



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**APLICACIÓN DE LA QUIMIOMETRÍA PARA EL ANÁLISIS SISTEMÁTICO DE
MIELES MEXICANAS**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. VALERIA VILCHIS ROMERO

TUTORA: DRA. BLANCA ESTELA RIVERO CRUZ
FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, JUNIO, 2021



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**APLICACIÓN DE LA QUIMIOMETRÍA PARA EL ANÁLISIS
SISTEMÁTICO DE MIELES MEXICANAS**

**T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Q.F.B. VALERIA VILCHIS ROMERO



Ciudad Universitaria, CDMX, 2021

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ
VOCAL: DR. ROGELIO GREGORIO PEREDA MIRANDA
VOCAL: DR. RICARDO REYES CHILPA
VOCAL: DR. EDUARDO RODRÍGUEZ DE SAN MIGUEL GUERRERO
SECRETARIO: DRA. MARÍA DE LA LUZ ZAMBRANO ZARAGOZA

Sitio donde se desarrolló el tema:

**LABORATORIO 113, EDIFICIO DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA, CONJUNTO E,
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

Blanca Estela Rivero Cruz

Dra. Blanca Estela Rivero Cruz

SUSTENTANTE:

Valeria Vilchis Romero

Q.F.B. Valeria Vilchis Romero

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mi *alma máter*, la Universidad Nacional Autónoma de México, al Programa de Posgrado en Ciencias Químicas y a la Facultad de Química, por abrirme las puertas del conocimiento y permitirme continuar con mi formación profesional a lo largo de la maestría dentro de sus instalaciones.

A mi tutora, la Dra. Blanca Estela Rivero Cruz, primeramente, por permitirme formar parte de un gran equipo de trabajo. Agradezco ampliamente su confianza, su paciencia, su apoyo y su dedicación constante en cada etapa de este proyecto. Gracias por todo el aprendizaje en este camino.

Al Dr. Fausto Rivero, por las facilidades brindadas, así como por su orientación, apoyo y valiosas aportaciones y sugerencias, que enriquecieron enormemente el desarrollo de este proyecto.

Al M. en C. Juan Manuel Rodríguez y a la Profesora Georgina Maya, por su valiosa asesoría y atención en las consultas sobre el procesamiento de datos y la metodología, así como por el material facilitado y las sugerencias.

A los miembros del jurado designado, por su tiempo y dedicación durante la revisión de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado a través de su programa de becas nacionales (CVU: 956730) y al Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP) por el financiamiento otorgado al grupo de investigación a través de los proyectos PAIP 5000-9165 y PAIP 5000-9138.

Al Lic. Emil Neme Martínez, propietario de la Finca "La Isla SPR de RL", por proporcionar las muestras de miel para el desarrollo de este estudio.

ÍNDICE

LISTA DE CUADROS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	V
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades de la miel	1
1.1.1. Definición y descripción	1
1.1.2. Composición química.....	2
1.1.3. Propiedades fisicoquímicas	3
1.2. Mieles mexicanas	5
1.3. Abejas sin aguijón o meliponas	8
1.3.1. Abejas meliponas en México.....	8
1.3.2. Meliponicultura.....	12
1.4. Miel de abejas meliponas	14
1.4.1. Usos y propiedades	14
1.4.2. Composición y propiedades fisicoquímicas.....	15
1.5. Calidad de la miel.....	15
1.5.1. Calidad de la miel de abejas melíferas.....	17
1.5.2. Calidad de la miel de abejas meliponas	18
1.6. Métodos quimiométricos.....	19
1.6.1. Estado actual de la quimiometría aplicada en el campo de las mieles.....	21
2. HIPÓTESIS	23
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. OBJETIVOS	24
5. PARTE EXPERIMENTAL	25
5.1. Determinación del contenido de humedad.....	25
5.2. Determinación colorimétrica	26
5.3. Determinación de la acidez libre.....	26
5.3.1. Método convencional	27
5.3.2. Método en pequeña escala.....	27
5.4. Determinación del contenido de azúcares reductores	28
5.4.1. Método en pequeña escala para muestras con posible sedimentación	29

5.4.2. Método en pequeña escala para muestras sin sedimentación	30
5.5. Determinación de Hidroximetilfurfural	30
5.6. Análisis estadístico	32
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
6.1. Determinación de humedad.....	33
6.2. Determinación colorimétrica	36
6.3. Determinación de la acidez libre.....	39
6.3.1. Optimización del método.....	41
6.4. Determinación del contenido de azúcares reductores	46
6.5. Determinación de hidroximetilfurfural	53
6.6. Análisis estadístico	59
7. CONCLUSIONES	70
8. PERSPECTIVAS	70
9. BIBLIOGRAFÍA	71

