



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Estudio de mieles de abejas *Apis melífera* y melipona por Resonancia Magnética Nuclear y métodos quimiométricos de clasificación.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA
JOSHUA ZUÑIGA GOMEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO , 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: EDUARDO RODRIGUEZ DE SAN MIGUEL GUERRERO

VOCAL: NURIA ESTURAU ESCOFET

SECRETARIO: ITZEL ALONSO VANEGAS

1er. SUPLENTE: ELIZABETH REYES LOPEZ

2° SUPLENTE: TANIA ROJO PORTILLO

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO UNIVERSITARIO
DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR, INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM**

ASESOR DEL TEMA: DRA. NURIA ESTURAU ESCOFET

SUPERVISOR TÉCNICO: DR. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ

SUSTENTANTE (S): JOSHUA ZUÑIGA GOMEZ

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar mis estudios de Licenciatura como Químico de Alimentos, así como también por darme la oportunidad de adquirir una amplia gama de conocimientos en las ciencias químicas.

A la Dra. Nuria Esturau Escofet y al Dr. José Fausto Rivero Cruz por su apoyo, asesoría y el tiempo brindado para la realización de este proyecto de investigación, sin ustedes este proyecto no se habría llevado a cabo.

Al Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear (LURMN) por el registro y análisis de los espectros de resonancia presentados en este trabajo.

A la Dra. Beatriz Quiroz García por su apoyo en la adquisición de los espectros y las asesorías brindadas.

Al proyecto “Plataforma nacional de Metabolómica en espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)-OMICS para la solución de problemas nacionales del sector Agroalimentario SAGARPA-2017-6-292836” por los recursos para realizar los análisis.

Al jurado por el tiempo otorgado para la revisión de esta investigación.

ÍNDICE	
1	INTRODUCCIÓN..... 1
2	OBJETIVOS E HIPÓTESIS..... 3
2.1	OBJETIVO GENERAL 3
2.2	OBJETIVOS PARTICULARES 3
2.3	HIPÓTESIS..... 3
3	ANTECEDENTES 4
3.1	MIEL Y TIPOS DE ABEJAS 4
3.1.1	<i>APIS MELLIFERA</i> 4
3.1.2	MELIPONAS..... 5
3.2	REGIONES APÍCOLAS DE MÉXICO 5
3.3	COMPOSICIÓN DE LA MIEL DE <i>APIS MELLIFERA</i> 7
3.4	COMPOSICIÓN DE LA MIEL DE MELIPONAS 9
3.5	PARÁMETROS DE CALIDAD PARA MIEL DE <i>APIS MELLIFERA</i> 10
3.6	PARÁMETROS DE CALIDAD PARA MIEL DE MELIPONAS 10
3.7	METABOLÓMICA 11
3.8	ESPECTROSCOPIA DE RMN 12
3.9	QUIMIOMETRÍA..... 15
3.9.1	ANÁLISIS ESTADÍSTICO MONOVARIANTE 15
3.9.2	ANÁLISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIANTE..... 16
3.10	ESTUDIOS DE METABOLOMICA APLICADA A LA MIEL 17
3.11	PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y EXPERIMENTOS DE RMN 18
4	METODOLOGÍA..... 20
4.1	MUESTRAS DE MIEL 20
4.1.1	PREPARACION DE LAS MUESTRAS 22
4.1.2	ADQUISICIÓN DE ESPECTROS..... 22
4.1.3	PROCESAMIENTO DE ESPECTROS 23
4.2	PREPROCESAMIENTO PARA ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO 23
4.3	ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO 23
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 24
5.1	ESPECTROS DE PROTON 24
5.2	ESPECTROS J-RESUELTO 27
5.3	MODELO QUIMIOMÉTRICO 28
5.3.1	ANÁLISIS DEL MODELO QUIMIOMÉTRICO 28
6	CONCLUSIONES..... 38
7	BIBLIOGRAFÍA..... 40

1 INTRODUCCIÓN

La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica analítica muy robusta, versátil, rápida y no destructiva. En general, la RMN es la herramienta más poderosa para la determinación estructural de las moléculas orgánicas, pero en los últimos años su aplicación para el análisis de diversos productos como los del sector agroalimentario, junto con la más reciente de las tecnologías ómicas, la Metabolómica, ha abierto nuevas perspectivas, permitiendo cambiar e incrementar los objetivos en los estudios para obtener por ejemplo “el perfil espectral” o “la huella dactilar” de un producto, lo que es una imagen completa de su composición. A nivel mundial existen muchas aplicaciones de esta metodología, tanto en el mundo académico como en el industrial e incluso a nivel regulatorio, aplicada al estudio de productos del sector agroalimentario con diversos enfoques, como son: análisis de sus componentes, evaluación de la calidad, determinación de origen, detección de adulteraciones, estimación de la autenticidad, control y monitorización de procesos, etc.

En la presente Tesis se aplicará la RMN para el estudio de miel, que de acuerdo con la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), México ocupa el sexto lugar a nivel mundial en producción de miel y el tercero en exportación,¹ por lo que hoy en día las técnicas para detectar el origen y las posibles adulteraciones se está volviendo un tema prioritario en nuestro país.

En el mundo existen más de 20,000 especies de abejas de diferentes tamaños, hábitos de nidificación, comportamiento y niveles de sociabilidad. Un tipo de abeja que no tiene aguijón son las meliponas que han sido criadas por culturas indígenas en las zonas tropicales y subtropicales del planeta. El cultivo de meliponarios es una tradición milenaria que se ha seguido realizando hasta nuestros días, tal es el caso del uso de productos de la especie *Melipona beecheii* en la medicina tradicional maya.²

Debido a la importancia de la producción de las mieles de meliponas (muy especial y apreciada por las cualidades curativas y nutricionales que se le atribuyen) y al alto costo, la comercialización de productos adulterados se ha incrementado de forma importante, tanto en México como en otros países latinoamericanos.

El presente trabajo se enfoca hacia la comparación de la miel producida por la abeja europea *Apis mellifera* y la abeja sin aguijón de la especie *Scaptotrigona mexicana*, que corresponde a la familia de las meliponas. Se evaluaron 80 muestras de miel de las dos especies de abeja, algunas obtenidas directamente de los apicultores y otras comercialmente. Es muy importante recalcar que el estudio se realizó con muestras comerciales y con muestras cuya información fue dada de buena fe por los apicultores. Primero, se investigó la aplicación de las huellas dactilares de $^1\text{H-RMN}$ para mieles siguiendo alguna de las metodologías existentes en la literatura, evaluando los aspectos prácticos que se deben tener en cuenta, como la preparación de la muestra, la adquisición de los espectros, su posterior procesado, etc. y posteriormente se emplearon herramientas estadísticas para la evaluación e interpretación de la información de los espectros. El objetivo final fue realizar la clasificación de las mieles por especie de abeja (con aguijón y sin aguijón).

Cabe mencionar que este trabajo, es el inicio de un proyecto que tiene el objetivo crear una base de datos de huellas dactilares de $^1\text{H-RMN}$ para mieles de México con el fin de autentificar la miel, detectando la adulteración, y para el control de calidad.

2 OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Obtener las huellas dactilares de ^1H -RMN de muestras de miel producidas por abejas *Apis mellifera* y *Scaptotrigona mexicana* en diferentes regiones apícolas de México, para poder evaluar diferencias o similitudes de las mieles utilizando herramientas estadísticas multivariadas.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Seleccionar el método de preparación de las muestras.
- 2) Adquirir y procesar los espectros de RMN (Protón con presaturación de la señal del agua y proyección 1D de J-resuelto).
- 3) Analizar y comparar el perfil espectral de las mieles producidas por abejas *Apis mellifera* y *Scaptotrigona mexicana*.
- 4) Preprocesar los espectros para la aplicación de métodos quimiométricos (alineación, normalización, binning, etc.)
- 5) Realizar el análisis de los datos utilizando métodos quimiométricos (PCA, PLS-DA, etc.) para discernir si existe diferencia entre las muestras por especie de abeja.

2.3 HIPÓTESIS

Dado que la miel producida por las abejas *Apis mellifera* y *Scaptotrigona mexicana* tienen composición diferente, el estudio de los espectros de ^1H -RMN en conjunto con la aplicación de herramientas estadísticas multivariadas permitirá diferenciar las mieles producidas por ambos tipos de abejas.

3 ANTECEDENTES

3.1 MIEL Y TIPOS DE ABEJAS

De acuerdo al CODEX alimentarius, organismo encargado de normalizar distintos productos alimenticios, la miel es la sustancia natural dulce producida por abejas melíferas a partir del néctar de plantas o de secreciones de las partes vivas de las plantas. Estas abejas, recolectan, transforman y combinan dichas sustancias que después son depositadas, deshidratadas, almacenadas y dejadas en un panal para que maduren.³

La miel de abeja es un producto natural de alto valor nutricional, es producida por distintas especies de abejas con aguijón (*Apis mellifera*) y sin aguijón (abejas de la subfamilia Meliponini de las cuales se derivan otras subespecies).⁴

3.1.1 APIS MELLIFERA

Las abejas del género *Apis mellifera* (*A. mellifera*) son insectos de la familia Himenóptera, es la especie de abeja con mayor distribución en el mundo. Llegó junto con los españoles a América, es conocida como abeja europea, abeja doméstica o abeja melífera. Existen diversas especies de abejas del género *Apis*, tales como *A. mellifera mellifera*, *A. mellifera carnica*, *A. mellifera caucásica* y *A. mellifera ligustica* entre muchas otras.⁵



Figura 1. Celdas de miel construídas por *Apis mellifera* (MVZ. Ángel Lopez)

3.1.2 MELIPONAS

Las abejas meliponas son abejas sin aguijón de la familia *Meliponini* (Figura 2) habitan en las regiones tropicales y subtropicales de América, Asia, África y Australia. En México, las culturas mesoamericanas lograron cultivar diversas variedades de abejas de esta especie (melipona y trigona), naciendo la meliponicultura, la cual es la actividad dedicada a la explotación de la abeja Melipona, siendo esta una actividad ancestral de los antiguos mayas.⁶

Existen aproximadamente 400 diferentes especies de abejas sin aguijón en el Continente Americano. En México se han encontrado 46 especies, de las cuales el 30.4 % son especies endémicas. De estas especies destacan *Melipona beecheii* (Península de Yucatán), *Scaptotrigona mexicana* (Golfo y Centro de México) y *Scaptotrigona hellwegeri* (Guerrero).⁷

Las abejas meliponas pueden ser utilizadas con gran facilidad como polinizadoras de distintos cultivos, ya que por su gran docilidad son fáciles de manejar y pueden ser utilizadas para la agricultura de traspatio.



Figura 2. Enjambre de *Scaptotrigona mexicana* (M. en C. Jorge Jiménez)

3.2 REGIONES APÍCOLAS DE MÉXICO

México es un país caracterizado por tener un clima privilegiado debido a su geografía, tiene una gran diversidad de vegetación con un gran contraste, como por ejemplo bosques de coníferas y pastizales. Dependiendo del clima, suelo, vegetación predominante y de las características generales de los sistemas de

producción empleados, México se divide en cinco regiones apícolas (Figura 3), las cuales son:⁵

- **REGIÓN DEL NORTE:** Es la región con mayor extensión, aproximadamente 930,000 km², la vegetación es de tipo Xerófila, con grandes áreas de pastizal, bosque espinoso y de coníferas.
- **REGIÓN CENTRAL:** Está comprendida en la “meseta central”, entre la sierra madre Occidental y la Oriental, limitando al sur con el eje Volcánico Transversal. Presenta una superficie aproximada de 390,000 Km² y se puede encontrar una vegetación predominante de tipo matorral xerófilo, bosque espinoso, pastizal, bosque de coníferas y de encinos, así como también bosque tropical caducifolio. Dentro de esta región se tienen dos épocas de floración que abarcan prácticamente todo el año.
- **REGIÓN DEL PACÍFICO:** Está comprendida desde la vertiente de la Sierra Madre Occidental hasta el Océano Pacífico, y desde el estado de Sinaloa hasta la frontera con Guatemala. Presenta una superficie de 260,000 Km² con una vegetación predominante de bosques tropicales caducifolios, así como también subcaducifolios. Además, también se encuentran zonas con bosques espinosos y en áreas de mayor altitud llega a tener bosques de coníferas y encinos; siendo esta una región muy favorable para la explotación de las abejas. Una de las épocas de floración más importante inicia al terminar la temporada de lluvias de otoño y la otra es en primavera.
- **REGIÓN DEL GOLFO DE MÉXICO:** Esta región se encuentra comprendida desde la vertiente de la Sierra Madre Oriental hasta la costa del Golfo de México, ocupando un área de 250,000 Km². La vegetación predominante en dicha región son bosques tropicales perennifolios, bosques tropicales caducifolios y en el extremo norte con vegetación xerófila y bosques espinosos. Las cosechas de miel corresponden a noviembre y en el periodo de abril a junio, dentro de esta región aparecen mieles especiales como la de naranjo.

- **REGIÓN DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN:** La región comprende los estados de Yucatán, Campeche y Quintana Roo, la cual abarca una superficie de 140,000 Km². En el noreste predomina una vegetación de bosques tropicales caducifolios y subcaducifolios, en la región sur y este presenta bosques tropicales perennifolios. Es considerada la región productora de miel más importante del país, ya que las floraciones ocurren de manera consecutiva en el periodo comprendido entre noviembre a julio de cada año, siendo la región de mayor floración del país.



