y b^* para el componente F2; estas variables son coordenadas cromáticas donde (+a) indica rojo, (-a) indica verde, (+b) indica amarillo y (-b) indica azul.

Las mieles M13, M20, M33 y M42 (mantequilla, aguacate, aguacate y miel de abeja silvestre, respectivamente) son las muestras que presentaron mayores diferencias y no tienen agrupamiento con las otras muestras (Figura 8). La representación gráfica de las coordenadas CIELAB se muestran en la Figura 10.

Cuadro 3. Contribuciones de las variables del espacio de color CIELAB (%).

	F1	F2	F3	F4	F5
L*	22.437	12.038	9.587	55.522	0.417
a*	23.718	4.111	71.655	0.226	0.290
b*	14.490	39.988	1.123	0.434	43.965
C*	19.121	24.906	0.886	2.183	52.904
h°	20.234	18.957	16.750	41.635	2.424

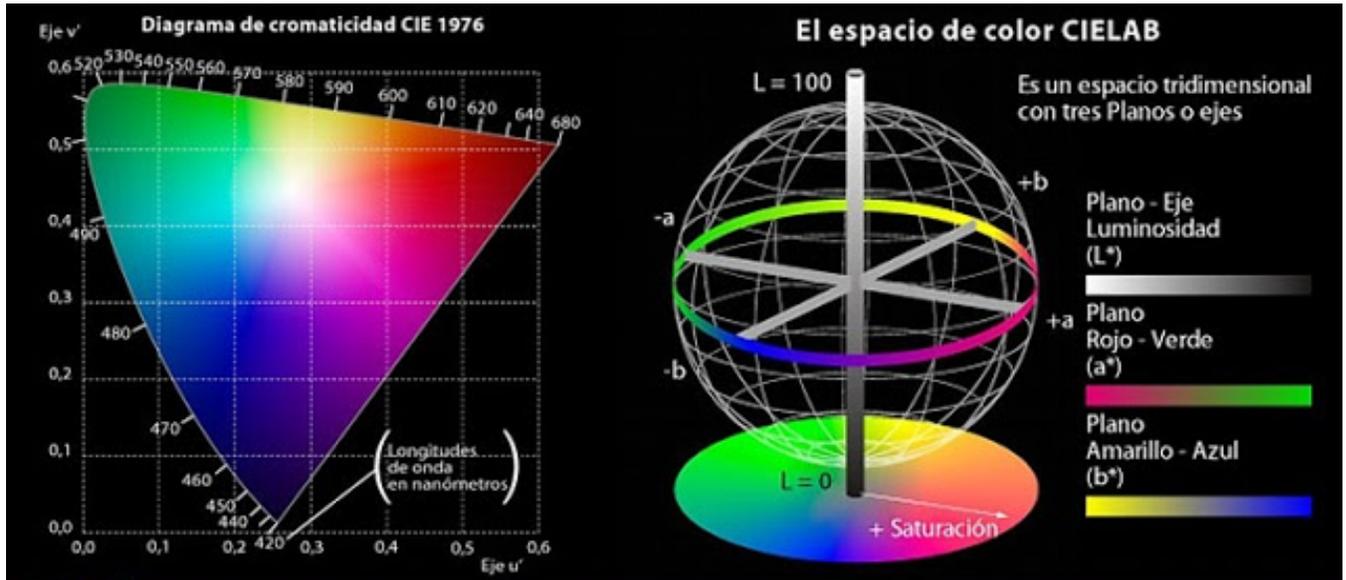


Figura 10. Representación gráfica de las coordenadas CIE L*a*b* (Alfonzo, 2015).

En este estudio, se reportan las características colorimétricas de mieles de diferentes sitios de colecta en la República Mexicana. Los resultados medidos por el método CIELAB tuvieron valores de L* (Cuadro A1) en un rango de 9.5413 a 99.8026 unidades CIELAB. La mayor luminosidad se obtuvo para la muestra M43, procedente de San Pedro Atocpan, Milpa Alta, CDMX (99.8026

unidades CIELAB), mientras que la muestra M20, procedente de Michoacán, presentó el menor valor (9.5413 unidades CIELAB) lo que indica que la muestra presentó mayor saturación de color y es la menos clara; se encontró diferencia significativa entre todas las muestras ($\alpha = 0.05$) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) del parámetro L*.

SUMACUAD	758159	FC	710791	ALPHA	0.05	
ANOVA						
FV	SC	GL	CM	FC	FT	PROB
TRATAMIENTOS	47366	34	1393.12	60773.7	1.59629	2.5215E-144
ERROR	1.60461	70	0.02292		H1	
TOTAL	47367.6	104				

Tomando en cuenta la luminosidad, González-Miret *et al*, (2005) clasificaron las mieles en dos grupos, mieles claras con $L^* > 50$ y mieles oscuras con $L^* < 50$, por lo que las mieles objeto de estudio bajo estos criterios se clasificaron en mieles claras, con excepción de las mieles M13, M20, M33 y M42 (46.6197, 9.5413, 37.6729 y 26.3007 unidades CIELAB, respectivamente).

Los parámetros a^* y b^* de la miel, pueden interpretarse como un índice deseable de la riqueza de pigmentos tales como carotenoides, xantofilas y antocianinas de las especies que aportan el polen a la miel (AMVEA, 2018). Para las coordenadas que miden la intensidad de a^* , los valores obtenidos estuvieron entre -0.2556 a -1.8268 y 0.0091 a 39.4827 unidades CIELAB (Cuadro A1), mientras que los valores de b^* estuvieron entre 7.2336 a 85.1043 unidades CIELAB. Estos valores indican que, 17 mieles (M2, M10, M15, M18, M21, M28, M29, M31, M34, M38, M43, M44, M46, M48, M49, M50,

M51) mostraron una gran proporción de colores verde y amarillo, encontrándose diferencia significativa entre ellas ($\alpha = 0.05$) (Cuadros 5 y 6); por otro lado, las mieles restantes mostraron una gran proporción de colores rojo y amarillo.

Cuadro 5. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) del parámetro a*.

SUMACUAD	17507.4	FC	3283.96	ALPHA	0.05	
ANOVA						
FV	SC	GL	CM	FC	FT	PROB
TRATAMIENTOS	14223.4	34	418.335	558322	1.59629	4.9138E-178
ERROR	0.05245	70	0.00075		H1	
TOTAL	14223.4	104				

Cuadro 6. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) del parámetro b*.

SUMACUAD	206380	FC	162246.6	ALPHA	0.05	
ANOVA						
FV	SC	GL	CM	FC	FT	PROB
TRATAMIENTOS	44132.8	34	1298.022	163457	1.59629	2.3072E-159
ERROR	0.55588	70	0.007941		H1	
TOTAL	44133.3	104				

El parámetro C* (croma) corresponde a la intensidad o pureza espectral del color (Mathias-Rettig y Ah-Hen, 2014). Los valores para las muestras evaluadas van de 7.2491 a 90.6876 (Cuadro A1), existiendo diferencia

significativa entre ellas ($\alpha = 0.05$) (Cuadro 7), lo cual nos indica una baja pureza en el color de las mieles. La muestra M43 obtuvo el valor más bajo (7.2491) es decir, menor pureza con respecto a la muestra M8 (90.6876) con el valor más alto.

Cuadro 7. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) del parámetro C*.

SUMACUAD	223887	FC	175097	ALPHA	0.05	
ANOVA						
FV	SC	GL	CM	FC	FT	PROB
TRATAMIENTOS	48790.3	34	1435.01	203263	1.59629	1.1226E-162
ERROR	0.49419	70	0.00706		H1	
TOTAL	48790.8	104				

Por último, el ángulo h° (Hue, h°) indica el tono o matiz, el cual expresa las variaciones cualitativas del color y puede variar entre 0° y 360° . Escobedo (2012) describió que 0° son tonalidades rojo-púrpura, 90° amarillo, 180° azul-verde y 270° azul. Las muestras obtuvieron valores entre 26.5619 a 96.9990 (Cuadro A1), lo cual nos indica tonalidades rojo-purpura a amarillas en las diferentes muestras de miel evaluadas, encontrando diferencia significativa entre ellas ($\alpha = 0.05$) (Cuadro 8). La muestra M20 obtuvo el valor más bajo (26.5619) con respecto a la muestra M49 con el valor más alto (96.9990).

Cuadro 8. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) del parámetro hº.

SUMACUAD	780324	FC	761189	ALPHA	0.05	
ANOVA						
FV	SC	GL	CM	FC	FT	PROB
TRATAMIENTOS	19135	34	562.795	232927	1.59629	9.5404E-165
ERROR	0.16913	70	0.00242		H1	
TOTAL	19135.2	104				

