



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y
ANTIBACTERIANA DE MIELES MEXICANAS**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q. KAROL CARRILLO JAIMES

TUTOR

DR. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ
FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO DE 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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	Dr. José Pedraza Chaverri
Vocal	Dr. Rogelio Pereda Miranda
Vocal	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Vocal	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Secretario	Dra. María de la Luz Zambrano Zaragoza

Sitió donde se desarrolló el tema de investigación:

Departamento de Farmacia, Laboratorio 111, Conjunto E, Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México.

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio 111 del conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. José Fausto Rivero Cruz.

Los resultados parciales de este trabajo se presentaron en el evento académico:

“Análisis y clasificación de mieles mexicanas por RMN-¹H”, en 15^a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales del 22 al 25 de mayo de 2019 en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.

“La vida se nos dio para devolverla vivida, ora, lucha, llora, ríe, cae, levántate, ama, perdona, resiste, empieza de nuevo y por lo que más valores en este mundo: sueña, has que tu momento fugaz en la tierra lo valga todo.”

Nicolas de Jesús Sierra Muñoz

A Él, que me concedió el sueño de realizar mi maestría en México, y me hace una mejor persona. A Ella, pues nunca me deja sola, me cuida y me guía con su amor.

A Lizeth, Mari, Alejo y Mati, gracias por todas esas bellas memorias que me recargaron para sobrellevar la distancia.

Al profesor Federico del Río Portilla, por enseñarme el verdadero significado de un maestro: gracias por su enseñanza, consejo, y guía.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Química y a la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de continuar mis estudios y realizar este logro en mi vida.

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz, del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química, por permitirme trabajar en su grupo y por su asesoría.

Al Dr. Eduardo Rodríguez San Miguel, por toda su ayuda y enseñanzas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento parcial de esta investigación y la beca otorgada (Número de becario CVU: 954406) durante mi periodo de estudio.

Proyecto PAIP 5000-9138 otorgado al Dr. José Fausto Rivero Cruz.

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 el financiamiento parcial de este estudio.

Al Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear (LURMN) por el eficiente servicio del registro de espectros.

A los miembros del Jurado: Dra. María Isabel Aguilar Laurents, Dra. María de la Luz Zambrano Zaragoza, Dr. Rogelio Pereda Miranda, Dr. José Pedraza Chaverri y Dr. Ricardo Reyes Chilpa, por las correcciones en el manuscrito de la tesis.

A la Dra. Blanca Rivero Cruz, por la asesoría y apoyo brindado en el desarrollo de este trabajo.

Al Q. A. Adrián Mejía González, por toda su ayuda en el procesamiento de los espectros y sus recomendaciones.

A mis amigos del laboratorio 123: Emma, Citlali, Lucero, Pedro y Armando, sin ustedes todo hubiese sido más difícil.

A mis amigos Katerine, Roger y Andrea por acompañarme en esta etapa de mi vida.

Por último, pero no menos importante, a mi familia, mi motor y mayor ejemplo.

CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE CUADROS.....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
INTRODUCCIÓN.....	1
1. ANTECEDENTES.....	3
1.1 Miel.....	3
1.2 Composición química de la miel.....	4
1.3 Compuestos fenólicos.....	5
1.4 Propiedades fisicoquímicas de la miel.....	6
1.5 Diferentes clasificaciones de la miel.....	7
1.6 Mieles mexicanas.....	8
1.7 Técnicas de extracción para el estudio de la miel.....	9
1.8 Análisis para la caracterización y clasificación de mieles.....	11
1.9 Métodos quimiométricos.....	15
1.10 Autenticidad y adulteración.....	16
1.11 Calidad de la miel.....	19
1.12 Determinación del contenido fenólico.....	23
1.13 Evaluación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo de decoloración del radical DPPH.....	23
1.14 Medición del contenido de flavonoides por medio del ensayo de cloruro de aluminio.....	25
2. HIPÓTESIS.....	26

3. OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo general.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
4.1 Recolección del material de estudio.....	28
4.2 Reactivos.....	28
4.3 Evaluación de la actividad antioxidante por el ensayo de decoloración del radical DPPH.....	29
4.4 Determinación del contenido fenólico por el método Folin-Ciocalteu.....	30
4.5 Determinación de flavonoides totales con $AlCl_3$	31
4.6 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las mieles sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	32
4.7 Registro de los espectros por RMN- 1H	33
4.8 Determinación del contenido de humedad.....	33
4.9 Análisis Quimiométrico.....	34
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
5.1 Muestras.....	35
5.2 Determinación de la actividad antioxidante, contenido de flavonoides y fenoles en las mieles.....	36
5.3 Variación del contenido de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante debido al cambio de temperatura, respecto al tiempo.....	42
5.4 Evaluación de la actividad antibacteriana.....	51
5.5 Identificación de los compuestos mayoritarios en las mieles por RMN- 1H	53

6. CONCLUSIONES	60
7. PERSPECTIVAS	61
8. BIBLIOGRAFÍA.....	62
9. ANEXOS.....	71

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Muestra de miel.	3
Figura 2. Escala de color <i>Pfund.</i>	6
Figura 3. Formación del 5-HMF en la miel	20
Figura 4. Reacción de los fenoles con el reactivo Folin-Ciocalteu	23
Figura 5. Reacción de un flavonoide con el radical DPPH	24
Figura 6. Reacción del cloruro de aluminio con un flavonoide	25
Figura 7. Mieles empleadas en el estudio	28
Figura 8. Curva de calibración para el ensayo de actividad antioxidante DPPH	30
Figura 9. Curva de calibración para el ensayo de fenoles totales	31
Figura 10. Curva de calibración para la determinación de flavonoides totales	32
Figura 11. Diagrama PCA, a partir del contenido fenólico, flavonoide y actividad antioxidante en las mieles estudiadas	40
Figura 12. Diagrama PCA, a partir del contenido fenólico, flavonoide y actividad antioxidante, respecto a la especie productora de la miel	41
Figura 13. Muestra de miel S38, <i>Nannotrigona</i> , que presentó un proceso de pardeamiento	48
Figura 14. Espectro característico de miel, por RMN- ¹ H. <i>Apis mellifera</i> , de aguacate	53
Figura 15. Espectro de RMN- ¹ H, de miel de <i>Melipona beecheii</i>	55
Figura 16. Región del espectro de miel (3.0 a 4.8 ppm), donde se identifican las azúcares principales, por RMN- ¹ H	56
Figura 17. Identificación de la prolina por RMN- ¹ H, presente en miel de <i>Apis mellifera</i>	56
Figura 18. Región del espectro de una miel envejecida (0 a 2.5 ppm), mostrando algunos compuestos de fermentación	57

- Figura 19.** Región del espectro de la miel (6.0 a 9.5 ppm) por RMN-¹H,
de una miel envejecida 58
- Figura 20.** Espectros por RMN-¹H (700 MHz, D₂O), de mieles de *Apis mellifera*,
en un tiempo inicial y al cabo de 60 días de almacenamiento
y a 40 °C 58

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Composición química de la miel	4
Cuadro 2. Parámetros de calidad de la miel	19
Cuadro 3. Listado de las mieles bajo estudio y su clase	35
Cuadro 4. Valores del contenido fenólico, flavonoides y capacidad antioxidante de mieles mexicanas	36
Cuadro 5. Correlación entre el contenido fenólico y flavonoide	39
Cuadro 6. Correlación entre flavonoides totales y la capacidad antioxidante	39
Cuadro 7. Correlación del contenido fenólico y la capacidad antioxidante	40
Cuadro 8. Valores del contenido fenólico, flavonoide y capacidad antioxidante de mieles sin ningún tratamiento térmico en un tiempo cero	42
Cuadro 9. Valores del contenido fenólico, flavonoides y capacidad antioxidante en las mieles del ensayo de estabilidad a 20 °C	45
Cuadro 10. Valores del contenido fenólico, flavonoides y capacidad antioxidante en las mieles del ensayo de estabilidad a 40 °C	46
Cuadro 11. Porcentajes de humedad en las mieles, en el tiempo inicial y al transcurso de 45 días	47
Cuadro 12. Valores de la concentración mínima inhibitoria determinados en las muestras de mieles mexicanas	51
Cuadro 13. Identificación de los compuestos principales en mieles mexicanas, por RMN- ¹ H	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
5-HMF	5-hidroximetilfurfural
AA	Actividad antioxidante
Am	<i>Apis mellifera</i>
BHI	Infusión de cerebro y corazón
CMI	Concentración mínima inhibitoria
D ₂ O	Agua deuterada
DPPH	Radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazilo
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EDPPH	Ensayo de decoloración del radical DPPH
EE. UU.	Estados Unidos de América
EFC	Ensayo de Folin Ciocalteu
EFT	Ensayo de flavonoides totales
EQ	Equivalentes de quercetina
ESI	Electronebulización
ETrolox®	Equivalentes de Trolox
F/G	Relación fructosa/glucosa
g	Gramo
HD	Hidrodestilación
HFCS	Jarabe de maíz alto en fructosa
HPLC-DAD	Cromatografía líquida con un sistema de detección de arreglo de diodos
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas

ABREVIATURA**SIGNIFICADO**

HS	Espacio de cabeza
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas tándem
LLE	Extracción líquido-líquido
mg	Miligramo
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MS	Espectrometría de masas
MSPD	Dispersión de la matriz en fase sólida
MWHD	Hidrodestilación asistida por microondas
NIR	Infrarrojo cercano
PCA	Análisis de Compuestos Principales
PDMS	Polidimetilsiloxano
PLS	Regresión de mínimos cuadrados parciales
ppm	Partes por millón
OPLS	Proyecciones ortogonales a estructuras latentes
OPLS-DA	Proyecciones Ortogonales a Estructuras Latentes Análisis Discriminante
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón

ABREVIATURA**SIGNIFICADO**

RP-HPLC

Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa

SCIRA

Análisis de la relación de isótopos de carbono estables

SDE

Destilación extracción simultánea con solvente

Sm

Scaptotrigona mexicana

SPE

Extracción en fase sólida

SPME

Micro extracción en fase sólida

TSP

Sal sódica del ácido 3-(trimetilsilil) propiónico 2,2,3,3-d₄

UFC

Unidades formadoras de colonias

UV

Ultravioleta

UV-VIS-NIR

Ultravioleta visible acoplada a infrarrojo cercano

RESUMEN

La miel se ha convertido en un producto muy preciado, no sólo por sus múltiples usos y su agradable sabor, sino por su alto valor nutricional y las actividades biológicas. Estas razones han ocasionado que el consumo de miel haya incrementado en el tiempo. Las propiedades, composición, aroma y sabor de la miel varían según su origen, las condiciones climáticas de las flores donde las abejas recolectan el néctar, las condiciones de embalaje, transporte y almacenamiento.

En el presente trabajo se muestra un estudio sobre mieles mexicanas donde se evaluó su actividad antioxidante, el contenido fenólico, contenido de flavonoides y composición principal, en un tiempo inicial a una temperatura de 4 °C y a temperaturas mayores (20 °C y 40 °C) en diferentes periodos de tiempo de almacenamiento; con el fin de monitorear cambios en la composición y actividades biológicas, para así encontrar las mejores condiciones de embalaje, transporte y almacenamiento de las mieles mexicanas.

Mediante resonancia magnética nuclear de protón, se logró identificar las azúcares principales en las mieles (fructosa y glucosa), junto con otros compuestos orgánicos (ácido láctico y aminoácidos, entre otros) y cómo la exposición de un tratamiento térmico incide generando cambios en las concentraciones de estos constituyentes. Por medio de ensayos espectroscópicos se evaluaron los cambios en la actividad antioxidante, el contenido de fenoles y flavonoides sobre las muestras en el transcurso del tiempo y con incidencia térmica. Se determinó que el almacenamiento de la miel por más de 15 días y a temperaturas superiores a los 20 °C disminuye su capacidad antioxidante, así como la concentración de los fenoles y flavonoides; ocasionando una disminución en su valor nutricional. También se evidenció que a los dos meses de almacenamiento y a 40 °C, disminuye las intensidades de los picos de las azúcares. Ya que a la miel se le atribuyen propiedades antibacterianas, también se realizó esta determinación para las muestras aquí estudiadas, donde se encontró que el valor promedio de las concentraciones mínimas inhibitorias fue del 25 %.

INTRODUCCIÓN

Se considera a la miel como un endulzante natural, compuesta principalmente por azúcares, y otros componentes menores como enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos y vitaminas.¹ También contiene flavonoides y ácidos fenólicos que generan en ella actividades biológicas y actúan como antioxidantes. La composición, el color, el aroma y el sabor de la miel dependen principalmente de las flores que proveen el néctar, las regiones geográficas donde se recolectó y las especies de abejas involucradas en su producción; dicha composición también se ve afectada por las condiciones climáticas presentes en la producción, procesamiento, transporte, envasado y almacenamiento de la misma.¹

El consumo de la miel tiene una historia muy amplia, ya que se ha utilizado en alimentos y bebidas como edulcorante y saborizante. Desde la antigüedad, a la miel se le han atribuido valores nutritivos y terapéuticos. Ha sido ampliamente usada como tratamiento calmante para la tos, ya que algunos fármacos generan efectos secundarios como somnolencia y presentan precios elevados que los hacen inaccesibles para cierta población.² Otra de las aplicaciones que ha tenido la miel en la medicina tradicional, es como un cicatrizante en heridas cutáneas. Se considera que mejora la circulación, minimiza el riesgo de infección en heridas abiertas y, por su actividad antibacteriana, evita la proliferación de microorganismos.² En México, hay dos tipos de abejas productoras de miel: la *Apis mellifera* (introducida por los europeos) y las del género *Melipona* (sin aguijón), originarias de la península de Yucatán.³ Además, el país es uno de los principales productores de miel, en el año de 2017 ocupó el noveno puesto en el mundo⁴ y su producción anual corresponde a más de 70 mil toneladas.³

La miel es un alimento que muestra cambios durante el almacenamiento. Estos cambios generalmente ocurren debido a reacciones químicas como la oxidación, y procesos de fermentación, modificándose la composición y apariencia.¹ Por ejemplo, el 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), es un aldehído volátil y tóxico que se forma por la deshidratación de azúcares en medio ácido, aunque también se produce cuando la miel se somete a tratamientos térmicos o durante un largo tiempo

de almacenamiento.¹ Debido a los múltiples usos que se le atribuyen a la miel, su consumo ha incrementado en todo el mundo; también en la cultura popular le han atribuido el título de “*ser el alimento que nunca se daña a pesar del paso del tiempo*”, y aunque la miel ha mostrado actividad antioxidante, antibacteriana y antiinflamatoria,² no son justificaciones para asegurar que la miel es un producto que no presenta deterioro. Por lo tanto, surge la necesidad de estudiar los cambios en la composición y las actividades biológicas de la miel en ciertas condiciones de almacenamiento con el transcurso del tiempo, para que los consumidores puedan adquirirla de manera segura.

En el trabajo aquí realizado, se muestra el contenido de flavonoides, de fenoles y capacidad antioxidante de 43 mieles mexicanas, conservadas a una temperatura de 4 °C y recientemente recolectadas (con una semana de almacenamiento). De este lote, 10 mieles fueron seleccionadas para un estudio de estabilidad, midiendo las variables anteriormente mencionadas, con la diferencia de que las muestras estuvieron a dos temperaturas de almacenamiento (20 °C y 40 °C) y monitoreando en un periodo de tiempo (15, 30 y 45 días). También se estudió el perfil espectroscópico de la composición principal de las mieles mediante RMN-¹H.

1. ANTECEDENTES

1.1 MIEL

La miel es un fluido viscoso producido principalmente por abejas a partir del néctar de plantas (Figura 1). Las abejas realizan una transformación del néctar por medio de sustancias excretoras y lo depositan en los panales para su posterior maduración.^{5, 6} La Comisión del Codex Alimentarius, 2001, define a la miel como una “sustancia dulce natural producida por abejas 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, depositan, deshidratan, almacenan y dejan en el panal para que madure”.⁷ El consumo de miel se ha incrementado en los últimos años debido a que es fácilmente asequible, es una fuente energética alimenticia y, también, por sus actividades antibacteriana y antioxidante.⁸ La miel está constituida principalmente por azúcares y entre sus componentes minoritarios se encuentran proteínas, aminoácidos, pigmentos, vitaminas y volátiles.



Figura 1. Muestra de miel.

1.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA MIEL

La miel se compone principalmente de azúcares, alrededor del 60% se encuentra constituida por la glucosa y la fructosa.⁹ Los azúcares pueden ser monosacáridos (glucosa, fructosa, manosa y ramnosa), disacáridos (sacarosa, trehalosa, turanosa, maltosa, entre otras) y trisacáridos (maltotriosa).¹⁰ También, contiene compuestos de origen fenólico, como la pinobanksina (flavonol), pinocembrina (flavanona), luteolina (flavona), crisina (flavona), ácido cafeico (ácido hidroxicinámico), kaempferol (flavonol), entre otros.¹¹ En cuanto a las vitaminas, contiene riboflavina (B2), niacina (B3), piridoxina (B6), vitamina C y es una fuente de calcio, hierro, magnesio, fósforo, potasio, sodio y zinc.¹² También es común encontrar aminoácidos tales como la prolina, la alanina, la treonina, la tirosina, la isoleucina y la fenilalanina.¹³ En el Cuadro 1 se incluye la relación de los compuestos más representativos presentes en las mieles.

Cuadro 1. Composición química de la miel.⁷

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	0.00-0.13
Enzimas	>0.1%
Aromas	>0.1%
Otros	>0.1%

1.3 COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos son moléculas con uno o más anillos aromáticos, y con uno o más grupos hidroxilo y pueden presentar sustituyentes diferentes a los grupos hidroxilo, por ejemplo, un oxígeno heterocíclico. En la naturaleza se encuentran más de 8000 compuestos fenólicos, los cuales se pueden clasificar según el número de posiciones oxigenadas y su posición en el núcleo de carbono, por ejemplo, las cumarinas, lignanos y flavonoides.¹⁴

Los fenoles y los polifenoles desempeñan importantes funciones en el metabolismo secundario de las plantas, como la regulación de las hormonas de crecimiento, la protección contra la radiación ultravioleta (UV, por sus siglas en inglés), la coloración para fomentar la atracción de polinizadores, la prevención de infecciones microbianas, entre otras funciones.¹⁵

Los compuestos fenólicos se encuentran de forma libre o como glucósidos en todas las partes de la planta.¹⁶ Algunos flavonoides poseen una alta actividad antioxidante que les confiere numerosas actividades de interés terapéutico como las propiedades antimicrobiana, antifúngica, anticoagulante, antibacteriana, antitumoral, antialérgica, antiinflamatoria o de inhibidoras de virus. Por esta razón, se recomienda ampliamente su ingesta en la dieta.¹⁷

Los compuestos fenólicos pueden usarse como marcadores de origen geográfico ya que los perfiles fenólicos cualitativos y cuantitativos de la miel dependen mucho de la fuente floral, es decir, las plantas de donde las abejas recolectan el néctar.¹⁸ Teniendo esto en cuenta, existe un interés en el desarrollo de métodos para determinar compuestos fenólicos como posibles marcadores del origen geográfico de la miel. Ciric y colaboradores¹⁹ identificaron y cuantificaron hesperetina, quercetina, hesperidina y kaempferol en mieles comerciales mediante cromatografía líquida acoplada a detectores de masas cuadrupolares (LC-MS/MS, por sus siglas en inglés) en modo negativo. En mieles monoflorales italianas (*Robinia*, *Castanea*, *Eucalyptus*, *Helianthus* y *Erica arborea*), los autores Pulcini y colaboradores²⁰ extrajeron e identificaron ácidos fenólicos como los ácidos cumárico, elágico, gálico, ferúlico, homogentísico y mandélico, junto con los

flavonoides pinocembrina, crisina, quercetina, apigenina, hesperetina, kaempferol, miricetina y naringenina por medio de cromatografía líquida con un sistema de detección de arreglo de diodos (HPLC-DAD, por sus siglas en inglés).

1.4 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LA MIEL

Una de las principales diferencias de las mieles es su sabor y fragancia. Aunque la base de la composición química de éstas siempre son las azúcares, los componentes menores marcan en ellas contrastes en su color, textura, sabor y olor.²¹ Esto se debe a los volátiles y a la composición de los néctares absorbidos por las abejas, así que tanto el sabor como el aroma de la miel van a estar asociados a los néctares florales. El color de la miel también se asocia con su sabor. La miel de color claro es suave, mientras que las más oscuras tienen sabores más fuertes. Las mieles de color oscuro tienen una mayor cantidad de derivados de ácidos fenólicos, pero menos flavonoides que las de color claro.²¹ Por ejemplo, la alfalfa produce una miel blanca, el brezo produce una miel color marrón rojizo, la acacia y los cítricos producen mieles de color pajizo.²¹ El color de la miel se puede determinar usando la escala *Pfund* midiendo el nivel de absorción (en milímetros) de la luz usando un espectrofotómetro visible.²² La unidad de referencia de la escala va de 0 a 140 mm, la escala va del color más claro y aumenta hasta el color de la miel más oscura (Figura 2).

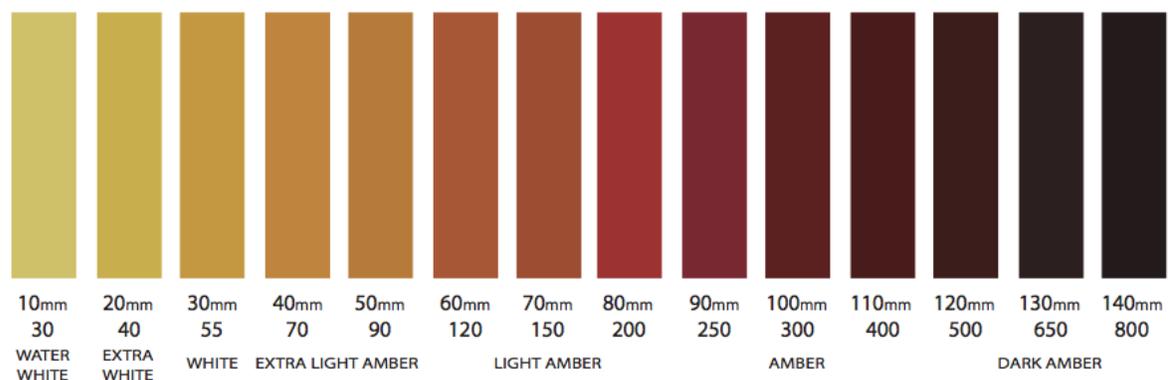


Figura 2. Escala de color *Pfund*.

En un estudio realizado por Silvano y colaboradores,²³ los parámetros fisicoquímicos (humedad, color, acidez libre, entre otros) y las propiedades sensoriales se analizaron para mieles de diferentes áreas geográficas de una región de Buenos Aires (Argentina). Se realizaron análisis de agrupamiento y discriminantes lineales. Las muestras se agruparon en función de las regiones de muestreo y se ilustraron mediante el análisis del componente principal (PCA, por sus siglas en inglés); este estudio demostró que la categorización geográfica de las mieles con base a los parámetros fisicoquímicos es posible. Otra de las propiedades que se considera en los análisis de mieles es el pH. Normalmente, el pH de la miel está entre 2.9 y 5.5 debido a la presencia de ácidos orgánicos que dan sabor a la miel y protección contra el daño microbiano. Además, los valores de pH también ayudan en la identificación de los orígenes botánicos de la miel.²¹

1.5 DIFERENTES CLASIFICACIONES DE LA MIEL

Las mieles pueden tener diferentes clasificaciones de acuerdo con las normativas de cada país. El *Codex Alimentarius*, 2001⁷ establece como las clasificaciones más importantes para las mieles las siguientes:

- a) Origen floral o vegetal u origen botánico, si proviene principalmente de una fuente particular.²⁴
- b) Origen geográfico o topográfico, cuando la miel se produce exclusivamente dentro de un área específica.⁷

1.5.1 Origen botánico

De acuerdo con el origen botánico se tienen dos tipos de miel: de flores y de mielada.

Miel de flores o blossom: Es aquella que proviene principalmente de los néctares de las flores y se tienen dos tipos de mieles en este grupo, monoflorales y poliflorales. Se le llaman mieles **monoflorales** a aquellas donde el néctar absorbido por las abejas prevalece de una sola especie de flor, por ejemplo, la lavanda y el

eucalipto. Las mieles **multiflorales** son aquellas que proceden del néctar de varias especies vegetales diferentes.²⁴

Miel de mielada: Es la miel que se origina de las exudaciones de las partes vivas de las plantas junto con los néctares.²⁴ Debido a las diferentes proporciones de las fuentes para la miel, el néctar de las flores y/o las exudaciones de la planta, ninguna miel es completamente igual a otra.

1.5.2 El origen geográfico

El origen geográfico se puede determinar si la miel se origina total o principalmente a partir de una fuente específica (miel monofloral) y, por lo tanto, adquiere las características fisicoquímicas y organolépticas de la fuente. Sin embargo, como las abejas se alimentan de diversas plantas, las mieles monoflorales son muy escasas. Varias mieles monoflorales exhiben propiedades sensoriales, fisicoquímicas, biológicas y melisopalinológicas similares.²¹ Los métodos implementados para determinar el origen geográfico de las mieles son las mediciones de propiedades fisicoquímicas, el análisis melisopalinológico y el análisis de la composición por técnicas espectroscópicas, junto con análisis quimiométricos que permiten la clasificación y selección de las diferentes mieles.