Figura 3. Mapa de Regiones apícolas en México (Correa y Guzmán, 2013)

3.3 COMPOSICIÓN DE LA MIEL DE *APIS MELLIFERA*

La composición de todas las mieles está relacionada de manera directa a su origen geográfico y botánico, la especie de la abeja productora y el origen floral del néctar recolectado. Éste último se ve afectado por factores extrínsecos tales como el clima, procesamiento y almacenamiento, los cuales le confieren a la miel ciertas propiedades fisicoquímicas, típicas del origen botánico de las plantas de las cuales procede.⁸

La composición de la miel de *Apis* consiste en distintas proporciones de azúcares, agua, aminoácidos, aceites, minerales y enzimas, siendo los azúcares los principales componentes.⁹ Los principales azúcares encontrados en la miel son: glucosa y fructosa (en mayor proporción), manosa, palatinosa, sacarosa, maltosa, kojibiosa, entre otros. Con respecto a la sacarosa, su concentración tiende a

disminuir debido a la acción de la enzima invertasa presente en la miel, la cual hidroliza la sacarosa dando paso a una mezcla de fructosa-glucosa.¹⁰

Debido al tratamiento térmico de la miel, pueden aparecer algunos compuestos de degradación no enzimática como el 5-(hidroximetil)furfural o 5-HMF, el alcohol furfurílico y el furfural, los cuales indican la pérdida de frescura debido a la exposición a altas temperaturas.¹⁰ También se ha encontrado que algunos otros compuestos como 2-acetilfurano, isomaltol y maltol aparecen con la degradación de la miel.^{10,11} En conjunto, todos estos compuestos dan como resultado un cambio de sabor, aroma y color del producto.

Las proteínas y aminoácidos presentes en la miel son producto de secreciones glandulares del néctar floral y “buche” de las abejas. El principal aminoácido en la miel es la prolina, la cual representa entre un 50% y 85% del total de aminoácidos, también se encuentran otros aminoácidos como ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina, histidina, glicina, treonina, alanina, arginina, tirosina, valina, metionina, cisteína, isoleucina, leucina, triptófano, fenilalanina, lisina y asparagina.¹⁰ La concentración de prolina es utilizada como método de evaluación de la madurez de la miel, la cual debe tener una concentración de 180 mg/Kg aproximadamente.¹⁰

Los ácidos orgánicos corresponden al 0.57 % de la composición de la miel y son los responsables de conferirle su acidez característica, algunos de estos ácidos son ácido aspártico, ácido butírico, cítrico, acético, fórmico, fumárico, galacturónico, fórmico, glucónico, glutámico, láctico, málico, malónico, propiónico, pirúvico, quínico, succínico, tartárico, oxálico, entre otros. La concentración de estos ácidos se utiliza como parámetro para diferenciar mieles de polen y de melaza.¹⁰

Por otra parte, los compuestos flavonoides, vitaminas y minerales dentro de la miel, se presentan en distintas concentraciones dependiendo de diversos factores. Los compuestos fenólicos, antioxidantes naturales, (especialmente flavonoides) constituyen un grupo importante por sus propiedades funcionales y su importancia terapéutica.^{8,10}

3.4 COMPOSICIÓN DE LA MIEL DE MELIPONAS

En cuanto a la composición la miel de meliponas las diferencias más relevantes con respecto a la composición de la miel de *A. mellifera* son que tiene altos valores de contenido de agua, acidez libre, conductividad eléctrica, maltosa y nitrógeno, así como bajos valores de diastasa.² Una de las características más importantes es su contenido de humedad, que en mieles de meliponas su valor máximo es de 30 %. Este valor se encuentra por encima de lo indicado en el CODEX STAN 12-1981, donde se especifica un valor máximo de 20% para la miel de *A. mellifera*.

Los azúcares y el agua son los componentes principales en la miel de melipona (>95%); entre los azúcares se encuentran la fructosa (38 %) y la glucosa (31 %). Las proteínas y aminoácidos representan aproximadamente un 0.5 %, entre los aminoácidos tenemos presentes prolina, lisina, ácido glutámico y ácido aspártico así como también enzimas como invertasa, amilasa y glucosidasa.² Debido a que la miel de melipona tiene una mayor concentración de ácidos orgánicos y porcentaje de agua en las muestras le confiere presenta una mayor acidez que la miel de *A. mellifera*.

A continuación en la Tabla 1 se comparan algunos de los principales componentes de miel de abejas sin aguijón y *A. mellifera*, donde se pueden comparar la concentración promedio de estos componentes de una y otra especie.

Tabla 1. Comparación de componentes de miel de abejas sin aguijón y *A. mellifera*

Abejas sin aguijón		<i>Apis mellifera</i>
Componente	Valor promedio (%)	Valor promedio (%)
Agua	20-25	15-20
Azúcares	60-69	80-82
Aminoácidos	0.7-0.8	0.2-1.6
Acidez libre	70 (meq/100g)	40 (meq/100g)

3.5 PARÁMETROS DE CALIDAD PARA MIEL DE *APIS MELLIFERA*

Los requisitos de control de calidad de la miel *A. Mellifera* se encuentran en el CODEX STAN 12-1981, el cual es parte del CODEX alimentarius.³ Dentro de esta norma se indica que no se debe adicionar a la miel ningún tipo de ingrediente o aditivo y no debe contener ningún aroma, sabor, o color que haya sido absorbido durante su proceso o almacenamiento. Además, no debe fermentarse o estar en efervescencia. Ningún tipo de polen o compuesto particular de la miel debe ser extraído, a no ser que sea un constituyente que no se puede evitar remover durante el proceso de retiro de componentes inorgánicos y materia extraña. Por otra parte, la miel no debe ser calentada ni procesada más allá de lo necesario para evitar que su composición y calidad se vean afectadas.

La miel debe tener la más alta pureza y la menor alteración posible. Algunos de los parámetros que se miden para verificar su calidad son humedad (20 %), contenido de azúcares considerando la suma de glucosa y fructosa (no menos de 60 g/100 g para mieles normales y no menor a 45 g/100 g para mieles de melaza y mezclas de pólenes), sacarosa (no más de 5 g/100 g), acidez libre (50 meq/1000 g), 5-HMF (no debe ser mayor de 40 mg/Kg y en caso de proceder de países con un ambiente tropical o ser una mezcla no deberá tener una concentración mayor a 80 mg/Kg).

En México existen regulaciones para la miel que se manufactura en el país y es vendida, dichas normas son la NOM-145-SCFI-2001 y se complementa con la NMX-F-036-981, actualmente existe un proyecto de norma para una nueva regulación de estos productos.

3.6 PARÁMETROS DE CALIDAD PARA MIEL DE MELIPONAS

En la actualidad no existe una norma en la cual se indiquen los parámetros de calidad de la miel de meliponas, pues el CODEX alimentarius y la Norma Oficial Mexicana (NOM-145-SCFI-2001) para miel basan su información en parámetros fisicoquímicos correspondientes a la especie de *A. mellifera*. Existen estudios en los cuales se han sugerido parámetros de calidad para la miel de meliponas (ver

Tabla 2). En comparación con la miel producida por *A. mellifera*, las diferencias más representativas con la de meliponas son los altos valores del contenido de agua, acidez libre y sacarosa, así como también los valores de actividad diastásica, cenizas y HMF.¹²

Tabla 2. Composición estándar sugerida para miel de abejas sin aguijón comparado contra miel de *Apis* del CODEX Alimentarius. ^{12,13}

Composición de la miel	Estándares			
	<i>A. mellifera</i>	<i>Melipona</i>	<i>Scaptotrigona</i>	<i>Trigona</i>
Contenido de agua (g/100 g)	máx. 20.0	máx. 30.0	máx. 30.0	máx. 30.0
Azúcares reductores (g/100 g)	min 65.0	min 50.0	min 50.0	min 50.0
Sacarosa (g/100 g)	máx. 5.0	máx. 6.0	máx. 2.0	máx. 6.0
Acidez libre (meq/100 g)	máx. 40.0	máx. 70.0	máx. 85.0	máx. 75.0
Cenizas (g/100 g)	máx. 0.5	máx. 0.5	máx. 0.5	máx. 0.5
HMF (mg/Kg)	máx. 40.0	máx. 40.0	máx. 40.0	máx. 40.0
Actividad diastásica (DN)	min 8.0	min 3.0	min 3.0	min 7.0

3.7 METABOLÓMICA

La metabolómica es un área de estudio correspondiente al grupo de las ciencias “ómicas” (que incluyen a la genómica, transcriptómica y proteómica), que estudia los cambios globales en el metabolismo de las células, tejidos, órganos y organismos. La metabolómica puede ser utilizada en diversas áreas, por ejemplo, puede ser aplicada en alimentos y farmacia (el número de metabolitos identificados dependerá del sistema en estudio).

La aplicación de la metabolómica en sistemas alimentarios es conocida como “foodomics” (metabolómica de alimentos), que puede ser aplicada a todos los procesos de sistemas alimentarios, incluyendo la producción de recursos alimentarios, procesamiento de alimentos y alimentos consumidos por humanos.¹⁴

Existen diferentes plataformas analíticas para realizar estudios de metabolómica, las dos principales son la espectrometría de masas (EM) y la RMN, las cuales son complementarias y no intercambiables. Aunque la EM es más sensible, la RMN

tiene las ventajas de que no es destructiva, es rápida y permite identificar y cuantificar el conjunto de metabolitos en un solo análisis.¹¹

3.8 ESPECTROSCOPIA DE RMN

La RMN, es una de las técnicas más poderosas utilizada para elucidar estructuras de moléculas, principalmente moléculas orgánicas. La técnica ha llegado a convertirse en una herramienta muy útil, primero en campos como la física y la química, y más recientemente en otros como la biología molecular, la medicina o la bioquímica.

La RMN estudia el comportamiento de ciertos núcleos atómicos (aquellos que poseen spin nuclear distinto de cero) en presencia de un campo magnético externo. El campo magnético produce un desdoblamiento de los niveles de energía del spin nuclear, de modo que pueden inducirse transiciones entre ellos como consecuencia de la absorción de una radiofrecuencia a la frecuencia adecuada.

En ausencia de campo magnético, los espines nucleares se orientan al azar, pero con la presencia de un campo magnético (B_0), los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo (en un estado de mínima energía denominado estado de espín α), mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético (en un estado de mayor energía denominado estado de espín β). El número de núcleos en cada estado sigue la distribución de Boltzmann:

$$\frac{N_{\beta}}{N_{\alpha}} = E^{-\Delta E/k_B T}$$

dónde:

N_{β} = Número de núcleos en el nivel alto

N_{α} = Número de núcleos en el nivel bajo

k_B = Constante de Boltzmann

T = Temperatura en K

La diferencia de energía entre los dos estados de espín α y β , depende de la fuerza del campo magnético aplicado B_0 . Cuanto mayor sea el campo magnético, mayor diferencia energética habrá entre los dos estados de espín.

La diferencia de energía, ΔE , entre los estados α y β es:

$$\Delta E = (h \gamma B_0) / 2 \pi$$

La “resonancia” entre los dos estados se consigue aplicando una radiación electromagnética (generalmente en la región de las radiofrecuencias, MHz) que tenga exactamente el valor de energía ΔE . Dado que la energía de un fotón es $E=h\nu$, donde ν es su frecuencia, la frecuencia de la radiación electromagnética requerida para producir resonancia de un determinado núcleo en un campo magnético B_0 es:

$$\nu = \gamma B_0 / 2\pi$$

Esta frecuencia de resonancia ν se conoce como frecuencia de Larmor y es la que provoca que los núcleos pasen a un nivel energético mayor, sacarlos de su estado de equilibrio, y permite observar la señal que generan al volver a su estado de equilibrio, dando lo que se conoce como un espectro de RMN.

Las partes esenciales de un espectrómetro de RMN se muestran en la Figura 4 y son:

- Imán superconductor el cual debe generar el campo magnético B_0 estable para poder orientar el espín nuclear.
- Transmisor de radiofrecuencia, el cual debe emitir la radiación de radiofrecuencia precisa, para la excitación de los núcleos.
- Detector, el cual permite medir la absorción de energía de radiofrecuencia de la muestra.
- Computadora, la cual permite controlar el sistema de procesamiento de la señal a través de un programa.

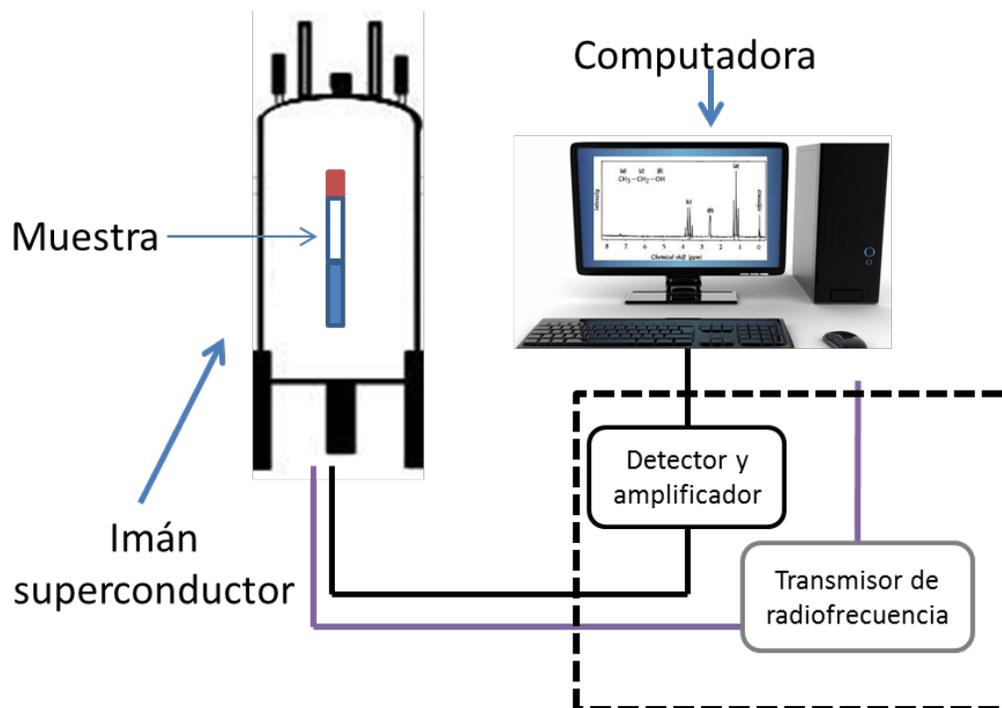


Figura 4. Partes esenciales de un espectrómetro de RMN.