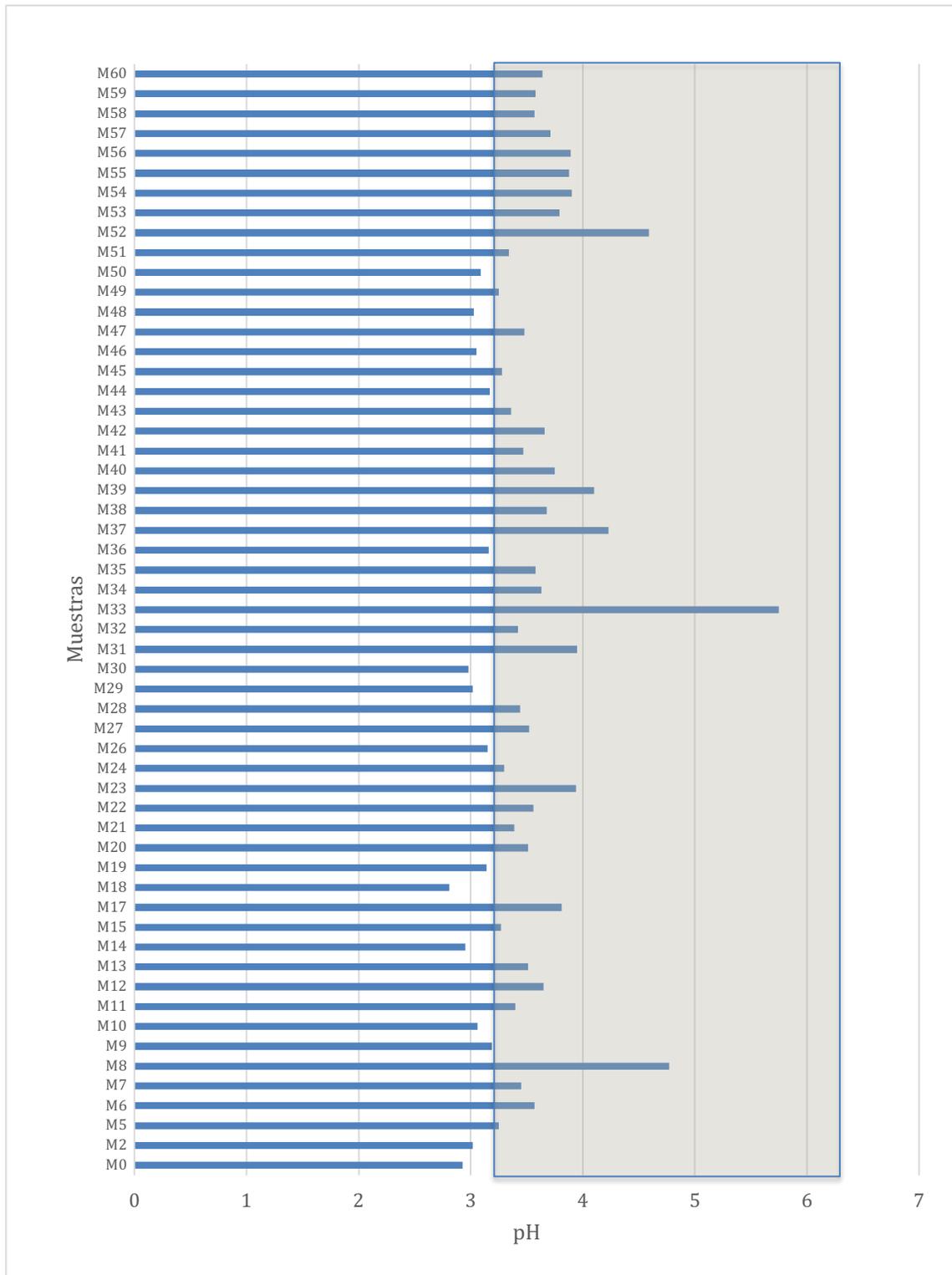
5.3 Medición del pH

Una de las determinaciones más importantes para conocer la calidad y el estado de conservación de las mieles es el pH. Este parámetro es relevante ya que variaciones importantes pueden ocasionar alteraciones en la calidad de la miel y en los desplazamientos químicos de las señales en la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) (Lino, 2002).

Los valores de pH se encontraron en un rango de valores de 2.81 a 5.75 (Gráfico 2). Los resultados de pH obtenidos son característicos de la miel, ya que la mayoría presenta pH ácido. Sin embargo, las muestras M8, M33 y M52 sobresalen, siendo todas de origen de aguacate, con pH de 4.77, 5.75 y 4.59, respectivamente. A pesar de que no se ha establecido un rango de pH estandarizado, se han encontrado valores similares con mieles de aguacate de la Península Ibérica y en la Región Andina de Ecuador (García, 2018).

Por otra parte, la Comisión del Codex Alimentarius reporta un rango de 3.24-6.21 (Codex Alimentarius Commission, 2001). Sin embargo, las muestras M0, M2, M9, M10, M14, M18, M19, M26, M29, M30, M36, M44, M46, M48 y M50 se encuentran por debajo del rango antes mencionado.

Gráfico 2. Datos obtenidos experimentalmente de pH de las mieles recolectadas. En gris se muestra el rango de pH establecido por el Codex (Codex Alimentarius Comission, 2001).



En estudios previos se establece que la miel de abeja tiene un pH bastante variable, esto se debe a las diferentes fuentes de néctar que las abejas pueden encontrar a sus alrededores. Todas las mieles tienen reacciones ácidas, debido a la presencia de ácidos orgánicos (algunos volátiles), ácidos inorgánicos (clorhídrico y fosfórico), etc. El componente más importante es el ácido glucónico, que se forma de la glucosa por acción enzimática. El origen de los demás ácidos es todavía incierto; parece en todo caso que algunos proceden del néctar y que otros se forman por procesos enzimáticos y fermentativos. Los ácidos contribuyen a otorgar aroma, si bien al sabor; la acidez no llega a ser advertida por estar enmascarada por el dulzor de los azúcares (Lino, 2002).

5.4 Perfiles de los espectros de RMN-¹H

Estos espectros fueron obtenidos a partir de los extractos clorofórmicos de las mieles y se obtuvieron utilizando el mismo tratamiento y la metodología descrita por Schievano y colaboradores (2012). En la mayor parte de los espectros se observó que las señales más intensas se encontraban en la región de los protones alifáticos (0.75 a 2.5). Otras señales de intensidad comparable se observaron en la región de los protones correspondientes a azúcares (3.0 a 4.5), compuestos aromáticos (6.9 a 8.0) y aldehídos (9.6 a 10.0). Las señales en estas regiones presentaron diferencias en el espectro de RMN¹H y son consideradas como relevantes para obtener las huellas digitales que caracterizan el origen de las mieles (Schwarzinger, *et al.*, 2014). En la Figura 11 se muestran los espectros de RMN¹H apilados de las muestras recolectadas en las diferentes zonas melíferas.

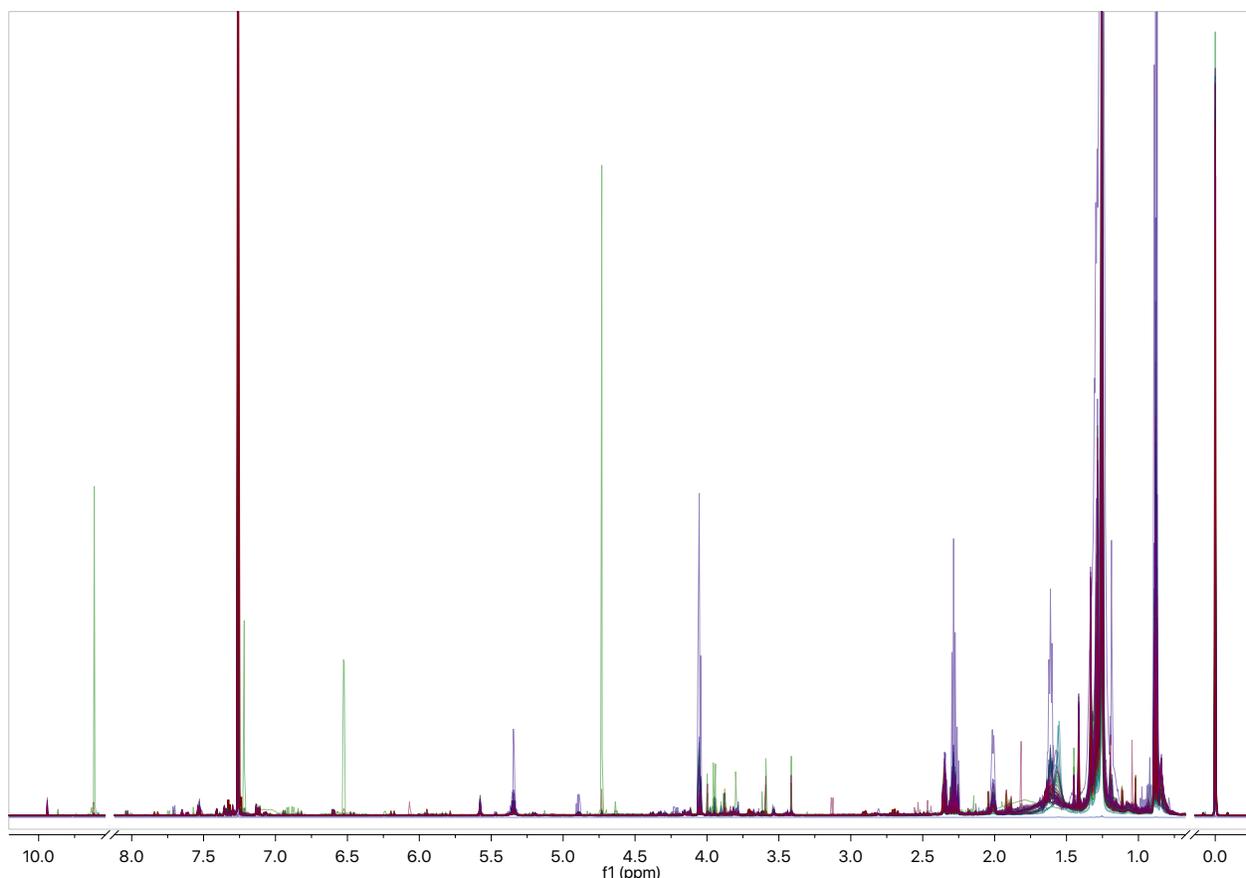


Figura 11. Espectros de RMN¹H apilados de las mieles recolectadas.

De acuerdo con estudios previos realizados utilizando una metodología similar, la información obtenida de todas las regiones del espectro es necesaria para la correcta identificación de la muestra, algunas diferencias en los metabolitos entre las muestras solo pueden detectarse por una inspección cuidadosa de regiones específicas del espectro (Schievano *et al.*, 2012). Estas diferencias se pueden observar principalmente en las regiones en el espectro en 0.0 a 3.0 (región alifática), 3.0 a 6.0 (región azúcares), 6.0 a 10.0 (región aromáticos y aldehídos) (Figura 12).