1.6 MIELES MEXICANAS

En México, existen diversos tipos de miel a causa de las variaciones en la flora que se producen en las diferentes estaciones del año. Estas mieles son:

- a) Mezquite: Esta miel proviene de la flor del mezquite, es una miel de color ámbar claro y, en estado sólido, casi blanca. Posee un sabor suave. Es originaria de Guanajuato y, por lo general, las mieles de la zona centro del país son multiflorales y ricas en antioxidantes y con un sabor muy delicado.²⁵
- b) Tajonal: Las flores del tajonal (*Viguiera dentata*) proliferan en Tabasco, la miel posee un color ámbar y cristaliza de manera cremosa.²⁵

- c) Mantequilla o multifloral: Es una miel de color ámbar claro que se produce en Milpa Alta. Su sabor es más intenso, pues en ésta se mezclan diversos aromas florales con algunas notas cítricas.²⁵
- d) Naranja: Las flores del naranja son la materia prima de este tipo de miel. Su sabor es suave, es un tipo de miel que casi no cristaliza.²⁵
- e) Aguacate: Es una miel de Michoacán donde la producción de aguacate es mayor. Es de color oscuro, y sabor fuerte. Este tipo de miel sólo se encuentra en la temporada de marzo a junio.²⁵

1.7 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN PARA EL ESTUDIO DE LA MIEL

Las técnicas de extracción son de gran importancia en la identificación de una muestra. Para conocer cuántos componentes hay en una muestra depende de varios factores, como la preparación de ésta, que va desde la técnica de extracción, la limpieza del extracto, la separación de interferencias, así como el grado de concentración de los analitos en el extracto, la solubilidad de los analitos de interés en los disolventes empleados y muchos factores más.^{26,27} Es importante conocer qué tipos de compuestos se desean caracterizar para realizar un correcto aislamiento de los analitos de interés. Para escoger correctamente la técnica de extracción hay que tener en cuenta el origen de la muestra y del analito a identificar, la estabilidad, concentración y características del analito, la intención del estudio ¿cualitativo o cuantitativo?, el tiempo que requiere la extracción, entre otros factores más.^{26,27}

Las técnicas de extracción se pueden clasificar de diferentes formas, por ejemplo las técnicas de destilación, que están basadas en las diferencias de las propiedades fisicoquímicas y la termoestabilidad de los analitos, entre estas tenemos a la hidrodestilación (HD, por sus siglas en inglés), la destilación-extracción simultánea con disolvente (SDE, por sus siglas en inglés) y la hidrodestilación asistida por microondas (MWHD, por sus siglas en inglés).²⁶ También, se tienen las extracciones con disolventes como la extracción líquido-líquido (LLE, por sus siglas en inglés), la extracción *Soxhlet*, ambas muy usadas en la extracción de grasas, pesticidas,

colorantes, dependiendo de la naturaleza del solvente. Otro grupo de los métodos de extracción son aquellos donde la separación de los analitos de interés están basados en diferencias de solubilidades, capacidad de absorción y/o adsorción sobre un adsorbente o polímero, por ejemplo, la extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés) que combina la extracción, limpieza y concentración en un sólo paso, donde se pueden encontrar diferentes adsorbentes de diferentes tipos como la gel de sílice, la alúmina, las resinas sintéticas (PDMS, Tenax, Porapak, entre otras),^{26, 27} o algún polímero poroso. Estas extracciones se emplean para la limpieza de muestras complejas e identificación de pesticidas, compuestos fenólicos, fármacos, entre otros.²⁶ Cuando se desea obtener compuestos volátiles se puede usar alguna de las técnicas de destilación, las de espacio de cabeza (HS, por sus siglas en inglés) o la microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés). Para la determinación de drogas, colorantes, alcaloides, azúcares, compuestos fenólicos, puede emplearse alguna técnica de extracción con un adsorbente, como SPE o la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD, por sus siglas en inglés).^{26,27}

La miel es una mezcla con un gran contenido en azúcares, lo cual dificulta la extracción de compuestos fenólicos, tanto por su baja concentración como por la degradación de éstos ante el aumento de temperatura, exposición a radiación ultravioleta, entre otros. Por ello, se han implementado métodos para lograr un porcentaje de recuperación alto durante la extracción de polifenoles en la miel y así lograr una identificación de la muestra. Entre las técnicas más usadas para el análisis de polifenoles en miel, se tienen las resinas polares que retienen los analitos y permiten su aislamiento de las azúcares, por ejemplo, la amberlita XAD-2 ha sido uno de los medios adsorbentes más populares para la extracción de compuestos fenólicos de la miel;²⁸ esta extracción muestra una alta sensibilidad con porcentajes de recuperación aproximadamente de 95%.²⁹ Chan y colaboradores¹¹ determinaron el contenido de flavonoides y caracterización de éstos en muestras de mieles Manuka usando SPE para el aislamiento de los compuestos fenólicos, empleando cartuchos de XAD-2 y Sephadex-LH20, los cuales tienen como fase estacionaria una resina adsorbente poliaromática hidrófoba que retiene los compuestos de

naturaleza fenólica para su posterior análisis. Identificaron ácido cafeico, ácido cumárico, pinobanksina, quercetina, luteolina, pinocembrina, kaempferol, crisina y galangina. Una desventaja de los métodos con resinas es que se requiere de una gran cantidad de muestra, entre 50 g a 100 g de miel y, además, se requiere de volúmenes grandes de disolventes.²⁹

Otra técnica usada recientemente para el aislamiento de polifenoles es la SPE, análoga a los métodos con resinas, pero a diferencia de éstos, la SPE no requiere grandes volúmenes de disolventes y con cantidades de muestras pequeñas es posible la extracción de los analitos.³⁰ En este caso, los compuestos fenólicos interactúan con el adsorbente y se retienen mediante interacciones hidrófobas, por ello, se han utilizado una gran variedad de adsorbentes, como el octadecil (C₁₈), Oasis HLB y Strata-X.³⁰ La SPE combina la selectividad por los compuestos fenólicos, la poca cantidad de muestra y reactivos con la gran variedad de adsorbentes, haciendo una de las técnicas de extracción más favorable para el análisis de polifenoles. Michalkiewicz y colaboradores³⁰ compararon la SPE con cuatro adsorbentes diferentes: C₁₈, Oasis HLB, Strata-X y Amberlita XAD-2 para la obtención de ácidos fenólicos y flavonoles en mieles de linden y brezo. En este estudio se identificaron a los ácidos, gálico, *p*-hidroxibenzoico, vanílico, cafeico y siríngico, además de los flavonoides rutina, quercetina y kaempferol, encontrando que el soporte Oasis HLB les proporciona mayores recuperaciones, permitiendo la confirmación de la identidad de los compuestos y su cuantificación.

1.8 ANÁLISIS PARA LA CARACTERIZACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE MIELES

1.8.1 Análisis melisopalinológico

La fuente botánica de la miel también se evalúa mediante análisis microscópico de polen, el análisis melisopalinológico. Este método fue propuesto por Louveaux en 1978,³¹ y es la técnica de referencia reconocida por las autoridades para abordar el origen botánico y geográfico de la miel. Sin embargo, para una correcta evaluación del origen botánico, se requieren parámetros organolépticos y fisicoquímicos, como color, sabor, pH, conductividad eléctrica, actividad óptica, humedad, perfil de azúcar, cantidad de prolina y actividad de diastasa.⁵

La determinación del origen geográfico por el método melisopolinológico se basa en la identificación y el recuento de los granos de polen y otras partículas en la miel; la caracterización se hace por comparación con la literatura.³¹ En ocasiones, el origen geográfico se puede establecer por la presencia de pólenes característicos que se limitan a una determinada región. Sin embargo, la región en la que se produjo la miel se puede determinar a partir de la presencia de ciertas combinaciones de polen. El espectro de polen de una miel depende de las condiciones florales, agrícolas y forestales donde se produce.³¹ La medida en que una determinada muestra de miel se deriva de diferentes fuentes de plantas se puede deducir de las frecuencias de los pólenes y los elementos de la miel en ella. En general, si la miel se ha producido principalmente a partir de una sola planta (miel monofloral), el polen de esa planta es predominante.³¹

En un estudio de miel de café, se encontró una correlación entre marcadores de cafeína, teobromina y trigonelina y las cantidades de polen en las muestras. Sin embargo, debido a la diferencia significativa del contenido de polen, ahora se considera como un método menor. También, se puede utilizar el análisis quimiométrico de los componentes volátiles, para evaluar el origen botánico de la miel; empleando un análisis de los compuestos volátiles. Los métodos actuales que utilizan extracción con solventes que analizan el espacio de cabeza (estático y dinámico) y/o la micro extracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) han mostrado una buena aproximación para determinar el origen geográfico.²¹

1.8.2 Cromatografía líquida de alta resolución, acoplada a espectrometría de masas

La mayoría de las muestras biológicas que se encuentran en la naturaleza son mezclas, como el petróleo, los aceites esenciales, los extractos vegetales, entre otras; para la identificación de la composición química de una mezcla, es necesaria la separación.³² La cromatografía es una técnica útil para separar compuestos, que tiene ciertos alcances, respecto a algunas propiedades fisicoquímicas de las sustancias, como son la polaridad, la termoestabilidad y el peso molecular. La cromatografía líquida es apta para sustancias de alto peso molecular (> 450 Da),

termolábiles y polares; la cromatografía gaseosa analiza sustancias de mediana o alta volatilidad, bajo peso molecular y termoestables.³²

Para la separación de compuestos fenólicos, la técnica más utilizada es la cromatografía líquida de fase reversa, generalmente RP-HPLC. En la separación de los analitos se usa comúnmente una columna de octadecilsilano enlazado en microesferas de sílice (RP-C₁₈). La fase móvil que se emplea para el estudio de estos compuestos es principalmente un gradiente de concentración de dos disolventes (A y B) para obtener un cambio de polaridad. El disolvente A es una solución acuosa acidificada y el B corresponde a un disolvente polar, casi siempre acetonitrilo o metanol.¹⁸ Respecto a la detección, los analizadores de masas más utilizados comúnmente para caracterizar compuestos de origen fenólico son: trampa iónica, triple cuadrupolo, inclusive hasta los más recientes como el analizador de masas Orbitrap.¹⁸ La fuente de ionización por electronebulización (ESI, por sus siglas en inglés), que se usa con mayor frecuencia en este tipo de análisis, generalmente se opera en el modo de ionización positivo y/o negativo, para obtener más información sobre la fragmentación de los compuestos fenólicos, lo que ayuda aún más en la identificación de posibles estructuras de compuestos desconocidos.¹⁸ Además, el uso de la espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés) de alta resolución es muy útil para el análisis, porque proporciona información de la fórmula molecular exacta de un compuesto desconocido. Con estas técnicas de alta resolución en masas se ha encontrado una aplicación en la identificación de perfiles polifenólicos de miel, con el objetivo de determinar su origen botánico. Truchado y colaboradores³³ identificaron ocho glucósidos flavonoides en muestras de miel de acacia, caracterizadas como glucósidos del kaempferol.

1.8.3 Resonancia Magnética Nuclear

En los últimos años se ha utilizado la resonancia magnética nuclear (RMN, por sus siglas en inglés) para determinar el origen floral de las mieles. La espectroscopía de RMN es una técnica útil para el análisis de mezclas. En un estudio realizado por Oddo y colaboradores³⁴, 23 muestras de miel polifloral y 18 de acacia de diferentes países se analizaron mediante RMN, con el objetivo de identificar azúcares. Los

autores emplearon la RMN junto con análisis estadísticos para determinar la clasificación geográfica de las mieles poliflorales y de acacia de las diferentes regiones geográficas estudiadas.³⁴ Otro análisis empleando la espectroscopía de RMN-¹H fue realizado por Consonni y colaboradores⁵, donde se mostró que la técnica espectroscópica desempeña un papel útil en el análisis de sacáridos, permitiendo la determinación del origen geográfico. Estudiaron 57 muestras de mieles de, Italia, Hungría, América del Sur y China, las cuales se diferenciaron mediante métodos multivariados y RMN. El modelo construido sobre 22 muestras resultó eficiente en el agrupamiento de las muestras bajo varios contenidos de sacáridos. Simova y colaboradores³⁵ usaron la RMN para diferenciar la miel de roble, entre otras; estudiaron 24 mieles de diferentes regiones, tanto monoflorales como poliflorales, monitoreando el quercitol (5-deoxyinositol) como marcador de la miel de roble, ya que es un ciclitol presente en las diferentes partes del roble.

1.8.4 Otras técnicas analíticas implementadas para la clasificación de mieles

Entre los métodos espectroscópicos, la espectroscopía Raman se utiliza ampliamente. Aunque en esta técnica, la definición de los picos de las muestras de miel en ocasiones se ve comprometida por la presencia de un fondo de fluorescencia que se superpone a la señal de Raman, se han propuesto varios métodos instrumentales y matemáticos para reducir dicho fondo con el fin de poder analizar los espectros Raman, como el uso de longitudes de onda de excitación en la región NIR.³⁶ Frausto y colaboradores³⁶ realizaron un análisis espectroscópico de la miel de la abeja *Apis mellifera* de diferentes regiones de México. La caracterización se realizó mediante espectroscopía Raman acoplada a infrarrojo cercano (NIR-Raman, por sus siglas en inglés) y ultravioleta visible acoplada espectroscopía infrarrojo cercano (UV-VIS-NIR, por sus siglas en inglés) junto con un análisis de componentes principales y colorimetría. En este estudio, se demostró que un calentamiento ligero reduce el fondo de fluorescencia que se presenta en Raman, y usando una longitud de onda de 830 nm, también redujo los efectos de la fluorescencia. Los autores estudiaron 11 muestras de mieles monoflorales y poliflorales de diferentes regiones de México, y demostraron experimentalmente

que el calentamiento de las muestras de miel ayudó a reducir el fondo de fluorescencia, generando un pico Raman mejor definido en comparación con las muestras no calentadas. El uso de las técnicas Raman y UV-VIS-NIR permite el estudio de una variedad de muestras de mieles mexicanas mediante el registro de datos espectroscópicos con características específicas para cada muestra individual según su origen botánico.

1.9 MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

Los métodos espectroscópicos se combinan con un análisis quimiométrico, con el objetivo de encontrar huellas digitales específicas o revelar marcadores específicos para tipos particulares de mieles monoflorales.³⁵ Aunque esta combinación de técnicas ha resultado útil en la clasificación de miles ya sean monoflorales o poliflorales y en la determinación de su origen geográfico, y es por medio del conjunto de evidencias de tipo espectroscópicas (RMN, UV-VIS-NIR, Raman), espectrométricas (masas), y quimiométricas (PCA, OPLS, OPLS-DA, entre otras) que se pueden diferenciar y clasificar las mieles respecto a su origen. El análisis por componentes principales es un método de clasificación y es empleado con diferentes fines; por ejemplo, la disminución en la dimensionalidad o número de variables de un conjunto de datos, el ordenamiento y el agrupamiento de un conjunto de muestras respecto a una propiedad en común.²¹ La regresión de mínimos cuadrados parciales encuentra una regresión lineal mediante la proyección de las variables de predicción (dependientes) y las variables observables (independientes) a un nuevo espacio, se usa para encontrar las relaciones fundamentales entre las dos matrices y/o variables (X e Y), es decir, un modelo de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS, por sus siglas en inglés) trata de encontrar el sentido multidimensional en el espacio de X que explica la orientación de la máxima varianza multidimensional en el espacio Y. La regresión de mínimos cuadrados parciales es adecuada cuando la matriz de variables predictoras son más que las variables de observaciones.^{22,31} Por esta razón el método PLS en combinación con datos espectroscópicos es útil en la clasificación del origen de las

mieles, ya que se tienen n variables a partir de los espectros y el observable será el agrupamiento de las muestras por una característica en común: su composición, la cual dependerá de su origen.

1.10 AUTENTICIDAD Y ADULTERACIÓN

La modificación de un producto ya sea mediante la adición, intercambio de la materia prima o exclusión de varios componentes principales, se denomina adulteración. También, los productos se declaran adulterados si se le adicionan sustancias más baratas que ocasionan daños perjudiciales para la salud.²¹ El aumento del consumo y la disponibilidad limitada del suministro de la miel de alta calidad ha dado lugar a un aumento en el precio y, también, la ha hecho más propensa a la adulteración. Por lo tanto, las técnicas para el control de calidad y la detección de la adulteración son de gran importancia para garantizar la calidad de la miel.

El método más frecuente de adulteración de la miel es la adición de sacarosa, también se tiene la alimentación de las abejas con sacarosa como uno de los métodos más frecuentes de adulteración. Otros métodos de adulteración incluyen la adición de fructosa o glucosa que alteran la relación F/G (fructosa/glucosa), la adición de edulcorantes como el jarabe de maíz, el jarabe de azúcar invertido, el jarabe de maíz con alto contenido en fructosa y el jarabe de arroz, son de los adulterantes principales.³⁷

Otra de las formas de adulteración es el ultrafiltrado de la miel, el cual consiste en eliminar el polen para imposibilitar la identificación del origen botánico y geográfico. Esta práctica dificulta corroborar la declaración del país de origen y/o la variedad botánica indicadas en las etiquetas. Este procedimiento implica tiempo y tecnología, ya que la miel se calienta gradualmente con agua, y se pasa a alta presión a través de unos filtros finos y, posteriormente, se elimina el exceso de agua. Como esta técnica impide la clasificación de la miel, entonces, las mieles que sufren este proceso son consideradas como adulteradas.³⁸

El análisis de la relación de isótopos de carbono estables (SCIRA, por sus siglas en inglés) es una técnica analítica estándar para detectar adulteración en miel. Esta

técnica se basa en la determinación de la relación de isótopos de carbono: $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Según el metabolismo del carbono, las plantas que producen sustancias utilizadas para adulterar las mieles se clasifican como plantas C3 o C4. Las plantas C3 fijan el CO_2 por el ciclo de Calvin, mientras que las plantas C4 lo hacen utilizando el ciclo Hatch-Slack. La mayoría de las plantas que contribuyen a la adulteración de la miel (como el trigo, arroz y remolacha, entre otras) son plantas C3. Las C4 más utilizadas para adulterar las mieles son el jarabe de maíz y el azúcar de caña. La técnica SCIRA es costosa, requiere mucho tiempo y también una habilidad técnica considerable.³⁹ Las abejas recolectan el néctar principalmente de las flores de plantas C3 y, en menor medida, de las flores de plantas C4. Los jarabes de azúcar derivados por la ruta metabólica C4 exhiben una relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ($\delta^{13}\text{C}$) diferente de los azúcares derivados de la ruta C3. Esta relación es cercana al -10% para los jarabes C4, mientras que el valor medio para la miel es del -25.4%. Sin embargo, estos valores no son un criterio creíble para la detección del azúcar de la planta C4 en la miel. Es probable que una muestra de miel pura se crea adulterada si las abejas usan plantas C4 junto con otras plantas, y el valor de $\delta^{13}\text{C}$ excede el límite. De manera similar, incluso si se agrega azúcar a la miel, el valor de $\delta^{13}\text{C}$ aún puede ser más negativo que -23.5%, dependiendo de la proporción de la adición y la muestra de miel puede declararse como no adulterada. Por lo tanto, es necesario tener en cuenta las relaciones de isótopos de carbono de la miel cruda y las fracciones de proteínas ($\delta^{13}\text{C}_{\text{hon}}$ y $\delta^{13}\text{C}_{\text{pro}}$, respectivamente) para detectar la adición de azúcar. Se espera que la diferencia mínima entre estos dos valores ($\delta^{13}\text{C}_{\text{hon}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{pro}}$) en una miel no adulterada sea de -1.0%, y de azúcar C4 es de 7%.²⁰ Padovan y colaboradores⁴⁰ llevaron a cabo una adulteración controlada con jarabe de maíz alto en fructosa (HFCS, por sus siglas en inglés) en miel de pino, para estimar el contenido de HFCS en la mezcla por medio de este análisis. Para este propósito, se analizaron las muestras que contenían diferentes cantidades de HFCS y se calculó el % de azúcar C4, por medio de la ecuación 1:

$$\text{Azúcar C4 (\%)} = \left[\frac{(\delta^{13}\text{C}_{\text{pro}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{hon}})}{(\delta^{13}\text{C}_{\text{pro}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{sug}})} \right] * 100\% \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde $\delta^{13}\text{C}_{\text{pro}}$ es $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, la relación de la fracción proteínica, $\delta^{13}\text{C}_{\text{hon}}$ es la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de la miel cruda, $\delta^{13}\text{C}_{\text{sug}}$ es $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de azúcar C4 (-9.7 para el azúcar de maíz). Los resultados mostraron que a medida que la concentración de HFCS aumentó en la muestra, también aumentó el valor del azúcar C4. En otras palabras, el valor de azúcar C4, calculado a partir de $\delta^{13}\text{C}_{\text{pro}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{hon}}$, es una indicación confiable de la adición de HFCS en la miel de pino. El método de la relación de isótopos de carbono para la detección de la adulteración de la miel no funciona correctamente cuando la miel está adulterada con jarabes de plantas C3, porque los néctares de las plantas son más o menos de origen de las plantas C3. La remolacha también es una planta C3 y, por lo tanto, no es fácil de identificar por el método de los isótopos de carbono. Sin embargo, la proporción de deuterio e hidrógeno de las azúcares varía en las plantas C3. Por lo tanto, la proporción de isótopos de hidrógeno se puede usar para la detección de la adulteración de la miel de una planta de azúcar C3.²¹

Paradkar y colaboradores⁴¹ utilizaron FT-Raman para anticipar el grado y el tipo de adulteración en la miel. Adicionaron varias cantidades de jarabes de remolacha a las muestras de miel de trébol, naranja y trigo sarraceno. El espectro FT-Raman de las muestras adulteradas se utilizó para la generación del modelo. PLS y PCA se aplicaron para la cuantificación, mientras que PLS-DA y los análisis de variables canónicas se aplicaron para el análisis discriminante. Los autores concluyeron que el análisis por espectroscopía FT-Raman pueden predecir la adulteración con remolacha y caña en las mieles.

Oliveira y colaboradores⁴² evaluaron el grado de adulteración de mieles de flores puras brasileñas, adicionando jarabe de maíz con alto contenido en fructosa, para estudiar los cambios en las mieles dependiendo del porcentaje de adulteración. Los autores emplearon la RMN-¹H y realizaron mediciones de parámetros fisicoquímicos como el pH, humedad, el color y la actividad del agua para monitorear como estas medidas cambiaban respecto al porcentaje de adulteración. Los autores mostraron que las muestras de mieles adulteradas pueden ser discriminadas de las

provenientes de mieles florales puras utilizando RMN-¹H. Los tiempos de relajación disminuyeron significativamente por la concentración del jarabe de fructosa en la miel pura.

1.11 CALIDAD DE LA MIEL

La calidad incluye todas las características y parámetros necesarios para garantizar el valor de un producto para el consumidor y la seguridad de su consumo. Abarca atributos negativos tales como deterioro, contaminación, decoloración, malos olores y atributos positivos como el origen, color, sabor o textura. En el caso de la miel, la Directiva del Consejo, 110/2001/EC⁴³ rige todos los criterios de calidad de la miel. Según la legislación, los parámetros que deben analizarse para garantizar la calidad de la miel son el contenido de azúcares, el contenido de humedad, el contenido de agua insoluble, la conductividad eléctrica, la acidez libre, la concentración del 5-HMF y la actividad diastásica. Los valores aceptados de cada parámetro están definidos y, si una miel no los cumple, no puede comercializarse (Cuadro 2).^{43,44}

Cuadro 2. Parámetros de calidad de la miel.⁴³

Contenido de fructosa y glucosa	
Miel de flores	60 g/100 g
Miel de mielada	45 g/100 g
Contenido de agua	
Mieles	20 %
Miel de brezo	23 %
Conductividad eléctrica	
Miel de flores	0.8 mS/cm
Miel de mielada	0.8 mS/cm
Índice diastásico	
Mieles en general	no menos de 8 DN
Mieles de cítricos	no menos de 3 DN
HMF	
Mieles en general	40 mg/kg
Mieles en mezclas	80 mg/kg

1.11.1 5-HMF

El 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) es un aldehído cíclico producto de la deshidratación de las azúcares (glucosa y fructosa) en un medio ácido y en presencia de temperatura (Figura 3). La miel recientemente extraída presenta bajos porcentajes de este compuesto (0-7 mg/kg), pero este valor aumenta con el calentamiento, mal almacenamiento y envejecimiento de la miel. Los estándares de calidad establecen que el valor del 5-HMF para la miel pura no debe ser superior a 40 mg/kg y para mieles de origen tropical y mezclas máximo puede llegar a 80 mg/kg.⁴⁵

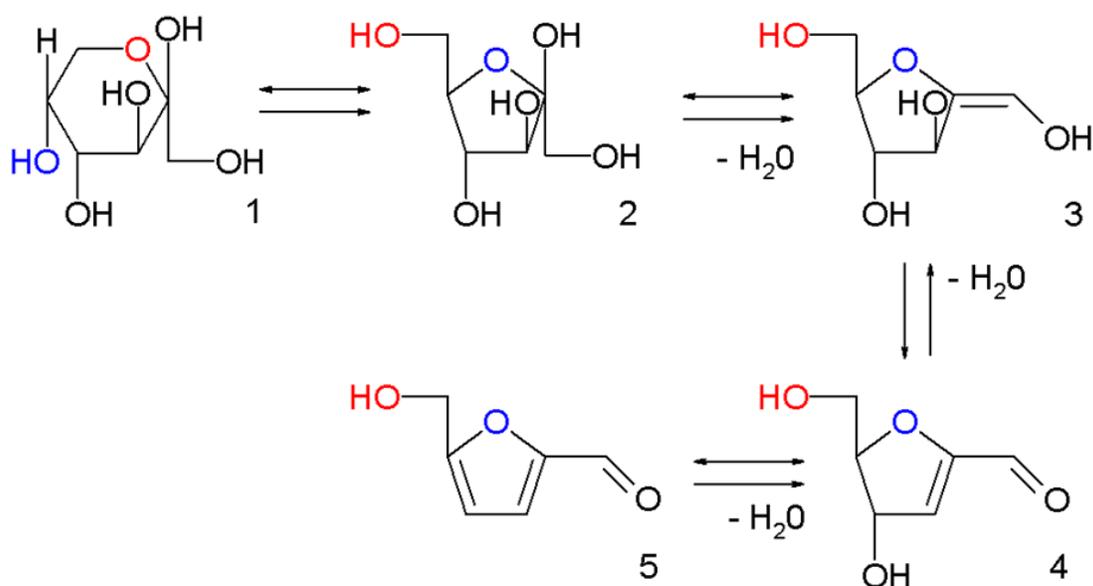


Figura 3. Formación del 5-HMF en la miel.⁴⁵

1.11.2 Contenido de azúcar

El almacenamiento produce una disminución aproximadamente del 15% en la cantidad de fructosa y glucosa, debido a la formación de maltosa y otros disacáridos reductores catalizados por el medio ácido. De esta manera, la norma de calidad pacta que la fructosa y la sacarosa deben superar los 60 g y los 45 g por 100 g de miel, respectivamente. Ya que la composición de los azúcares se ve afectada por el origen botánico y geográfico, si se detecta una cantidad diferente de azúcares, se debe considerar una posible práctica fraudulenta.⁴⁶ La proporción de las dos

azúcares principales, fructosa y glucosa (F/G) condiciona la velocidad de cristalización de la miel, una miel con una relación $F/G > 1.33$ tardará en cristalizar, y cuando sea $F/G < 1.11$ acelerará el proceso.⁴⁷ Un inconveniente presentado en la cristalización es la fermentación, algunas mieles cristalizan formando 2 fases. La superior es la fase más líquida y rica en agua, lo cual favorece la proliferación de bacterias (*Bacillus*, principalmente) generándose la transformación de los azúcares en alcohol y dióxido de carbono.⁴⁸