Uno de los núcleos más estudiados en RMN es el protón, ^1H , ya que es muy abundante. La radiofrecuencia que absorbe un núcleo determinado se ve fuertemente afectada por el entorno químico, es decir por los núcleos y electrones vecinos. El fenómeno conocido como *desplazamiento químico*, corresponde a las diferencias existentes en la frecuencia de absorción del protón estudiado debido a su entorno, es decir a los núcleos a los cuales se encuentra unido. El desplazamiento químico se utiliza para identificar grupos funcionales (se debe tener en cuenta que los valores exactos de desplazamiento químico dependen de la naturaleza del solvente, así como de la concentración del soluto). Otro efecto secundario del entorno se denomina desdoblamiento *spin-spin*, que genera una separación de las señales (en Hz y se representa por una constante J , denominada constante de acoplamiento) cuyo fenómeno es conocida como multiplicidad, que es producto de la interacción con los protones de los grupos adyacentes al protón estudiado.

Uno de los principales obstáculos para la visualización de los metabolitos en los espectros de RMN en muestras acuosas es la intensa señal del agua, una forma

de lograr disminuir la intensidad de dicha señal es la utilización de alguna secuencia de pulsos para suprimir dicha señal. Una de las más utilizadas en RMN es la secuencia de pulsos con presaturación de agua: *1D NOESY-presat (One Dimensional Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy with Presaturation)*.¹⁵

Por otro lado, existe una secuencia de pulsos conocida como J-resuelto, la cual se basa en la transformación de un espectro 2D J-resuelto a un espectro 1D de protón homodesacoplado, donde puede ser posible la separación del desplazamiento químico y las *J* de acoplamiento, simplificando las señales a singuletes, lo cual es útil para obtener información en el análisis de muestras complejas.¹⁶

3.9 QUIMIOMETRÍA

El término de quimiometría nació en 1972 por Svante Wold y Bruce R. Kowalski, y es la disciplina de la química que utiliza matemáticas y estadística para obtener la mayor cantidad de información relevante de datos químicos. El uso de la quimiometría para el análisis de datos de espectroscopía de RMN fue probada a inicios de la década de 1980 y demostró ser de gran utilidad, ya que la cantidad de datos en un espectro de RMN es muy grande.¹⁷

La quimiometría pretende extraer información química multivariada, utilizando las herramientas de la estadística y las matemáticas. Es utilizada principalmente para 3 propósitos principales: exploración de patrones asociados en los datos, para realizar el rastreo de las propiedades de materiales en una base continua y para preparar y usar modelos de clasificación multivariados.¹⁷

Existen distintas técnicas de análisis de datos, como el análisis estadístico monovariante y multivariante.

3.9.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO MONOVARIANTE

La primera parte de un análisis estadístico corresponde a la exploración de los datos, esta parte del análisis estadístico brinda información importante sobre los parámetros estadísticos de cada variable, la correlación entre las variables, y

otros. Entre las posibles metodologías, el análisis de varianza (ANOVA) se utiliza para seleccionar las variables más significativas en la diferenciación de muestras. Es una técnica estadística univariante para probar las hipótesis de que dos o más muestras provienen de la misma población. Esta herramienta no se utiliza para grandes conjuntos de datos (como es el caso de datos espectroscópicos).¹⁷

3.9.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIANTE

A diferencia de los métodos monovariantes, donde solo se considera una variable, en el análisis estadístico multivariante se consideran correlaciones entre varias variables. El análisis estadístico multivariante es ampliamente utilizado debido a que los datos obtenidos de los espectros permiten visualizar el contenido metabólico.

El **análisis por componentes principales** (PCA), es un método no supervisado y es aplicado en química con diferentes finalidades, entre ellas destacan la clasificación de muestras, la reducción en la dimensionalidad de los datos y la identificación de la existencia de alguna agrupación entre un conjunto de datos, siendo este el paso previo de muchos métodos multivariantes de análisis. El método de PCA corresponde, por lo tanto, a un análisis exploratorio de los datos.^{17, 18}

En estadística se utilizan métodos de regresión lineal para poder desarrollar modelos que correlacionen la información de un conjunto de mediciones con la propiedad de interés o variable respuesta. Dos de los modelos más utilizados para la **regresión son Mínimos Cuadrados Parciales** (*Partial Least Squares*, PLS por sus siglas en inglés) y la **Regresión por Componentes Principales** (*Principal Components Regression*, PCR por sus siglas en inglés), los cuales han sido diseñados para evitar los problemas relacionados con el *ruido* en los datos.¹⁸

Por otra parte, existen otros métodos para la interpretación de los datos, los cuales corresponden a métodos de análisis supervisados, que, a diferencia de los métodos de análisis no supervisados, permiten aplicarse en situaciones donde se requiere clasificar a las muestras en categorías previamente definidas. Algunos de los métodos de análisis supervisados más utilizados son: el **Análisis**

Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*, PLS-DA por sus siglas en inglés) y el **Análisis Discriminante de Proyección Ortogonal por Mínimos Cuadrados Parciales** (OPLS-DA, *Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis*, por sus siglas en inglés), este último es una extensión del método PLS con una corrección ortogonal, siendo una herramienta muy poderosa de análisis.^{17, 18}

3.10 ESTUDIOS DE METABOLOMICA APLICADA A LA MIEL

En la Tabla 3 se enlistan en orden cronológico diversos artículos enfocados al estudio de miel mediante RMN, donde se analizan una gran cantidad de información respecto a diferentes factores como: composición, origen geográfico, análisis de calidad, adulteraciones (como la realizada con jarabes de azúcar) y a los métodos de tratamiento de las muestras. La región del espectro de RMN que se estudia comúnmente es de 3 a 6 ppm en donde se observan principalmente los carbohidratos.

Tabla 3. Aplicaciones del estudio por ¹H-RMN y/o ¹³C-RMN de mieles.

Aplicaciones	Año	Ref.
Caracterización de diferentes orígenes florales de miel rumana utilizando HPLC combinado con ¹ H-NMR y ¹³ C-NMR.	2004	19
Análisis para detectar adulteraciones en miel por adición intencional de diferentes concentraciones de azúcares comerciales. Se utiliza RMN de 1D y 2D. Se realiza análisis estadístico multivariante.	2010	20
Detección rápida y exacta de metilglioxal en miel. Se utiliza RMN cuantitativa y se compara con datos obtenidos por LC-UV y LC-MS.	2010	21
Diferenciación de miel de acuerdo con el néctar empleado en su producción. Se caracterizan mieles producidas en el estado de Sao Paulo, por diferentes concentraciones de fenilalanina, tirosina y sacarosa. Realizan análisis estadístico multivariado en ¹ H-RMN.	2012	9
Determinación de polisacáridos en miel mediante RMN, se identifican cerca de 19 polisacáridos, se realiza análisis multivariante con ¹ H-RMN.	2012	22
Se detectan por medio de ¹ H-RMN adulteraciones de miel con jarabe de arroz integral.	2012	23
Desarrollo de métodos para analizar 13 compuestos, entre los cuales se encuentran carbohidratos, ácidos carboxílicos, aminoácidos, etanol y HMF.	2016	24
Estudio de las diferencias en composición y origen de la miel. Se Identifican de metabolitos presentes en muestras en medio acuoso y cloroformo. Se analizan por medio de un análisis multivariante para ¹ H-RMN.	2016	25

Análisis de las diferencias en composición de miel floral de Bashkir de abejas silvestres y domesticadas. ^1H -RMN y ^{13}C -RMN.	2016	26
Análisis de mieles de distintas especies de abejas sin aguijón ecuatorianas, para realizar una discriminación entomológica. Análisis multivariante para ^1H -RMN.	2016	27
Análisis de muestras de distintos orígenes geográficos, identificación de metabolitos (azúcares, aldehídos, cetonas y aminoácidos), origen geográfico y adulteración, utilizando análisis multivariante y PCA.	2016	28
Análisis de marcadores conocidos de miel de manuka (metilglioxal y dihidroxiacetona), para estimar la proporción de miel de manuka en una muestra, así como identificar otros marcadores en las mieles estudiadas.	2016	29

3.11 PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y EXPERIMENTOS DE RMN

En la Tabla 4 se enlistan los artículos en los que realizan investigación de mieles RMN y se especifica el tipo de preparación de muestra que se utilizó. Se revisó la bibliografía y se encontró que existen técnicas de tratamiento de muestras diferentes (extracción clorofórmica y dilución en agua), se decidió seguir la metodología de dilución de agua. Estas metodologías se utilizan para identificar metabolitos no polares (extracción clorofórmica), mientras que en la metodología por dilución en agua se buscaba identificar carbohidratos, principalmente. Las muestras de miel se disuelven en agua deuterada D_2O o $\text{DMSO-}d_6$ y para la extracción clorofórmica se utilizó CDCl_3 para concentrar los compuestos menos polares, como se mencionó anteriormente. En la misma tabla se indica el campo magnético correspondiente al espectrómetro de RMN y el tipo de experimentos realizados en cada artículo.

Tabla 4. Metodología de preparación de muestras para su estudio por ^1H -RMN y/o ^{13}C -RMN de mieles.

Año	Metodología de preparación de las muestras	Campo / Experimentos	Ref.
2008	1 g de miel en 100 mL H_2O . Liofilizar dos alícuotas de 20 mL. Redisolver en 0.6 mL de D_2O o $\text{DMSO-}d_6$.	9.39 T / ^1H , ^{13}C , HMBC	30
2010	200 mg de miel en 600 μL $\text{DMSO-}d_6$. Adicionar una gota de TMS como referencia.	9.39 T / ^1H , HMBC	20
2010	50 mg de miel en 1 mL H_2O , centrifugar. Filtrar 0.2 μL con filtro PTFE. 300 μL filtrado en 60 μL NaN_3 , 60 μL buffer fosfatos con TSP. 180 μL D_2O	11.7 T / ^1H	21
2012	150 mg de miel en 450 μL D_2O y adicionar 50 μL de TSP.	9.39 T / ^1H , ^{13}C , COSY, TOCSY, HMBC, HSQC	9
2012	100 mg de miel en 600 μL D_2O .	11.7 T / ^1H , H-C HSQC	22
2013	0.2 g de miel en 1 mL de D_2O . 0.2 g de miel en 1mL de $\text{DMSO-}d_6$.	9.39 T / ^1H , ^{13}C , HMBC, HSQC, COSY, TOCSY	31
2015	20 g de miel en 15 mL agua. Filtrar con membrana de nylon de 0.45 μm . Diluir a 40% de azúcar con H_2O . Tomar 600 μL y agregar 100 μL TSP con D_2O .	11.74 T / ^1H , NOESY	24
2016	70 mg de miel en 700 μL D_2O .	9.39 T / ^1H , ^{13}C	19
2016	100 mg de miel en 800 μL H_2O ultrapura. Centrifugar a 14000 CGS/1min a 20°C. Filtrar con membranas 3kDa. Tomar 207 μL y agregar 23 μL $\text{DSS-}d_6$.	14.09 T / ^1H	25
2016	30 mg de miel en 0.7 mL de buffer fosfatos. Para el experimento con relajación de agua disolver 20 mg de miel en 0.5 mL agua destilada.	9.39 T, 14.09T / ^1H , ^{13}C , TOCSY	32
2016	100 mg de miel en 400 μL D_2O y adicionar 100 μL de DSS (0.1%)	11.7T / ^1H , ^{13}C , HSQC	23
2017	200 mg de miel en 1 mL de D_2O , transferir 650 μL a un tubo de RMN. Para los extractos con CHCl_3 se utiliza metodología de Schievano, et al ³³ .	14.09T / ^1H	27

4 METODOLOGÍA

4.1 MUESTRAS DE MIEL

En la Tabla 5 se enlistan las muestras de miel analizadas en esta tesis. Las muestras se obtuvieron de distintos apicultores así como de muestras comerciales. Todas fueron proporcionadas por el Dr. José Fausto Rivero Cruz de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Cada muestra de miel se identificó con un código y se conservó a 4°C en los recipientes de plástico o de vidrio en los que fueron proporcionadas por los apicultores. El pH de las muestras estuvo en un intervalo de 3.7-4.2, este dato fue proporcionado por el Dr. Rivero.

Tabla 5. Muestras de miel de distintas regiones de México y orígenes florales.