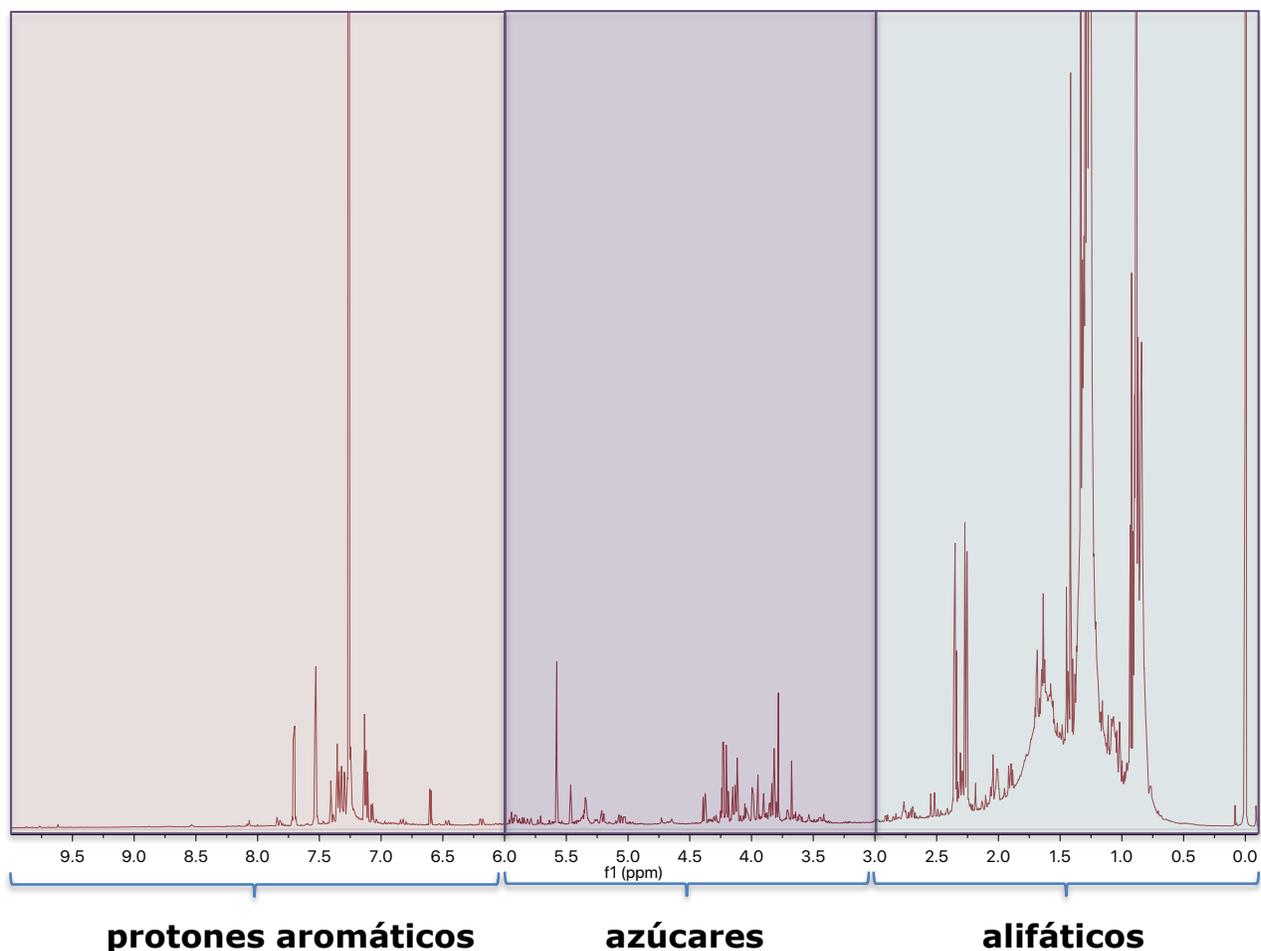


Figura 12. Segmento del espectro de RMN¹H (0.0 a 10.0 ppm) de la muestra de miel M40 (700 MHz, CDCl₃, 298K).

Por otra parte, es importante mencionar que en la literatura revisada se menciona que la normalización y alineación de los espectros es de suma importancia, ya que nos permite descartar información que puede generar error dentro de los modelos matemáticos y estadísticos que se utilizan. Estos pre-procesamientos permiten optimizar el tratamiento estadístico de las muestras, corregir el tratamiento interno de las mismas y corregir problemas que se introduzcan al sistema por la diferencia de pH en las muestras. Las variaciones de pH pueden originar un ligero cambio en los desplazamientos químicos de aquellos protones que puedan llegar a tener un comportamiento

ácido-base. El *binning* es utilizado para la reducción de la dimensionalidad generando cajas con un tamaño homogéneo, consistiendo en la división del espectro en regiones más pequeñas, esto nos permite un conjunto de variables más pequeño, permaneciendo los datos de mayor importancia dentro del análisis.

5.5 Análisis multivariado

El análisis quimiométrico de las 47 muestras de miel se realizó con la finalidad de simplificar las variables y obtener las combinaciones lineales para describir el conjunto de datos de una manera más simple (PCA).

5.5.1 Análisis clasificatorio por PCA

Se le aplicó un análisis por PCA a 47 muestras de mieles (Figura 13). En primer lugar, este análisis fue construido utilizando todas las regiones del espectro de RMN¹H.

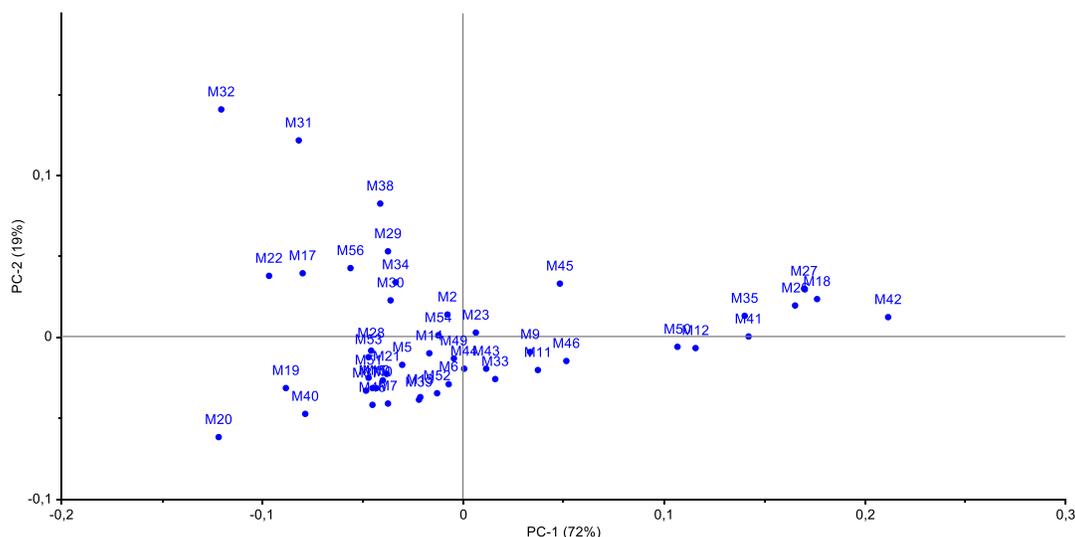


Figura 13. Análisis del componente principal (PCA) realizado con los datos de RMN¹H para 47 muestras de miel.

Este análisis permitió determinar que el comportamiento de las muestras se puede describir con dos componentes (91%). En la Figura 14 se ilustra la varianza X en función de los componentes encontrados. Así, se seleccionaron dos componentes principales para explicar la variación (varianza) que presentan los datos. La curva azul representa el modelo matemático y la roja su validación.

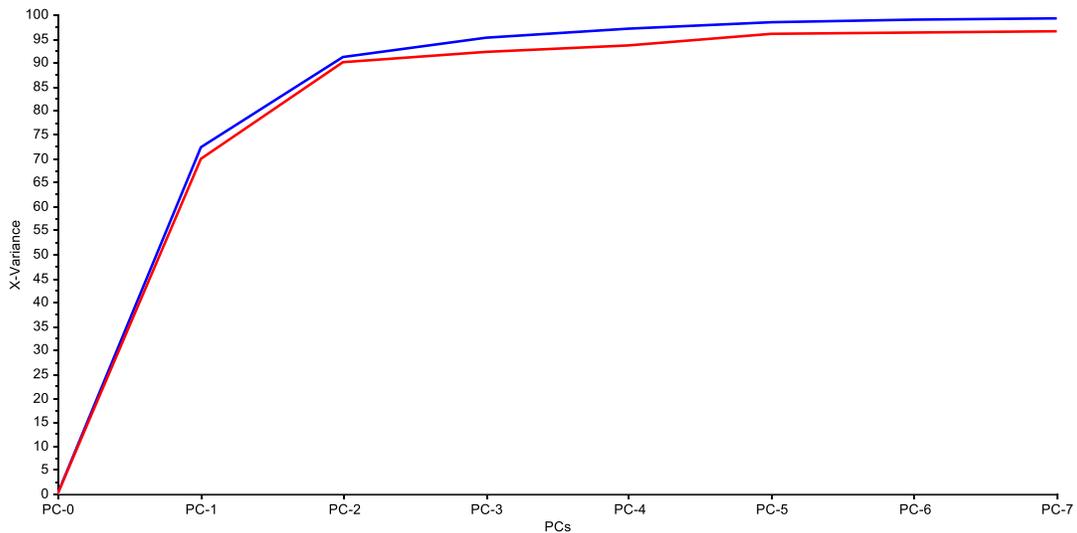


Figura 14. Varianza de los datos de los dos componentes seleccionados

Con base en la elipse de Hotelling's T^2 con un nivel de confianza del 91%, se identificaron tres muestras anómalas (M20, M31 y M32) (Figura 15).

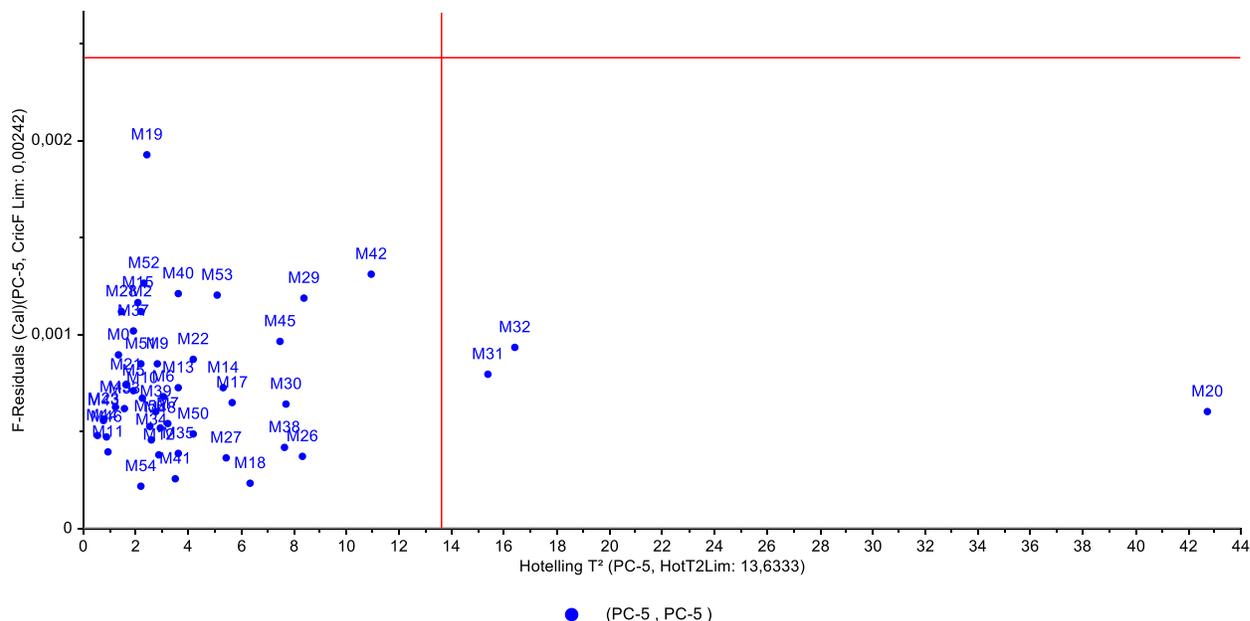


Figura 15. Hotelling's T2 con un nivel de confianza del 91% para PCA con datos de RMN¹H.