1.11.3 Humedad y actividad del agua

La importancia del contenido de humedad de la miel debe subrayarse, ya que afecta en gran medida a la calidad del producto. El agua se encuentra entre los principales compuestos de la miel y representa en promedio alrededor del 17%. De acuerdo con normativa el contenido de humedad de la miel no debe exceder el 20% del producto total. Sin embargo, el contenido de humedad no es estable, ya que la miel muestra una alta propiedad higroscópica, en otras palabras, puede absorber agua fácilmente bajo ciertas condiciones. Por lo tanto, el contenido de humedad cambia a lo largo del ambiente que rodea a la miel. En condiciones de alta humedad relativa, se demuestra que hay un aumento en el contenido de humedad.⁴⁹ De hecho, el almacenamiento de miel debe realizarse en un ambiente seco para asegurar que no haya ningún deterioro por una fermentación emergente. Sin embargo, no es el contenido de humedad lo que gobierna y controla el crecimiento microbiano, sino la actividad del agua. La actividad del agua representa el contenido de agua que está "disponible" para el crecimiento microbiano. Las moléculas de agua están principalmente unidas por sólidos solubles. En consecuencia, los microorganismos no tienen suficiente humedad para crecer. La miel contiene levaduras osmofílicas y osmotolerantes que pueden producir alcohol etílico que afecta la calidad de la miel.⁵⁰ En el caso de la cristalización, los sólidos solubles se reducen y la actividad del agua aumenta, por lo que hay una mayor posibilidad de degradación de la calidad. La miel suele tener una actividad de agua entre 0.50 y 0.65. Los valores de actividad del agua por debajo de 0.60 presentan un ambiente estable donde los microorganismos no pueden sobrevivir. Además, el contenido de humedad depende

del nivel de madurez alcanzado en la colmena, la región, el clima y la temporada de producción, mientras que las propiedades fisicoquímicas como la viscosidad y la cristalización también se ven afectadas por estos factores. La determinación de la humedad, utilizando un refractómetro, es un procedimiento de rutina en el análisis de la miel. Debe tenerse en cuenta que este tipo de medición no es precisa y para poder acceder con precisión al contenido de humedad, se debe realizar una titulación Karl-Fischer.⁵¹

1.11.4 Actividad diastásica

Las diastasas incluyen α y β -amilasa que son un grupo de enzimas que digieren almidón. La α -amilasa degrada el almidón a una mezcla de la maltosa disacárida, la maltotriosa trisacárida y oligosacáridos conocidos como dextrinas. La actividad diastásica comprende otra opción para la evaluación de la calidad de la miel. Junto con el contenido de 5-HMF, una disminución de la actividad de la diastasa puede indicar un envejecimiento excesivo o un proceso térmico en una temperatura superior a 60 °C. La normativa plantea como un mínimo de actividad diastásica igual a 8 DN, en unidades Schade para la mayoría de las mieles. La actividad de la diastasa se expresa en unidades de Schade, como DN. En particular, una unidad de diastasa está relacionada con la actividad enzimática que puede hidrolizar 0.01 g de almidón en 1 hora a 40 °C para 1 g de miel. Sin embargo, hay una excepción para las mieles con baja actividad enzimática y el valor permisible de las unidades de DN es superior a 3. La miel producida a partir de néctares jóvenes a principios de primavera es la razón de una menor actividad enzimática.⁵²

1.12 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO FENÓLICO

Los compuestos fenólicos están constituidos por uno o más anillos aromáticos y por varios grupos hidroxilo; tienen diferentes estructuras y propiedades biológicas, entre ellas, la capacidad antioxidante contra el daño oxidativo causado por radicales libres.⁵³ Entre los métodos más usados para determinar el contenido de fenoles es el ensayo de Folin-Ciocalteu. Este consiste en medir los fenoles que reaccionan con agentes oxidantes; en este procedimiento, se usa el reactivo Folin-Ciocalteu, que está formado por una mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfowolfrámico, que reaccionan con algún fenol para dar productos cromóforos.⁵⁴ El método de Folin-Ciocalteu es una técnica colorimétrica, basada en una reacción de óxido-reducción, donde el reactivo de Folin-Ciocalteu se reduce y los compuestos fenólicos se oxidan en un medio básico. En esta reacción se presenta un cambio de color, de amarillo a azul. Por medio de ese cambio de color es posible monitorear la reacción en un espectrofotómetro, en el modo de absorbancia a una longitud de onda de 750 nm, y la absorción es proporcional a la concentración de los compuestos fenólicos.⁵⁵ En la Figura 4, se muestra la reacción entre el reactivo Folin-Ciocalteu y fenoles.⁵⁶



Figura 4. Reacción de los fenoles con el reactivo Folin-Ciocalteu.⁵²

1.13 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE EL ENSAYO DE DECOLORACIÓN DEL RADICAL DPPH

El método antioxidante del radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) es un ensayo colorimétrico donde se mide la decoloración de la solución del radical al reaccionar

con el antioxidante (extracto, compuesto o muestra problema). Se trata de una reacción vía radical libre, que mide la capacidad del antioxidante de transferir un radical hidrógeno al DPPH y estabilizarlo (Figura 5).⁵⁷ Al transcurrir el tiempo de reacción y alcanzarse el equilibrio, se mide el cambio de color (de morado a amarillo o transparente) por medio de espectroscopía en el modo de absorbancia, a una longitud de onda de 515 nm. Entre mayor es la decoloración de la mezcla mayor es la concentración de los compuestos antioxidantes.⁵⁷

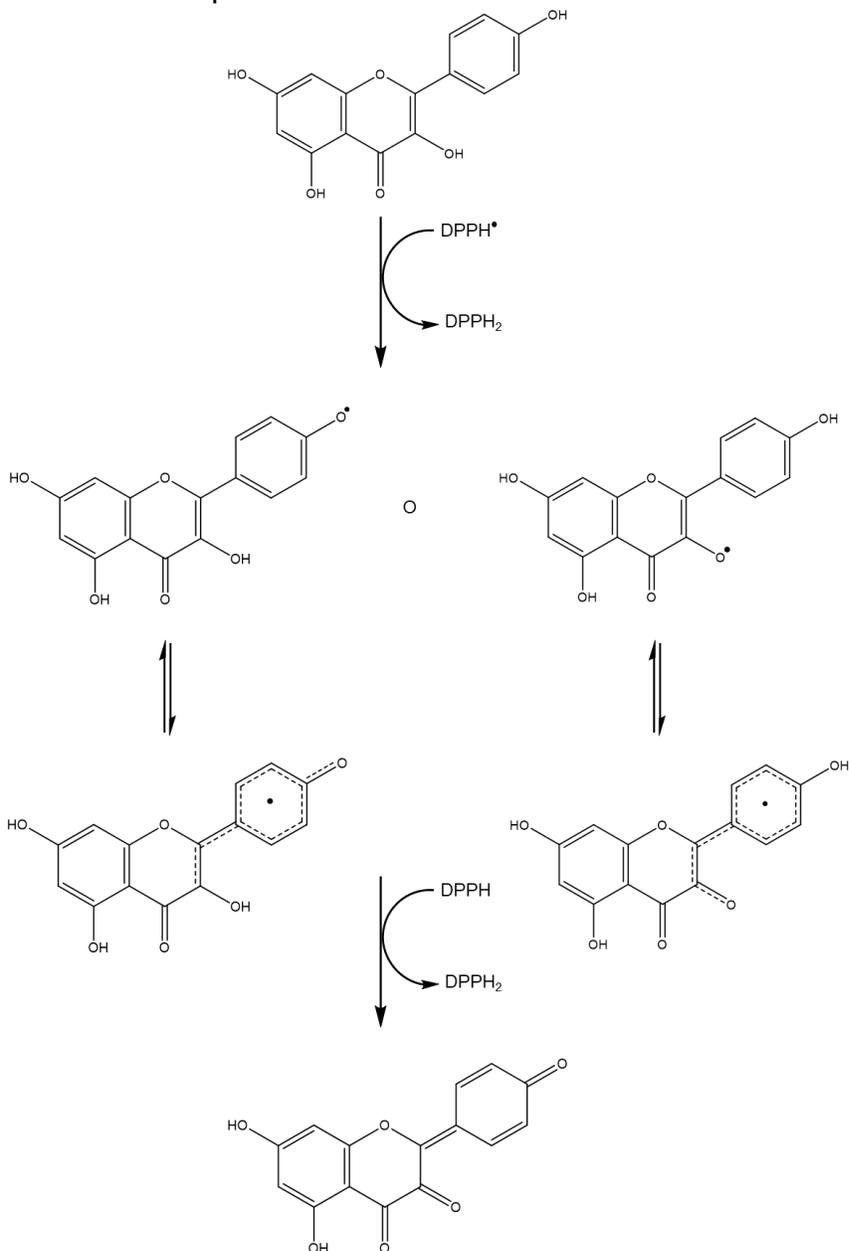


Figura 5. Reacción de un flavonoide con el radical DPPH.⁵³

1.14 MEDICIÓN DEL CONTENIDO DE FLAVONOIDES POR MEDIO DEL ENSAYO DE CLORURO DE ALUMINIO

Uno de los métodos para la determinación de flavonoides es por medio del ensayo con cloruro de aluminio.⁵⁸ Las flavonas y flavonoles forman complejos de aluminio estables de coloración amarilla, lo cual permite la cuantificación de estos por medio de espectroscopía ultravioleta-visible.⁵⁸ En principio, el ion aluminio forma el complejo con el carbonilo del anillo B y un grupo hidroxilo, o con los hidroxilos del grupo catecol del flavonoide (Figura 6). El ensayo se determina a 420 nm, que es la longitud de onda máxima de absorción que presentan los complejos.

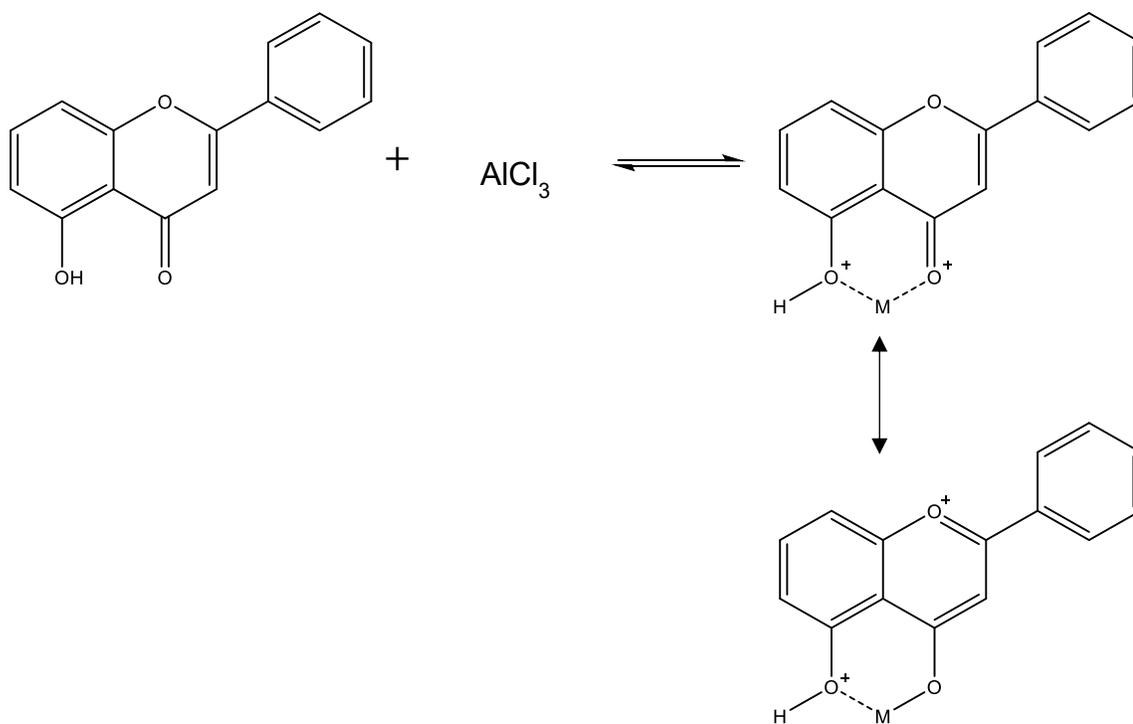


Figura 6. Reacción del cloruro de aluminio con un flavonoide.⁵⁴

2. HIPÓTESIS

Las mieles tienen un alto contenido en fenoles y flavonoides, los cuales le proporcionan a ésta diferentes actividades biológicas, entre ellas, capacidad antioxidante y antibacteriana; aunque en malas condiciones de conservación el contenido de estos compuestos y la actividad antioxidante se ve afectado. Las mieles mexicanas presentan una capacidad antioxidante, contenido fenólico y flavonoide que disminuye en el paso del tiempo por malas condiciones de almacenamiento y generando productos de degradación.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del calentamiento y del tiempo de almacenamiento sobre la actividad antioxidante, contenido de fenoles, de flavonoides, y la composición principal de mieles mexicanas, por técnicas espectroscópicas, con el propósito de establecer las mejores condiciones de conservación.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Determinar la actividad antioxidante de mieles mexicanas producidas por abejas de los géneros *Apis*, *Scaptotrigona*, *Melipona*, *Plebeia* y *Nannotrigona* utilizando el ensayo de blanqueamiento de DPPH.

3.2.2 Cuantificar el contenido total de fenoles y flavonoides en las muestras de miel.

3.2.3 Estudiar la correlación entre el contenido total de fenoles y flavonoides en las mieles mexicanas con su actividad antioxidante.

3.2.4 Identificar los compuestos mayoritarios y los productos de degradación producidos en las mieles, relacionados a variaciones de temperatura y tiempo por medio de resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H).

3.2.5 Medir los cambios en la actividad antioxidante, contenido de fenoles y flavonoides de las mieles conservadas a diferentes temperaturas en diferentes tiempos.

3.2.6 Determinar la actividad antibacteriana de las mieles mexicanas frente a *Staphylococcus aureus*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL DE ESTUDIO

Las muestras de mieles de los géneros *Apis*, *Scaptotrigona*, *Nannotrigona*, *Melipona* y *Plebeia* fueron obtenidas de apiarios de diferentes zonas de México y algunas son muestras comerciales (Figura 7). En el Anexo I se incluye el listado completo de mieles, donde se indica el nombre común y la especie productora. Todas las muestras fueron rotuladas, selladas, conservadas a 4 °C y aisladas de la luz (en una nevera con control de temperatura y sin incidencia luminosa) para su posterior análisis. Respecto a las muestras que fueron seleccionadas para el ensayo de estabilidad, fueron conservadas de igual manera, excepto por la variable de temperatura (20 y 40 °C), la cual fue monitoreada por la estufa con control térmico donde se conservaron las muestras.



Figura 7. Mieles empleadas en el estudio.

4.2 REACTIVOS

Ácido gálico, 99 %; ácido trimetilsililpropanoico, 98%, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, 99.9 %; trolox®: ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromán-2-carboxílico, 97%; de Sigma-Aldrich, EE.UU. Quercetina, 95 %; de Sigma-Aldrich,

Toluca, México. Reactivo de Folin-Ciocalteu, 2N de Sigma-Aldrich, Suiza. Etanol, 96 %; de Meyer, México. Caldo de infusión de cerebro-corazón BHI; de Merck, Alemania. Metanol, 99.8 %; de Merck, EE.UU. Cloruro de aluminio, 97.8%; de J. T. BAKER, Xalostoc, México. Carbonato de sodio, grado técnico; de LAITZ, México, D.F. Agua deuterada, 99.8 %; Cambridge Isotopes, EE.UU.

4.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL ENSAYO DE DECOLORACIÓN DEL RADICAL DPPH

La evaluación de la capacidad antioxidante de las mieles se determinó por el método de blanqueamiento del radical DPPH bajo la metodología descrita por Prieto, J.⁵⁹ con algunas modificaciones. Los resultados se expresan en $\mu\text{mol ETrolox}^{\circledR}/\text{g}$ de miel; para ello se elaboró una curva de calibración con Trolox[®] a partir de una solución madre de 500 μM , y concentraciones en un rango de 2 μM a 125 μM (Figura 8). También, se preparó una solución del radical DPPH (0.2 mM) en metanol, la cual se preservó de la luz para evitar su degradación. Por otra parte, las muestras de miel se diluyeron para tener una concentración de 1 g/mL. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un lector de placas de 96 pozos (Epoch, BioTek) a una longitud de onda de 517 nm. La determinación de la capacidad antioxidante de cada sustancia de prueba se realizó utilizando placas con pozos de 200 μL . Brevemente, a cada pozo se le adicionaron 100 μL de la solución del estándar o de las muestras y, posteriormente, 100 μL de la solución de DPPH. Por último, la placa se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente por 30 minutos y se realizó la lectura de la absorbancia. Para el análisis de los resultados se calculó el porcentaje de inhibición según la ecuación 2. El ensayo se realizó con 5 réplicas por muestra.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Absorbancia}_{\text{blanco}} - \text{Absorbancia}_{\text{muestra}}}{\text{Absorbancia}_{\text{blanco}}} * 100\% \quad \text{Ecuación 2}$$

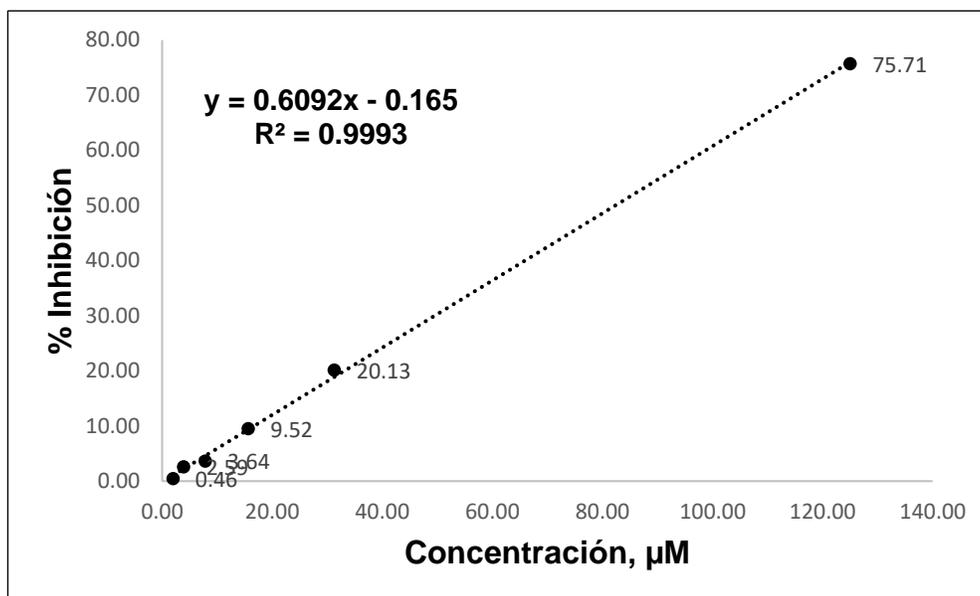


Figura 8. Curva de calibración para el ensayo de actividad antioxidante DPPH.

4.4 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO FENÓLICO POR EL MÉTODO FOLIN-CIOCALTEU

Para determinar el contenido total de fenoles se empleó la metodología descrita por Magalhaes y colaboradores,⁶⁰ con algunas modificaciones. En este ensayo se empleó un lector de placas (Epoch, BioTek) con placas de 96 pozos. Como primer paso, se realizó la dilución del reactivo Folin-Ciocalteu (2.0 N) con agua desionizada para tener una concentración final de 1.0 N, por aparte, se prepararon las soluciones acuosas de carbonato de sodio (8 % m/v) y de ácido gálico a 200 ppm. Las muestras de miel se diluyeron en agua, para tener concentraciones finales de 1 g/mL. El ácido gálico se utilizó como sustancia de referencia para construir la curva de calibración en un rango de concentración de 0.5 a 200 ppm (Figura 9) y expresar el contenido fenólico en mg EAG/g de miel. Para realizar la determinación se tomaron alícuotas de 50 μL de las sustancias de prueba, posteriormente, se adicionaron 50 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu, se esperó 1 minuto para homogenizar y, por último, 100 μL de carbonato de sodio al 8% a cada pozo. Las placas se mantuvieron aisladas de la luz durante 60 minutos a una temperatura de 25 °C y lecturas de la absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 760 nm. Para la corrección de la

absorbancia de las muestras, se usó la Ecuación 3. Se realizaron 5 réplicas por muestra.

$$A_T = \text{Absorbancia}_{\text{muestra}} - \text{Absorbancia}_{\text{blanco}}$$

Ecuación 3

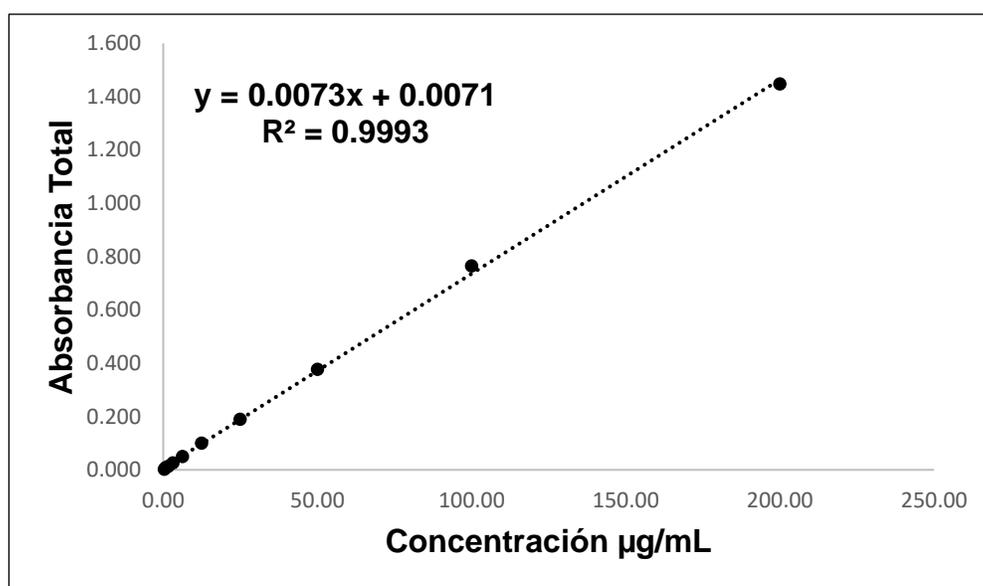


Figura 9. Curva de calibración para el ensayo de fenoles totales.

4.5 DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES CON AlCl_3

El contenido de flavonoides totales se determinó en las muestras de miel siguiendo la metodología descrita por Kumazawa y colaboradores.⁶¹ Para la cuantificación de los flavonoides, se construyó una curva de calibración con quercetina en un rango de 0.4 a 25 ppm, partiendo de una solución madre etanólica de 200 ppm (Figura 10). Las muestras de mieles se diluyeron en agua para tener concentraciones de 1 g/mL. Para cuantificar los flavonoides a cada pozo de la placa se le adicionaron 100 µL de la sustancia de prueba y 100 µL de solución etanólica de cloruro de aluminio (AlCl_3 , 2%). Las placas se mantuvieron en la oscuridad por un período de 15 minutos y posteriormente, las placas se leyeron a 420 nm en el modo de absorbancia. Para el cálculo de corrección de la absorbancia total se usó la Ecuación 4. Los resultados

de este ensayo se expresaron en $\mu\text{g EQ/g}$ de miel. El ensayo se realizó con 5 réplicas por muestra.

$$A_T = \text{Absorbancia}_{\text{muestra}} - \text{Absorbancia}_{\text{blanco}}$$

Ecuación 4

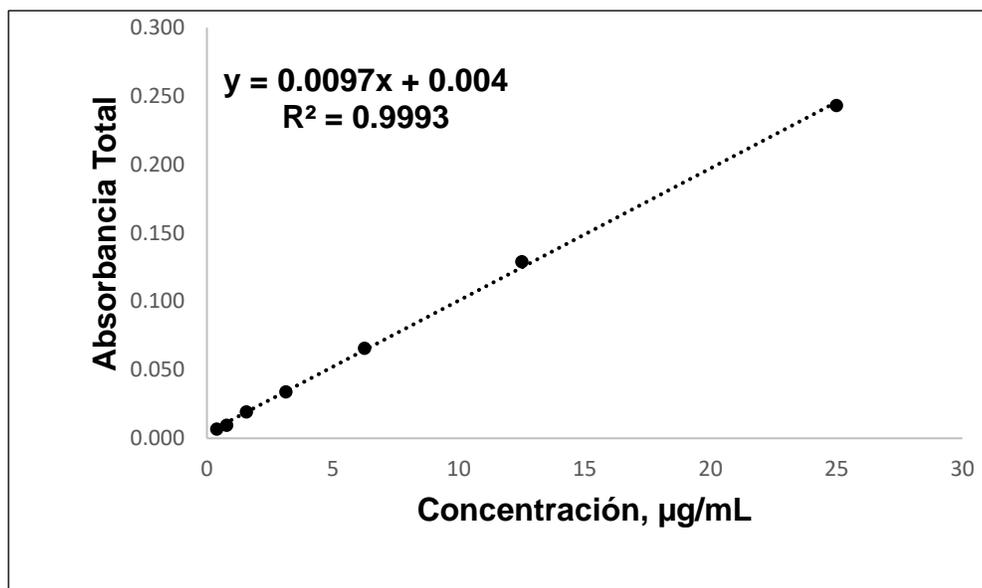


Figura 10. Curva de calibración para la determinación de flavonoides totales.