Código	Lugar Origen	Región apícola	Tipo de miel / Origen Floral	Procedencia	Especie de abeja
M0	Puebla	Central	Multifloral	Apiario	Melipona
M2	Veracruz	Golfo	Monofloral / Flor de Naranja	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M6	San Pablo Oztotepec	Central	Multifloral / Mantequilla	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M7	Acuexcomatl	Central	Multifloral / Mantequilla	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M8	Chihuahua	Norte	Monofloral / Aguacate	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M9	San Juan Ixtayopa	Central	Monofloral / Eucalipto	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M10	Veracruz	Golfo	Monofloral / Flor de Naranja	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M11	Acuexcomatl	Central	Multifloral / Mantequilla	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M12	Acuexcomatl	Central	Multifloral / Mantequilla	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M13	Topilejo	Central	Multifloral / Mantequilla	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M14	Veracruz	Golfo	Multifloral	Apiario	Melipona
M15	Zacatecas	Central	Monofloral / Mezquite	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M17	San Luis Potosí	Central	Monofloral	Comercial	<i>Apis mellifera</i>
M18	N/A	Desconocida	Multifloral	Comercial	Melipona
M19	San Luis Potosí	Central	Multifloral	Comercial	<i>Apis mellifera</i>
M20	Michoacán	Pacífico	Monofloral / Aguacate	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M21	Veracruz	Golfo	Monofloral / Flor de Naranja	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M22	Tabasco	Golfo	Multifloral	Comercial	<i>Apis mellifera</i>
M23	San Luis Potosí	Central	Multifloral	Comercial	<i>Apis mellifera</i>
M24	Puebla	Central	Multifloral	Apiario	Melipona
M26	Milpa Alta	Central	Multifloral / Mantequilla	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M26-2	Milpa Alta	Central	Multifloral / Mantequilla	Apiario	<i>Apis mellifera</i>

M27	Milpa Alta	Central	Multifloral / Mantequilla	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M28	San Pedro Actopan	Central	Multifloral / Mantequilla	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M29	San Pablo Oztotepec	Central	Multifloral / Mantequilla	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M30	Milpa Alta	Central	Multifloral / Mantequilla	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M31	Michoacán	Pacífico	Multifloral / Mantequilla	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M32	Canadá	N/A	Monofloral / Canola	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M33	Michoacán	Norte	Monofloral / Aguacate	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M34	San Pedro Actopan	Central	Multifloral / Mantequilla	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M35	Canadá	N/A	Multifloral	Comercial	<i>Apis mellifera</i>
M36	San Pedro Actopan	Central	Multifloral / Mantequilla	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M38	Milpa Alta	Central	Multifloral / Mantequilla	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M39	Michoacán	Pacífico	Monofloral / Aguacate	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M40	Hidalgo	Central	Multifloral	Comercial	<i>Apis mellifera</i>
M42	Zacatecas	Central	Multifloral / Abeja Silvestre	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M44	Morelos	Central	Multifloral	Comercial	<i>Apis mellifera</i>
M45-1	Zacatlán	Central	Multifloral	Comercial	<i>Apis mellifera</i>
M45-2	Zacatlán	Central	Multifloral	Comercial	<i>Apis mellifera</i>
M45-3	Zacatlán	Central	Multifloral	Comercial	<i>Apis mellifera</i>
M46-1	Milpa Alta	Central	Multifloral / Mantequilla	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M46-2	Milpa Alta	Central	Multifloral / Mantequilla	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M48	Puebla	Central	Multifloral / Mantequilla	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M49	Zacatecas	Central	Monofloral / Mezquite	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M51	Veracruz	Golfo	Monofloral / Naranja	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M50	Yucatán	Península	Multifloral	Comercial	<i>Apis mellifera</i>
M52	Michoacán	Pacífico	Monofloral / Aguacate	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M37	Hidalgo	Central	Multifloral / Mantequilla	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M28-1	Milpa Alta	Central	Multifloral / Mantequilla	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M28-2	Milpa Alta	Central	Multifloral / Mantequilla	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M43	Milpa Alta	Central	Multifloral / Mantequilla	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M38-2	Milpa Alta	Central	Multifloral / Mantequilla	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M26-3	Milpa Alta	Central	Multifloral / Mantequilla	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M41-1	Milpa Alta	Central	Multifloral / Mantequilla	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M41-2	Milpa Alta	Central	Multifloral / Mantequilla	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
M47	Toluca	Central	Multifloral	Apiario	<i>Apis mellifera</i>
P1	Cuetzalan, Puebla	Central	Multifloral	Apiario	Melipona
P2	Cuetzalan, Puebla	Central	Multifloral	Apiario	Melipona
P3	Cuetzalan, Puebla	Central	Multifloral	Apiario	Melipona
P4	Cuetzalan, Puebla	Central	Multifloral	Apiario	Melipona
P5	Cuetzalan, Puebla	Central	Multifloral	Apiario	Melipona

P6	Cuetzalan, Puebla	Central	Multifloral	Apiario	Melipona
P7	Cuetzalan, Puebla	Central	Multifloral	Apiario	Melipona
P8	Cuetzalan, Puebla	Central	Multifloral	Apiario	Melipona
P9	Cuetzalan, Puebla	Central	Multifloral	Apiario	Melipona
P10	Cuetzalan, Puebla	Central	Multifloral	Apiario	Melipona
P11	Cuetzalan, Puebla	Central	Multifloral	Apiario	Melipona
P12	Cuetzalan, Puebla	Central	Multifloral	Apiario	Melipona
P13	Cuetzalan, Puebla	Central	Multifloral	Apiario	Melipona
P14	Cuetzalan, Puebla	Central	Multifloral	Apiario	Melipona
P15	Cuetzalan, Puebla	Central	Multifloral	Apiario	Melipona
P16	Cuetzalan, Puebla	Central	Multifloral	Apiario	Melipona
P17	Cuetzalan, Puebla	Central	Multifloral	Apiario	Melipona
P18	Cuetzalan, Puebla	Central	Multifloral	Apiario	Melipona
P19	Cuetzalan, Puebla	Central	Multifloral	Apiario	Melipona
P20	Cuetzalan, Puebla	Central	Multifloral	Apiario	Melipona
P21	Cuetzalan, Puebla	Central	Multifloral	Apiario	Melipona
P22	Cuetzalan, Puebla	Central	Multifloral	Apiario	Melipona
P23	Cuetzalan, Puebla	Central	Multifloral	Apiario	Melipona
P24	Cuetzalan, Puebla	Central	Multifloral	Apiario	Melipona

4.1.1 PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Las 80 muestras de miel fueron preparadas el mismo día de su adquisición. Para el análisis por RMN se pesaron 0.2 ± 0.025 g de cada muestra de miel en viales de 4 mL. Se disolvieron en 600 μ L de agua deuterada con TSP como estándar interno con un Vortex (aproximadamente por 10 minutos). Se trasvasó el total de la disolución a un tubo de RMN de 9 pulgadas y 5 mm de diámetro con calidad para equipo de RMN de 700 MHz.

4.1.2 ADQUISICIÓN DE ESPECTROS

Los espectros fueron adquiridos a 25°C en un espectrómetro *Bruker Avance III* de 16.44 Teslas (700 MHz para ^1H) equipado con una criosonda TCI y un muestreador automático *Sample Jet*. Para el experimento de ^1H con supresión de agua se seleccionó la secuencia de la biblioteca de *Bruker 1D-NOESY* con pre-saturación, se adquirieron un total de 128 scans, con un tiempo de espera de 2 s. Para el experimento J-resuelto se adquirieron un total de 8 scans con tiempo total

de espera de 0.4 s y finalmente para el experimento de ^{13}C se adquirieron un total de 256 scans con un tiempo de espera de 1 s.

4.1.3 PROCESAMIENTO DE ESPECTROS

El procesamiento de los espectros se realizó en el programa MestReNova (versión 12.0.0, Mestrelab Research S.L. 2017), TopSpin (versión 4.0, Bruker) y Chenomx nmr suite (versión 8.3). Se corrigió la fase y se ajustó la línea base, todo esto de forma manual; el ^1H con supresión de agua y el J-resuelto se referenciaron a la señal del protón del carbono anomérico de la β -Glucosa (4.64 ppm).

4.2 PREPROCESAMIENTO PARA ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO

Los espectros de ^1H con pre-saturación de agua se superpusieron y se realizó la normalización al 100% de área, recortando la región del agua comprendida entre 4.68-4.88 ppm. Posteriormente, se aplicó la función *binning* al espectro para la reducción de la dimensionalidad y disminuir la variación asociada al cambio en el desplazamiento químico entre cada espectro se estableció el 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 para cada una de las muestras.

4.3 ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO

El análisis estadístico se realizó en el programa SIMCA (versión 14, UMETRICS). Se construyeron los modelos PCA, PLS-DA y OPLS-DA; previo a la proyección de los modelos se realizó escalado por Pareto (Par). Los modelos de PLS-DA y OPLS-DA fueron utilizados para el reconocimiento de patrones, discriminación entre grupos y relación entre algunos factores (como tipo de origen floral, tipo de abeja y región geográfica de las muestras), con la finalidad de obtener la mayor cantidad de información posible que permitiera la diferenciación por tipo de abeja.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 ESPECTROS DE PROTON

En la Figura 5 se muestra el espectro de ^1H -RMN de la muestra M6 de miel de *A. mellifera*. En la región de δ 0.0 a 3.0 ppm se encontraron señales características de compuestos como aminoácidos (prolina, fenilalanina por ejemplo, entre otros), etanol, metanol y acetona; en la región de δ 6.0 a 10.0 ppm se observaron señales características de compuestos aromáticos como fenoles, polifenoles, 5-HMF, entre otros. Finalmente, en la región de 3.0 a 6.0 ppm se encontraron señales características de carbohidratos. Una ampliación de esta última región se muestra en la Figura 6, donde se observan las señales más importantes de algunos carbohidratos como sacarosa, maltosa, fructosa, α -glucosa y β -glucosa.

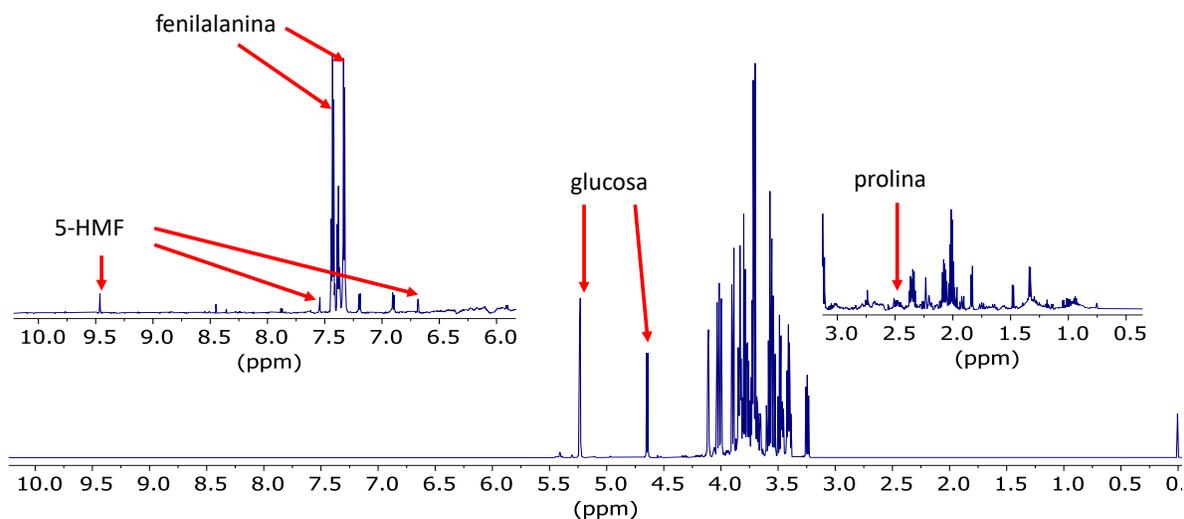


Figura 5. Espectro ^1H (700 MHz, D_2O , 25°C , 1D-NOESY-presat) para la muestra de miel de *A. mellifera* M6 con ampliación de las regiones de δ 0.0-3.0 y 5.0-10.0 ppm.

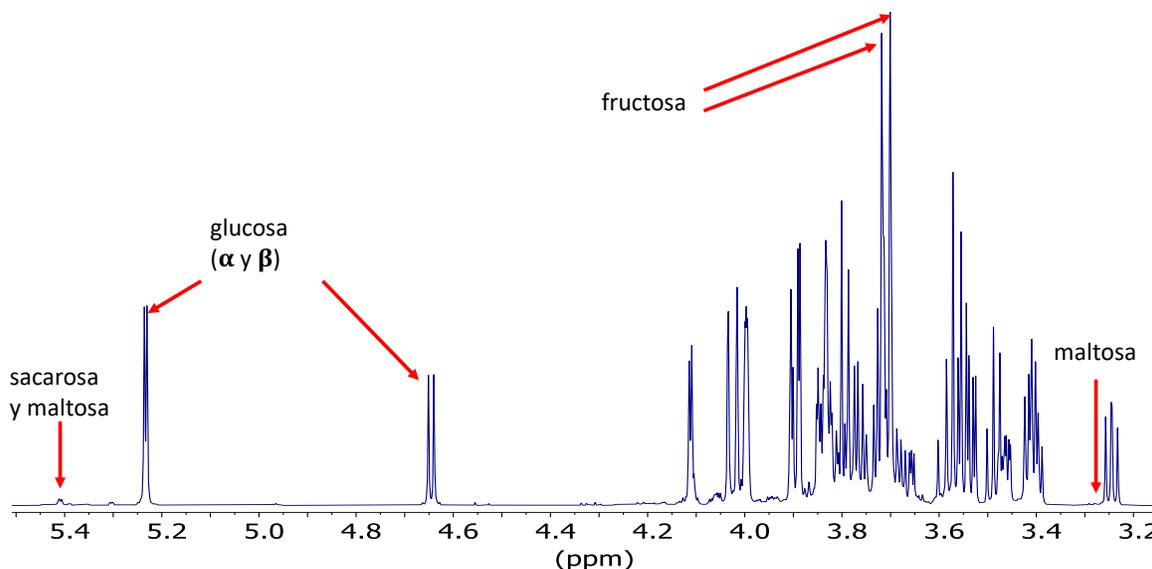


Figura 6. Región de δ 3.2-5.5 ppm del espectro ^1H (700 MHz, D_2O , 25°C , 1D-NOESY-presat) para la muestra de miel de *A. mellifera* M6.