El análisis del espectro de RMN¹H de la muestra M20 (Figura 16) permitió detectar las señales diagnósticas para la presencia de 5-HMF [5-(hidroximetil)furfural]. En este espectro se observaron las señales características para el compuesto en δ_H 9.61 (s), 7.22 (d, $J = 7.0$ Hz), 6.53 (d, $J = 7.0$ Hz) y 4.73 (s).

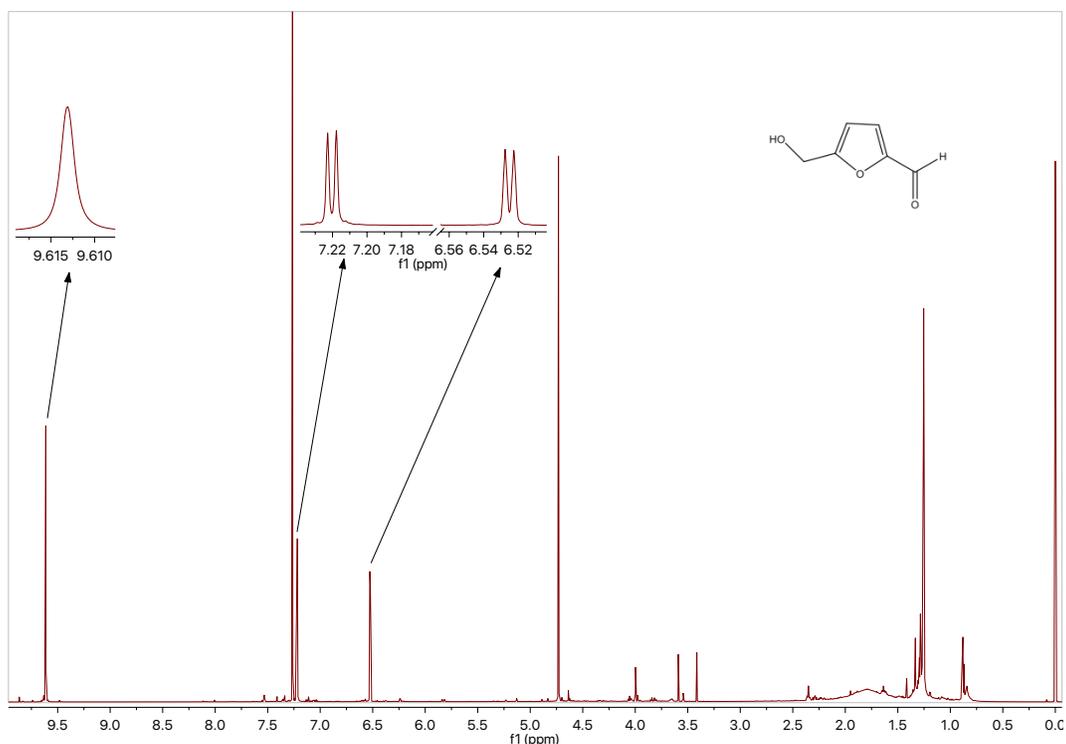


Figura 16. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de la muestra M20 (700 MHz, CDCl₃, 298K).

El hallazgo del 5-HMF en la miel o en alimentos, es relevante, ya que recientemente se le ha reportado como un compuesto carcinogénico (Alabdeen *et al.*, 2009). En otros estudios se ha reportado este compuesto con efectos negativos para la salud humana, así como toxicidad contra membranas mucosas, la piel y el tracto respiratorio, mutagenicidad, irregularidades cromosómicas y carcinogenicidad en humanos y animales (Shapla *et al.*, 2018).

Sin embargo, en estudios recientes también se ha descrito que el 5-HMF tiene un amplio rango de efectos positivos. Entre los que podemos destacar: antioxidante, antialérgico, antiinflamatorio, antihipóxico y antihiperuricémico. Por último, es importante destacar que la ingesta diaria de los humanos a partir de diferentes alimentos se encuentra en un rango de 30 a 150 mg (Shapla *et al.*, 2018).

En el análisis de datos en metabolómica nos encontramos con una difícil detección directa de la variación en los espectros de RMN¹H y por esta situación es necesario utilizar técnicas estadísticas complejas, como es el caso del análisis estadístico multivariante. Este análisis nos permite observar y evaluar dichas diferencias y así poder observar la formación de patrones.

Se llevaron a cabo diferentes modelos con los cuales se busca encontrar la relación entre las variables encontradas durante el estudio.

En el primer modelo (Figura 17), se analizó la relación de RMN¹H con el origen floral de cada muestra (monofloral y multifloral), esto se describe mediante dos componentes (91%). Se identificó que las muestras M20 y M32 presentan anomalías, debido a que ambas son de origen monofloral, pero se observan con un comportamiento de mieles multiflorales (Figura 17, círculos verdes). En la Figura 15 se observa que estas muestras tienen un comportamiento anómalo "outliers" por lo cual se descartaron para la construcción del modelo. Como resultado, se distinguen dos agrupamientos, uno que corresponde a las mieles monoflorales y otro a las multiflorales. Claramente el agrupamiento no es resuelto por PCA (técnica no supervisada), dado que las mieles monoflorales quedan como un subconjunto de las multiflorales en el espacio PC1 vs PC2 y se tendría que recurrir a un método supervisado, como PLS-DA, con el fin de ver si es posible definir a los grupos.

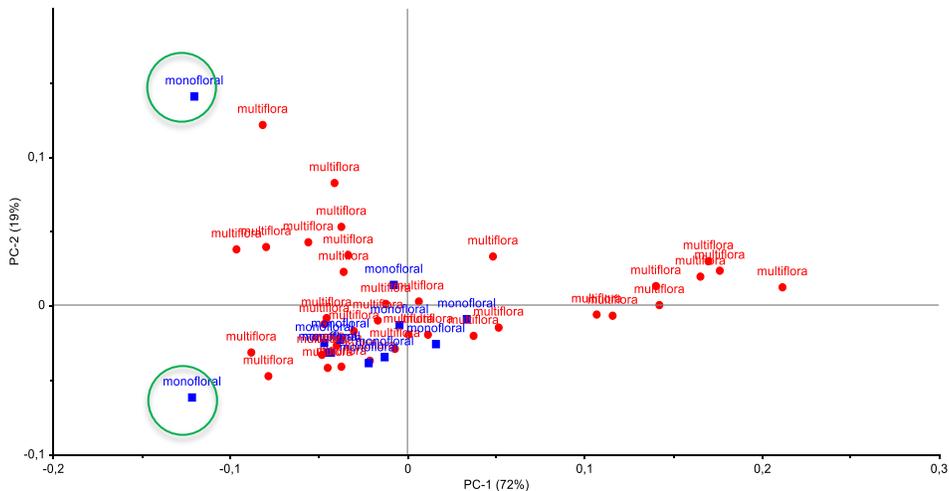


Figura 17. Análisis del componente principal con datos de RMN¹H y origen floral para 47 muestras de mieles.

Por otra parte, se buscó determinar si el año de producción de la miel tenía influencia sobre el agrupamiento de las mieles y se realizó un análisis para tratar de obtener un modelo que explicara las posibles diferencias. En este análisis (Figura 18) no se encontró un agrupamiento de las mieles considerando el año de producción de las mismas, siendo 2016, 2017 y 2018 las variables de este estudio; por lo que, el año de colecta no presenta influencia para el agrupamiento. Estos resultados eran esperados ya que, en estudios anteriores se han mostrados resultados similares (Kortesniemi, 2016).

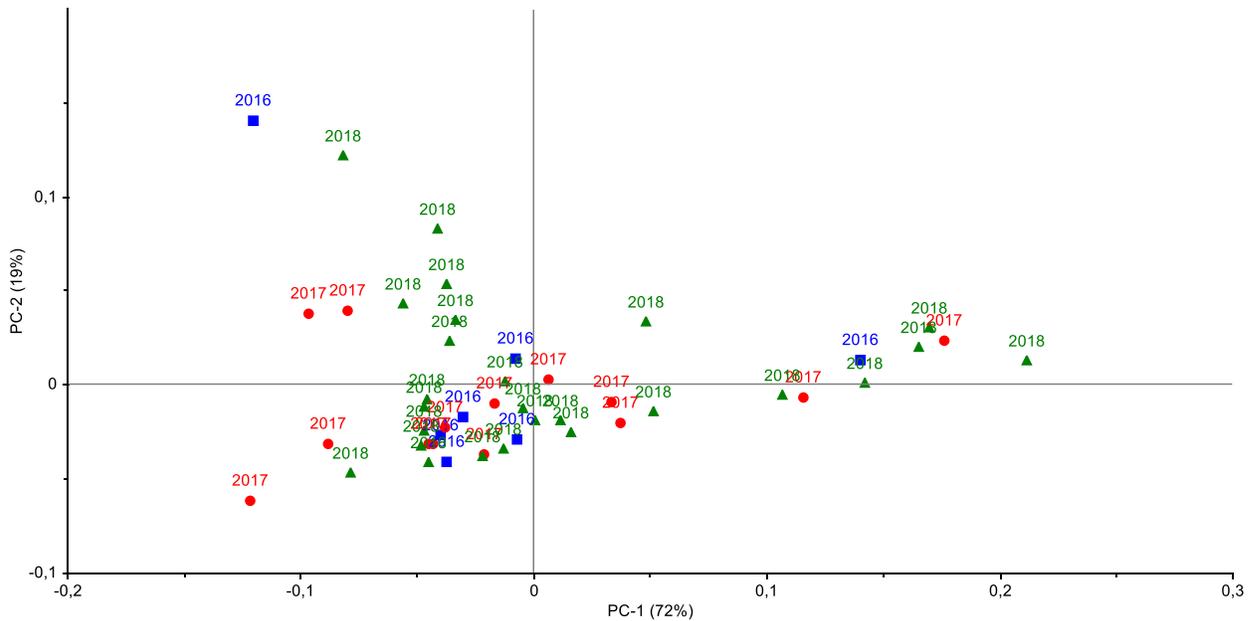


Figura 18. Análisis del componente principal con datos de RMN¹H y año de recolección para 47 muestras de mieles.

Por último, se buscó determinar si el origen geográfico o especie de abeja tenía influencia sobre el agrupamiento de las mieles. En estos análisis (Figuras 19 y 20) no se encontraron agrupamientos, por lo que estos dos parámetros no presentan influencia significativa.

En el caso particular de la especie de abeja productora de la miel, se puede inferir que la miel de meliponas, que se adquirió, sufrió una adulteración con miel de abeja europea. Por otra parte, la mayor parte de mieles que se venden en México con la denominación de monoflorales no lo son, debido a que en el país no existen plantíos monoflorales que permitan que las abejas solo utilicen un tipo de flor para producir la miel.