4.6 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LAS MIELES SOBRE *Staphylococcus aureus*

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada una de las mieles se determinó utilizando la metodología reportada por Rosas y colaboradores⁶² y como organismo de prueba el *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Las bacterias se activaron realizando una solución de la suspensión de bacterias con caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI, por sus siglas en inglés) y se incubaron por un periodo de 24 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, adicionalmente, la bacteria utilizada se ajustó a 0.5 unidades de McFarland (1×10^6 UFC/mL). Posteriormente, la CMI se determinó utilizando el método de microdilución en placas estériles de 96 pozos. Se usó como control positivo el fármaco antimicrobiano digluconato de clorhexidina y como control negativo (control de crecimiento) el medio de cultivo con la suspensión microbiana.

También se midió la actividad antibacteriana de una solución de peróxido de hidrógeno, con el fin de comparar la efectividad de las mieles.

4.7 REGISTRO DE LOS ESPECTROS POR RMN-¹H

Para el análisis de las muestras por RMN-¹H se pesaron 50 mg de miel y se disolvieron en 600 µL de agua deuterada con TSP (5 mM) como sustancia de referencia, preparada siguiendo el protocolo descrito por Chenomx.⁶³ Los espectros se registraron en un espectrómetro Bruker Avance III de 700 MHz equipado con una criosonda y un muestreador automático Sample Jet a 25°C. El procesamiento de los espectros se realizó con el programa MestReNova (versión 12.0.1, Mestrelab Research, 2018) y Chenomx (versión 8.5), donde se realizó el ajuste de fase, línea base, y se referenció respecto a la señal del TSP-*d*₄ [sal sódica del ácido 3-(trimetilsilil) propiónico 2,2,3,3-*d*₄].

4.8 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD

El contenido de agua se determinó midiendo el índice de refracción a 20 °C con un refractómetro (Atago, NAR 1T Liquid) provisto de un controlador de temperatura. Los valores del índice de refracción se convirtieron a contenidos de humedad de acuerdo con el método oficial de la AOAC 969.38.⁶⁴ El refractómetro se calibró con agua ultrapura a 20 °C antes de los análisis. Las muestras se llevaron a 20 °C para realizar las mediciones. Luego se añadieron aproximadamente 0,5 mL de muestra a la celda de medición del prisma para realizar la lectura. La medición por cada muestra se realizó 3 veces.

4.9 ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO

Para el reporte de los resultados de los ensayos de actividad antioxidante, contenido fenólico y flavonoide, se expresó el promedio más o menos la desviación estándar (con 5 réplicas), y se realizó una prueba de contraste de Tukey, de diferencias honestamente significativas (HSD, por sus siglas en inglés) al 95 % de confianza para evidenciar que muestras de mieles presentaban diferencias significativas, por medio del software Statgraphics (versión 15.2.05). Se determinaron las correlaciones posibles entre los ensayos evaluados por medio de la prueba de P de Person. Posteriormente se realizó un diagrama de análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) respecto a las muestras de mieles y a su género por medio del programa Statistica (Versión 8).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 MUESTRAS

En el Cuadro 3 se presentan las muestras de mieles mexicanas que se estudiaron y su origen respecto a la abeja productora.

Cuadro 3. Listado de las mieles bajo estudio y su clase.

Muestra	Tipo de miel	Muestra	Tipo de miel
S1	<i>Apis mellifera</i>	S23	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S2	<i>Apis mellifera</i>	S24	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S3	<i>Apis mellifera</i>	S25	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S4	<i>Apis mellifera</i>	S26	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S5	<i>Melipona spp.</i>	S27	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S6	<i>Apis mellifera</i>	S28	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S7	<i>Plebeia spp.</i>	S29	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S8	<i>Apis mellifera</i>	S30	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S9	<i>Apis mellifera</i>	S31	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S10	<i>Apis mellifera</i>	S32	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S11	<i>Apis mellifera</i>	S33	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S12	<i>Apis mellifera</i>	S34	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S13	<i>Apis mellifera</i>	S35	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S14	<i>Apis mellifera</i>	S36	<i>Plebeia spp.</i>
S15	<i>Apis mellifera</i>	S37	<i>Scaptotrigona pectoralis</i>
S16	<i>Apis mellifera</i>	S38	<i>Nannotrigona spp.</i>
S17	<i>Scaptotrigona mexicana</i>	S39	<i>Melipona beecheii</i>
S18	<i>Scaptotrigona mexicana</i>	S40	<i>Apis mellifera</i>
S19	<i>Scaptotrigona mexicana</i>	S41	<i>Apis mellifera</i>
S20	<i>Scaptotrigona mexicana</i>	S42	<i>Apis mellifera</i>
S21	<i>Scaptotrigona mexicana</i>	S43	<i>Apis mellifera</i>
S22	<i>Scaptotrigona mexicana</i>	-	-

Las muestras fueron recolectadas en diferentes zonas del país (Anexo I) por apicultores artesanales y comerciales, en los primeros meses del año 2019. Todas las muestras son mieles multiflorales, excepto la muestra S41, que es una miel monofloral de aguacate.

5.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, CONTENIDO FLAVONOIDES Y FENOLES EN LAS MIELES

Para determinar el contenido de fenoles, flavonoides y la capacidad antioxidante de las mieles, se usaron las ecuaciones de las curvas de calibración con los estándares de referencia utilizados en las normas Mexicana y extranjeras.⁷ En el Cuadro 4, se muestran los resultados de los ensayos mencionados anteriormente aplicados a las muestras de mieles mexicanas, con un n de 5 réplicas.

Cuadro 4. Valores del contenido fenólico, flavonoides y capacidad antioxidante de mieles mexicanas.

Muestra	Flavonoides		Folin-Ciocalteu		DPPH	
	µg EQ/g miel		µg EAG/g miel		µmol ETrolox®/g miel	
S1	6.7 ^{w,x}	± 0.5	110 ^{l,m}	± 3.6	0.11 ^{f,g,h,i,j,k}	± 0.028
S2	27.5 ^ñ	± 0.6	130 ^k	± 2.5	0.10 ^{e,f,g,h,i}	± 0.003
S3	23.1 ^{o,p,q}	± 0.2	60 ^{o,p}	± 1.7	0.10 ^{e,f,g,h,i,j}	± 0.012
S4	5.3 ^{y,x}	± 0.3	100 ^{m,n}	± 2.1	0.04 ^{b,c}	± 0.005
S5	43.2 ^{f,e,d}	± 0.5	90 ^{n,ñ}	± 1.5	0.15 ^{i,j,k,l,m,n}	± 0.01
S6	21.2 ^{p,q,r}	± 0.5	70 ^o	± 2.0	0.08 ^{b,c,d,e,f}	± 0.003
S7	35.8 ^{i,j,k}	± 0.5	210 ^{e,f}	± 7.6	0.14 ^{i,j,k,l,m}	± 0.01
S8	18.6 ^{r,s}	± 0.3	140 ^j	± 3.5	0.26 ^r	± 0.015
S9	10.7 ^{u,v}	± 0.5	40 ^q	± 1.5	0.08 ^{b,c,d,e,f}	± 0.001
S10	24.1 ^{o,p}	± 0.7	90 ^ñ	± 3.5	0.09 ^{c,d,e,f,g}	± 0.002
S11	9.3 ^{u,v,w}	± 0.5	110 ^{l,m}	± 3.1	0.15 ^{k,l,m,n}	± 0.015
S12	41.9 ^{e,f,g}	± 1.2	130 ^{j,k}	± 2.5	0.20 ^{q,r}	± 0.05
S13	7.3 ^{w,x}	± 0.5	40 ^q	± 2.1	0.08 ^{b,c,d,e,f}	± 0.009
S14	41.0 ^{f,g}	± 0.8	130 ^{j,k}	± 1.5	0.17 ^{l,m,n,ñ}	± 0.01
S15	4.1 ^y	± 0.2	110 ^l	± 1.0	0.04 ^b	± 0.003
S16	25.3 ^{ñ,o}	± 0.6	50 ^{p,q}	± 1.0	0.17 ^{l,m,n,ñ}	± 0.009
S17	36.3 ^{k,l,m}	± 1.7	150 ⁱ	± 2.5	0.07 ^{b,c,d,e}	± 0.001
S18	38.8 ^{i,h}	± 1.1	140 ^j	± 2.0	0.09 ^{d,e,f,h}	± 0.005
S19	49.1 ^b	± 1.5	190 ^g	± 2.5	0.20 ^{ñ,o,p,q}	± 0.023
S20	32.6 ^{k,l,m,n}	± 0.9	170 ^h	± 1.5	0.04 ^b	± 0.004
S21	54.8 ^a	± 1.3	200 ^{f,g}	± 3.2	0.23 ^{q,r}	± 0.035
S22	15.0 ^t	± 0.5	90 ^{n,ñ}	± 2.0	0.08 ^{b,c,d,e,f}	± 0.003

EQ: Equivalentes de quercetina.

EAG: Equivalentes de ácido gálico.

ETrolox: Equivalentes de Trolox®.

n=5

^aMuestra significativamente diferente.

b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n,ñ,o,p,q,r Grupo de muestras que no presentaron diferencias entre las muestras del mismo grupo.

Cuadro 4. Valores del contenido fenólico, flavonoides y capacidad antioxidante de mieles mexicanas (continuación).

Muestra	Flavonoides		Folin-Ciocalteu		DPPH	
	µg EQ/g miel		µg EAG/g miel		µmol ETrolox®/g miel	
S23	30.8 ^{m,n}	± 1.1	170 ^h	± 1.5	0.23 ^{p,q,r}	± 0.005
S24	38.9 ^{h,g}	± 1.0	110 ^{l,m}	± 1.5	0.09 ^{d,e,f,h}	± 0.002
S25	22.6 ^{o,p,q}	± 0.8	70 ^o	± 0.5	0.12 ^{f,g,h,i,j,k}	± 0.01
S26	18.9 ^s	± 0.8	70 ^o	± 0.8	0.04 ^b	± 0.003
S27	37.7 ^{h,i,j}	± 1.4	220 ^d	± 5.7	0.17 ^{l,m,n,ñ}	± 0.006
S28	76.2 ^a	± 1.0	360 ^b	± 9.0	0.10 ^{h,i,j,k,l,m}	± 0.032
S29	47.3 ^{b,c}	± 0.6	220 ^{d,e}	± 3.1	0.19 ^{n,ñ,o,p}	± 0.003
S30	46.0 ^{b,c,d,e}	± 1.0	120 ^{k,l}	± 2.5	0.13 ^{g,h,i,j,k,l}	± 0.01
S31	32.1 ^{l,m,n}	± 0.5	250 ^c	± 6.0	0.22 ^{o,p,q,r}	± 0.01
S32	46.8 ^{b,c,d}	± 1.1	130 ^{j,k}	± 2.0	0.04 ^b	± 0.003
S33	19.2 ^{r,s}	± 0.6	130 ^{j,k}	± 1.5	0.09 ^{d,e,f,g,h}	± 0.003
S34	30.7 ⁿ	± 0.7	70 ^o	± 1.5	0.11 ^{e,f,g,h,i,j,k}	± 0.006
S35	12.8 ^{t,u}	± 0.6	50 ^{p,q}	± 0.9	0.05 ^{b,c,d}	± 0.01
S36	34.9 ^{j,k,l}	± 0.6	250 ^c	± 7.0	0.18 ^{m,n,ñ,o}	± 0.005
S37	14.2 ^t	± 1.3	110 ^{l,m}	± 2.6	0.05 ^{b,c,d}	± 0.003
S38	22.0 ^{o,p,q}	± 1.3	270 ^a	± 7.2	0.15 ^{i,j,k,l,m,n}	± 0.005
S39	18.3 ^{r,s}	± 0.9	90 ^{n,ñ}	± 2.2	0.14 ^{i,j,k,l,m}	± 0.006
S40	7.7 ^{v,w}	± 0.6	50 ^{p,q}	± 0.5	0.04 ^b	± 0.003
S41	46.2 ^{c,d,e}	± 1.6	370 ^b	± 5.9	0.67 ^a	± 0.01
S42	20.8 ^{q,r,s}	± 0.8	150 ⁱ	± 1.4	0.17 ^{l,m,n,ñ}	± 0.004
S43	22.3 ^{q,r,s}	± 1.2	210 ^{e,f}	± 1.5	0.17 ^{l,m,n,ñ}	± 0.002

EQ: Equivalentes de quercetina.

EAG: Equivalentes de ácido gálico.

ETrolox: Equivalentes de Trolox®.

n=5

^aMuestra significativamente diferente.
b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n,ñ,o,p,q,r Grupo de muestras que no presentaron diferencias entre las muestras del mismo grupo.

Las muestras que tienen la letra “a” como súper índice son aquellas que presentaron una diferencia estadísticamente significativa con un nivel del 95 % de confianza. Para el ensayo de actividad antioxidante se han identificado 18 grupos homogéneos (b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, ñ, o, p, q, r) donde las muestras de estos grupos no tienen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras del mismo grupo. Esta prueba de contraste de las medias de los ensayos se realizó con el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD, por sus siglas en inglés) de Tukey. Para el ensayo de contenido de fenoles se encontraron 18 grupos de muestras diferentes, y respecto al ensayo del contenido de flavonoides se hallaron 27 grupos diferentes.

Los valores de la actividad antioxidante de las mieles estudiadas estuvieron en el rango de 0.04 a 0.67 $\mu\text{mol ETrolox}^{\text{®}}/\text{g}$ miel, donde S41, S8, S21 y S23 son las muestras que presentaron mayor capacidad antioxidante. Las muestras corresponden a las especies de *Apis mellifera* y *Scaptotrigona mexicana*, respectivamente. Estos datos concuerdan con Jiménez y colaboradores⁶⁵ donde discutieron que las mieles de *Scaptotrigona mexicana* presentan actividad antioxidante, aunque las mieles de *Apis mellifera* tienen valores mayores.

La muestra S41 fue la que presentó la mayor actividad antioxidante y es una muestra de miel monofloral de aguacate; en comparación a las otras muestras que son multiflorales. Este resultado coincide con lo encontrado por Alves y colaboradores,⁶⁶ quienes estudiaron mieles monoflorales y hallaron actividades antioxidantes superiores en comparación con algunas mieles multiflorales. Paralelamente, esta miel presentó el mayor contenido de fenoles respecto a todas las muestras; esto indica una posible correlación entre el contenido fenólico y la capacidad antioxidante de la muestra. Jiménez y colaboradores⁶⁵ encontraron una correlación lineal y fuerte entre estas variables para las mieles monoflorales. Por otra parte, las muestras S28, S21, S19, S29 y S30 pertenecientes al grupo de las *Scaptotrigona mexicana*, y la S41 (*Apis mellifera*, aguacate), fueron las que presentaron el mayor contenido de flavonoides. En este caso, las mieles de *Scaptotrigona* obtuvieron mayores valores en comparación con las de *Apis*. En un estudio previo, Rodríguez, A.⁶⁷ comparó el contenido de flavonoides entre mieles de la tribu Meliponini (*Scaptotrigonas*, *Meliponas*, entre otras) y de *Apis mellifera*, y concluyó que las primeras poseían una mayor concentración de flavonoides.

Con la finalidad de determinar la existencia de una correlación entre los ensayos evaluados, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson por medio del software Statgraphics (versión 15.2.05) para cada una de las combinaciones posibles entre ellos. En el Cuadro 5 se presentan las correlaciones de Pearson, entre cada par de variables. El rango de estos coeficientes de correlación va de -1 a +1, y miden la fuerza de la relación lineal entre las variables. El tercer número en

cada columna del cuadro es el valor-P que prueba la significancia estadística de las correlaciones estimadas. Valores-P abajo de 0.05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95.0 %.

Cuadro 5. Correlación entre el contenido flavonoide y fenólico.

	Contenido flavonoide	Contenido fenólico
Contenido flavonoide	-	0.63
N° de muestras	-	(43)
P	-	0.0
Contenido fenólico	0.63	-
N° de muestras	(43)	-
P	0.0	-

Para los contenidos de flavonoides y fenoles se obtuvo un factor de correlación de 0.63, el cual indica una relación fuerte entre las variables, que junto con el valor positivo muestra una proporcionalidad directa entre ellas. Como se describe en la literatura,⁶⁸ un valor P de 0.8-1.0 indica una correlación muy fuerte, 0.6-0.8 fuerte, 0.4-0.6 moderada, 0.2-0.4 débil y 0.0-0.2 indica ausencia de correlación.

Para el contenido de flavonoides y ensayo de la capacidad antioxidante (Cuadro 6) se encontró una correlación de 0.36, que indica que no hay una fuerte relación entre los observables, puede decirse que una variable no influye en la otra.

Cuadro 6. Correlación entre flavonoides totales y la capacidad antioxidante.

	Contenido flavonoide	Capacidad antioxidante
Contenido flavonoide	-	0.36
N° de muestras	-	(43)
P	-	0.02
Capacidad antioxidante	0.36	-
N° de muestras	(43)	-
P	0.02	-

Respecto a la correlación entre el contenido fenólico y la capacidad antioxidante (Cuadro 7) que fue de 0.61, puede indicarse que estas variables también tienen una fuerte relación entre ellas y presentan una proporcionalidad directa.

Cuadro 7. Correlación del contenido fenólico y la capacidad antioxidante.

	Contenido fenólico	Capacidad antioxidante
Contenido fenólico	-	0.61
N° de muestras	-	(43)
P	-	0.0
Capacidad antioxidante	0.61	-
N° de muestras	(43)	-
P	0.0	-

Estos resultados concuerdan con los descritos por Jamróz y colaboradores,⁶⁹ quienes estudiaron 25 mieles de *Apis mellifera* y encontraron una correlación de 0.65 para el contenido fenólico y la actividad antioxidante por el ensayo DPPH. En concordancia con Bertocelj y colaboradores,⁷⁰ que evaluaron la capacidad antioxidante y el contenido fenólico de 7 grupos de mieles típicas de Eslovenia y encontraron una correlación entre estas variables del 0.93. Puede señalarse que el contenido de fenoles aporta en la actividad antioxidante de las mieles. En la Figura 11 se presenta un diagrama PCA construido por medio del software Statistica (Versión 8), a partir del contenido fenólico, flavonoide y actividad antioxidante que

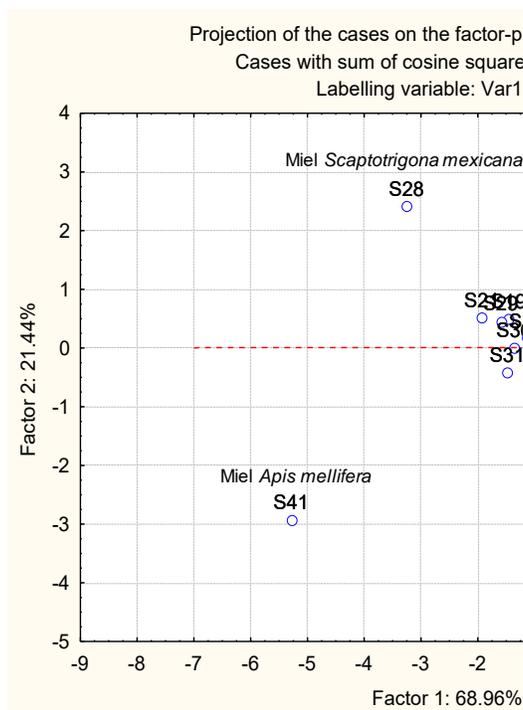


Figura 11. Diagrama PCA, a partir del contenido fenólico, flavonoide y actividad antioxidante en las mieles estudiadas.

PCA: Análisis de componentes principales.

Las etiquetas usadas en el diagrama están descritas en el Cuadro 3.

presentaron las mieles bajo estudio. Por medio de la gráfica, se puede apreciar que las mieles presentaron valores similares entre ellas respecto a los ensayos evaluados, excepto las muestras S41 y S28. Esto se debió a que la muestra S41, fue la que presentó la mayor actividad antioxidante superando las restantes en varias unidades, y también tuvo de los valores más altos de contenido de fenoles, lo que la hace no pertenecer a la tendencia. La miel S41 es una miel monofloral de aguacate, su composición difiere de las otras, ya que son multiflorales, lo cual la hace diferente también en los ensayos medidos.

La muestra S28 correspondiente al género *Scaptotrigona*, tampoco perteneció a la tendencia que presentaron las otras mieles, ya que presentó un alto contenido de flavonoides, y entre las mejores también respecto al contenido fenólico.

En la Figura 12 se puede apreciar que no hay un agrupamiento respecto al género de las abejas, tanto las mieles de *Scaptotrigona* como las de *Apis* tienen valores de actividad antioxidante, contenido fenólico y flavonoide similares. No puede asegurarse que un género es mejor que el otro de acuerdo con los ensayos evaluados, bajo estas muestras.

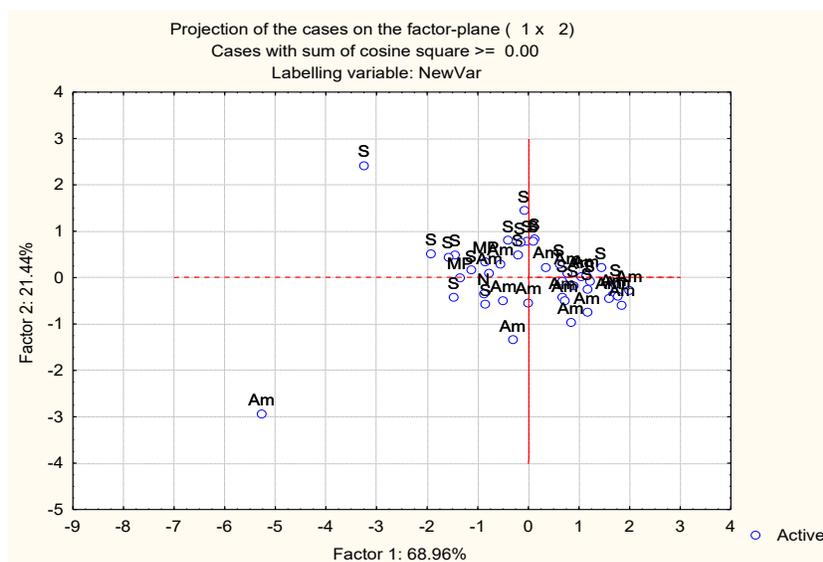


Figura 12. Diagrama PCA, a partir del contenido fenólico, flavonoide y actividad antioxidante, respecto a la especie

PCA: Análisis de componentes principales

*S, *Scaptotrigona mexicana*

*Am, *Apis mellifera*

*P, *Scaptotrigona pectoralis*

*Pb, *Plebeia*

5.3 VARIACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES, FLAVONOIDES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEBIDO AL CAMBIO DE TEMPERATURA, RESPECTO AL TIEMPO

Para monitorear la estabilidad de la miel respecto al tiempo y temperatura, se seleccionaron 10 mieles (*Apis mellifera*, *Scaptotrigonas*, *Plebeia* y *Nannotrigona*) de las 43 bajo estudio, y se dispusieron a temperaturas de 20 °C y 40 °C, con el fin de evaluar el cambio en el contenido fenólico, flavonoide y su capacidad antioxidante al transcurrir 15, 30 y 45 días.

Se tomó como control o blanco los valores de los ensayos aplicados a las mieles en el día cero y sin ser expuestas a cambios de temperaturas (Cuadro 8), con el propósito de comparar el cambio de las mieles en el transcurso del tiempo.

Cuadro 8. Valores del contenido fenólico, flavonoide y capacidad antioxidante de mieles sin ningún tratamiento térmico en un tiempo cero.

TIEMPO CERO, para un n=5							
Muestra	Flavonoides		DPPH			Folin-Ciocalteu	
	µg EQ/g miel		µmol ETrolox®/g miel			µg EAG/g miel	
S1	6.7 ^{x,w}	± 0.5	0.11 ^{f,g,h,i,j,k}	± 0.028	110 ^{l,m}	± 3.6	
S35	12.8 ^{u,t}	± 0.6	0.05 ^{b,c,d}	± 0.01	50 ^{p,q}	± 0.9	
S36	34.9 ^{j,k,l}	± 0.6	0.18 ^{m,n,ñ,o}	± 0.005	250 ^c	± 7.0	
S37	14.2 ^t	± 1.3	0.05 ^{b,c,d}	± 0.003	110 ^{l,m}	± 2.6	
S38	22.0 ^{o,p,q}	± 1.3	0.15 ^{j,k,l,m,n}	± 0.005	270 ^a	± 7.2	
S39	18.3 ^{r,s}	± 0.9	0.14 ^{i,j,k,l,m}	± 0.006	90 ^{n,ñ}	± 2.2	
S40	7.7 ^{v,w}	± 0.6	0.04 ^b	± 0.003	50 ^{p,q}	± 0.5	
S41	46.2 ^{c,d,e}	± 1.6	0.67 ^a	± 0.01	370 ^b	± 5.9	
S42	20.8 ^{q,r,s}	± 0.8	0.17 ^{l,m,n,ñ}	± 0.004	150 ⁱ	± 1.4	
S43	22.3 ^{q,r,s}	± 1.2	0.17 ^{l,m,n,ñ}	± 0.002	210 ^{e,f}	± 1.5	

EQ: Equivalentes de quercetina.
EAG: Equivalentes de ácido gálico.
ETrolox: Equivalentes de Trolox®.
n=5

^aMuestra significativamente diferente.
^{b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n,ñ,o,p,q,r} Grupo de muestras que no presentaron diferencias entre las muestras del mismo grupo.