En la Tabla 6 se enlistan los principales metabolitos identificados en el espectro de ^1H -RMN de las muestras de miel, para cada metabolito se dan los valores de desplazamiento químico, multiplicidad y constantes de acoplamiento (J) de las señales con las que identificaron.

Tabla 6. Desplazamientos químicos, multiplicidad y constantes de acoplamiento de las señales con las que fueron identificados algunos de los metabolitos.

Metabolito	Desplazamiento químico (δ en ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento J (Hz)
α -Glucosa	δ 5.23 (H1, d, $J= 3.79$)
β -Glucosa	δ 4.65 (H1, d, $J= 7.97$)
Fructosa	δ 4.13, d, $J= 3.87$
5-HMF	δ 6.69 (d, $J= 7.00$); δ 7.54 (d, $J= 7.00$), δ 9.46 (s)
Prolina	δ 1.99 (H3, m); δ 2.02 (H2, m)
Etanol	δ 1.18, t, $J= 7.10$
Fenilalanina	δ 7.33, m; δ 7.43, t, $J= 7.44, 7.44$
Valina	δ 1.04, d, $J= 7.04$
Tirosina	δ 7.20, d, $J= 8.39$
Trigonelina	δ 8.09, m; δ 8.84, dd, $J= 11.69, 7.12$; δ 9.13, s

En la Figura 7 se muestran sobrepuestos los espectros de ^1H de todas las muestras. Se puede observar que presentan casi las mismas señales, pero la

intensidad es distinta para cada muestra, lo cual nos indica que la concentración de los metabolitos varía entre las muestras.

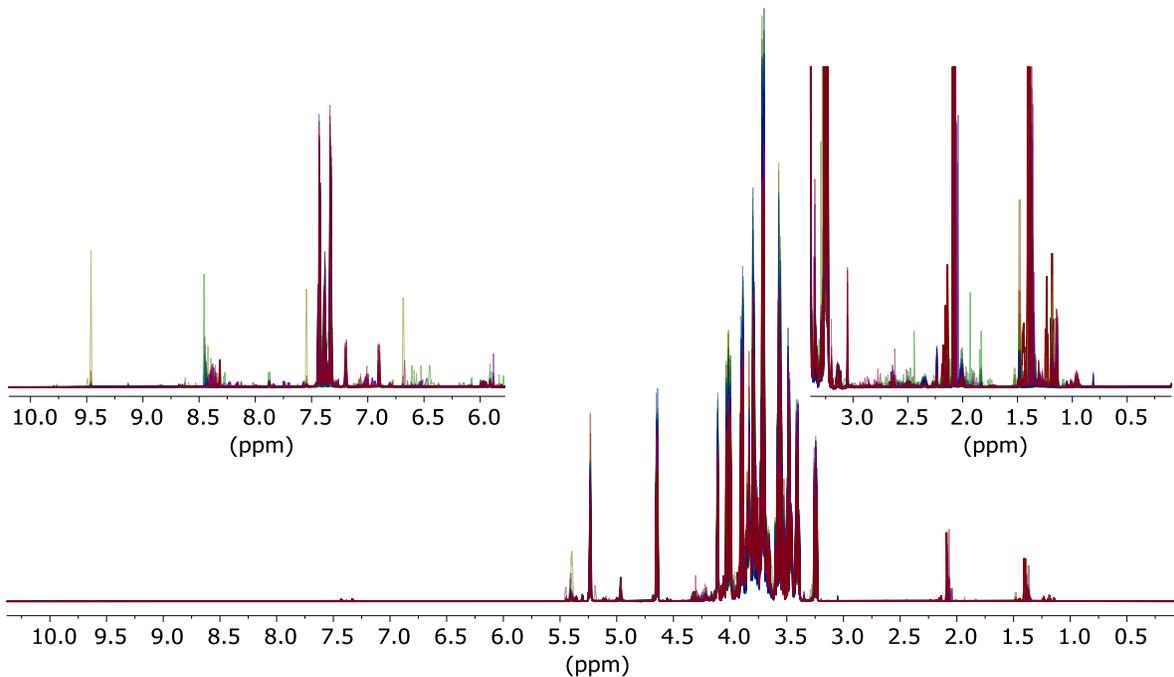


Figura 7. Espectros sobrepuestos de ^1H -RMN (700 MHz, D_2O , 25°C , 1D-NOESY-presat) con ampliación en las regiones de 6.0-10.0 ppm y 0.0-3.0 ppm.

En la Figura 8 se muestran los espectros sobrepuestos de las muestras de miel de ^1H -RMN (700 MHz, D_2O , 25°C , 1D-NOESY-presat), (en la parte superior) y los de melipona (en la parte inferior). A simple vista se alcanzan a observar diferencias en varias regiones de los espectros de las mieles de ambas especies de abejas, en la región comprendida entre 0.0 y 3.0 ppm se identificaron algunos compuestos tales como el succinato (2.6 ppm), acetato (2.1 ppm) y lactato (1.4 ppm), en las cuales se encuentra en mayor concentración en las mieles de ^1H -RMN (700 MHz, D_2O , 25°C , 1D-NOESY-presat). De igual manera se puede observar que las muestras de ^1H -RMN (700 MHz, D_2O , 25°C , 1D-NOESY-presat) aparentemente tienen mayor concentración de carbohidratos que de compuestos aromáticos y flavonoides; mientras que en el caso de las muestras de melipona se logra observar que, por el contrario, tiene mayor concentración de compuestos aromáticos y flavonoides. Además, se observa que la concentración de etanol en las muestras de melipona

es visiblemente mayor que las señales presentes en mieles de *A. mellifera*. Finalmente, podemos observar que en la región comprendida entre 6.0-10.0 ppm (Figura 8) hay señales de compuestos presentes en las mieles de ambas especies, como 5-HMF, tirosina, fenilalanina y trigonelina.

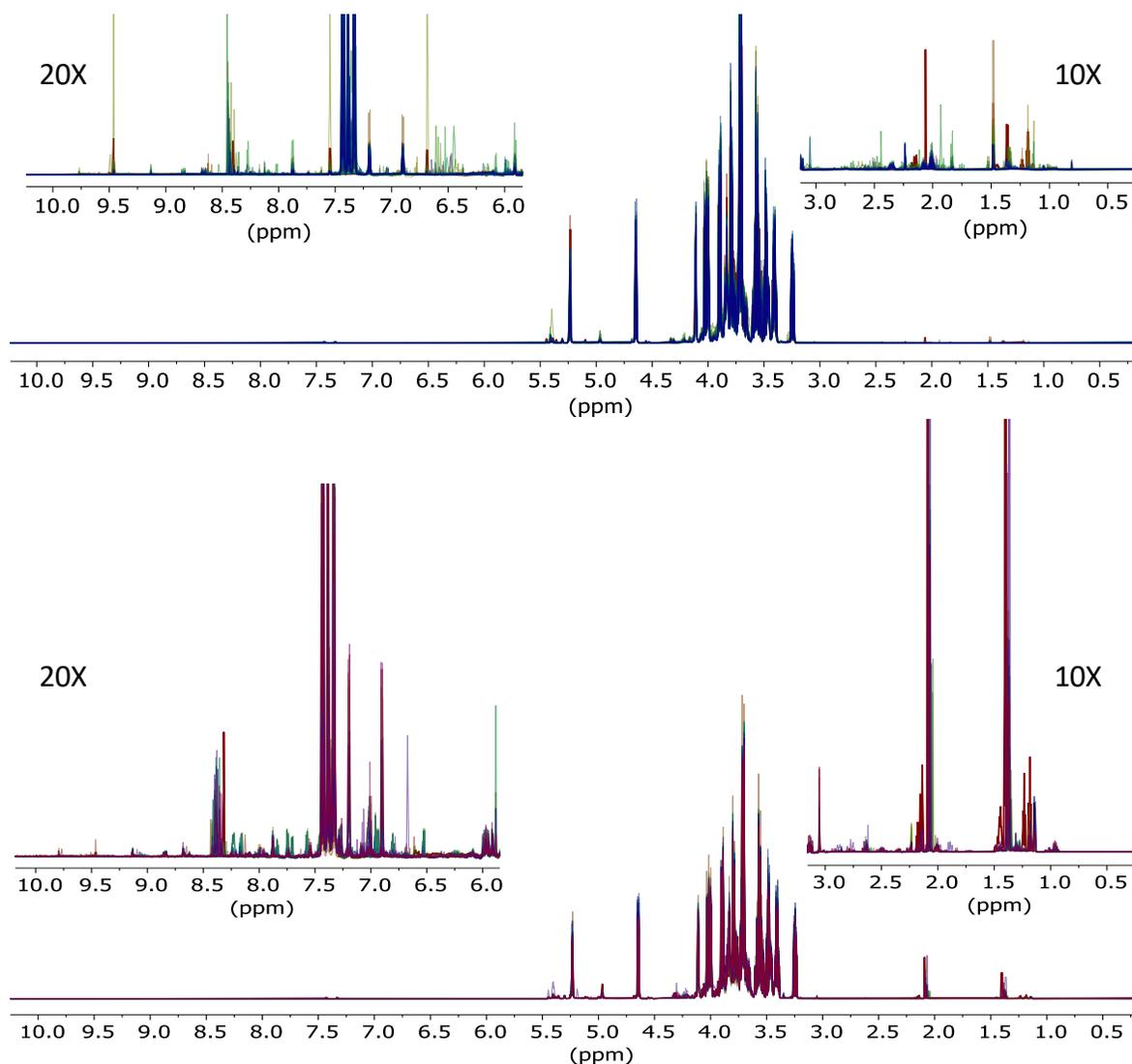


Figura 8. Espectros sobrepuestos de ^1H -RMN (700 MHz, D₂O, 25°C, 1D-NOESY-presat) con ampliación en las regiones de 6.0-10.0 ppm y 0.0-3.0 ppm. Miel proveniente de las abejas: arriba *Apis mellifera* (azul) y abajo *Scaptotrigona mexicana* (rojo).

5.2 ESPECTROS J-RESUELTO

Además de los espectros de ^1H con supresión de agua, se realizaron experimentos de J-resuelto, en los cuales es más sencillo interpretar y obtener información debido a que todas las señales aparecen como singuletes. En la

Figura 9 podemos observar la comparación de un espectro de ^1H -RMN y un J-resuelto en la región de 3.0-6.0 ppm, donde se encuentran principalmente las señales de carbohidratos. Este experimento nos permitió confirmar la presencia de señales importantes en la identificación de algunos metabolitos tales como la glucosa, fructosa, etanol, metanol, fenilalanina, prolina y trigonelina, entre otros.

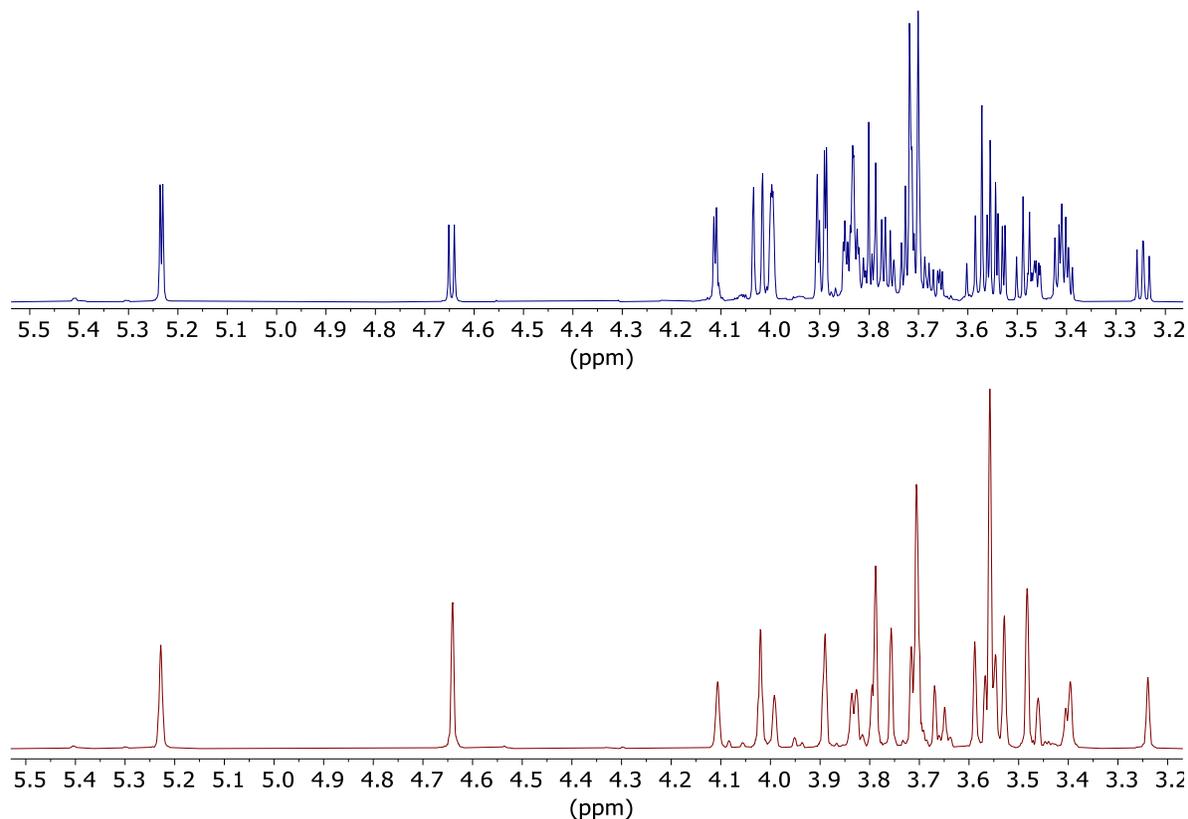


Figura 9. Espectros de ^1H -RMN con supresión de agua (azul) y J-resuelto (rojo) para una muestra de *A. mellifera* (M6).