Otro análisis de PCA se realizó utilizando los datos de la evaluación instrumental de color para determinar si éstos permitían la construcción de un modelo que describiera el comportamiento de las mieles estudiadas (Figura 8). El resultado de este análisis con base en la elipse de Hotelling 's T2 con un nivel de confianza del 99% permitió identificar cuatro muestras anómalas (M13, M20, M33 y M42) (Figura 21).

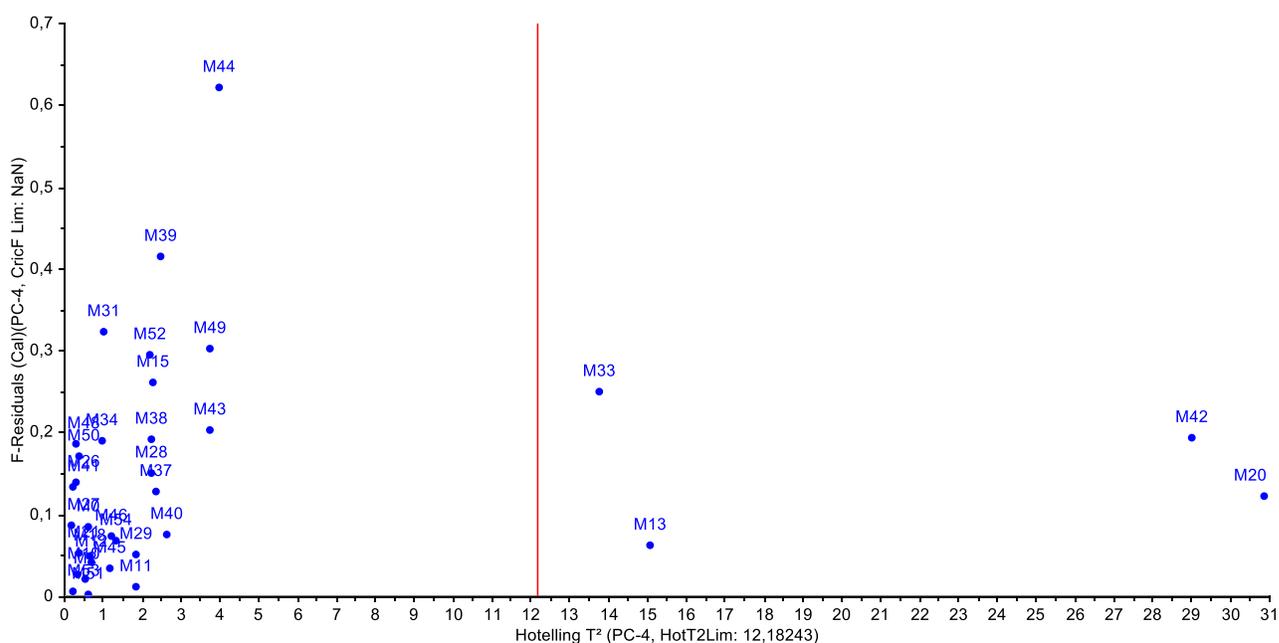


Figura 21. Hotelling 's T2 con un nivel de confianza del 99% para PCA con datos de evaluación instrumental de color.

En el espectro de la muestra M42 (Figura 22), de una miel que fue recolectada a partir de una población de abejas silvestres en Zacatecas, se observaron las señales para una mezcla de ácidos grasos saturados e insaturados. Las señales en δ_H 5.37 (m), 4.07 (t, $J = 7.0$ Hz), 2.03 (m), 1.27 (m) y 0.90 (t, $J = 7.0$ Hz) son características para este tipo de ácidos grasos.

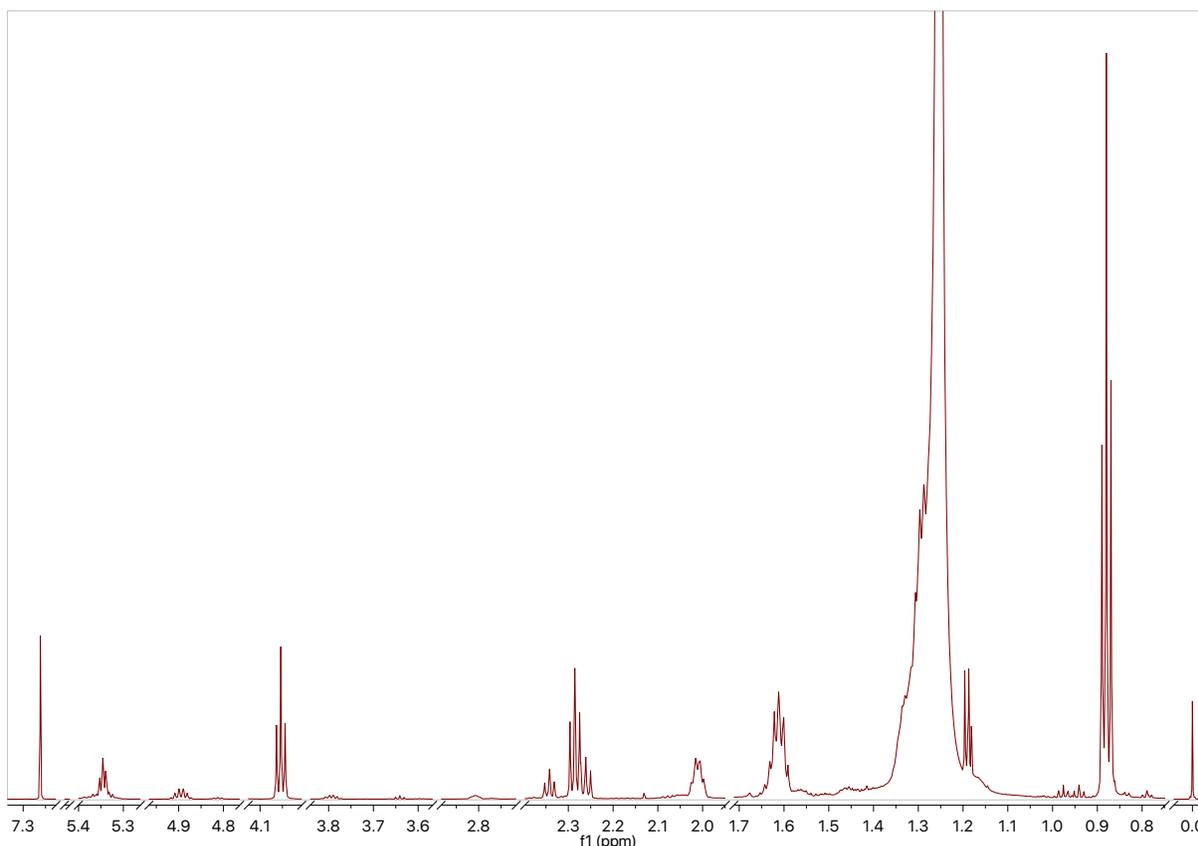


Figura 22. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de la muestra M42 (700 MHz, $CDCl_3$, 298K).

En este nuevo modelo (Figura 23), se analizó la relación de los datos de la evaluación instrumental del color con el origen geográfico de cada muestra. Las muestras M13 (Topilejo) y M42 (Zacatecas) son "outliers" (Figura 21) por lo que, se pueden excluir del modelo; teniendo en cuenta lo anterior, se puede observar el agrupamiento de las mieles michoacanas con respecto a las demás

muestras de mieles. Sin embargo, no hay agrupamiento visible de las demás muestras de mieles con respecto al origen geográfico.

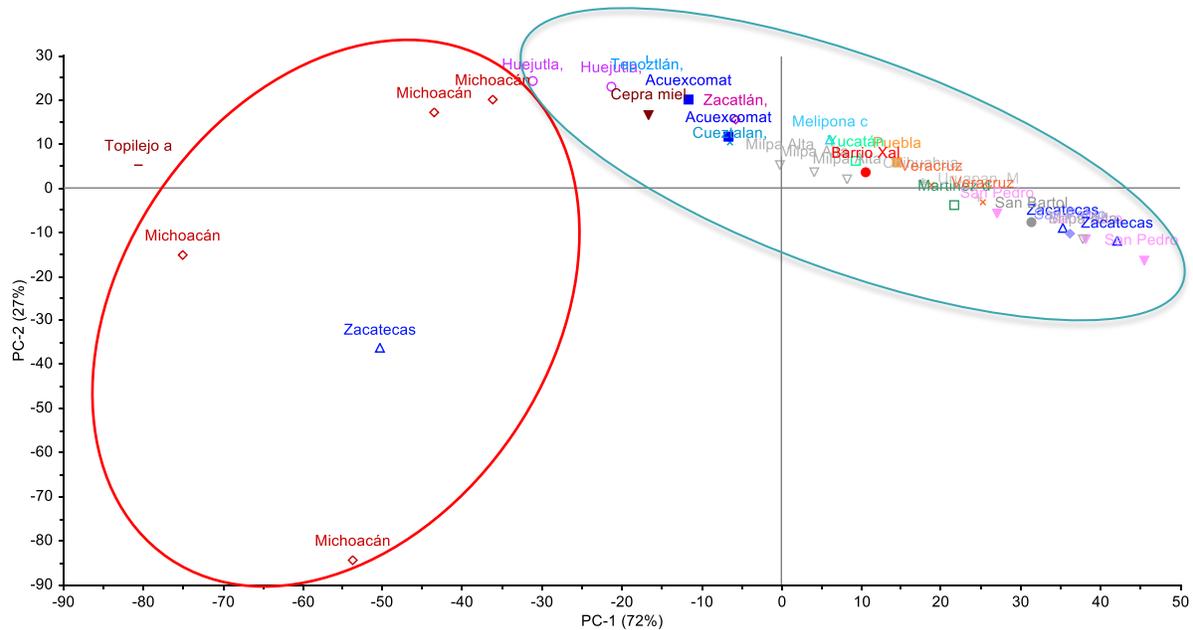


Figura 23. Análisis del componente principal con datos de evaluación instrumental de color y origen geográfico para 34 muestras de mieles.

En el siguiente modelo (Figura 24), nuevamente se observa que no existe agrupamiento de las mieles considerando el año de recolección de éstas; siendo 2016, 2017 y 2018 las variables de este estudio.