En el Cuadro 9, se presentan los contenidos de fenoles, flavonoides y antioxidantes de las mieles que se acondicionaron a 20 °C a 15, 30 y 45 días. Las mieles de *Apis mellifera* S1, S40, S41, S42 y S43 fueron las que tuvieron mayores cambios. La miel S40 tuvo una variación en el contenido de flavonoides: de 5.0 µg EQ/g miel a los 15 días, a 1.5 µg EQ/g miel a los 30 días y finalmente, a los 45 días no fue posible detectar flavonoides. Esta tendencia fue similar para el contenido de fenoles y actividad antioxidante para esta muestra. Estos cambios pueden explicarse por la inestabilidad que presentan los flavonoides por exposición al calor,⁷¹ pH, la luz y presencia de oxígeno. En estudios previos se describe que los flavonoides pueden oxidarse y generar compuestos de degradación como las quinonas.^{72, 73} Las muestras S1, S40, S41, S42 y S43 producidas por *Apis mellifera* presentaron comportamientos variados, por ejemplo, la miel S1 aunque también tuvo una disminución en el contenido de flavonoides como la S40, no llegó a ser cero, para 20 °C. Esto indica que, aun cuando las mieles fueron producidas por la misma especie, su composición es diferente, ya que las abejas recolectan el néctar de múltiples especies vegetales que aportan a la miel diferentes componentes. Otro comportamiento que se puede apreciar en este grupo de mieles es el incremento en el contenido de flavonoides, fenoles y antioxidantes en las mieles S41, S42 y S43 al transcurrir el tiempo, tanto para las muestras a 20 °C como las de 40 °C (Cuadro 10). Este cambio se puede explicar por las variaciones en el contenido de humedad de las muestras al ser expuestas a temperaturas mayores a la ambiental (Cuadro 11).

Las mieles de abejas de abejas sin aguijón S36 y S38 también presentaron cambios similares a los observados en las mieles de *A. mellifera*, con un incremento en los fenoles, flavonoides y antioxidantes debido a la deshidratación que presentaron las muestras (Cuadro 11). La muestra S35 de *Scaptotrigona mexicana* fue estable a las diferentes temperaturas los primeros 15 días y, posteriormente, se observó una notable disminución en el contenido de fenoles, flavonoides y antioxidantes (Cuadros 9 y 10). Por otra parte, la muestra más inestable fue la S37 con una reducción en su contenido de fenoles, de flavonoides y actividad antioxidante en el

paso del tiempo a los 20 y 40 °C. Por último, la muestra S39 presentó menores variaciones en el contenido de los compuestos de interés.

En el Cuadro 11, se presentan los resultados de humedad de las mieles, al tiempo inicial y al paso de los 45 días. Las muestras que presentaron los mayores incrementos en el contenido de los fenoles, flavonoides y antioxidantes en todos los casos presentaron deshidratación. Esto indica que, los compuestos se concentraron en las muestras al paso del tiempo y en exposición de la temperatura. La respuesta a estos ensayos es directamente proporcional a la concentración y, por lo tanto, al aumentar la concentración se presentó un aumento en los resultados.

Cuadro 9. Valores del contenido fenólico, flavonoides y capacidad antioxidante en las mieles del ensayo de estabilidad a 20 °C

20 °C, con n=5									
Muestra	15 DÍAS			30 DÍAS			45 DÍAS		
	EFT*	EDPPH**	EFC***	EFT*	EDPPH**	EFC***	EFT*	EDPPH**	EFC***
S1	6.9 ^b ± 0.6	0.04 ^d ± 0.007	110 ^a ± 2.5	5.8 ^a ± 0.3	0.04 ^c ± 0.003	100 ^a ± 6.2	4.3 ^a ± 0.5	0.03 ^b ± 0.002	100 ^a ± 5.3
S35	12.5 ^c ± 0.6	0.04 ^d ± 0.005	40 ^a ± 2.0	0.0 ± 0.0	0.00 ± 0.000	20 ^a ± 1.5	0.0 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0 ± 0.0
S36	35.8 ^a ± 0.5	0.20 ^b ± 0.032	250 ^a ± 3.0	38.7 ^a ± 0.9	0.33 ^a ± 0.031	290 ^a ± 6.6	41.8 ^a ± 1.1	0.40 ^a ± 0.035	300 ^b ± 11.0
S37	0.0 ± 0.0	0.05 ^{c,d} ± 0.004	60 ^c ± 1.5	0.0 ± 0.0	0.00 ± 0.0	50 ^a ± 2.5	0.0 ± 0.0	0.00 ± 0.0	30 ^a ± 2.5
S38	22.3 ^d ± 0.8	0.15 ^a ± 0.003	270 ^a ± 7.8	25.9 ^{b,c} ± 0.7	0.17 ^b ± 0.012	270 ^a ± 7.1	29.4 ^b ± 0.9	0.17 ^a ± 0.010	300 ^b ± 7.5
S39	13.7 ^c ± 0.7	0.08 ^c ± 0.004	90 ^a ± 2.2	9.7 ^a ± 0.6	0.05 ^c ± 0.006	70 ^a ± 2.5	7.5 ^a ± 0.7	0.05 ^b ± 0.004	50 ^a ± 2.5
S40	5.0 ^b ± 0.7	0.04 ^d ± 0.002	50 ^a ± 1.7	1.5 ^a ± 0.2	0.03 ^c ± 0.004	40 ^a ± 3.0	0.0 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0 ± 0.0
S41	47.8 ^a ± 2.6	0.75 ^a ± 0.007	400 ^a ± 18.2	49.4 ^a ± 1.9	0.85 ^a ± 0.017	400 ^a ± 18.2	51.6 ^a ± 3.6	0.90 ^a ± 0.023	510 ^a ± 15.5
S42	22.4 ^d ± 2.2	0.19 ^b ± 0.004	150 ^a ± 6.1	24.8 ^c ± 1.2	0.20 ^b ± 0.015	180 ^a ± 6.1	27.7 ^b ± 2.0	0.23 ^a ± 0.010	190 ^a ± 9.5
S43	24.9 ^d ± 0.6	0.20 ^b ± 0.015	210 ^a ± 4.0	28.1 ^b ± 0.8	0.26 ^a ± 0.009	220 ^a ± 14.7	31.5 ^b ± 1.2	0.28 ^a ± 0.010	230 ^a ± 7.6

* Ensayo de flavonoides (EFT); resultados expresados en µg EQ/g miel.

** Ensayo de AA por DPPH (EDPPH); resultados expresados en µmol ETrolox®/g miel.

*** Ensayo de Folin-Ciocalteu (EFC); resultados expresados en mg EÁG/g miel.

^aMuestra significativamente diferente.
^{b,c,d} Grupo de muestras que no presentaron diferencias entre las muestras del mismo grupo.

Cuadro 10. Valores del contenido fenólico, flavonoides y capacidad antioxidante en las mieles del ensayo de estabilidad a 40 °C

Muestra	40 °C, con n=5								
	15 DÍAS			30 DÍAS			45 DÍAS		
	EFT*	EDPPH**	EFC***	EFT*	EDPPH**	EFC***	EFT*	EDPPH**	EFC***
S1	5.3 ^b ± 0.7	0.05 ^d ± 0.002	100 ^a ± 5.0	4.5 ^c ± 0.5	0.04 ^c ± 0.002	90 ^a ± 5.3	3.5 ^c ± 0.5	0.00 ± 0.0	80 ^a ± 3.5
S35	11.7 ± 0.8	0.02 ^e ± 0.007	40 ^d ± 1.5	0.0 ± 0.0	0.00 ± 0.0	20 ^a ± 2.5	0.0 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0 ± 0.0
S36	38.9 ^a ± 1.5	0.39 ^a ± 0.012	250 ^{b,c} ± 15.3	42.5 ^a ± 1.6	0.39 ^a ± 0.015	270 ^a ± 6.3	46.3 ^a ± 1.7	0.42 ^b ± 0.020	300 ^a ± 8.5
S37	0.0 ± 0.0	0.05 ^d ± 0.004	50 ^a ± 2.5	0.0 ± 0.0	0.00 ± 0.0	40 ^a ± 4.1	0.0 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0 ± 0.0
S38	25.3 ^c ± 1.4	0.19 ^b ± 0.010	290 ^b ± 22.0	29.1 ^b ± 0.6	0.20 ^b ± 0.011	310 ^a ± 9.5	33.2 ^b ± 1.0	0.23 ^c ± 0.026	350 ^a ± 12.6
S39	8.8 ^a ± 0.7	0.08 ^c ± 0.003	70 ^a ± 3.6	4.4 ^c ± 0.2	0.05 ^c ± 0.003	50 ^a ± 4.4	3.0 ^c ± 0.5	0.03 ^a ± 0.005	40 ^a ± 6.6
S40	5.0 ^b ± 0.4	0.03 ^e ± 0.002	40 ^d ± 3.0	1.4 ^a ± 0.1	0.00 ± 0.0	30 ^a ± 2.0	0.0 ± 0.0	0.00 ± 0.000	0 ± 0.0
S41	50.5 ^a ± 1.7	0.07 ^c ± 0.005	400 ^a ± 23.6	53.7 ^a ± 2.6	0.85 ^a ± 0.034	490 ^a ± 14.4	55.3 ^a ± 2.0	0.85 ^a ± 0.050	500 ^a ± 25.2
S42	23.4 ^c ± 0.8	0.20 ^b ± 0.013	170 ^a ± 9.5	27.5 ^b ± 1.0	0.22 ^b ± 0.015	170 ^a ± 7.1	29.6 ^a ± 1.0	0.23 ^c ± 0.025	190 ^a ± 3.5
S43	28.5 ^a ± 1.1	0.31 ^a ± 0.008	220 ^c ± 17.6	30.9 ^b ± 1.7	0.35 ^a ± 0.012	220 ^a ± 6.4	33.4 ^b ± 1.0	0.39 ^b ± 0.040	230 ^a ± 6.1

* Ensayo de flavonoides totales (EFT); resultados expresados en µg EQ/g miel.

** Ensayo de AA por DPPH (EDPPH); resultados expresados en µmol ETrolox®/g miel.

*** Ensayo de Folin-Ciocalteu (EFC); resultados expresados en mg EAG/g miel.

^aMuestra significativamente diferente.

^{b,c,d} Grupo de muestras que no presentaron diferencias entre las muestras del mismo grupo.

Cuadro 11. Porcentajes de humedad en las mieles, en el tiempo inicial y al transcurso de 45 días.

Muestra	% Humedad								
	Tiempo inicial			45 días					
	4 °C			20 °C			40 °C		
S1	17.3	±	0.5	17.2	±	0.5	17.0	±	0.5
S35	24.8	±	0.5	24.6	±	0.5	24.6	±	0.5
S36	29.5	±	0.5	28.0	±	0.5	27.0	±	0.5
S37	25.5	±	0.5	25.4	±	0.5	25.3	±	0.5
S38	28.0	±	0.5	27.4	±	0.5	25.8	±	0.5
S39	25.0	±	0.5	25.0	±	0.5	24.8	±	0.5
S40	16.0	±	0.5	15.8	±	0.5	15.8	±	0.5
S41	16.7	±	0.5	15.4	±	0.5	14.6	±	0.5
S42	18.2	±	0.5	17.8	±	0.5	16.2	±	0.5
S43	19.0	±	0.5	18.6	±	0.5	17.8	±	0.5

Con un n=3

Por lo descrito anteriormente, se puede expresar que la estabilidad (respecto a las pruebas aquí evaluadas) en las mieles en función del tiempo no depende del género de la abeja que la produce sino del tipo de compuestos que estén presentes en la miel.

Las variaciones en los valores de los ensayos aquí estudiados concuerdan con los resultados reportados por Díaz y colaboradores⁷⁴ donde concluyeron que los tratamientos térmicos aplicados a la miel ocasionan cambios significativos en la actividad enzimática, fenoles totales, flavonoides totales, actividad antioxidante y viscosidad. Cuando las mieles son expuestas a tratamientos térmicos generan una descomposición de peróxido de hidrógeno, reactividad de iones de los metales de transición y se pueden inducir reacciones redox que influyen en la estabilidad de los antioxidantes.⁷⁵

En el desarrollo del estudio aquí realizado, se presenció un fenómeno de oscurecimiento en las muestras de mieles al paso del tiempo y expuestas a temperaturas. En la Figura 13, se muestra una fotografía donde se compara la miel del género *Nannotrigona*, sin ser expuesta a tratamiento térmico (clara) y la otra muestra cuando fue expuesta a 40 °C durante 2 meses (oscura). Una explicación

para este cambio, es que las mieles como otros alimentos, se vieron expuestas a un pardeamiento,⁷⁶ lo cual les generó el cambio de coloración.



Figura 13. Muestra de miel S38, *Nannotrigona*, que presentó un proceso de pardeamiento.

El pardeamiento es el proceso de oscurecimiento que presentan algunos alimentos a causa de ciertas reacciones.⁷⁶ El pardeamiento puede ser enzimático o no enzimático. El pardeamiento enzimático se lleva a cabo por reacciones químicas en donde intervienen enzimas como la polifenol oxidasa, catecol oxidasa y otras que pueden promover la obtención de melaninas y quinonas a partir de polifenoles en presencia de oxígeno.⁷⁷ Por otra parte, el pardeamiento no enzimático, como su nombre lo indica, es aquel donde el exceso de pigmentación se produce en ausencia de enzimas. Los tipos de pardeamiento no enzimático son resultado de la caramelización y la reacción de Maillard,⁷⁷ pardeamientos presentes en la miel.¹

El pardeamiento enzimático presente en la miel es causado por la oxidación de los compuestos fenólicos iniciada por la enzima polifenol oxidasa. Los factores más importantes que afectan la velocidad del pardeamiento son las concentraciones

tanto de la polifenol oxidasa, como de los compuestos fenólicos, el pH, la temperatura y la disponibilidad de oxígeno en la matriz.¹ Esta enzima en presencia de oxígeno reacciona con los compuestos fenólicos, formando quinonas. Estos compuestos reaccionan entre sí o con otros compuestos (aminoácidos, péptidos y azúcares reductores) formando melaninas, compuestos de color rojo, café o negro.⁷² El oscurecimiento enzimático ocurre cuando los compuestos fenólicos, la enzima polifenol oxidasa y el oxígeno molecular interaccionan bajo condiciones específicas de pH, temperatura y actividad de agua.⁷² El pardeamiento no enzimático se presenta por medio de la reacción de Maillard, aquella donde se producen melanoidinas (responsables de la coloración oscura) a partir de un grupo amino y un azúcar reductor.¹ En la miel puede presentarse este tipo de reacciones, ya que la glucosa es un excelente azúcar reductora y los aminoácidos aportan el grupo amino. Por otra parte, la caramelización es otro tipo de pardeamiento no enzimático, que difiere de las reacciones de Maillard porque es un proceso de pirólisis del azúcar, que también genera un oscurecimiento de la muestra.¹ Igualmente, en otros estudios se ha concluido que el calentamiento inicial de la miel de abejas ejerce un efecto considerable sobre el color pues este cataliza la reacción de Maillard.⁷⁸

En las mieles se han descrito dos clases de pigmentos responsables del color, los hidrosolubles y los liposolubles. Los liposolubles están presentes en mieles de color claro y los del tipo hidrosoluble en las oscuras. En la fracción liposoluble se han identificado carotenoides y en la fracción hidrosoluble se presentan compuestos polifenólicos que al oxidarse dan lugar a compuestos de tonos oscuros.⁷⁹ El oscurecimiento que presentan las mieles que son almacenadas durante cierto tiempo puede atribuirse a algunos factores, por ejemplo, la presencia de tanatos, la reacción de azúcares con sustancias que contienen nitrógeno (aminoácidos, proteínas), y los procesos de caramelización.⁷⁹ Con base en lo anteriormente descrito, puede explicarse el cambio de apariencia que experimentaron las mieles S36, S38, S41, S42 y S43.

Estos resultados también indican que el fenómeno del pardeamiento no es exclusivo de un tipo de miel, ya que tanto las muestras de *Apis mellifera* (S41, S42 y S43) como las de los géneros *Plebeia* (S36) y *Nannotrigona* (S38) sufrieron un oscurecimiento con el paso del tiempo.

Entre el tipo de pardeamiento no enzimático como la reacción de Maillard, se presentan productos e intermediarios de esta reacción, conocidos como productos de reacción de Maillard (MRP, por sus siglas en inglés).⁸⁰ Estos, se producen durante el procesamiento térmico y el almacenamiento de alimentos y han presentado actividad antioxidante, los cuales pueden ser usados como antioxidantes naturales y endógenos para retrasar o inhibir la reacción de oxidación de algunos lípidos en los alimentos. La reacción de Maillard produce algunos productos, como las melanoidinas y los productos de reordenamiento de Amadori, con potencial para quelar metales y estabilizar radicales. Las altas temperaturas y los períodos largos de tiempo de almacenamiento generalmente dan como resultado un mayor grado de glicación con mayores concentraciones de los MRP.⁸⁰ En este sentido, se forman más donantes de electrones e hidrógeno, en presencia de melanoidinas con efecto secuestrante de metales, fortaleciendo así el potencial antioxidante de los MRP; aunque las temperaturas intensas también pueden conducir a la degradación de los MRP y limitan su capacidad antioxidante. También se ha reportado una mayor actividad antioxidante de los MRP a partir de la unión entre la fructosa y lisina en función del tiempo y temperatura. Las melanoidinas, las reductonas y también algunos heterocíclicos formados a partir de la presencia de temperatura, son responsables del aumento de la actividad antioxidante de los MRP obtenidos a partir de los grupos amino-azúcar.⁸⁰ Con base en lo anteriormente descrito, puede decirse, que otra posible explicación para el aumento de la actividad antioxidante en las mieles que presentaron el fenómeno del pardeamiento, es a causa de la formación de MRP en las muestras de mieles.

5.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

En el Cuadro 12, se muestran los valores de actividad antibacteriana que presentaron las mieles bajo estudio respecto al microorganismo *Staphylococcus aureus*.

Cuadro 12. Valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) determinados en las muestras de mieles mexicanas.

Muestra	CMI (% p/v)	Muestra	CMI (% p/v)
S1	25	S24	37.5
S2	25	S25	25.0
S3	25	S26	np*
S4	25	S27	12.5
S5	25	S28	12.5
S6	25	S29	18.8
S7	25	S30	12.5
S8	25	S31	12.5
S9	25	S32	np*
S10	25	S33	50.0
S11	25	S34	25.0
S12	25	S35	25
S13	25	S36	6.25
S14	12.5	S37	25
S15	25	S38	6.25
S16	25	S39	12.5
S17	np*	S40	np*
S18	12.5	S41	25.0
S19	31.3	S42	25
S20	12.5	S43	25
S21	25.0	C-	np*
S22	np*	C+(Digluconato de clorhexidina)	0.065
S23	25.5	H ₂ O ₂	0.39

*np: no presentó actividad inhibitoria

Se observa en el Cuadro 12, que la mayoría de las muestras tuvieron efecto sobre el crecimiento de la bacteria *S. aureus* a CMI en un rango de 6.25 a 50 %. Las muestras S17, S22, S26, S32 y S40 no presentaron efecto sobre el crecimiento de la bacteria. Por otra parte, las mieles S36 y S38 fueron las que presentaron el mejor efecto sobre el crecimiento de microorganismo a concentraciones de 6.25 %. Estos

resultados son similares con los reportados por Mandal y colaboradores,⁸¹ quienes determinaron CMI de mieles Nilgiri, Tualang, Bluegum, Manuka, Scabiosa y Fynbos en un rango de 8.75-25 % para *Staphylococcus aureus*. Estos autores describen que los posibles mecanismos de inhibición del crecimiento de la bacteria pueden estar relacionados con los bajos pH de las mieles y sus altos contenidos de azúcares, los cuales dificultan el crecimiento de microorganismos.

5.5 IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS MAYORITARIOS EN LAS MIELES POR RMN-¹H

Los espectros fueron obtenidos a partir de las muestras de mieles mexicanas, bajo el tratamiento y metodología descrita en la sección 3.7. En la Figura 14, se muestra el espectro RMN-¹H característico de una muestra de miel. En este caso, corresponde a una miel de aguacate de *Apis mellifera*, donde se puede apreciar que las señales más intensas se encuentran en el rango de 3.0 a 5.0 ppm, que es la región correspondiente a los protones de las azúcares.⁸²

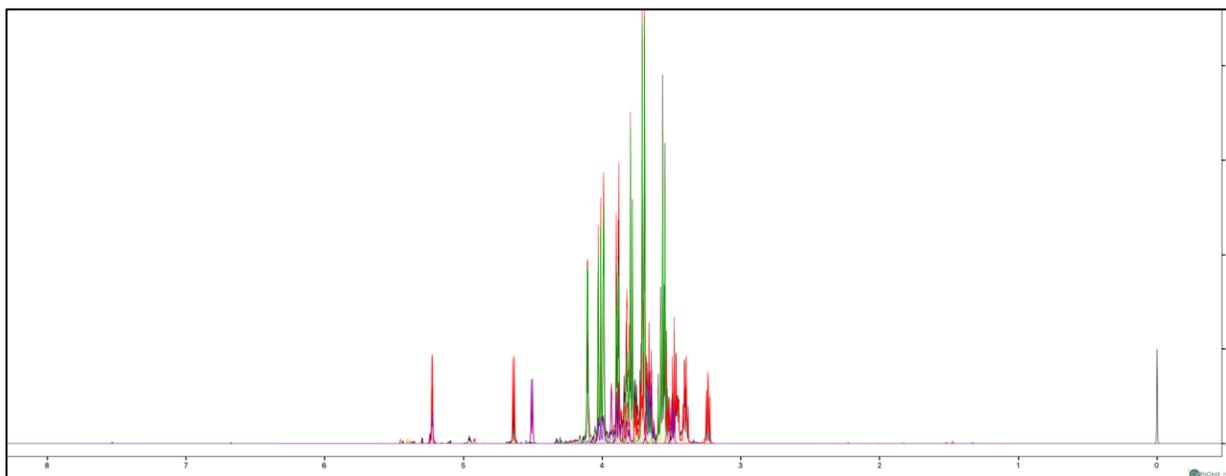
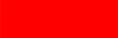
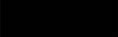


Figura 14. Espectro característico de miel, por RMN-¹H. *Apis mellifera*, de aguacate.

En el Cuadro 13 se presenta la identificación de los compuestos principales de 7 muestras de miel. Se evidencia que la composición principal de las mieles son las azúcares, fructosa y glucosa. También, se identificaron ácidos orgánicos como el láctico y fórmico, aminoácidos como la prolina, alanina y fenilalanina y otros compuestos de interés como el etanol.

Cuadro 13. Identificación de los compuestos principales en mieles mexicanas, por RMN-¹H.

Compuesto	Color	Cantidad, mM						
		<i>Apis mellifera, aguacate</i>	<i>Melipona beecheii</i>	<i>Apis mellifera acahual</i>	<i>Nannotrigona</i>	<i>Scaptotrigona pectoralis</i>	<i>Plebeia spp</i>	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
Fructosa		X	X	X	X	X	X	X
Glucosa		X	X	X	X	X	X	X
Maltosa		X	X	X	X	X	X	X
Sacarosa		X	X	X	X	X	X	X
Arabinosa		X	nd*	nd*	nd*	nd*	nd*	nd*
Alanina		X	X	X	X	X	X	X
Ácido láctico		X	X	X	X	X	X	X
Ácido fórmico		X	X	X	X	nd*	nd*	nd*
Etanol		X	X	X	X	X	X	X
Fenilalanina		X	nd*	X	X	X	X	X
Prolina		nd*	X	X	X	X	X	X

*nd: compuesto no detectado.

En la Figura 15, se muestra el espectro de RMN-¹H, de la miel de la especie *Melipona beecheii*, donde se puede apreciar que su perfil de azúcares es muy similar al de la *Apis mellifera*. Aunque se presentaron diferencias en su perfil de composición, la miel de aguacate presentó arabinosa y fenilalanina, mientras que en la miel de *Melipona beecheii*, estos compuestos no fueron detectados, pero sí se identificó en esta miel la prolina.

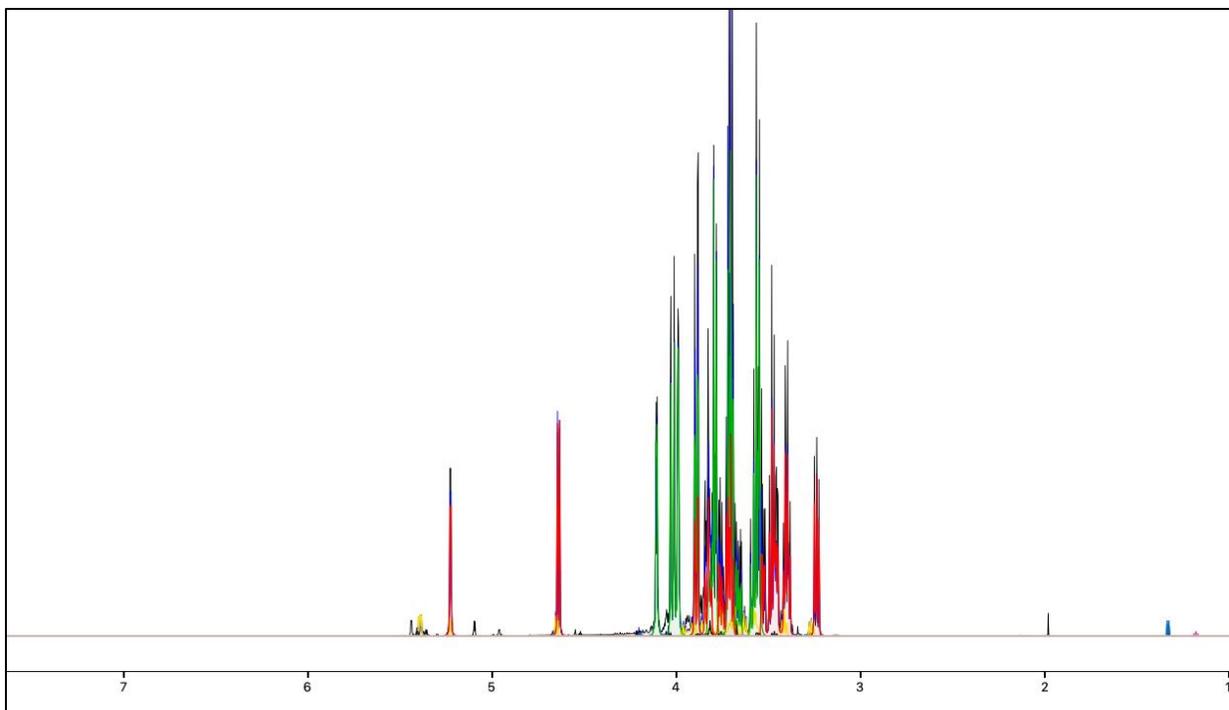


Figura 15. Espectro de RMN-¹H, de miel de *Melipona beecheii*.