5.3 MODELO QUIMIOMÉTRICO

5.3.1 ANÁLISIS DEL MODELO QUIMIOMÉTRICO

Primero se aplicó un método no supervisado de clasificación, el PCA, para realizar un análisis exploratorio de los datos e identificar posibles datos anómalos (*outliers*) y agrupaciones.

El gráfico de PCA de la Figura 10 muestra la dispersión gráfica de las puntuaciones (*scores*) mismo que presenta un total de 10 componentes principales, y mismo que permite una explicación del 82.45% de la variabilidad con los tres primeros componentes principales: 59.2% el primero, 14.5% el segundo y 8.67% el tercero. Se tiene un nivel de predicción con valores de $R^2X=0.592$ y $R^2Y=0.145$. En la gráfica se pueden observar 2 muestras con valores que caen fuera de la elipse de confianza al 95% que son la M8 y la M33, por lo que en principio se consideran muestras diferentes al resto. Analizando más a detalle la información de dichas muestras se encontró:

- En 4.66 ppm se puede observar la presencia de señales de otro metabolito que no se observan en el resto de las muestras. Estas señales no pudieron ser identificadas en este estudio y pueden ser de interés en futuras investigaciones.
- En las muestras M8 y M33 se logra identificar la presencia de una coloración color café intenso, a diferencia del resto de las muestras analizadas, las cuales en su mayoría son amarillo claro o incluso blancas.
- En los espectros de RMN se observa que estas muestras son las que presentan mayor cantidad de 5-HMF.

Por lo anteriormente expuesto las muestras M8 y M33 presentan algunas diferencias con respecto al resto de las muestras, tanto en la intensidad de señales de los metabolitos: etanol, glucosa y fructosa, así como en la presencia de otros metabolitos no identificados que no se observan en el resto de las muestras. Adicionalmente, se hace notar que dichas muestras junto con las muestras M20, M39 y M52 son de origen de Aguacate, así que se considera que para futuras investigaciones sería muy interesante conseguir un número representativo de este tipo de mieles para poder ampliar su estudio.

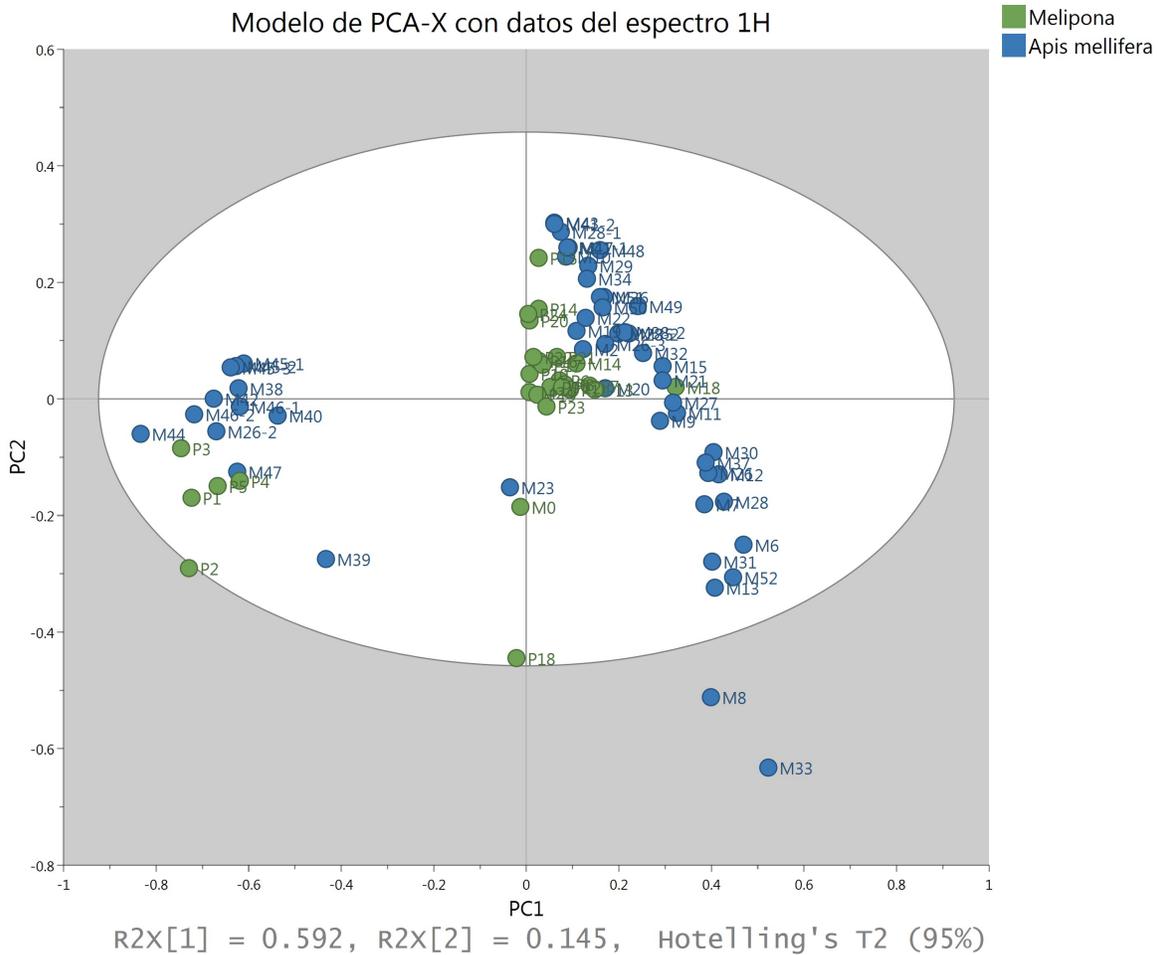


Figura 10. Gráfico de puntuaciones en el plano PC 1 vs. PC 2 (azul para *Apis mellifera* y verde para *Scaptotrigona mexicana*).

Regresando al análisis de la dispersión de los datos en el mismo gráfico de PCA de la Figura 10 se puede observar que hay 2 grupos de muestras que se diferencian a lo largo de la información contenida en el PC1, que no logramos explicar en función del tipo de abeja. Adicionalmente, aunque en nuestro estudio se tuvieron una gran cantidad de muestras provenientes de la misma región, se buscó si esta agrupación del PCA se relaciona con el origen geográfico (Figura 11), pero no se obtuvo información relevante.

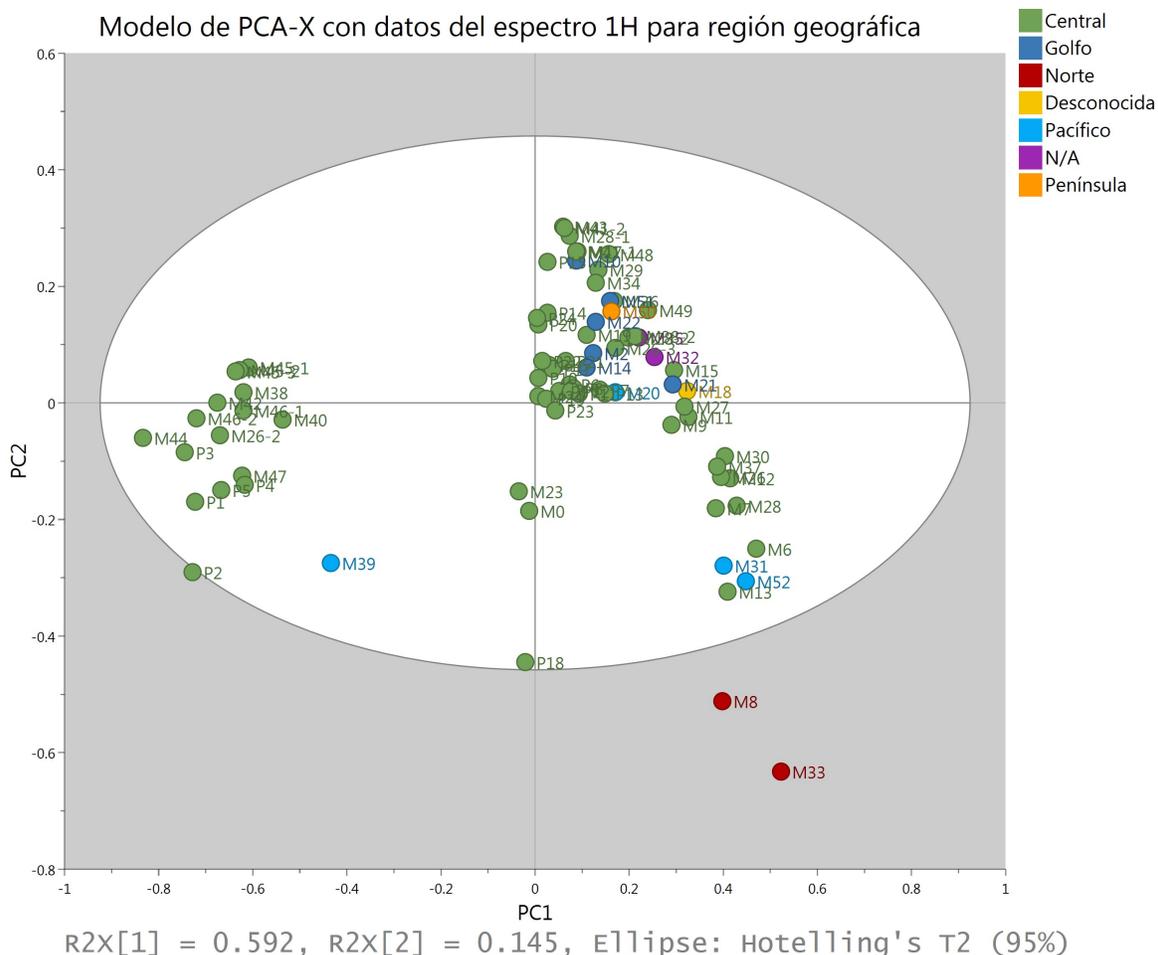


Figura 11. Gráfico de puntuaciones en el plano PC 1 vs. PC 2 (azul para región del Golfo, verde para región Central, rojo para región Norte, amarillo de región no conocida, azul cielo para región del Pacífico, morado para N/A y naranja para región de la Península).

Aparentemente la diferencia entre estos grupos se debe al contenido de carbohidratos, ya que al analizar los loadings (Figura 12, Figura 13 y Figura 14), pudimos observar que la principal diferencia está en δ 3.4-5.0 ppm y de 0.5-3.0 ppm, pero se observó que existen señales en diferente desplazamiento químico y por tanto caen en diferente bins. Por ejemplo, pese a haber referenciado el H-1 de la β -glucosa en 4.64 ppm, el H-2 (3.23 ppm) se encuentra ligeramente desplazado a mayor desplazamiento químico en las muestras del grupo orientado a la izquierda del PCA con respecto al grupo orientado a la derecha, lo que nos sugiere podría deberse a la diferencia de pH que existe entre las muestras, el cual no fue ajustado en la preparación de las muestras para este estudio.

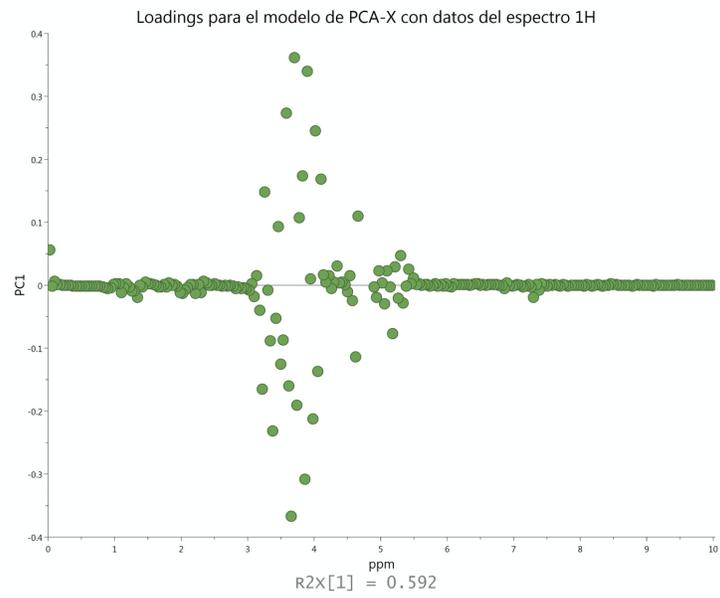


Figura 12. Loadings para el modelo de PCA-X con datos del espectro ^1H para PC1.

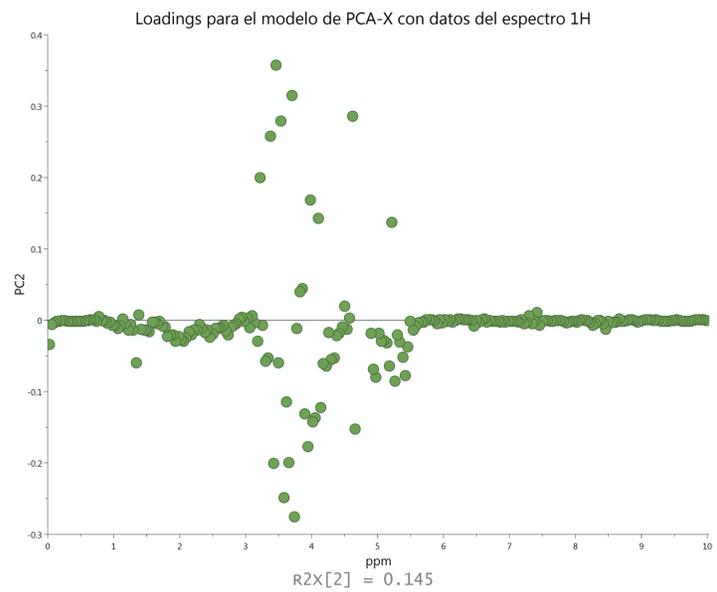


Figura 13. Loadings para el modelo de PCA-X con datos del espectro ^1H para PC2.