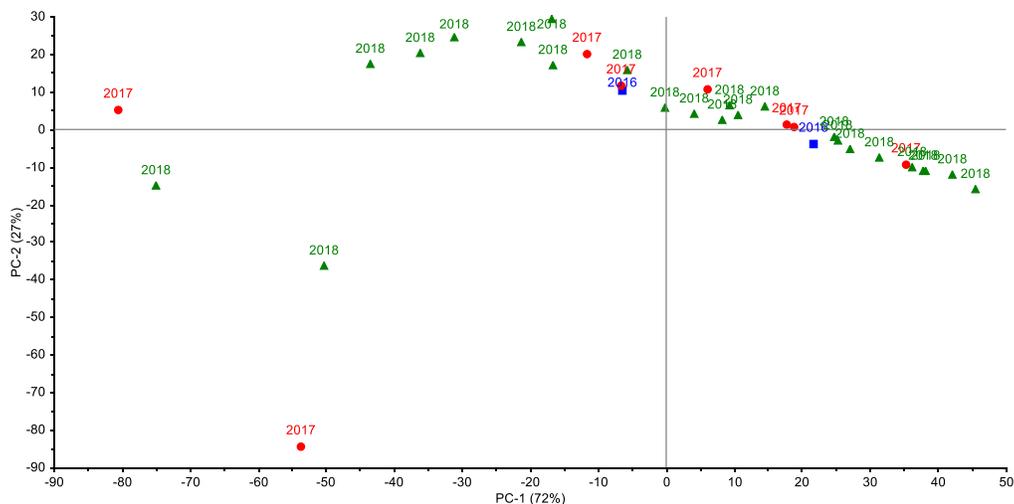


Figura 24. Análisis del componente principal con datos de evaluación instrumental de color y año de recolección para 34 muestras de mieles.

Se realizó un PCA utilizando los datos de evaluación instrumental de color y todas las regiones del espectro de RMN¹H; sin embargo, al analizar las contribuciones de cada variable para los dos componentes principales que explican la variación (varianza) de los datos, se muestra que los datos de RMN¹H no contribuyen (Figura 25, círculo rojo) por lo que se decidió no seguir analizando este modelo. Cabe remarcar que no se hicieron correcciones por las diferencias de escala entre la evaluación instrumental de color y los espectros de RMN, motivo por el cual pudo obtenerse el resultado, quedando como perspectiva a futuro realizar este ajuste, así como probar diferentes procedimientos de pretratamiento de datos para ambos tipos de datos y una normalización para cuando estos conjuntos de datos se conjunten.

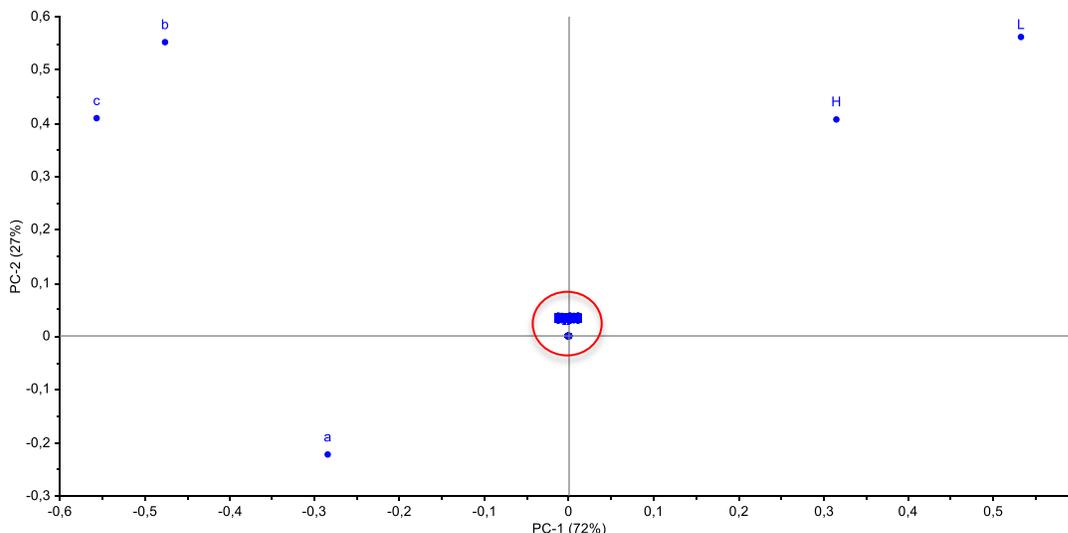


Figura 25. Contribuciones de las variables de evaluación instrumental de color y RMN¹H para el análisis de PCA.

5.5.2 Análisis multivariado por PLS-DA

Se aplicó un análisis por PLS-DA a 47 muestras de mieles (Figura 26). Este análisis fue realizado utilizando todas las regiones del espectro de RMN¹H. En el Cuadro 9 se puede observar que las 2 variables latentes explican el 73.33% en la varianza en X (espectros) y 87.11% en la Y (clasificación).

Cuadro 9. Contribuciones de las variables para PLS-DA (%).

X-Block (%)	LV	X-Block Cumulative (%)	Y-Block LV (%)	y-Block Cumulative (%)	CV Class Err Ave (%)
37.65		37.65	61.24	61.24	0.336
35.68		73.33	25.87	87.11	0.281

En las Figuras 26 y 27 se observó muy buena separación de clases cuando se realizó un pretratamiento de los datos con corrección ortogonal de señal y centrado en la media para X y solo centrado en la media para Y. En este modelo se tuvieron solo tres muestras con un comportamiento alejado, pero no relevante.

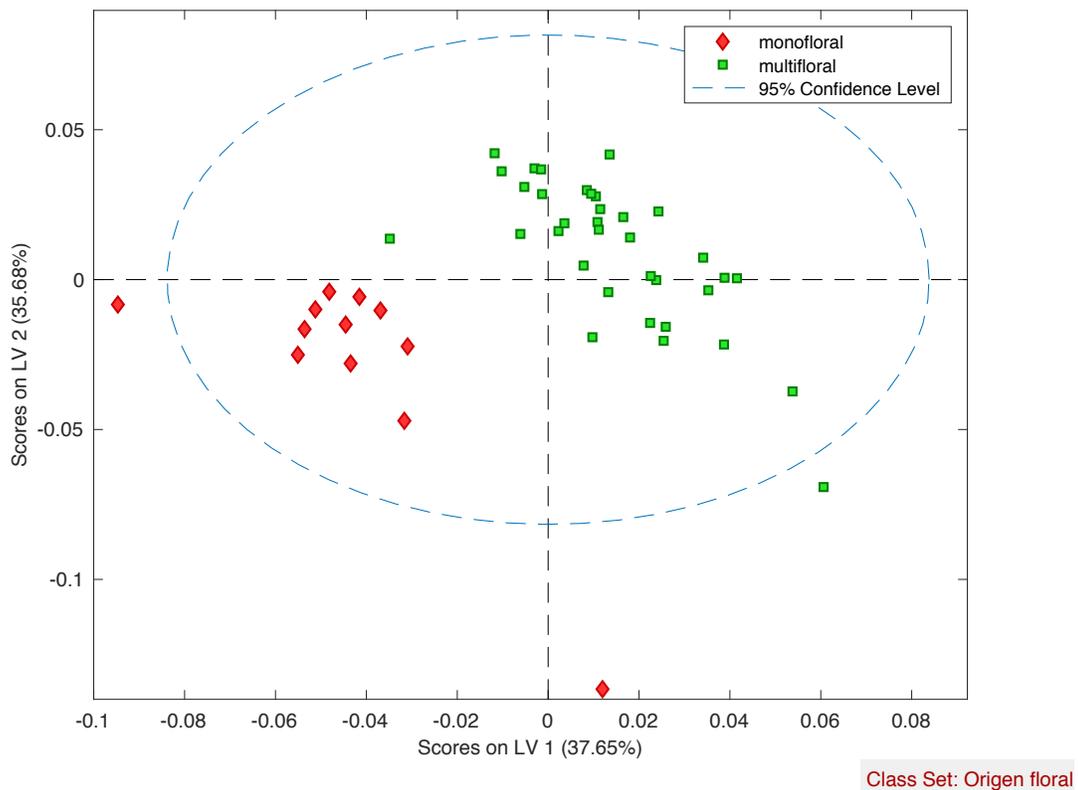


Figura 26. Gráfica de PLS-DA para las muestras de miel monoflorales y multiflorales a un nivel de confianza de 95%.

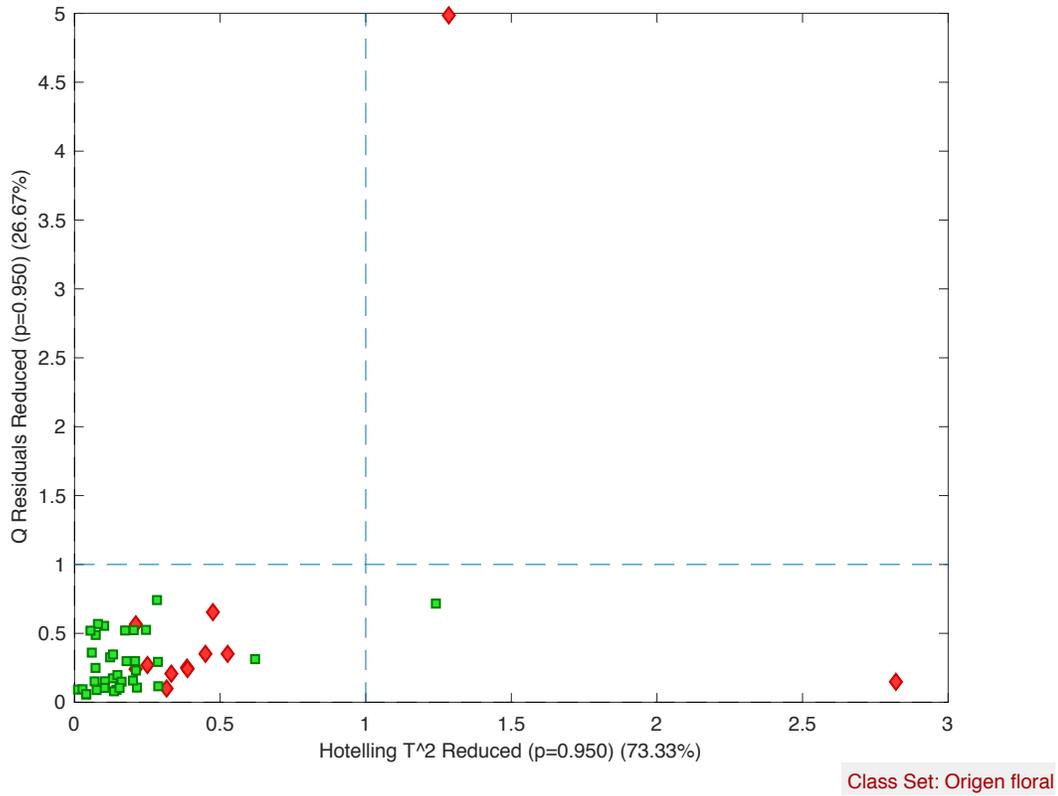


Figura 27. Hotelling´s T2 vs Q

Cuando se comparan los valores reales de clase (Figura 28 A) con los predichos por el modelo de PLS-DA (Figura 28 B), solo una muestra queda erróneamente clasificada la M40.