Otra diferencia por destacar entre las mieles estudiadas es la concentración de los diferentes metabolitos identificados (Cuadro 13), y la ausencia de algunos compuestos menores, como por ejemplo el ácido fórmico que no estuvo presente en las mieles de *Scaptotrigona* y *Plebeia*. En la Figura 16 se muestra la región de 3.0 a 4.8 ppm del espectro de RMN-¹H de la miel monofloral de aguacate. En esta muestra se logró la identificación de la fructosa, glucosa, arabinosa, sacarosa y maltosa, aunque estas dos últimas están en concentraciones menores.

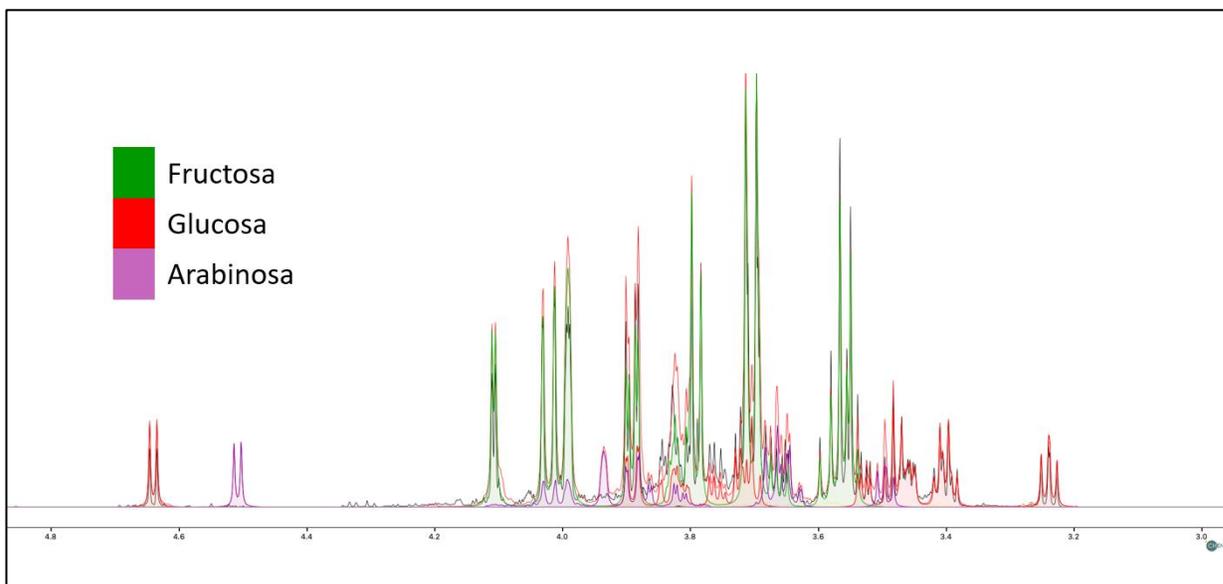


Figura 16. Región del espectro de miel (3.0 a 4.8 ppm), donde se identifican los azúcares principales, por RMN-¹H.

También es importante mencionar, en las mieles estudiadas se logró la identificación por RMN-¹H de aminoácidos como la prolina, alanina y fenilalanina. Como se mencionó en la sección 1.2, los aminoácidos hacen parte de los compuestos principales en la miel. En la Figura 17, se muestra las señales características para la identificación de la prolina en la muestra de Acahual (*Apis mellifera*).

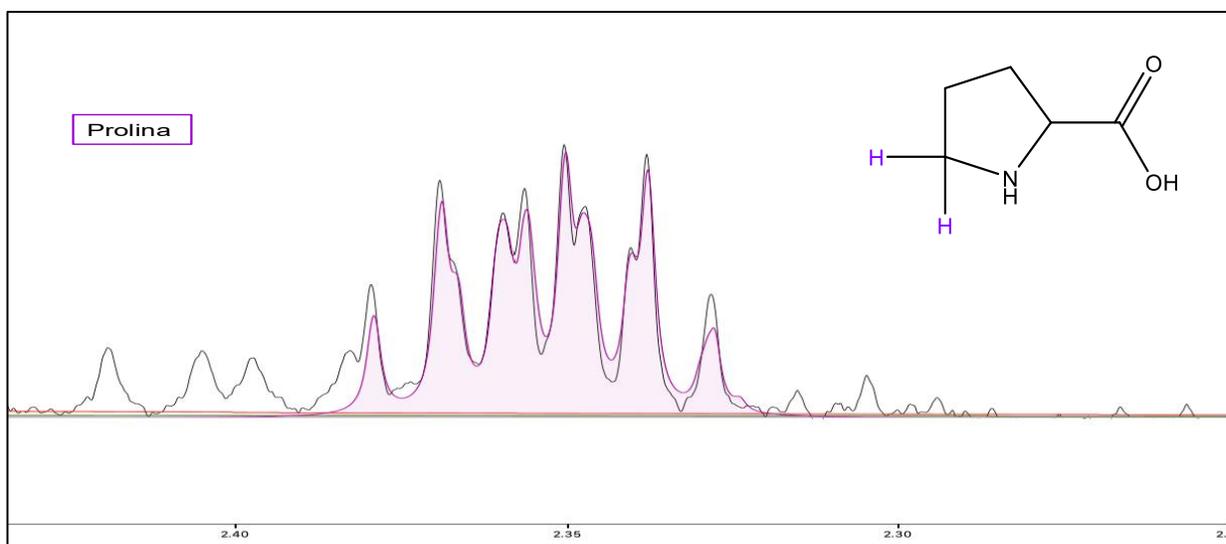


Figura 17. Región del espectro RMN-¹H de 2.2 a 2.45 ppm, donde se identifica la prolina, la miel de acahual (*Apis mellifera*).

Como se mencionó en la sección 4.2, cuando las mieles están expuestas a cambios térmicos, se producen algunos compuestos debidos a la fermentación. En las Figuras 18 y 19 se muestran las regiones del espectro de 0.5 a 2.5 ppm y de 6.0 a 9.5 ppm, respectivamente, donde se identificaron el etanol, el ácido láctico y el 5-hidroximetilfurfural en una muestra de miel a la cual se indujo al envejecimiento al exponerla a temperaturas elevadas durante su almacenamiento.

El 5-hidroximetilfurfural es un compuesto producto de la deshidratación de los azúcares en medio ácido y en presencia de temperatura, presente en las mieles en altas concentraciones cuando estas han sido expuestas a malas condiciones de almacenamiento; este aldehído es controlado para la comercialización de la miel, ya que se le atribuyen propiedades tóxicas y cancerígenas.¹ En la Figura 19 se muestra la región del espectro de RMN-¹H y la asignación de las señales características de este compuesto, en una muestra de miel que se almacenó a 40 °C durante 60 días.

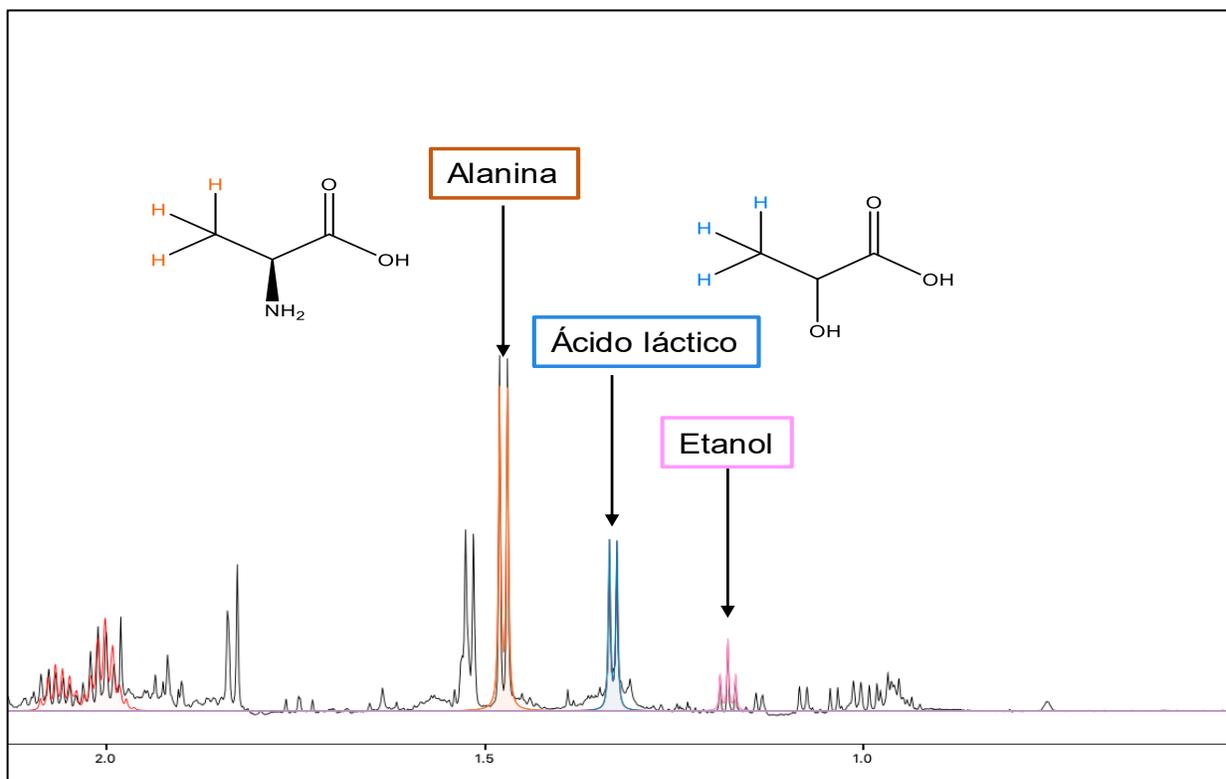


Figura 18. Región del espectro de una miel envejecida (0 a 2.1 ppm), mostrando algunos compuestos de fermentación.

Por otra parte, en la Figura 20, se presenta la superposición de los espectros de dos muestras de miel de acahual, producida por *Apis mellifera*, que fueron expuestas a dos tratamientos térmicos diferentes (4 °C y 40 °C) y variación de tiempo.

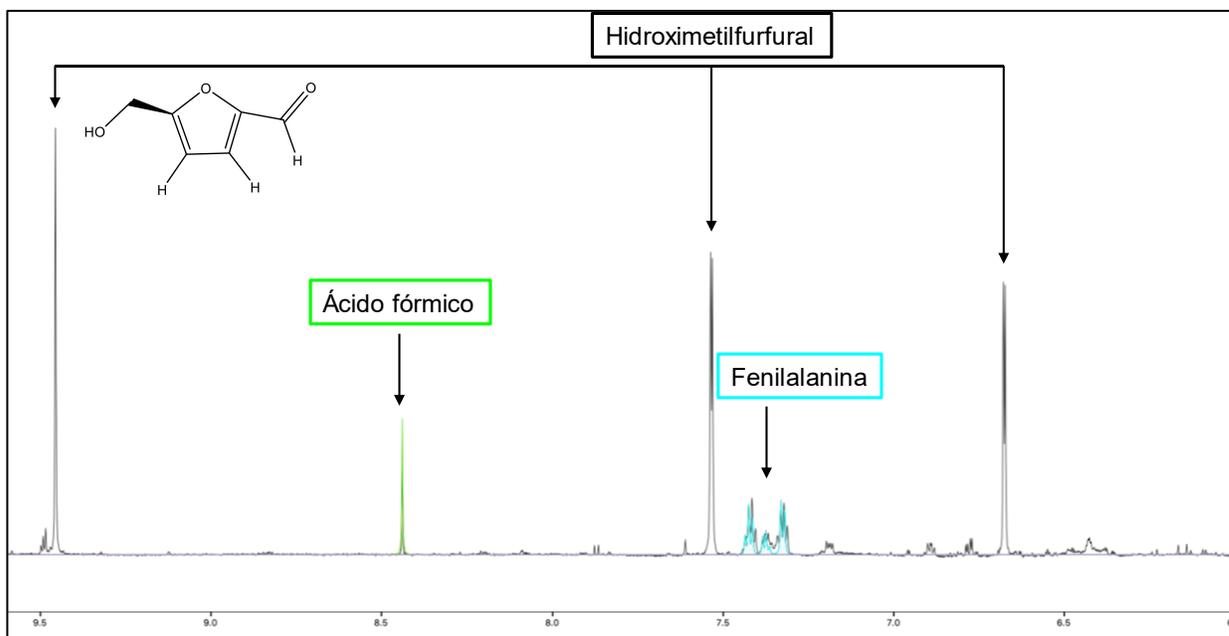


Figura 19. Región del espectro de la miel (6.0 a 9.5 ppm) por RMN-¹H, de una miel envejecida.

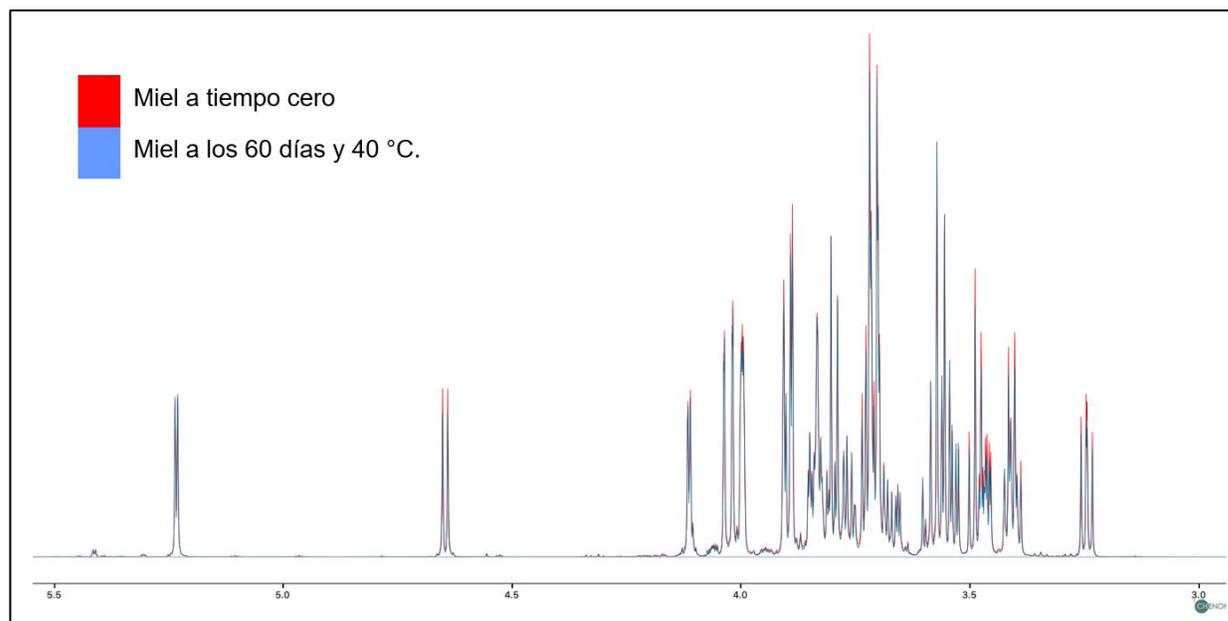


Figura 20. Espectros por RMN-¹H (700 MHz, D₂O), de mieles de *Apis mellifera*, en un tiempo inicial y al cabo de 60 días de almacenamiento y a 40 °C.

Otro cambio importante que se observó como resultado de la exposición a una temperatura de 40 °C durante almacenamiento por un período de dos meses fue la disminución de en el perfil de los azúcares. En la Figura 20, se puede ver como la muestra en su tiempo inicial y sin ningún tratamiento térmico (línea roja) presenta mayores intensidades en los picos de las azúcares, respecto a la miel expuesta a 60 días de almacenamiento y a 40 °C (línea azul).

6. CONCLUSIONES

6.1 La miel monofloral de aguacate de *Apis mellifera* (S41) presentó la mayor actividad antioxidante con 0.67 ± 0.01 $\mu\text{mol ETrolox}^{\text{®}}/\text{g}$ miel entre todas las muestras estudiadas, también mostró entre los mejores resultados de flavonoides (46.2 ± 1.6 $\mu\text{g EQ/g}$ miel) y contenido fenólico (370 ± 5.9 $\mu\text{g EAG/g}$ miel), junto con la muestra S28 de la especie *Scaptotrigona mexicana*, con el valor más alto para el contenido de flavonoides, 76.2 $\mu\text{g EQ/g}$ miel, 360 ± 9 $\mu\text{g EAG/g}$ miel en su contenido de fenoles y una capacidad antioxidante de 0.10 ± 0.032 $\mu\text{mol ETrolox}^{\text{®}}/\text{g}$ miel.

6.2 Las mieles estudiadas almacenadas a una temperatura de 20 °C fueron estables hasta los 15 días y, posteriormente, la cantidad de fenoles, flavonoides y antioxidantes mostró una notable disminución.

6.3 El análisis de los espectros de RMN-¹H permitió la detección de los componentes mayoritarios en las mieles. Por otra parte, se logró detectar cambios en la composición de las mieles expuestas a una temperatura de 40 °C. Las principales variaciones observadas fueron la disminución en el contenido de los azúcares. Por último, en los espectros de las mieles que sufrieron procesos de fermentación se detectó la presencia de 5-HMF, ácido láctico y etanol.

6.4 Las mieles conservadas a una temperatura de 40 °C presentaron una disminución en el contenido de fenoles, flavonoides y antioxidantes. Esta variación puede explicarse por los procesos de fermentación, degradación, caramelización y/o pardeamiento que sufrieron.

6.5 Las mieles ensayadas demostraron una buena actividad antibacteriana con concentraciones mínimas inhibitorias en un rango de 6.25 a 50 % (p/v). Estos resultados son similares a los reportados en la literatura para mieles utilizadas en el tratamiento de enfermedades infecciosas, como el pie diabético.

6.6 Con base en los resultados obtenidos para los ensayos de composición de las mieles se propone que las mieles se conserven a una temperatura de 4 °C para evitar cambios en su composición y pérdidas de la actividad biológica.

7. PERSPECTIVAS

7.1 Ampliar el número de muestras bajo estudio, garantizando una densidad poblacional respecto a cada especie y tipo de miel (monofloral y multifloral) para poder establecer resultados según las especies productoras y las clases de mieles.

7.2 Realizar una cuantificación individual de los compuestos fenólicos y flavonoides, utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

7.3 Exponer las mieles a condiciones extremas de temperatura, luz UV y oxidantes con la finalidad de estudiar su estabilidad, monitoreando compuestos de degradación.

7.4 Estudiar el efecto de las mieles sobre el crecimiento de bacterias patógenas de interés clínico involucradas en las infecciones cutáneas.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Da Silva PM, Gauche C, Gonzaga LV, Costa ACO, Fett R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem.* 2015;196:1-54. doi:10.1016/j.foodchem.2015.09.051
2. Meo SA, Al-Asiri SA, Mahesar AL, Ansari MJ. Role of honey in modern medicine. *Saudi J Biol Sci.* 2016;24:975-978. doi:10.1016/j.sjbs.2016.12.010
3. Wikipedia. Miel en México. Wikipedia. https://es.wikipedia.org/wiki/Miel_en_México#cite_ref-1. Published 2019.
4. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). *Principales Productores de Miel En El Mundo.*; 2017. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QL>.
5. Consonni R, Cagliani LR. Recent developments in honey characterization. *RSC Adv.* 2015;5(73):59696-59714. doi:10.1039/c5ra05828g
6. Arvanitoyannis IS, Chalhoub C, Gotsiou P, Lydakis-Simantiris N, Kefalas P. Novel quality control methods in conjunction with chemometrics (multivariate analysis) for detecting honey authenticity. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005;45(3):193-203. doi:10.1080/10408690590956369
7. Codex. Codex Standard for Honey. *Codex Stand.* 2001;1:1-7.
8. Consonni R, Cagliani LR. Geographical Characterization of Polyfloral and Chemometrics. *J Agric Food Chem.* 2008;56:6873-6880. doi:10.3171/2009.2.SPINE08727
9. Kazalaki A, Misiak M, Spyros A, Dais P. Identification and quantitative determination of carbohydrate molecules in Greek honey by employing ^{13}C NMR spectroscopy. *Anal Methods.* 2015;7(14):5962-5972. doi:10.1039/c5ay01243k
10. Schievano E, Tonoli M, Rastrelli F. NMR Quantification of Carbohydrates in Complex Mixtures. A Challenge on Honey. *Anal Chem.* 2017;89(24):13405-13414. doi:10.1021/acs.analchem.7b03656

11. Chan CW, Deadman BJ, Manley-Harris M, Wilkins AL, Alber DG, Harry E. Analysis of the flavonoid component of bioactive New Zealand mānuka (*Leptospermum scoparium*) honey and the isolation, characterisation and synthesis of an unusual pyrrole. *Food Chem.* 2013;141(3):1772-1781. doi:10.1016/j.foodchem.2013.04.092
12. United States Department of Agriculture. National Nutrient Database for Standard Reference Legacy Release: Honey. USDA - National Nutrient Database for Standard Reference Legacy Release. <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/11265?fgcd=&manu=&format=&count=&max=25&offset=&sort=default&order=asc&qlookup=Mushrooms%2C+portabella%2C+raw&ds=&qt=&qp=&qa=&qn=&q=&ing=%0Ahttps://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods>. Published 2018.
13. Schievano E, Morelato E, Facchin C, Mammi S. Characterization of markers of botanical origin and other compounds extracted from unifloral honeys. *J Agric Food Chem.* 2013;61(8):1747-1755. doi:10.1021/jf302798d
14. Handique JG, Baruah JB. Polyphenolic compounds: An overview. *React Funct Polym.* 2002;52(3):163-188. doi:10.1016/S1381-5148(02)00091-3
15. Watson RR. *Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation*. Segunda. (ELSEVIER, ed.); 2014.
16. Andersen, Øyvind M.; Markham KR. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. (FRANCIS TA, ed.); 2006.
17. Xiao J, Chen T, Cao H. Flavonoid glycosylation and biological benefits. *Biotechnol Adv.* 2014:1-21. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.05.004
18. Gašić UM, Milojković-Opsenica DM, Tešić ŽL. Polyphenols as possible markers of botanical origin of honey. *J AOAC Int.* 2017;100(4):852-861. doi:10.5740/jaoacint.17-0144
19. Ćirić A, Prosen H, Jelikić-Stankov M, Durević P. Evaluation of matrix effect in determination of some bioflavonoids in food samples by LC-MS/MS method. *Talanta.* 2012;99:780-790. doi:10.1016/j.talanta.2012.07.025

20. Pulcini, P.; Allegrini, F.; Festuccia N. Fast extraction and LC-ESI-MS-MS analysis of flavonoids and phenolic acids in honey. *APIACTA*. 2006;33:21-27. doi:10.19744/j.cnki.11-1235/f.2006.09.027
21. Siddiqui AJ, Musharraf SG, Choudhary MI, Rahman A ur. Application of analytical methods in authentication and adulteration of honey. *Food Chem*. 2017;217:687-698. doi:10.1016/j.foodchem.2016.09.001
22. Olawode EO, Tandlich R, Cambray G. ¹H-NMR profiling and chemometric analysis of selected honeys from South Africa, Zambia, and Slovakia. *Molecules*. 2018;23(3). doi:10.3390/molecules23030578
23. Silvano MF, Varela MS, Palacio MA, Ruffinengo S, Yamul DK. Physicochemical parameters and sensory properties of honeys from Buenos Aires region. *Food Chem*. 2014;152:500-507. doi:10.1016/j.foodchem.2013.12.011
24. Bogdanov S. *Book of Honey*.; 2017.
25. México G de. Tipos de miel mexicanas que deberías probar. 2018. <https://gourmetdemexico.com.mx/comida-y-cultura/tipos-de-miel-que-debes-conocer/>.
26. Stashenko EE, Martínez JR. Preparación de la muestra: un paso crucial para el análisis por GC-MS. *Sci Chromatogr*. 2011;3(1):25-49. doi:10.4322/sc.2011.003
27. Stashenko EE, Martínez JR. ¿Cuántos componentes hay en una mezcla? Respuesta cromatográfica. *Sci Chromatogr*. 2009;1(2):23-33.
28. da Silva IAA, da Silva TMS, Camara CA, et al. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. *Food Chem*. 2013;141(4):3552-3558. doi:10.1016/j.foodchem.2013.06.072
29. Gómez-Caravaca AM, Gómez-Romero M, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Advances in the analysis of phenolic

- compounds in products derived from bees. *J Pharm Biomed Anal.* 2006;41(4):1220-1234. doi:10.1016/j.jpba.2006.03.002
30. Michalkiewicz A, Biesaga M, Pyrzynska K. Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *J Chromatogr A.* 2008;1187(1-2):18-24. doi:10.1016/j.chroma.2008.02.001
 31. Louveaux J, Maurizio A, Vorwohl G. Methods of Melissopalynology. *Bee World.* 2015;59(4):139-157. doi:10.1080/0005772x.1978.11097714
 32. Stashenko EE, Martínez JR. Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Sci Chromatogr.* 2010;2(1):29-47. <http://www.scientiachromatographica.com/files/v2n1/v2n1a3.pdf>.
 33. Truchado P, Ferreres F, Bortolotti L, Sabatini AG, Tomás-Barberán FA. Nectar flavonol rhamnosides are floral markers of acacia (*Robinia pseudacacia*) honey. *J Agric Food Chem.* 2008;56(19):8815-8824. doi:10.1021/jf801625t
 34. Oddo LP, Piazza MG, Sabatini AG, Accorti M. Characterization of unifloral honeys. *Apidologie.* 1995;26(6):453-465.
 35. Simova S, Atanassov A, Shishiniova M, Bankova V. A rapid differentiation between oak honeydew honey and nectar and other honeydew honeys by NMR spectroscopy. *Food Chem.* 2012;134(3):1706-1710. doi:10.1016/j.foodchem.2012.03.071
 36. Frausto-Reyes C, Casillas-Peñuelas R, Quintanar-Stephano JL, Macías-López E, Bujdud-Pérez JM, Medina-Ramírez I. Spectroscopic study of honey from *Apis mellifera* from different regions in Mexico. *Spectrochim Acta - Part A.* 2017;178:212-217. doi:10.1016/j.saa.2017.02.009
 37. Musharraf SG, Ambreen Fatima S, Siddiqui AJ, Iqbal Choudhary M, Atta-Ur-Rahman. ¹H-NMR fingerprinting of brown rice syrup as a common adulterant in honey. *Anal Methods.* 2016;8(34):6444-6451. doi:10.1039/c6ay01082b
 38. Schneider A. Tests Show Most Store Honey Isn't Honey | Food Safety News.