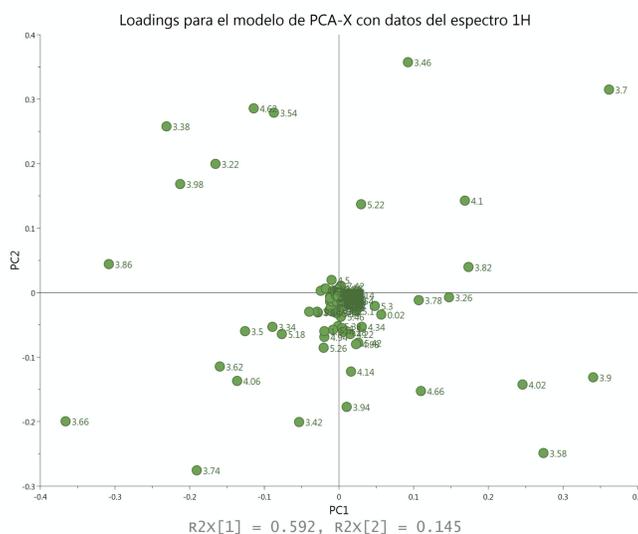


Figura 14. Loadings para el modelo de PCA-X con datos del espectro ^1H para PC1 vs PC2.

Continuando con el estudio y para poder buscar un modelo que nos permita diferenciar la miel en función de la especie de abeja productora, se muestra el gráfico de PLS-DA (Figura 15), el cual tiene 2 componentes principales que explican el 64.33% de la variabilidad: 19.43% el primero y 44.9% el segundo. En este gráfico se observa que dentro de los dos grupos observados anteriormente en el PCA se definen dos subgrupos, cuya agrupación si se debe a la especies de abejas. Casi todas las muestras de melipona se agrupan orientados hacia abajo con respecto a las muestras de *Apis mellifera*. El modelo tiene un nivel de predicción y calibración bastante alto, con valores de $R^2x= 0.645$, $R^2y= 0.643$ y $Q^2= 0.590$.

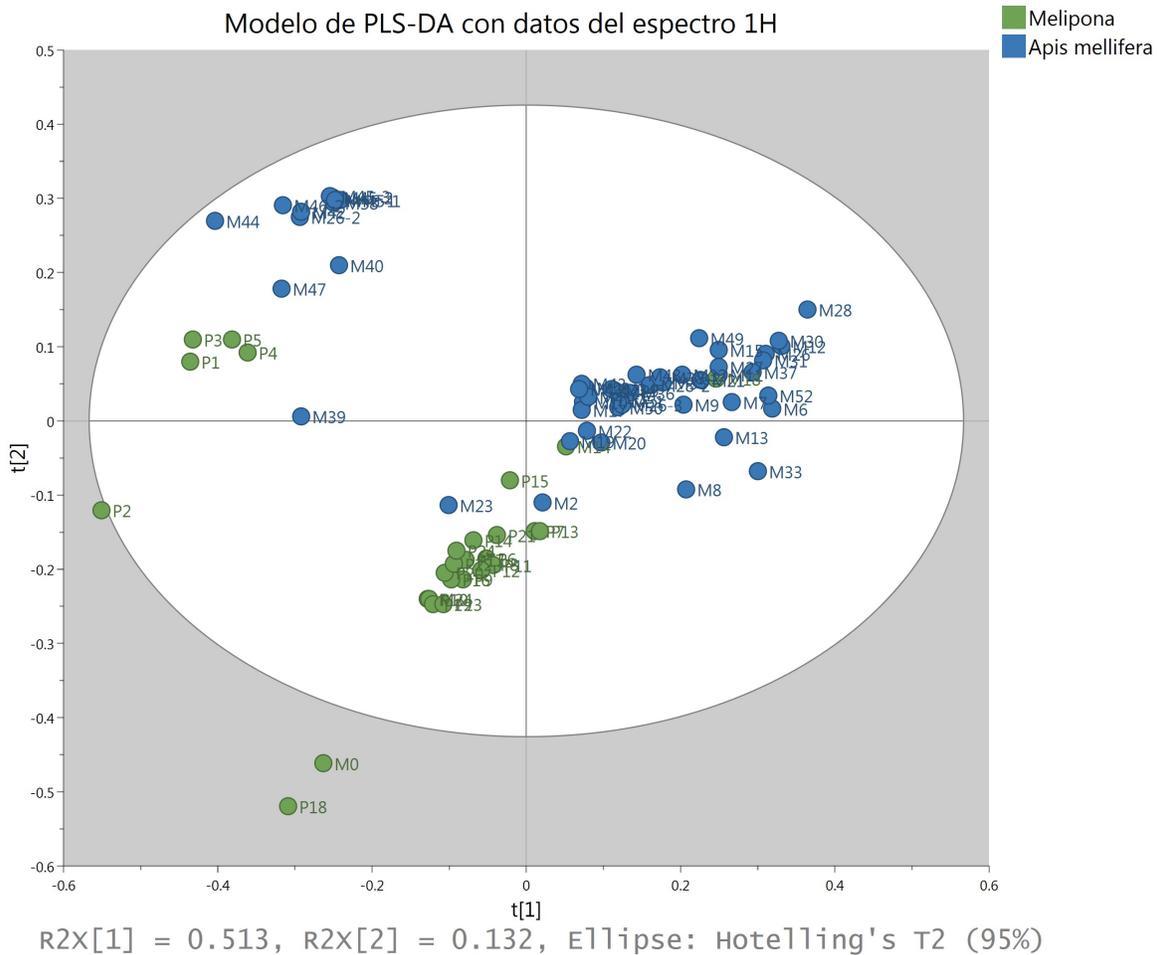


Figura 15. Gráfico de puntuaciones del modelo de PLS-DA (azul muestras de *Apis mellifera* y verde de *Scaptotrigona mexicana*).

Posteriormente para mejorar el modelo de clasificación, se decidió utilizar un modelo OPLS-DA (Figura 16), que tiene 4 componentes principales, los cuales explican el 76.07% de la variabilidad: 19.43% el primero, 45% el segundo, 7.44% el tercero y 4.3% el cuarto. La proyección de los datos que permite visualizar la clasificación de las muestras en dos grupos, se observa claramente que las muestras tienden a agruparse a lo largo de PC2 de acuerdo a la especie de abeja. La variación dentro de dicho modelo obtiene un nivel de predicción y calibración alto para este tipo de muestras, con valores de $R^2x=0.819$, $R^2y=0.761$ y $Q^2=0.670$.

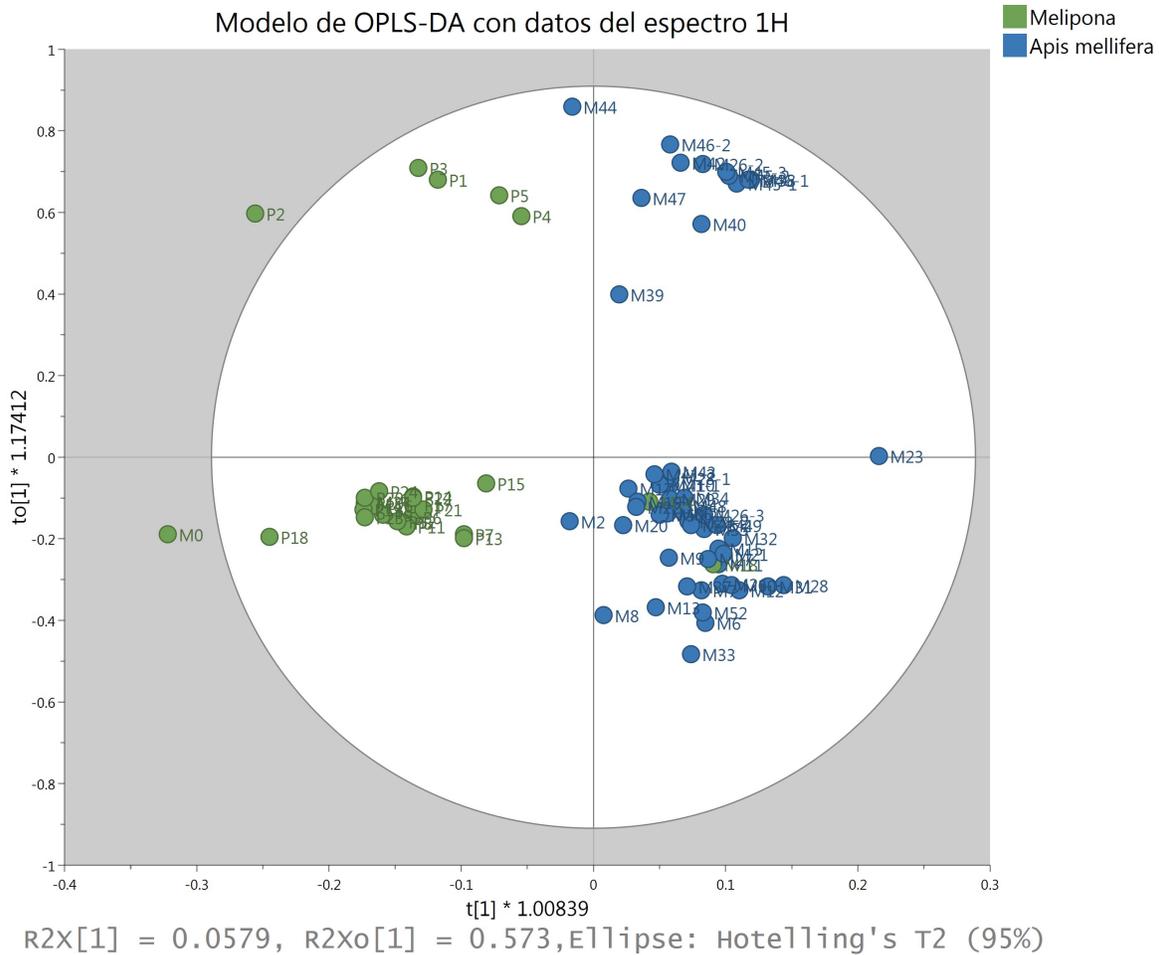


Figura 16. Gráfico de puntuaciones del modelo de OPLS-DA del total de las muestras para 1D-NOESY (azul muestras de *Apis mellifera* y verde de *Scaptotrigona mexicana*).

Al analizar los loadings del gráfico OPLS-DA (Figura 17), se observó que los principales metabolitos que propician la diferencia sobre el modelo corresponden a las señales presentes en 2.6 ppm (succinato), 2.1 ppm (acetato) y 1.4 ppm (lactato), estas señales se encuentran presentes en mayor concentración en las muestras de melipona, a diferencia de las muestras de *A. mellifera*. Por otra parte, también se observa diferencia en la concentración de fructosa (4.13 ppm) y glucosa (4.64 ppm).

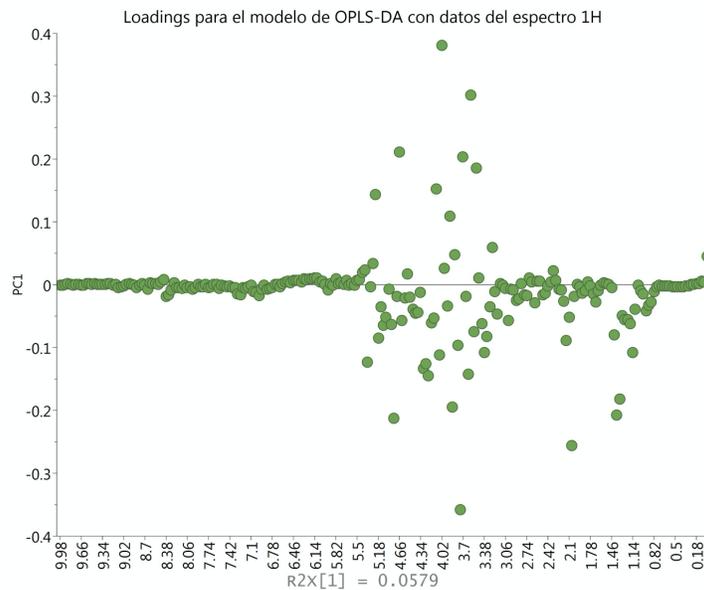


Figura 17. Loadings para el modelo del OPLS-DA con datos del espectro ^1H para PC1.

En el gráfico OPLS-DA existen 2 muestras M14 y M18 etiquetadas como “miel de melipona” y entregada por dos apicultores distintos (datos en Tabla 5), pero de acuerdo a nuestro modelo dichas muestras se agrupan en la región correspondiente a las muestras de *Apis mellifera*. Para comprobar y visualizar el comportamiento de dichas muestras se realizó un OPLS-DA utilizando 3 componentes (Figura 18), donde se puede observar claramente que las muestras M14 y M18 se encuentran en el centro de la agrupación de las muestras de *A. mellifera*. Por ello, se analizaron los espectros de RMN para estas dos muestras y se observó que son muy parecidas a las de *Apis mellifera* y dado que este estudio se realizó con muestras e información dada de buena fe, no podemos asegurar si se trata de muestras anómalas, mal etiquetadas o incluso un fraude.