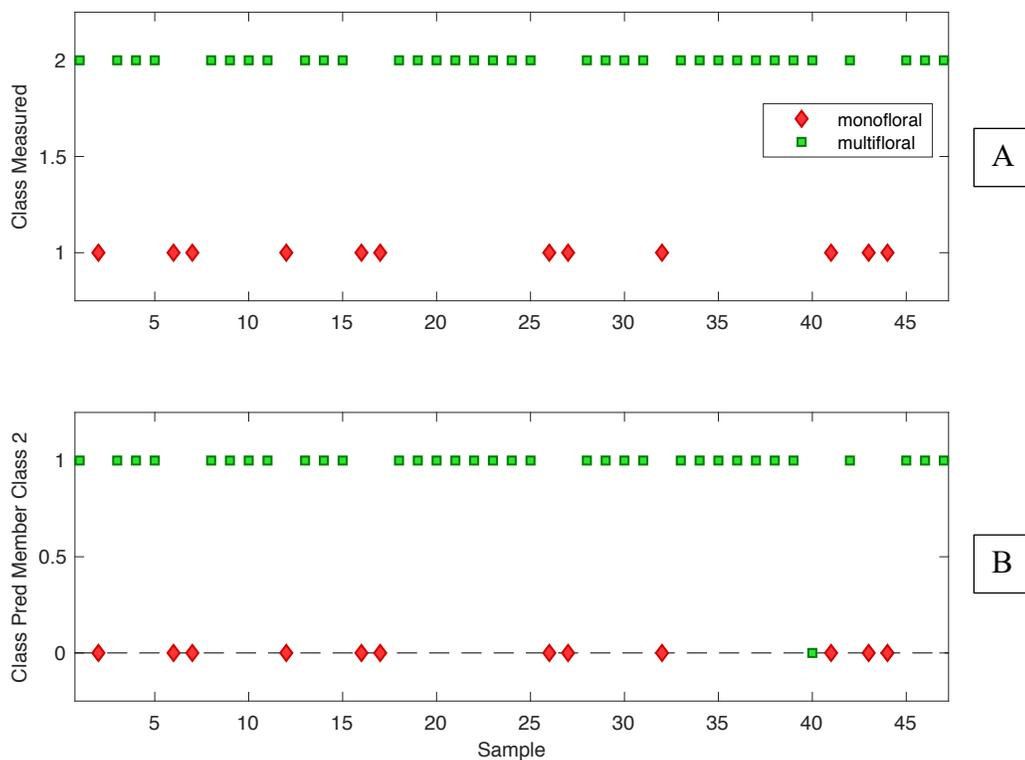


Figura 28. Comparación de valores reales de clase (A) y valores predichos por PLS-DA (B).

En la Figura 29, se analiza la VTP (Importancia de la varianza en la proyección) todos los valores >1 , indican valores de desplazamientos químicos asociados con la predicción. Los desplazamientos en 0.84, 1.24, 1.28, 1.32, 1.56, 1.60, 4.72, son los que están determinando la clasificación de clase monofloral o multifloral.

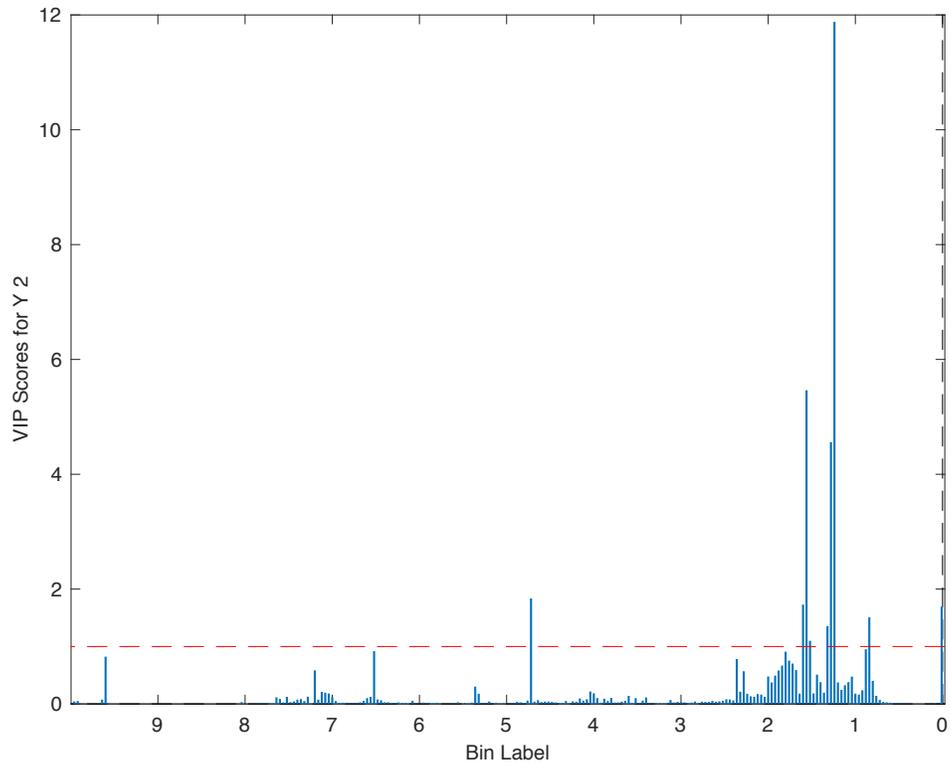


Figura 29. Importancia de la varianza en proyección PLS-DA.

6. CONCLUSIONES

- El pH determinado para las mieles en estudio, se encontró en un rango de 2.81-5.75. Los valores de pH establecidos por el Codex Alimentarius (CAC, 2001) para que un producto sea considerado miel de abeja deben estar en un rango de 3.24 - 6.21. Las muestras M0, M2, M9, M10, M14, M18, M 19, M26, M29, M30, M36, M44, M46, M48 y M50 no cumplen con esta especificación, ya que sus valores pH estuvieron entre 2.81 y 3.19.
- Los resultados de la evaluación instrumental de color, utilizando el método CIELAB, fueron de 9.5413–99.8026 unidades CIELAB para L*, con lo cual, se clasificaron en dos grupos: mieles claras y oscuras. Por otra parte, los valores de a* fueron de -0.2556 a -1.8286 y de 0.0091 a 39.4827 unidades CIELAB, mientras que los valores de b* fueron de 7.2336–85.10443 unidades CIELAB. Finalmente, los valores de C* y h° fueron de 7.2491–90.6876 y 26.5619–96.9990, respectivamente.
- El análisis de los datos de RMN¹H en conjunto con el análisis multivariado por PCA para las muestras analizadas no permitió clasificar a las mieles de acuerdo a su origen geográfico, año y especie de abeja. En cuanto al origen floral, se distingue una agrupación que no pudo ser resuelta por PCA, técnica no supervisada, por lo que se recurrió a la técnica de PCA-DA que si es supervisada. Se pudieron resolver satisfactoriamente por PLS-DA ambos grupos, con un error mínimo, pues de 47 muestras solo una quedo mal clasificada.
- La mayor parte de las mieles estudiadas no contienen cantidades apreciables de 5-HMF, excepto la muestra M20 que presentó una cantidad elevada de este compuesto lo cual puede deberse a un mal manejo y almacenamiento de la miel.

- El análisis del componente principal utilizando los datos de la evaluación instrumental de color y origen geográfico de las muestras permitió observar el agrupamiento de las mieles y la distinción de las mieles de Michoacán.

7. PERSPECTIVAS

- Incrementar el número de muestras de mieles de las principales regiones productoras de México, tales como Yucatán, Hidalgo, Quintana Roo, etc.
- Incluir mieles operculadas, no operculadas, además de mieles provenientes de abejas que han sido alimentadas con jarabes, entre otras anomalías, con el fin de ampliar las variables del estudio para poder obtener mejores agrupaciones.
- Aplicar otros métodos de clasificación (DA, SIMCA) que permitan una mejor discriminación de las mieles monoflorales y multiflorales.
- Aumentar el número de muestras buscando mayor representatividad y variedad, pues el análisis por PCA es muy dependiente de las muestras con las que el análisis se hace. Agregar otras muestras puede orillar a observar agrupaciones que no se definieron en este trabajo.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Alabdeen, S., Idrees, M., Ahmed, B., Siddig, B., Mahmud, H., Mohamed, A., Gad, E. (2009). Identification and Quantification of 5-Hidroxymethyl Furfural (HMF) in some sugar-containing food products by HPLC, *Pakistan Journal of Nutrition*, 9, 1391-1396.
2. Alqarni, A., Owayss, A., y Mahmoud, A. (2012). Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia, *Journal of Saudi Chemical Society*, 5, 618-625.
3. Aljohar, H., Maher, H., Albaqami, J., Al-Mehaizie, M., Orfali, R., Orfali R., Alrubia, S., (2018). Physical and chemical screening of honey samples available in the Saudi market: An important aspect in the authentication process and quality assesment, *Saudi Pharmaceutical Society*, 26, 932-942.
4. Alfonzo, A., (2015). Camufla arte e ilustración: Comunicación del color. Venezuela. Recuperado de: <http://adolfoalfonzo.blogspot.com/2015/11/comunicacion-del-color.html>
5. ANMVEA, (2018), *Compendio Científico-Técnico Apícola 2018*, 1-11-12.
6. Apicultors Gironins Associats, (2013). Proceso de extracción y envasado de la miel II. SAGARPA. Recuperado el 14 de enero de 2019 de : <http://www.aga.cat/index.php/es/articulos/articulos-de-interes/productos/216-proceso-de-extraccion-y-ensado-de-la-miel-ii>
7. Bereton, R. (2007). Applied chemometrics for scientist, *John Wiley & Sons*, Ltd, Gran Bretaña.
8. Boffo, E., Tavares, L., Tobias, A., Ferreira, M., Ferreira, A. (2012). Identification of components of Brazilian honey by 1H NMR and

- classification of its botanical origin by chemometric methods, *LWT – Food Science and Technology*, 49, 55-63.
9. Buenas Prácticas Pecuarias en la Producción Primaria de la Miel. (2018). Secretaria del Trabajo y Previsión Social. Recuperado el 11 de enero de 2019 de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/395732/Manual_BPP_en_la_Produccion_primaria_de_Miel_octubre_2018.pdf
 10. Calidad de miel de abeja. (2001). *Revista del consumidor*. Recuperado de: https://www.profeco.gob.mx/revista/pdf/est_01/miel.pdf
 11. Caporgno, J., Gaggiotti, M., Barreto, J. (2016). Calidad de miel, *Artículo de divulgación del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*, Buenos Aires Argentina.
 12. Castellanos, B., Ramirez, E., Zaldivar, J. (2012). Análisis del contenido polínico de mieles producidas por *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: apidae) en el estado de Tabasco, México, *Acta zoológica mexicana*, 28(1), 13-36. Recuperado el 20 de septiembre de 2018, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0065-17372012000100002&lng=es&tlng=es
 13. Challacombe, C., Abdel-Aal, E., Seetharamana, K., y Duizer, L. (2012). Influence of phenolic acid content on sensory perception of bread and crackers made from red or white wheat, *Journal of Cereal Science*, 56, 181-188.
 14. Codex Alimentarius Commission, 1981. Revised Codex Standard for Honey Codex Stan 12-1981. Rev. 1 (1987), Rev (2001), Codex Standard, vol. 12, pp. 1-7.
 15. Consonni, R., Cagliani, L., (2015). Recent developments in honey characterization, *Royal Society of Chemistry, Istituto per lo Studio delle Macromolecole*, 5, 5969-59714.