Food Saf News. 2011.

39. Ohmenhaeuser M, Monakhova YB, Kuballa T, Lachenmeier DW. Qualitative and Quantitative Control of Honeys Using NMR Spectroscopy and Chemometrics. *ISRN Anal Chem*. 2013;2013:1-9. doi:10.1155/2013/825318
40. Padovan G, Leme I, Jong D De, Marchini JS. Presence of C4 Sugars in Honey Samples Detected by The Carbon Isotope Ratio Measured by IRMS. *Eurasian J Anal Chem*. 2007;2(3):134-141.
41. Paradkar MM, Irudayaraj J. Discrimination and classification of beet and cane inverts in honey by FT-Raman spectroscopy. *Food Chem*. 2001;76(2):231-239. doi:10.1016/S0308-8146(01)00292-8
42. Ribeiro RDOR, Mársico ET, Carneiro CDS, Monteiro MLG, Júnior CC, Jesus EFO De. Detection of honey adulteration of high fructose corn syrup by Low Field Nuclear Magnetic Resonance (LF 1H NMR). *J Food Eng*. 2014;135:39-43. doi:10.1016/j.jfoodeng.2014.03.009
43. DIRECTIVA 2014/110/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 15 de mayo de 2014 relativa a la miel. 164/1-164/5.
44. Pico Y. *Advanced Mass Spectrometry for Food Safety and Quality*. Vol 53. (ELSEVIER, ed.); 2013.
45. Fallico B, Zappalà M, Arena E, Verzera A. Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. *Food Chem*. 2004;85(2):305-313. doi:10.1016/j.foodchem.2003.07.010
46. Çınar SB, Ekşi A, Coşkun I. Carbon isotope ratio ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) of pine honey and detection of HFCS adulteration. *Food Chem*. 2014;157:10-13. doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.006
47. Smanalieva J, Senge B. Analytical and rheological investigations into selected unifloral German honey. *Eur Food Res Technol*. 2009;229(1):107-113. doi:10.1007/s00217-009-1031-2
48. Zamora MC, Chirife J. Determination of water activity change due to

- crystallization in honeys from Argentina. *Food Control*. 2006;17(1):59-64. doi:10.1016/j.foodcont.2004.09.003
49. Cereser Camara V, Laux D. Moisture content in honey determination with a shear ultrasonic reflectometer. *J Food Eng*. 2010;96(1):93-96. doi:10.1016/j.jfoodeng.2009.06.049
 50. Chirife J, Zamora MC, Motto A. The correlation between water activity and % moisture in honey: Fundamental aspects and application to Argentine honeys. *J Food Eng*. 2006;72(3):287-292. doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.12.009
 51. Gallina A, Stocco N, Mutinelli F. Karl Fischer Titration to determine moisture in honey: A new simplified approach. *Food Control*. 2010;21(6):942-944. doi:10.1016/j.foodcont.2009.11.008
 52. Sakač N, Sak-Bosnar M. A rapid method for the determination of honey diastase activity. *Talanta*. 2012;93:135-138. doi:10.1016/j.talanta.2012.01.063
 53. Martínez S, González J, Culebras JM, Tuñón MJ. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*. 2002;17:271-278.
 54. Julkunen-Tiitto R. Phenolic Constituents in the Leaves of Northern Willows: Methods for the Analysis of Certain Phenolics. *J Agric Food Chem*. 1985;33:213-217.
 55. Zulueta A, Esteve MJ, Frígola A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chem*. 2009;114(1):310-316. doi:10.1016/j.foodchem.2008.09.033
 56. Wanasundara PK, Shahidi F. Antioxidants: Science, Technology, and Applications. In: *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. Sexta edic. ; 2015:1-11.
 57. Tsimogiannis DI, Oreopoulou V. The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency . A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2006;7:140-

146. doi:10.1016/j.ifset.2005.09.001
58. Jurd L, Geissman TA. Absorption Spectra of Metal Complexes of Flavonoid Compounds. *J Org Chem*. 1956;882:1395-1401.
59. Prieto JM. Procedure: Preparation of DPPH Radical , and antioxidant scavenging assay. *Dr Prieto's DPPH Microplate Protoc*. 2012:1-3.
60. Magalhães LM, Santos F, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC. Talanta Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta*. 2010;83:441-447. doi:10.1016/j.talanta.2010.09.042
61. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem*. 2004;84:329-339. doi:10.1016/S0308-8146(03)00216-4
62. Rosas Y, Mejía A, Díaz-ruiz G, Isabel M, Sánchez S, Rivero JF. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. *J Ethnopharmacol*. 2012;141:860-865. doi:10.1016/j.jep.2012.03.020
63. Chenomx. Chenomx. <https://www.chenomx.com/products/>. Published 2019.
64. 969.38B A. Determination of Moisture Content. *J Assoc Public Anal*. 1992;28(4):183-187.
65. Jimenez M, Beristain CI, Azuara E, Mendoza MR, Pascual LA. Physicochemical and antioxidant properties of honey from *Scaptotrigona mexicana* bee. *J Apic Res*. 2016;55(2):151-160. doi:10.1080/00218839.2016.1205294
66. Alves A, Ramos A, Gonçalves MM, Bernardo M, Mendes B. Antioxidant activity, quality parameters and mineral content of Portuguese monofloral honeys. *J Food Compos Anal*. 2013;30(2):130-138. doi:10.1016/j.jfca.2013.02.009
67. Rodríguez Malaver AJ. Antioxidant Activity of Pot-Honey. In: *Pot-Honey: A*

- Legacy of Stingless Bees*. Nueva York; 2013:475-480. doi:10.1007/978-1-4614-4960-7
68. Salkind NJ, Delhi S. *Statistics for People Who (Think They) Hate Statistics*. Sexta Edic. (SAGE, ed.). Kansas; 2017.
69. Jamróz MK, Paradowska K, Zawada K, Makarova K, Kaźmierski S, Wawer I. ¹H and ¹³C NMR-based sugar profiling with chemometric analysis and antioxidant activity of herbhoneys and honeys. *J Sci Food Agric*. 2013;94:246-255. doi:10.1002/jsfa.6241
70. Bertoncej J, Dobersek U, Jamnik M, Golob T. Food Chemistry Evaluation of the phenolic content , antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chem*. 2007;105:822-828. doi:10.1016/j.foodchem.2007.01.060
71. Biesaga M. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *J Chromatogr A*. 2011;1218:2505-2512. doi:10.1016/j.chroma.2011.02.059
72. Apodaca JM, Martínez MDL, Robles R, Rodríguez A. Polifenoloxidasas , fenoles totales y oscurecimiento de nopal verdura. *Rev Mex Ciencias Agrícolas*. 2016;7(3):531-543.
73. Artés F, Gómez PA, Artés F. Physical, Physiological and Microbial Deterioration of Minimally Fresh Processed Fruits and Vegetables. *Food Sci Technol Int*. 2007;13(3):177-188. doi:10.1177/1082013207079610
74. Díaz A. Influencia de las condiciones de almacenamiento sobre la calidad físicoquímica y biológica de la miel. 2009.
75. Brudzynski K, Sjaarda C, Maldonado-Alvarez L. A New Look on Protein-Polyphenol Complexation during Honey Storage: Is This a Random or Organized Event with the Help of Dirigent-Like Proteins? *PLoS One*. 2013;8(8):1-9. doi:10.1371/journal.pone.0072897
76. Corzo M, Corzo N, Villamiel M, del Castillo MD. Browning Reactions. In: *Food Biochemistry and Food Processing*. Segunda ed. ; 2012:56-83.
77. Artés F, Castañer M, Gil MI. Food Science and Technology International. *Food*

Sci Technol Int. 1998;4(6):377-389. doi:10.1177/108201329800400602

78. Zhang Y, Song Y, Zhou T, Liao X, Hu X, Li Q. Kinetics of 5-hydroxymethylfurfural formation in chinese acacia honey during heat treatment. *Food Sci Biotechnol.* 2012;21(6):1627-1632. doi:10.1007/s10068-012-0216-9
79. Saínz C, Gómez C. *Mieles Españolas. Características e Identificación Mediante El Análisis de Polen.* (Mundi-Prensa, ed.). España; 2000.
80. Nooshkam M, Varidi M, Bashash M. The Maillard reaction products as food-born antioxidant and antibrowning agents in model and real food systems. 2019;275:644-660. doi:10.1016/j.foodchem.2018.09.083
81. Mandal MD, Mandal S. Honey : its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2011;1(2):154-160. doi:10.1016/S2221-1691(11)60016-6
82. Consonni R, Cagliani LR, Cogliati C. NMR characterization of saccharides in italian honeys of different floral sources. *J Agric Food Chem.* 2012;60(18):4526-4534. doi:10.1021/jf3008713
83. Abdel-Aal ESM, Ziena HM, Youssef MM. Adulteration of honey with high-fructose corn syrup: Detection by different methods. *Food Chem.* 1993;48(2):209-212. doi:10.1016/0308-8146(93)90061-J

9. ANEXOS

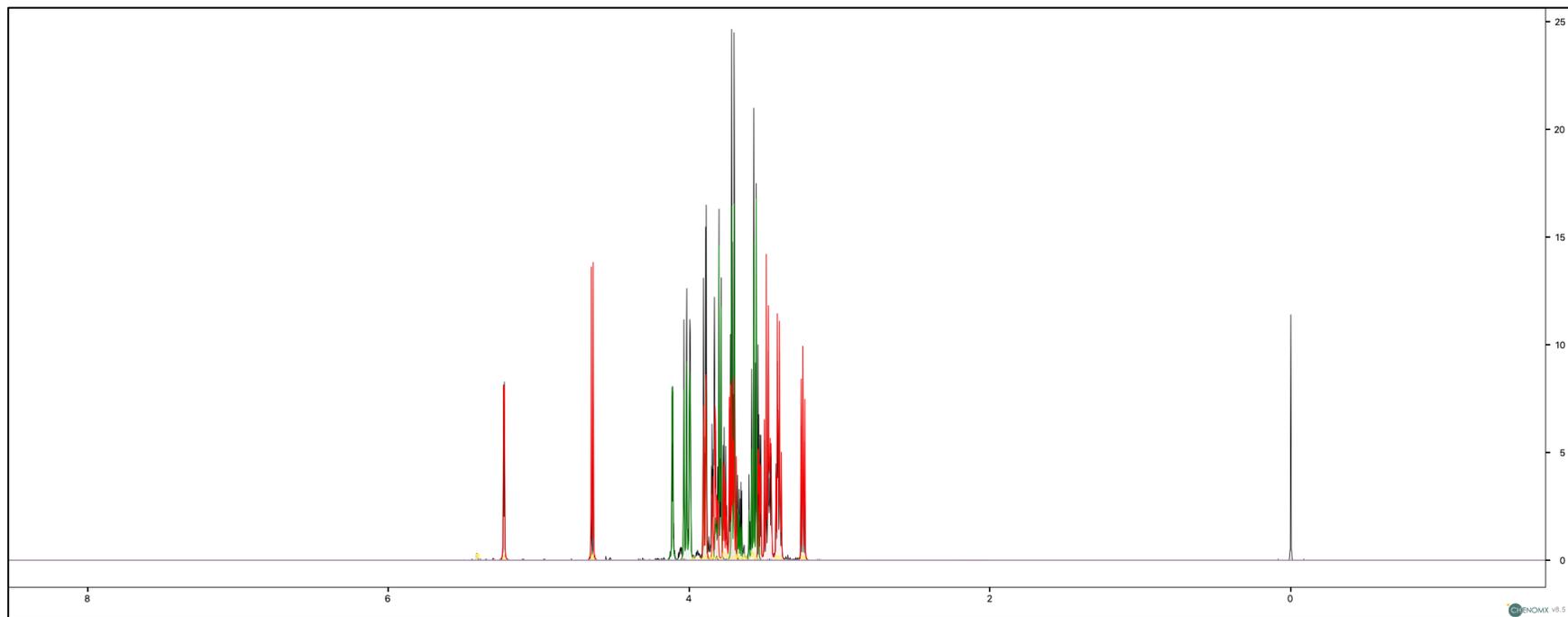
ANEXO I. Listado de las mieles empleadas en este estudio.

Muestra	Nombre por parte del proveedor	Tipo de miel
S1	Miel comercial	<i>Apis mellifera</i>
S2	Miel comercial	<i>Apis mellifera</i>
S3	Naranja	<i>Apis mellifera</i>
S4	Dolores	<i>Apis mellifera</i>
S5	Melipona	<i>Melipona spp</i>
S6	Miel Labonte	<i>Apis mellifera</i>
S7	Miel Plebeia	<i>Plebeia spp</i>
S8	Miel comercial BUNA	<i>Apis mellifera</i>
S9	Miel MILEN	<i>Apis mellifera</i>
S10	Miel #2	<i>Apis mellifera</i>
S11	Miel #3	<i>Apis mellifera</i>
S12	Miel #4	<i>Apis mellifera</i>
S13	Miel #5	<i>Apis mellifera</i>
S14	Miel Tlaxcala	<i>Apis mellifera</i>
S15	Miel TEVTLI	<i>Apis mellifera</i>
S16	Miel Billybee	<i>Apis mellifera</i>
S17	Miel M.Hernandez	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S18	Miel Guadalupe Castelan	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S19	Miel Joaquin Tirso	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S20	Miel Alvaro Lobato	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S21	Miel Primitivo Juarez Romero	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S22	Miel Francisco Morales ABAD	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S23	Miel Alvaro Ortega Santiago	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S24	Miel Alvaro Juarez Gonzalez	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S25	Miel Francisco Morales ABAD	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S26	Miel Desiderio Enrique Bello	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S27	Miel Mezcla de 3 productores	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S28	Miel Rogelio Juarez y Romero	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S29	Miel Rito Quezada Hernandez	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S30	Miel Venustiano Gonzalez	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S31	Miel A. Juarez Romero	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S32	Miel M. D. Vicente Garcia	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S33	Miel Juan Gaona Dominguez	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S34	Miel Victor Manuel Montalvo	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S35	Miel Mexicana	<i>Scaptotrigona mexicana</i>
S36	Miel Plebeia	<i>Plebeia spp</i>
S37	Miel Pectoralis	<i>Scaptotrigona pectoralis</i>

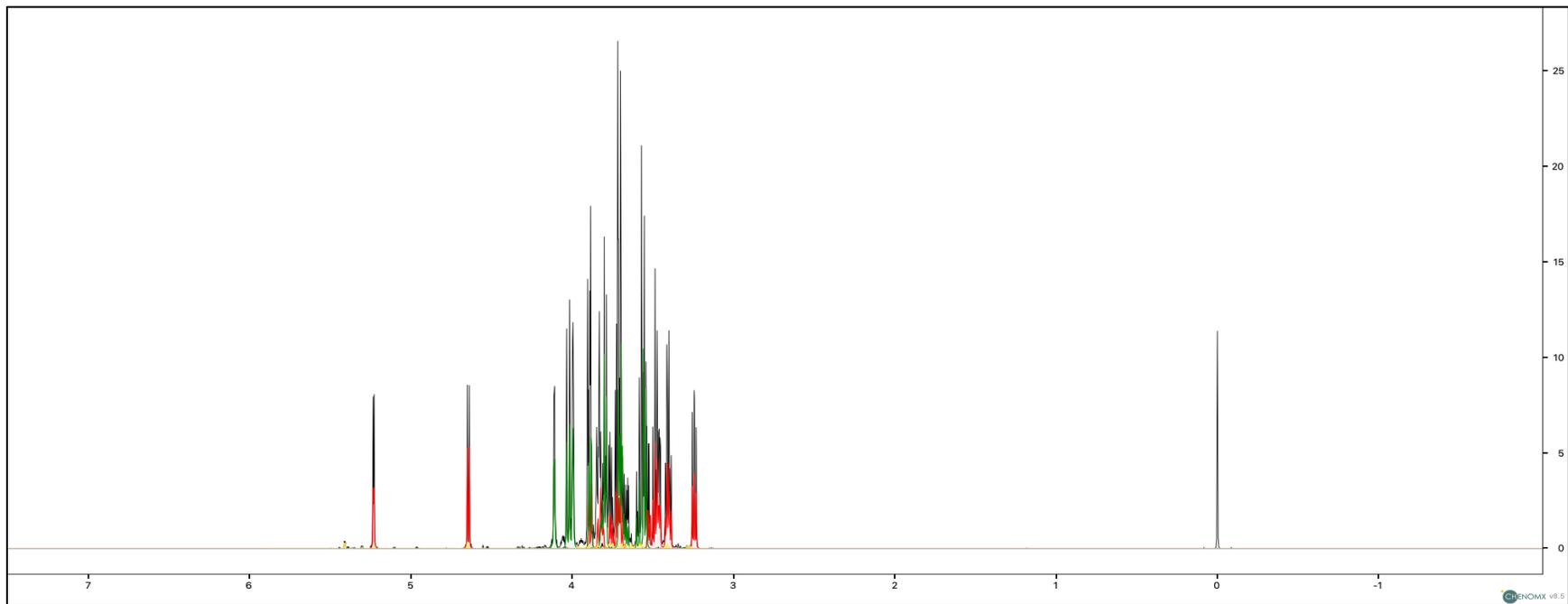
ANEXO I. Listado de las mieles empleadas en este estudio. (Continuación).

S38	Miel Nanotrigona	<i>Nannotrigona spp</i>
S39	Miel Beechile	<i>Melipona beecheii</i>
S40	Miel <i>Apis mellifera</i>	<i>Apis mellifera</i>
S41	Miel de aguacate	<i>Apis mellifera</i> , monofloral
S42	Miel <i>Apis mellifera</i>	<i>Apis mellifera</i>
S43	Miel <i>Apis mellifera</i>	<i>Apis mellifera</i>

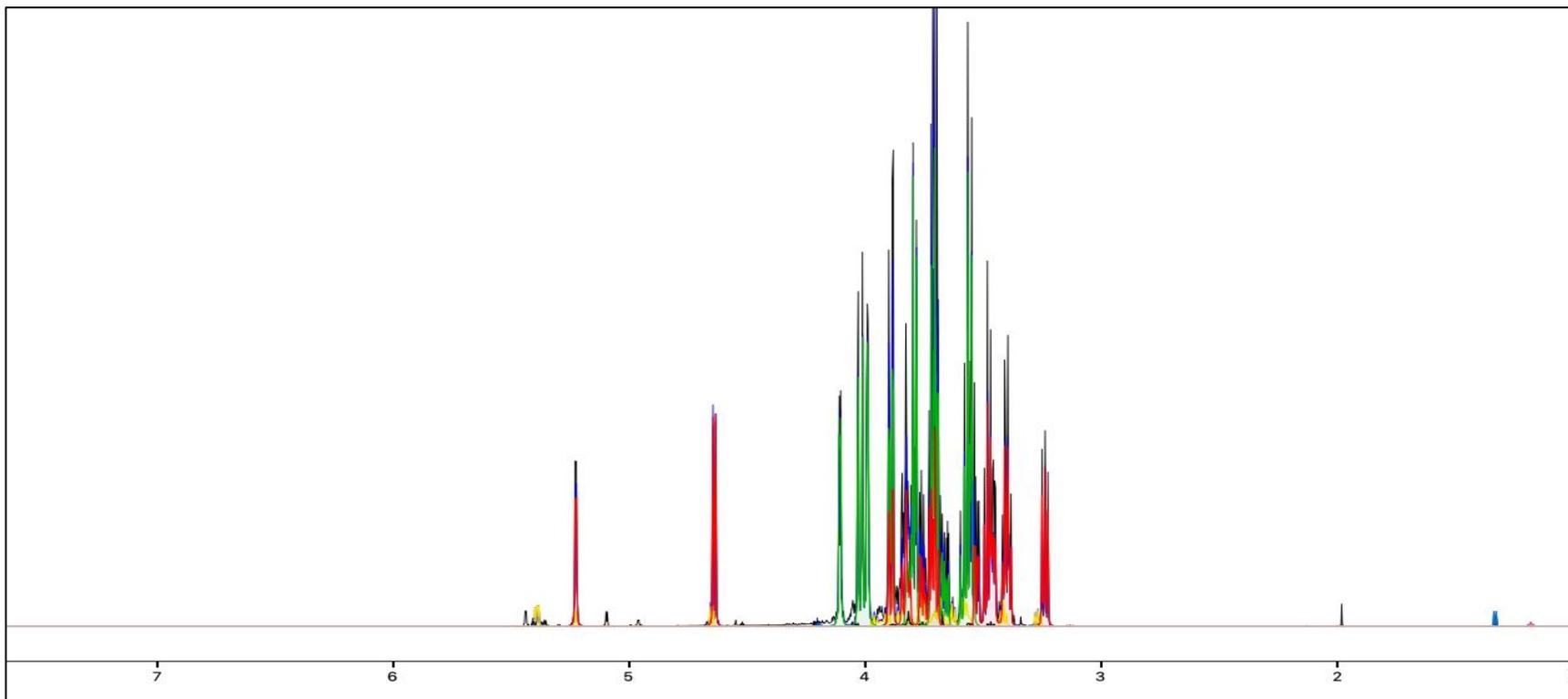
ANEXO II. Espectros RMN-¹H



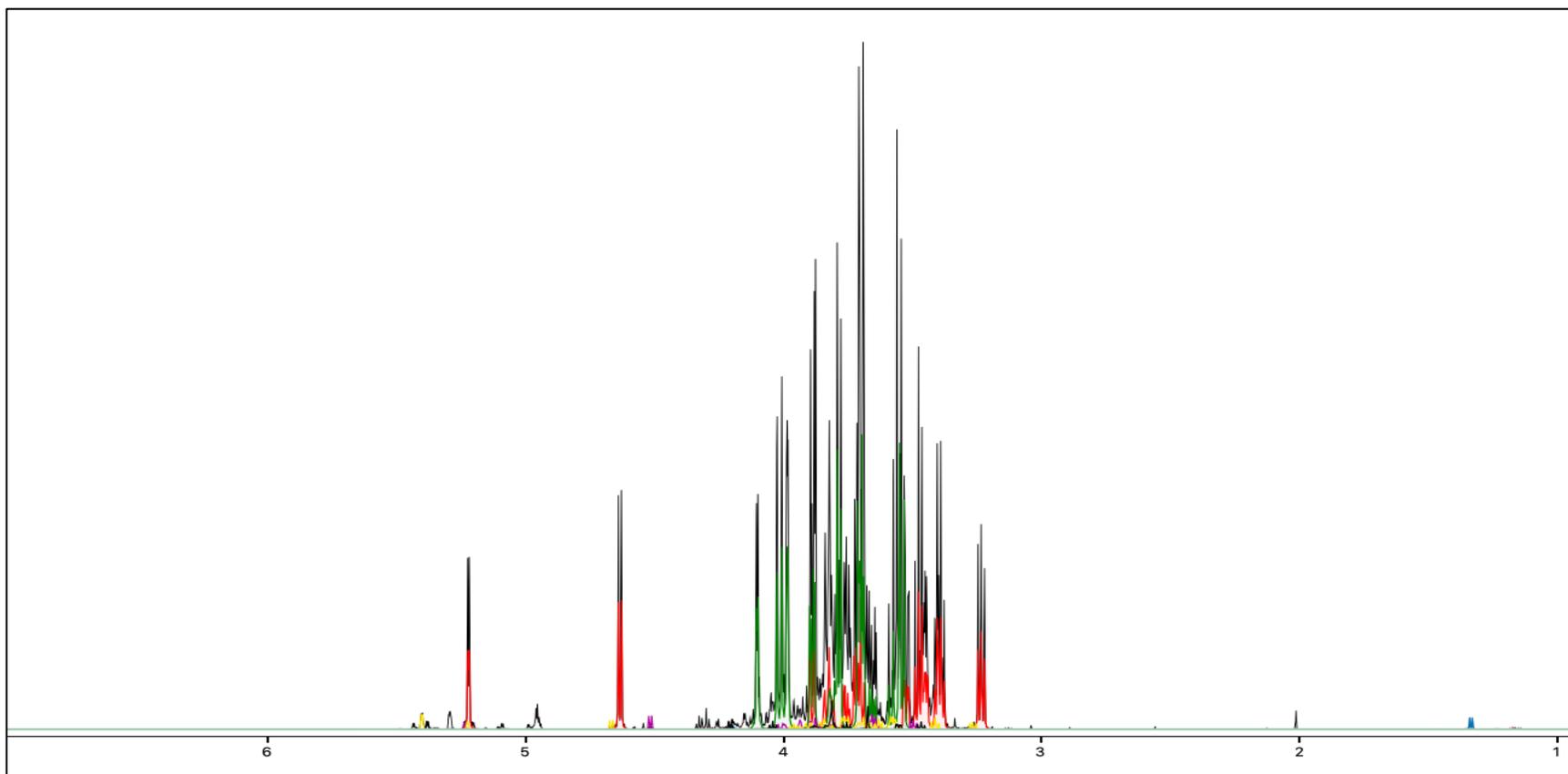
Espectro 1. Espectro por RMN-¹H (700 MHz, D₂O), de la miel *Apis mellifera* en su tiempo inicial y a 4 °C.