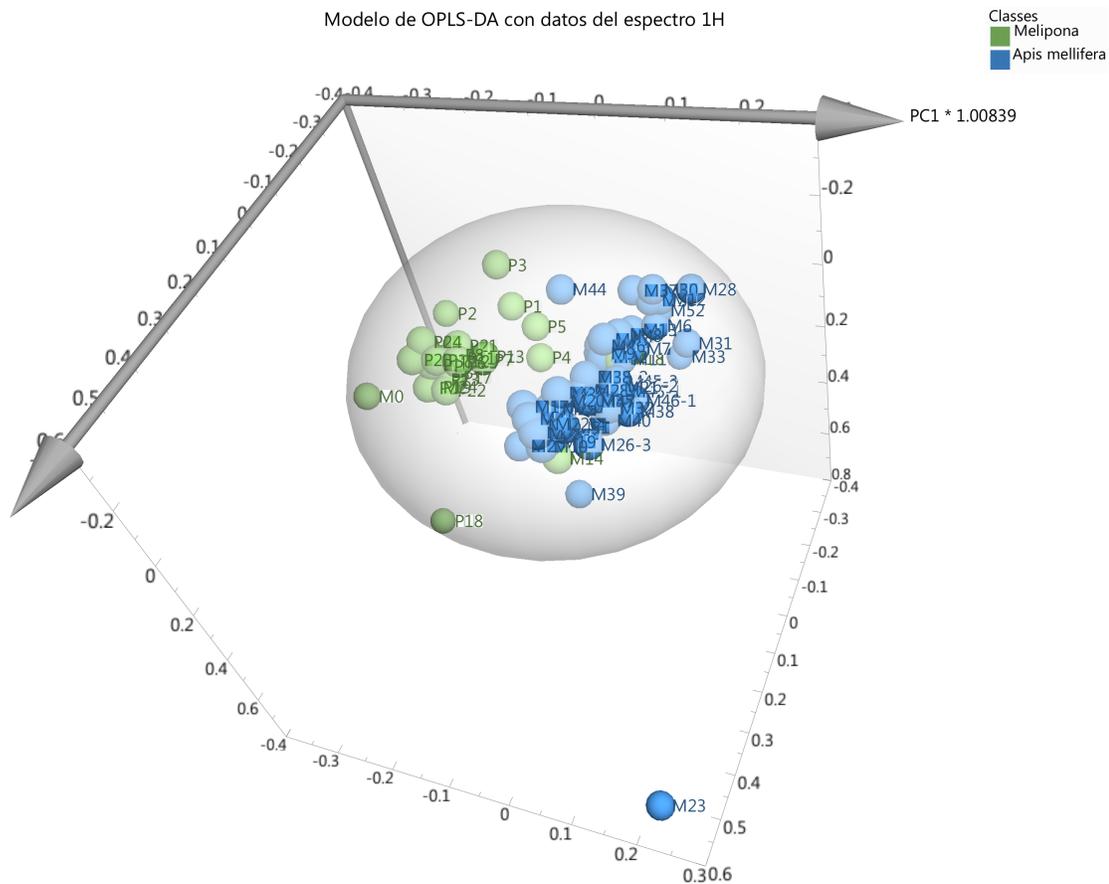


Figura 18. Gráfico de puntuaciones del modelo de OPLS-DA del total de las muestras para 1D-NOESY utilizando 3 componentes (azul muestras de *Apis mellifera* y verde de *Scaptotrigona mexicana*).

6 CONCLUSIONES

El estudio de la Huella espectral por ^1H -RMN, combinado con métodos multivariados, permitió analizar muestras de miel de dos especies de abeja. Las principales conclusiones son:

En los espectros de ^1H -RMN se identificaron señales correspondientes a algunos metabolitos, tales como glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa, 5-HMF, tirosina, prolina, fenilalanina, trigonellina, etanol, metanol, succinato, lactato y acetato.

En algunas muestras hubo presencia de etanol y/o 5-HMF, lo que podría indicar que han comenzado con un proceso de fermentación y/o que en su manufactura se llevó a cabo un calentamiento o incluso un mal almacenamiento. Como nuestro estudio no fue cuantitativo no podemos aseverar que la miel se encuentre en mal estado, pero si demostrar que la técnica de RMN puede ser una herramienta para identificar este tipo de compuestos y si se de forma cuantitativa puede usarse para control de calidad.

En este estudio no se ajustó el pH de las muestras a analizar y aunque se referenciaron los espectros a la señal del protón anomérico H-1 de la glucosa, se cree que puede haber cambios en los desplazamientos químicos de otras señales debido a esta falta de ajuste. Aun así, el modelo de OPLS-DA logró diferenciar las muestras de miel de acuerdo al tipo de especie de la que provienen, *Scaptotrigona mexicana* o *A. mellifera*.

Las diferencias principales entre las muestras corresponden al contenido de aminoácidos (prolina y fenilalanina principalmente) y succinato, acetato y lactato, son metabolitos que se encuentran en mayor cantidad en mieles de *Scaptotrigona mexicana*, mientras que la intensidad en las señales correspondientes a carbohidratos en las muestras de *Scaptotrigona mexicana* es aparentemente menor que en el caso de mieles de *A. mellifera*.

En nuestro estudio, el comportamiento de las muestras M14 y M18 es similar a las muestras de miel de la especie *Apis mellifera* en contraposición de la información dada por los apicultores que indicaron que estas muestras son de *Scaptotrigona mexicana*. Dado que en este estudio se realizó con muestras e información dada de buena fe, no podemos asegurar si se trata de muestras anómalas, mal etiquetadas o incluso un fraude.

En el PCA realizado por el tipo de región apícola de las muestras no se encontraron diferencias significativas posiblemente debido a la gran cantidad de muestras de la región central con respecto al resto.

7 BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹ Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <https://www.gob.mx/inaes/articulos/conoce-detalles-de-la-produccion-de-miel-dentro-de-la-economia-social?idiom=es> (consultada 29-Abr-2019)
- ² Cauich Kumul, R.; Ruiz Ruiz, J. C.; Ortiz Vázquez, E.; Segura Campos, M. R. Potencial antioxidante de la miel de *Melipona beecheii* y su relación con la salud: una revisión; *Nutrición hospitalaria* 2015, 32, 1432-1442.
- ³ Codex Alimentarius (2011). Codex Standard for honey <http://www.ihc-platform.net/codex2001.pdf> (Consultada el 10-May-2019).
- ⁴ Jones, R., & Sweeney-Lynch, S.; *The beekeeper's bible: Bees, honey, recipes & other home uses*. New York, N.Y.: Stewart, Tabori & Chang; 2011.
- ⁵ Correa Benítez, A.; Guzmán-Novoa, E.; *Zootecnia Apícola*, capítulo 11. http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/p_estudios/apuntes_zoo/UNIDAD%2011%20ZOOTECNIA%20APICOLA.pdf (consultada 06/May/2019)
- ⁶ González Acereto, Jorge A.; *Revista. Bioagrocencias Volumen 5 No.1; La importancia de la meliponicultura en México, con énfasis en la Península de Yucatán*; junio de 2012.
- ⁷ Méndez, M; Durán, R. *Revista. Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán. Mexico*. 1ª edición, 382-384.
- ⁸ Juan Borrás, Marisol.; *Herramientas Analíticas en la Clasificación de Mieles en Base a Criterios de Calidad e Inocuidad*; Tesis doctoral, Universitat Politècnica de València; Febrero de 2016.
- ⁹ Boffo, E. F.; Tavares, L. A.; Tobias, A. C. T.; Ferreira, M. M. C.; Ferreira, A. F.; Identification of components of Brazilian honey by ¹H NMR and classification of its botanical origin by chemometric methods. *Elsevier LWT - Food Science and Technology* 2012. 55-63.
- ¹⁰ da Silva, P. M.; Gauche, C.; Gonzaga, L. V.; Oliveira Costa, A. C.; Fett, R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry* 2016, 196, 309-323.
- ¹¹ Siddiqui, A. J.; Musharraf, S. G.; Choudhary, M. I.; Atta-ur-Rahman; Application of analytical methods in authentication and adulteration in honey. *Food Chemistry* 2017, 217, 687-698.
- ¹² Vit, P.; Eunice Enriquez, Ma.; Medina, M. Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. *Taylor & Francis. Bee World*, 2015, 85, 2-5.
- ¹³ Vit, P.; Enriquez, E.; O Barth, M.; Matsuda, H. A.; Almeida-Muradan, L. Necesidad del control de calidad de la miel de abejas sin aguijón. *MedULA, revista de la facultad de medicina, Universidad de los Andes*, 2006,15, 89-95.

-
- ¹⁴ Kim, S.; Kim, J.; Yun, E.; Heon Kim, K. Food metabolomics: from farm to human. *Current Opinion in Biotechnology* 2016, 37:16–23
- ¹⁵ McKay, R. T. How the 1D-NOESY Suppresses solvent signal in Metabonomics NMR spectroscopy: An examination of the pulse sequence components and evolution; Wiley Online Library, Wiley Periodicals Inc 2011. 38A(5), 197-220.
- ¹⁶ Huang, Y.; Yang, Y.; Cai, S.; Chen, Z.; Zhan, H.; Li, C.; Tan, C.; Chen, Z. (2017). General Two-Dimensional Absorption-Mode J-Resolved NMR Spectroscopy. *Analytical chemistry*, 2017, 89, 12646-12651.
- ¹⁷ Massarat, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Deming, S.N.; Michotte, Y.; Kaufman, L. *Chemometrics: a textbook*. Elsevier Science B.V. 2003. Quinta edición
- ¹⁸ Porcel García, M. Aplicación de técnicas quimiométricas para el desarrollo de nuevos métodos cinético-espectrofotométricos de análisis. PhD. Memoria. Universitat Autònoma de Barcelona.
- ¹⁹ Popescu, R.; Irina Geana, E.; Dinca, O. R.; Sandru, C.; Costinel, D.; Lonete, R. E. Characterization of the Quality and Floral Origin of Romanian Honey. *Analytical Letters*; Taylor & Francis 2016, 49 (3), 411-422.
- ²⁰ Bertelli, D.; Massimo, L.; Papotti, G.; Bortolotti, L.; Serra, G.; Plessi, Ma.; Detection of Honey Adulteration by Sugar Syrups Using One-Dimensional and Two-Dimensional High-Resolution NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010. 8495-8501.
- ²¹ Bertelli, D.; Massimo, L.; Papotti, G.; Bortolotti, L.; Serra, G.; Plessi, Ma.; Quantitative NMR spectroscopy for the rapid measurement of methylglyoxal in manuka honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010. 1479-1483.
- ²² Consonni, R.; Cagliani, L. R.; Cogliati, C.. NMR Characterization of Saccharides in Italian Honeys of Different Floral Sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2012, 60, 4526-4534.
- ²³ Musharraf, S. G.; Fatima, S. A.; Siddiqui, A. J.; Choudhary, M. I.; Atta-ur-Rahman. H-NMR fingerprinting of brown rice syrup as a common adulterant in honey. *Royal Society of Chemistry. CrossMark* 2016, 8, 6444-6451.
- ²⁴ del Campo, G.; Zuriarrain, J.; Zuriarrain, A.; Berregi, I. Quantitative determination of carboxylic acids, amino acids, carbohydrates, ethanol and hydroxymethylfurfural in honey by H NMR. *Elsevier. Food Chemistry* 2016. 196. 1031-1039.
- ²⁵ Kortensniemi, M.; Slupsky, C. M.; Ollikka, T.; Kaukoe, L.; Spevacek, A. R.; Sjövall, O.; Yang, B.; Kallio, H. NMR profiling clarifies the characterization of Finnish honeys of different botanical origins. *Food Research International* 2016. 86, 83-92.

-
- ²⁶ Alvaréz-Sánchez, B.; Priego-Capote, F.; Luque-de-Castro, M.D. Metabolomic analysis II. Preparation of biological samples prior to detection. *Trends Anal. Chem.* 2010, 120, 123.
- ²⁷ Zuccato, V.; Finotello, C.; Menegazzo, I.; Peccolo, G.; Schievano, E., Entomological authentication of stingless bee honey by ¹H NMR-based metabolomics approach. *Food Control* 2017, 82, 145-153.
- ²⁸ Zheng, X.; Zhao, Y.; Wu, H.; Dong, J.; Feng, J. Origin Identification and Quantitative Analysis of Honeys by NMR and Chemometric Techniques. Springer-Science+Business Media New York; CrossMark, 2016, 9, 1470-1479.
- ²⁹ Spiteri, M.; Jamin, E.; Thomas, F.; Rebours, A.; Lees, M.; Rogers, K. M.; Rutledge, D. N. Combination of ¹H-NMR and chemometrics to discriminate Manuka honey from other honey types of Oceania; *Food Chemistry* 2016; 217, 0308-8146.
- ³⁰ Massimo, L.; Bertelli, D.; Plessi, M.; Sabatini, A. G.; Restani, C.; Classification of Italian Honeys by 2D HR-NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008, 56, 1298-1304.
- ³¹ Jamroz, M. K.; Paradowska, K.; Zawada, K.; Makarova, K.; Kazmierski, S.; Wawer, I. ¹H and ¹³C NMR-based sugar profiling with chemometric analysis and antioxidant activity of herbhoneys and honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2014, 94, 246-255.
- ³² Babushkina, T.A.; Klimova, T.P.; Kudashov, A.A.; Novikov, V.V.; Peregudov, A.S. NMR & Water Relaxation of Floral Honey Samples from Wild & Domesticated Bees. *Molecular Biophysics* 2016. 28-33.
- ³³ Schievano, E.; Tonoli, M.; Rastrelli, F. NMR Quantification of Carbohydrates in Complex Mixtures. A Challenge in Honey. *Analytical Chemistry* 2017, 89, 13405-13414.