16. Correa, A., Guzmán-Novoa, E.,(s.f.), Unidad 11 Zootecnia Apícola, CDMX, *Facultad de Medicina V. y Z.*, Recuperado de: www.fmvz.unam.mx/fmvz/p.../UNIDAD%2011%20ZOOTECCNIA%20APICOLA.pdf
17. Ericson, E., Carlson, S., Garmen, M. (2009). The natural History of the Honey Bees, *Atlas of the Honey Bee*, Iowa University Press, pag. 1.
18. Escamilla, M. V., (2006). Evaluación instrumental de color en alimentos mexicanos tradicionales y de alto consumo, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM pp 2-15.
19. Escobedo, E. (2012). Comparación de las características sensoriales, textura y color de zarzamoras silvestres y comerciales, Tesis de Licenciatura, *Facultad de Química*, UNAM.
20. Escuredo, O., Dobre, I., Fernández-González, M., y Seijo, M. (2014). Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon, *Food Chemistry*, 149, 84–90.
21. Escuredo, O., Míguez, M., Fernández-González, M., y Seijo, M. C. (2013). Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area, *Food Chemistry*, 138, 851–856.
22. Espinosa, S., Reyes, R., (2014). Desarrollo del perfil sensorial de mezcales tradicionales de dos regiones productoras: Zapotitlán de Vadillo, Sur de Jalisco y la región Occidental del Distrito de Ejutla, Valles Centrales de Oaxaca, Tesis de Licenciatura, *Facultad de Química*, UNAM.
23. Fordellone, M., Bellincontro, A., Mencarelli, F., (2018). Partial least squares discriminant analysis : A dimensionality reduction method to classify hyperspectral data, *Cornell University*, 1-24.

24. Fuente, E., Ruiz-Matute, A., Valencia-Barrera, R., Sanz, J., y Castro, I. (2011). Carbohydrate composition of Spanish unifloral honeys, *Food Chemistry*, 129, 1483–1489.
25. Garcia, M., (2018). Estudio de las propiedades antioxidantes, antimicrobianas y su relación con el origen floral de mieles específicas de la Región de Andina de Ecuador (Tesis para obtener el título de Ingeniería en Biotecnología). *Universidad de las Americas*, Quito, Ecuador.
26. González, F., Rebollar, S., Hernández, J., Guzmán, E., (2014), La comercialización de la miel en el sur del Estado de México, *Revista Mexicana de Agronegocios*, 34 (806-815).
27. González-Miret, M., Terrab, A., Hernanz D., Fernández-Recamales, M., Heredia, F., (2005). Multivariate correlation between color and mineral composition of honeys and by their botanical origin, *Journey of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2574-2580.
28. Hui, Y., Guerrero, I., Rosmini, R. (2006) *Ciencia y Tecnología de Carnes*, Editorial Limusa, S.A. México.
29. Iglesias, M., Martián-Álvarez, P., Polo, M., Lorenzo, C., González, M., y Pueyo, E. (2006). Changes in the free amino acid contents of honeys during storage at ambient temperature, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9099–9104.
30. Instituto Nacional de Economía social. *Guía empresarial miel*, (2011).
31. Karabagias, I., Badeka, A., Kontakos, S., Karabournioti, S., y Kontominas, M. G. (2014). Characterization and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics, *Food Chemistry*, 146, 548–557.
32. Khalil, I., Moniruzzaman, M., Boukraâ, L., Benhanifia, M., Islam, A., Islam, N., Amrah S., Hua Gan, S., (2012). Physicochemical and

- Antioxidant Properties of Alegrian Honey, *Molecules*, 17, 11199 – 11215.
33. Kortensniemi, M., (2016). *NMR metabolomics of food – Investigating the influence of origin on sea Buckthorn Berries, Brassica Oilseeds and Honey*, (Tesis de Doctorado), University of Turku, Finlandia.
34. Lino, F., (2002). Estudio de la calidad de la miel de abeja *Apis mellifera L.* comercializada en Tegucigalpa, Honduras. [En línea]. Disponible en : <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1524/1/AGI-2002-T021.pdf> [Último acceso: 13 de marzo de 2019]
35. Lucio, J., (2012). *Aplicación de métodos quimiométricos para la caracterización y control de calidad de plantas medicinales*, (Tesis de Doctorado), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.
36. Magaña, M., Moguel, Y., Sanginés, J., y Leyva C. (2012). Estructura e importancia de la cadena productiva y comercial de la miel en México, *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 3(1), 49-64. Recuperado en 18 de julio de 2018, de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242012000100004&lng=es&tlng=es.
37. Mathias-Rettig, K., Ah-Hen, K. (2014). El color en los alimentos un criterio de calidad medible, *Agro Sur*, 42(2), 39-48.
38. Miel de abeja, (2015, Febrero), *Revista del Consumidor*. Recuperado de : https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/100347/RC456_Estudio_Calidad_de_Miel_de_Abejas.pdf
39. Missio, P., Gauche, C., Valdemiro, L., Oliveira, A., Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity, *Food chemistry*, 196, 309-323.

40. Moreira, R., Maria, C., Pietroluongo, M., y Trugo, C. (2010). Chemical changes in the volatile fractions of Brazilian honeys during storage under tropical conditions, *Food Chemistry*, 121, 697–704.
41. Musharraf, S., Fatima, S., Siddiqui, A., Iqbal- Choudhary, M., Rahman, A., (2016). ¹H-NMR fingerprinting of brown rice syrup as a common adulterant in honey, *Royal Society of Chemistry*, 8, 6444-645.
42. Norma Oficial Mexicana NMX-F-036-NORMEX-2006, Miel de abeja, Especificaciones.
43. Norma Oficial Mexicana NOM-145-SCFI-2001, Información comercial-Etiquetado de miel en sus diferentes presentaciones [Modificación publicada en el DOF el 5 de agosto de 2009].
44. Olaxode, E., Tandlich, R., Cambray, G. (2018). H-NMR Profiling and Chemometric Analysis of Selected Honeys from South Africa, Zambia, and Slovakia, *Molecules*, 23(578), 1-19.
45. Resumen nacional agroalimentario (2019). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Recuperado el 2 de febrero de 2019, de: http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecResumen.jsp
46. Rivas, C. (2014). *Desarrollo del perfil sensorial del pulque muestras: Tradicionales y experimentales*, (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
47. SAGARPA (2012). Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Miel, 1-40.
48. SAGARPA (2012). Manual de Buenas Prácticas en el Manejo y Envasado de la Miel, 1-90.
49. Santos-Buelga C., González-Paramás AM (2017). "Composición química de la miel". En: Alvarez-Suarez J. (eds) *Productos para la abeja - Propiedades químicas y biológicas* (pp. 42-82). Ecuador, Quito: Springer.

50. Schievano, E., Stocchero, M., Morelato, E., Facchin C., Mammi S., (2012). An NMR-based metabolomic approach to identify the botanical origin of honey, *Metabolomics*, 8, 679-690.
51. Shapla, U., Solayman, Md., Alam, N., Ibrahim-Khalil, Md., Huang, S., (2018). 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health, *Chemistry Central Journal*, 12 (35).
52. Schencke, C., Vásquez, B., Sandoval, C., y Del Sol, M. (2016). El Rol de la Miel en los Procesos Morfofisiológicos de Reparación de Heridas, *International Journal of Morphology*, 34(1), 385-395.
53. Schneiter, E., Haag, M., Yurvik, G. (2015). Miel: Beneficios, propiedades y usos. *Instituto Nacional de Tecnología Industrial*, 1-15. Recuperado el 11 de enero de 2019 de: https://www.inti.gov.ar/apitec/pdf/MaterialPromocion/folletos/06-Cuadernillo_apicultor_webMielBeneficiosPropiedadesyUsos.pdf
54. Schwarzingher, S., Bachert, W., Igel C., Brayer, F., Rösch, P., (2014). Rapid authenticity testing for honey with NMR spectroscopy and consequences for sample preparation, *Food & Analysis*, (5), 36-43.
55. Shlens, J. (2009) *A tutorial on principal component analysis*. center for neural science, New York University. Pp 1-5.
56. Souza, P., Rocha, L., Abreu, M. (2016). Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods, *Talanta*, 149, 124-141.
57. Spiteri M., Jamin, E., Thomas, F., Rebours, A., Lees, M., Rogers, K., Rutledge D., (2015). Fast and global authenticity screening of honey using ¹H-NMR profiling, *Food Chemistry*, 189, 60-66.
58. Stewart, Tabori, Chang, (2011), *The beekeeper's bible*, Nueva York, USA, Abrams, 7.

59. Truzzi, C., Annibaldi, A., Illuminati, S., Finale, C., y Scarponi, G. (2014). Determination of proline in honey: Comparison between official methods, optimization and validation of the analytical methodology, *Food Chemistry*, 150, 477-48.
60. Ulloa, J., A., Mondragón, P., M., Rodríguez, R., Reséndiz, J., A., Rosas, P. (2010). La miel de abeja y su importancia, *Revista Fuente*, 2(4), 11-18.
61. Vit, P., Uddin, P., Zuccato, V., Maza, F., Schievano, E. (2015). Entomological Origin of Honey Discriminated by NMR Chloroform Extracts in Ecuadorian Honey, *International Scholarly and Scientific Research & Innovation*, 9(5), 494-497.
62. Won, S. A., Li, C., Kim, J. y Rhee, H. (2009). Immunological characterization of honey major protein and its application, *Food Chemistry*, 113, 1334-1338.