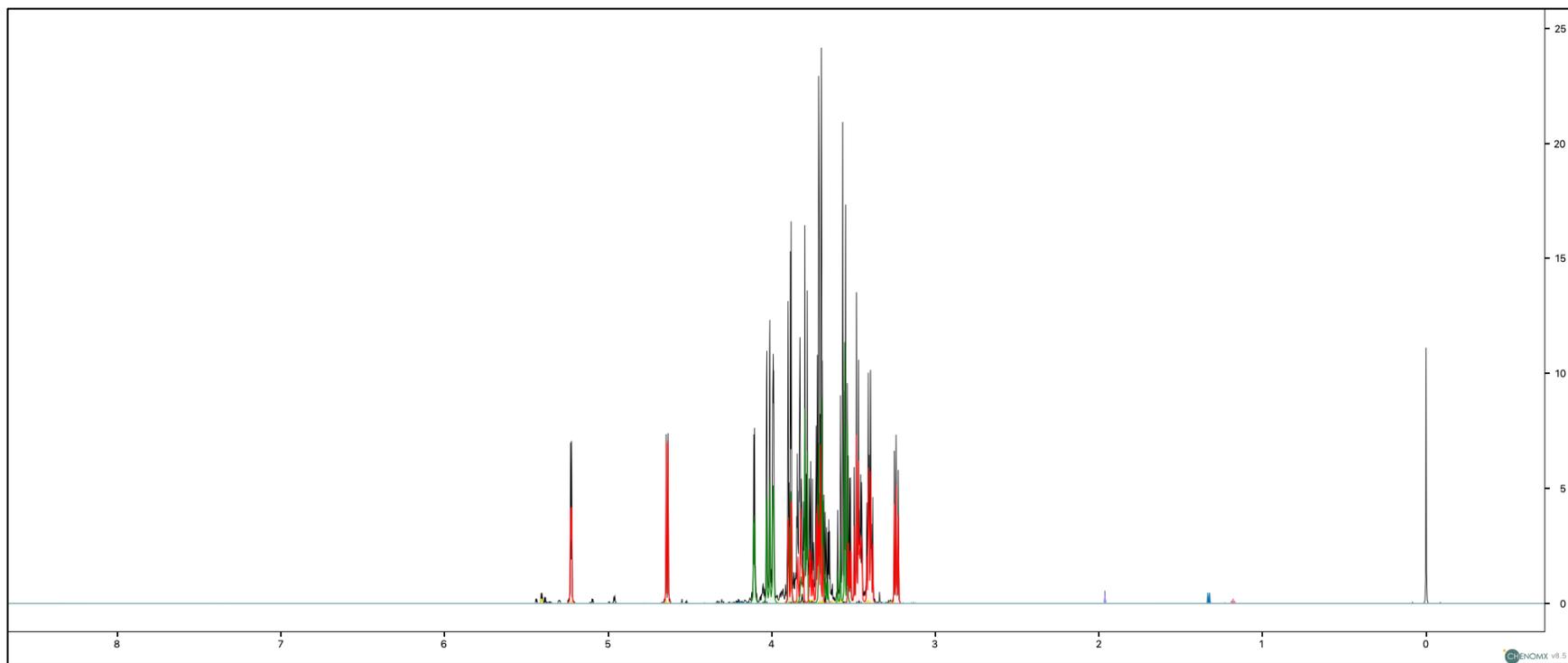
Espectro 2. Espectro por RMN-¹H (700 MHz, D₂O), de la miel de *Apis mellifera* a los 60 días y a 40 °C.



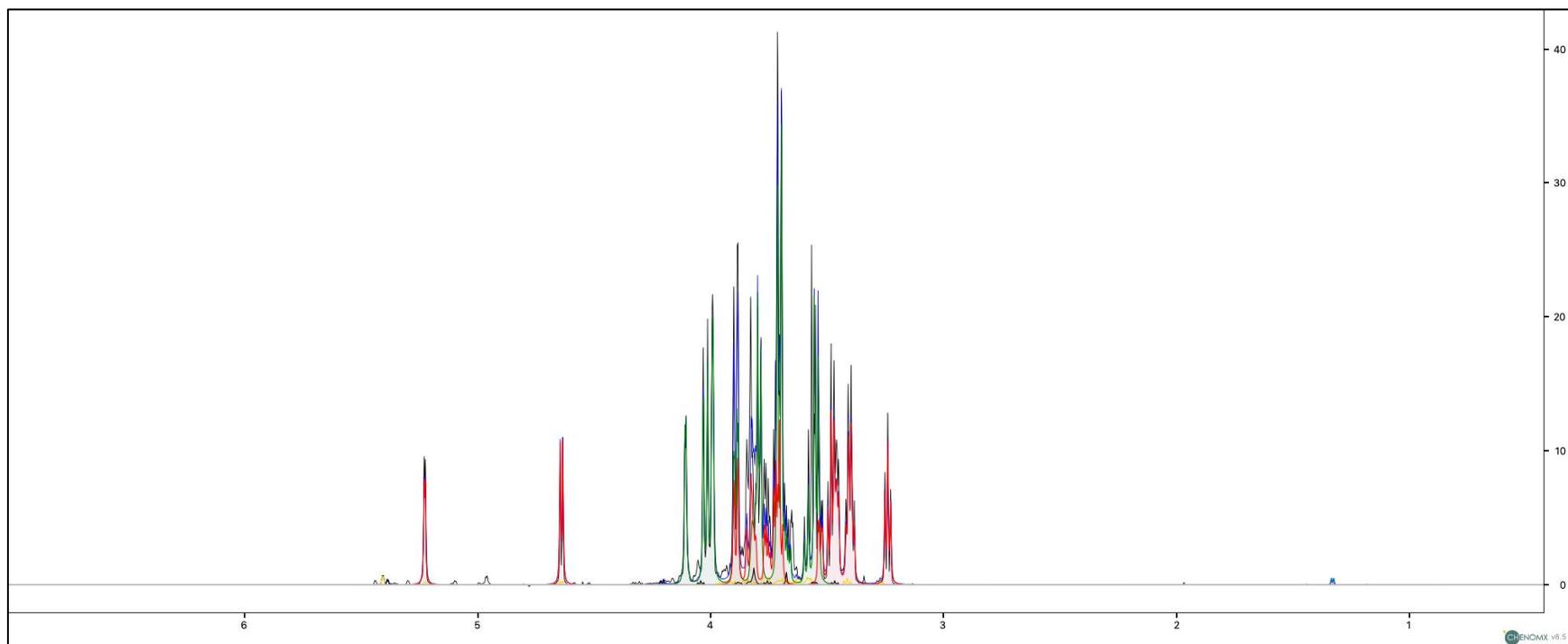
Espectro 3. Espectro por RMN-¹H (700 MHz, D₂O), de la miel *Mellipona beecheii* en su tiempo inicial y a 4 °C.



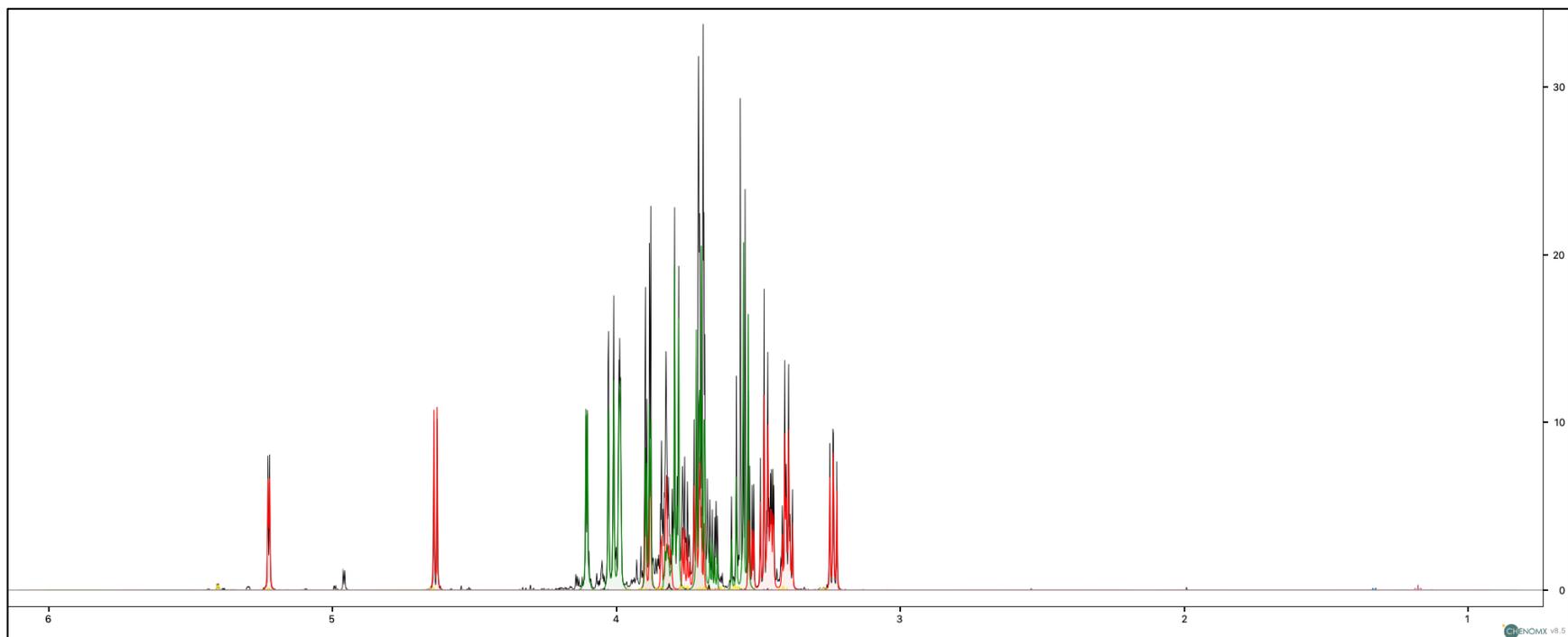
Espectro 4. Espectro por RMN-¹H (700 MHz, D₂O), de la miel *Mellipona beecheii* en un tiempo 60 días y a 40 °C.



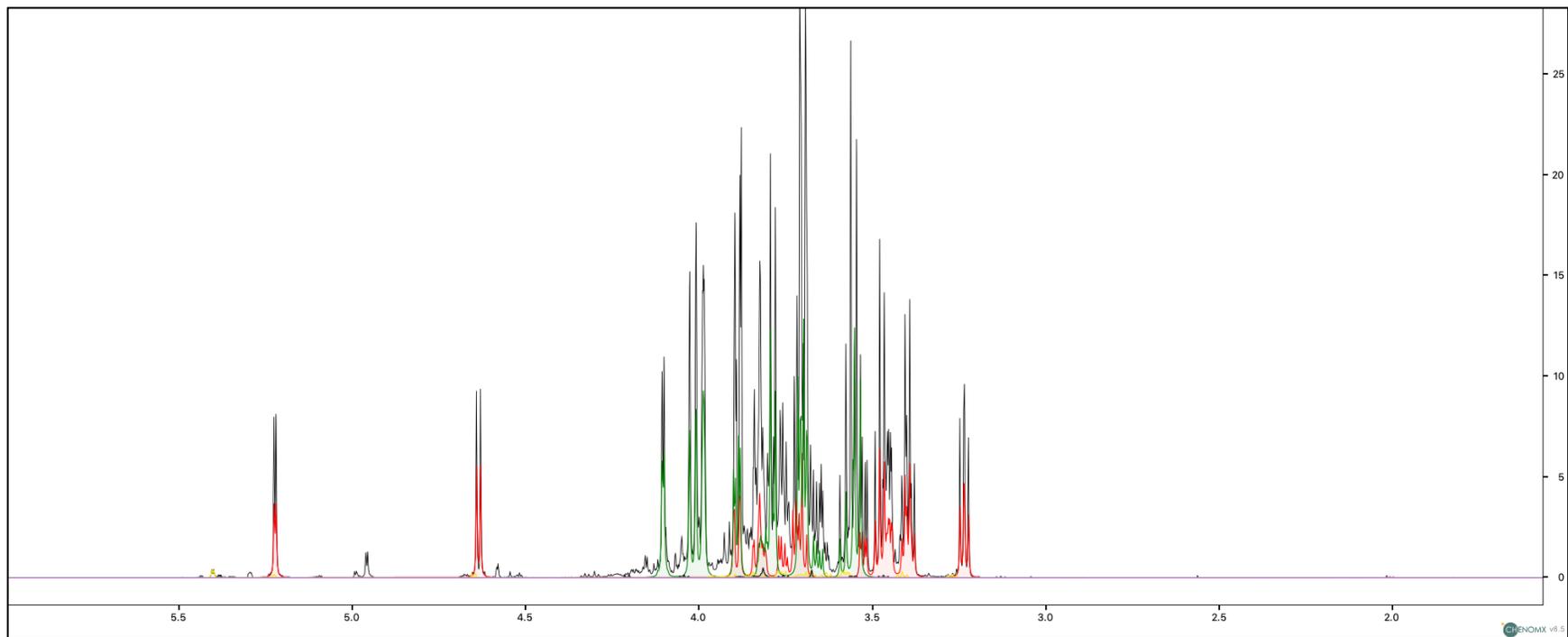
Espectro 5. Espectro por RMN-¹H (700 MHz, D₂O), de la miel *Scaptotrigona pectoralis* en un tiempo inicial y a 4 °C.



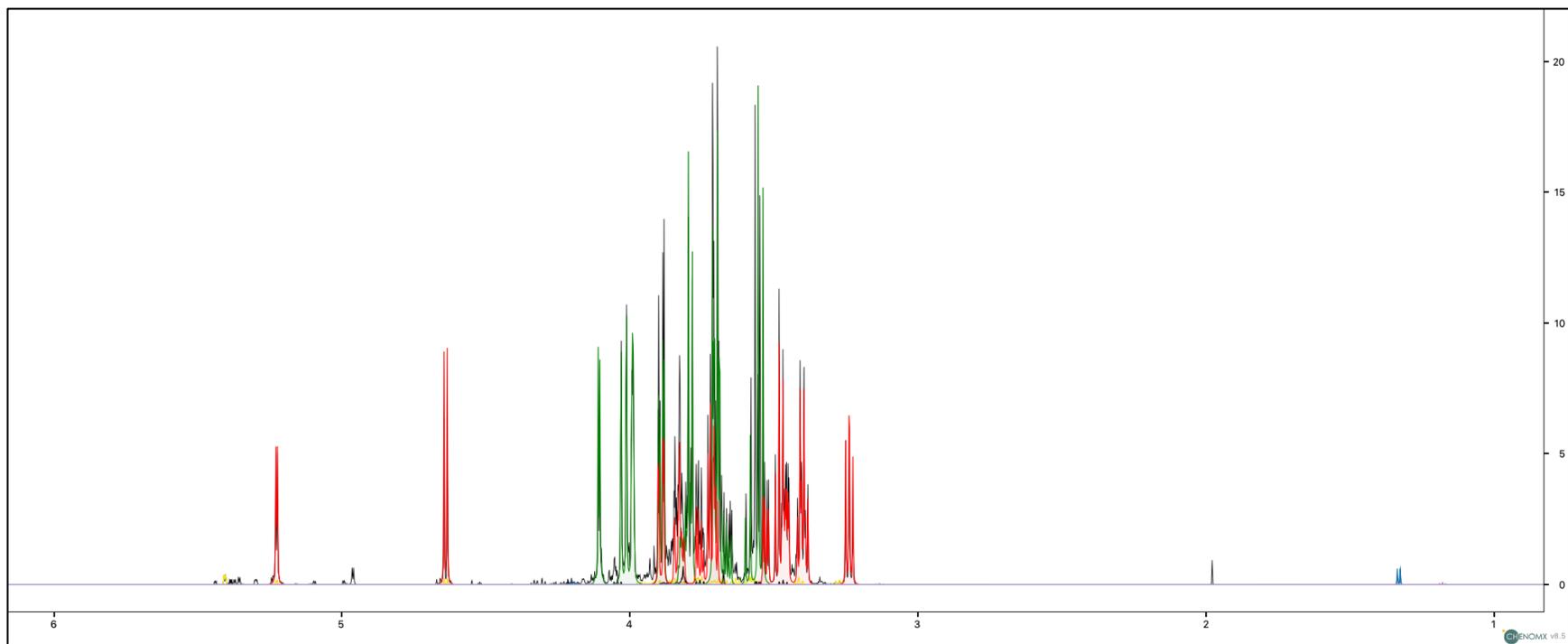
Espectro 6. Espectro por RMN-¹H (700 MHz, D₂O), de la miel *Scaptotrigona pectoralis* a los 60 días y a 40 °C.



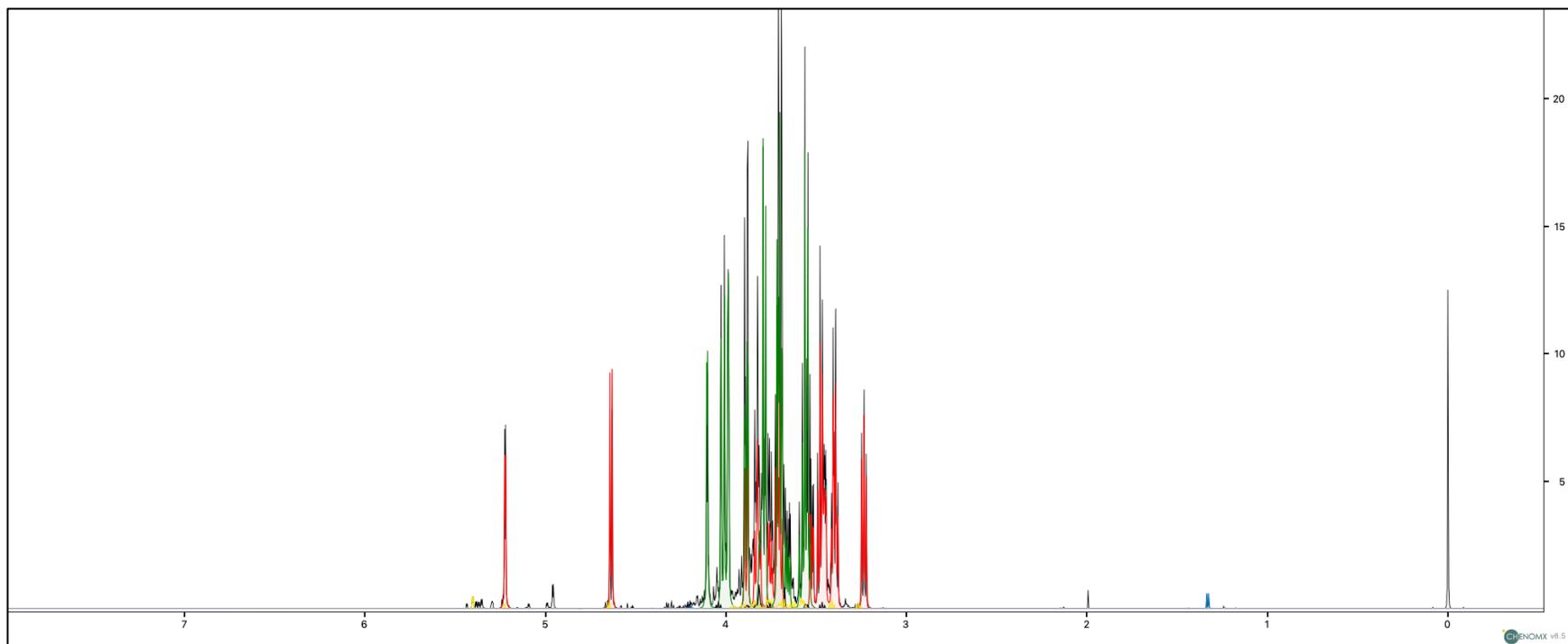
Espectro 7. Espectro por RMN-¹H (700 MHz, D₂O), de la miel *Plebeia* spp. en un tiempo inicial y a 4 °C.



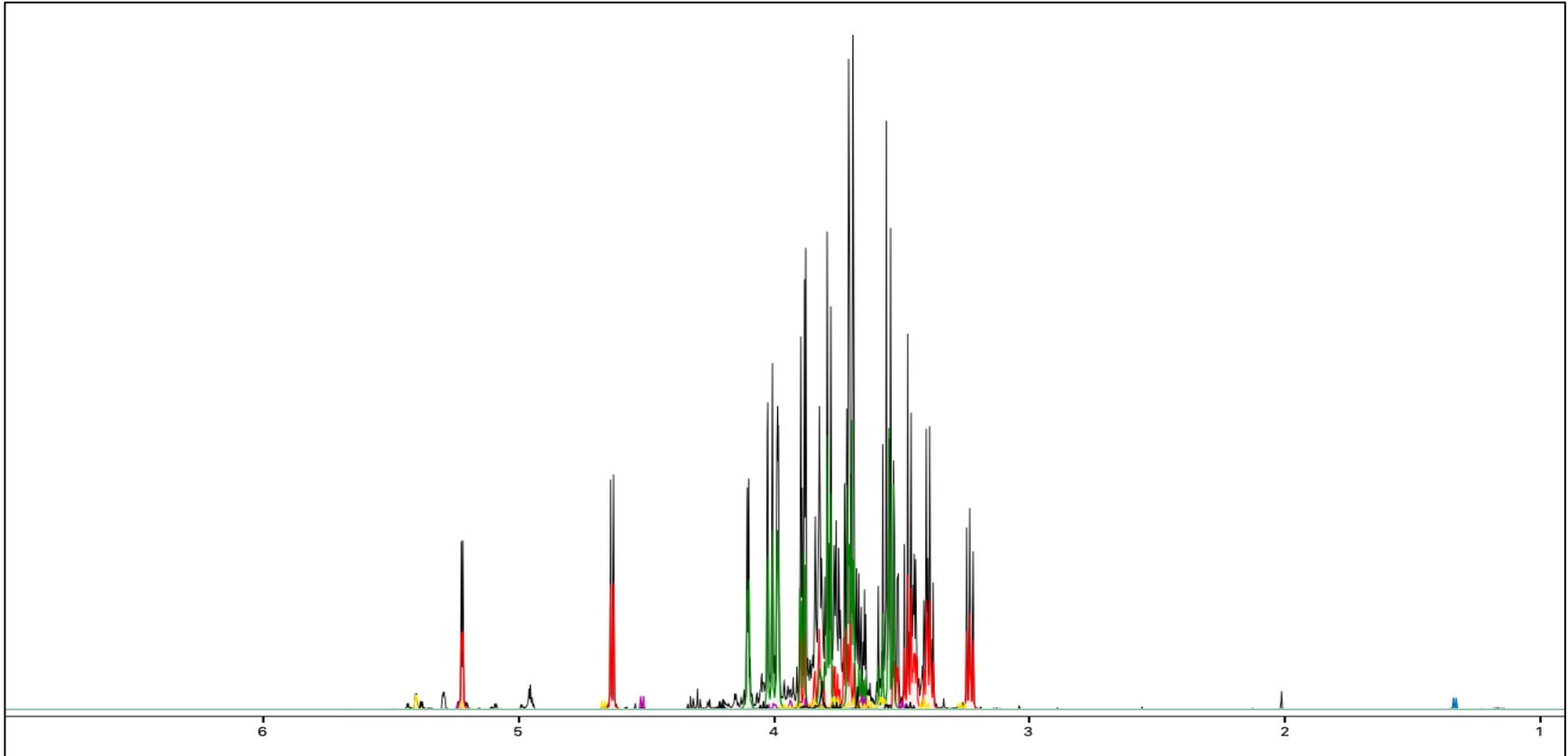
Espectro 8. Espectro por RMN-¹H (700 MHz, D₂O), de la miel *Plebeia spp.* a los 60 días y a 40 °C.



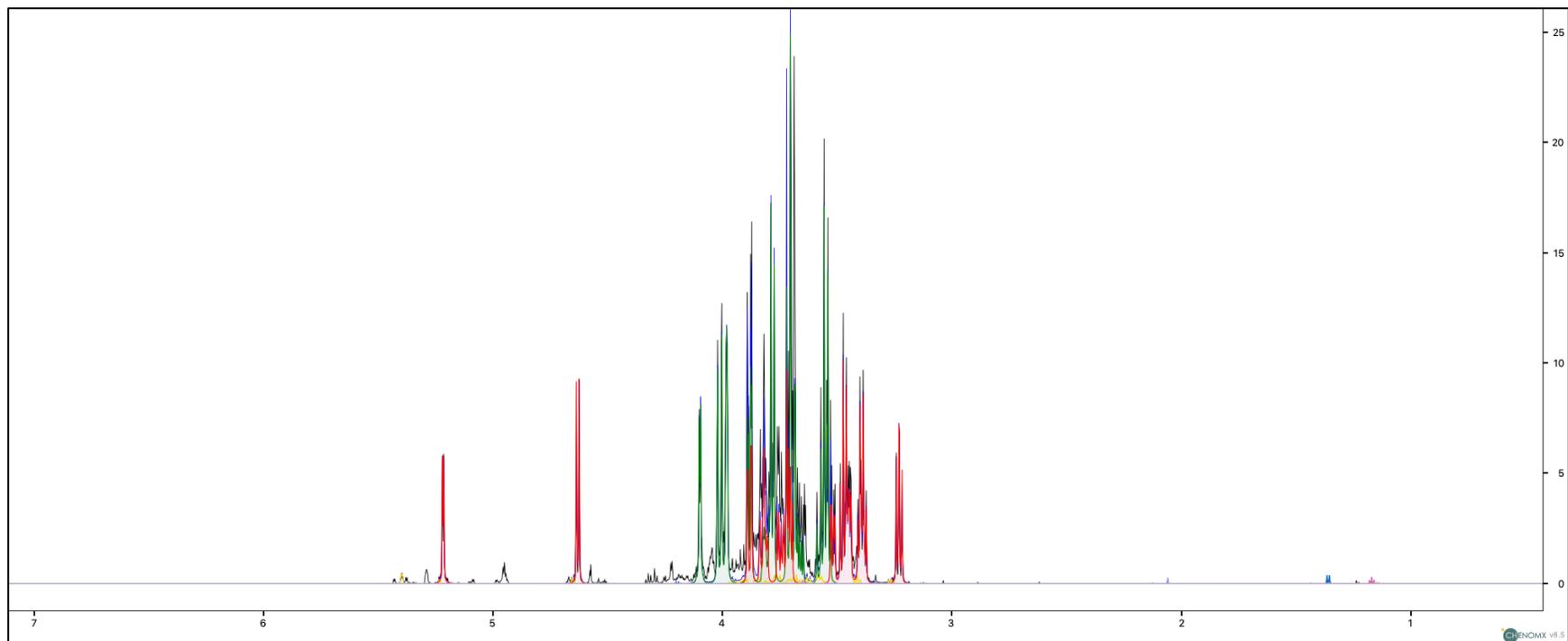
Espectro 9. Espectro por RMN-¹H (700 MHz, D₂O), de la miel *Scaptotrigona mexicana* en un tiempo inicial y a 4 °C.



Espectro 10. Espectro por RMN- ^1H (700 MHz, D_2O), de la miel *Scaptotrigona mexicana* a los 60 días y a 40 °C.



Espectro 11. Espectro por RMN-¹H (700 MHz, D₂O), de la miel *Nannotrigona spp.*, en un tiempo inicial y a 4 °C.



Espectro 12. Espectro por RMN-¹H (700 MHz, D₂O), de la miel *Nannotrigona* spp., a los 60 días y a 40 °C.