LISTA DE CUADROS

		Página
Cuadro 1.	Composición química promedio de la miel.	3
Cuadro 2.	Tipos de mieles mexicanas y sus características.	7
Cuadro 3.	Ventajas y desventajas del sistema meliponicultor.	13
Cuadro 4.	Clasificación de los parámetros de calidad para la miel.	16
Cuadro 5.	Especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas de la miel de abeja melífera.	17
Cuadro 6.	Especificaciones sensoriales de la miel de abeja melífera.	17
Cuadro 7.	Límites permisibles de contaminantes en miel de abeja melífera.	18
Cuadro 8.	Estándares de calidad para la miel de abeja melipona vs miel producida por <i>A. mellifera</i> .	19
Cuadro 9.	Determinación del porcentaje de humedad en mieles mexicanas.	34
Cuadro 10.	Frecuencia de valores para %Humedad en muestras de mieles mexicanas.	35
Cuadro 11.	Frecuencia de valores para °Brix en muestras de mieles mexicanas.	35
Cuadro 12.	Determinación colorimétrica de mieles mexicanas.	37
Cuadro 13.	Frecuencia de colores en muestras de mieles mexicanas.	38
Cuadro 14.	Estandarización de las soluciones valoradas.	40
Cuadro 15.	Curva de linealidad para escalamiento del método convencional.	42
Cuadro 16.	Parámetros estadísticos del análisis de regresión lineal simple.	43
Cuadro 17.	Análisis de varianza de la regresión lineal simple.	43
Cuadro 18.	Determinación de la acidez libre de mieles mexicanas.	45
Cuadro 19.	Frecuencia de valores de acidez libre en mieles mexicanas.	46
Cuadro 20.	Determinación del Factor Fehling para azúcares reductores.	49
Cuadro 21.	% ARD utilizando el Método 2 y diferentes cantidades de crema de alúmina.	49
Cuadro 22.	Comparación de métodos modificados para evaluar el efecto del proceso de limpieza en la muestra.	50
Cuadro 23.	Determinación de %ARD en mieles mexicanas.	51
Cuadro 24.	Frecuencia de valores de %ARD en mieles mexicanas.	52
Cuadro 25.	Condiciones cromatográficas propuestas para determinar el contenido de HMF en mieles de <i>S. mexicana</i> .	54
Cuadro 26.	Concentraciones aproximadas de HMF en mieles mexicanas.	59
Cuadro 27.	Resumen de análisis para gráfico multivariado EWMA.	60
Cuadro 28.	Reporte de Gráfico Multivariado EWMA.	60-61
Cuadro 29.	Descomposición T-Cuadrada para el análisis multivariado de mieles mexicanas.	63
Cuadro 30.	Análisis de componentes principales para la determinación del número de componentes principales.	63
Cuadro 31.	Tabla de pesos de los componentes para el análisis de componentes principales.	64
Cuadro 32.	Tabla de componentes principales, datos de puntuaciones para casos individuales.	66-67

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Escala Pfund para la determinación del color de las mieles.	4
Figura 2.	Distribución geográfica de las regiones productoras de miel en México.	6
Figura 3.	Aportación de los principales estados en la producción nacional de miel.	6
Figura 4.	Distribución geográfica de las abejas meliponas en México: densidad relativa del número de especies.	11
Figura 5.	Distribución geográfica de las abejas meliponas en México: áreas de endemismo de algunas especies mexicanas.	11
Figura 6.	Técnicas de meliponicultura tradicional.	13
Figura 7.	Especies de abejas meliponas en México.	14
Figura 8.	Cromatogramas generados, estándares de HMF.	31
Figura 9.	Histograma de %Humedad en muestras de mieles mexicanas.	36
Figura 10.	Histograma de °Brix en muestras de mieles mexicanas.	36
Figura 11.	Gráfico de frecuencia de colores en muestras de mieles mexicanas.	38
Figura 12.	Curva de linealidad para el escalamiento del método convencional.	43
Figura 13.	Histograma de acidez libre en muestras de mieles mexicanas.	46
Figura 14.	Propuesta de escalamiento del método para la determinación de %ARD.	47
Figura 15.	Curva de adiciones de crema de alúmina para escalamiento del Método 2 de azúcares reductores.	50
Figura 16.	Histograma de %ARD en mieles mexicanas.	52
Figura 17.	Formación del HMF, vía cíclica.	53
Figura 18.	Perfiles para establecer las condiciones cromatográficas del método para determinar el contenido de HMF en mieles de <i>S. mexicana</i> .	55-56
Figura 19.	Análisis preliminar del contenido de HMF en mieles mexicanas.	57-58
Figura 20.	Gráfico multivariado EWMA para el análisis de mieles mexicanas.	60
Figura 21.	Gráfico de elipse 2-D de control para el análisis multivariado de mieles mexicanas.	62
Figura 22.	Gráfico 3-D (elipsoide de control) para el análisis multivariado de mieles mexicanas.	62
Figura 23.	Gráfica de sedimentación para el análisis de componentes principales.	64
Figura 24.	Gráfico de dispersión 2-D para el análisis de componentes principales para mieles mexicanas, acorde a la zona geográfica.	66
Figura 25.	Diagrama de dispersión 3-D para el análisis de componentes principales para mieles mexicanas, acorde a la zona geográfica.	66
Figura 26.	Gráfico de influencia 2-D de componentes para el análisis de componentes principales para mieles mexicanas.	68
Figura 27.	Gráfico de influencia 3-D de componentes para el análisis de componentes principales para mieles mexicanas.	68
Figura 28.	Gráfico de doble proyección para el análisis de componentes principales para mieles mexicanas.	69
Figura 29.	Gráfico de doble proyección 3-D para el análisis de componentes principales para mieles mexicanas.	69

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

HCl	Ácido clorhídrico	λ	Longitud de onda
Na₂CO₃	Carbonato de sodio	μg	Microgramo
cm	Centímetro	μm	Micrómetro
CV	Coefficiente de variación	mEq	Miliequivalente
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia	mg	Miligramo
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos	mL	Mililitro
°C	Grado Celsius	mm	Milímetro
°Brix	Grados Brix	min	Min
g	Gramo	nm	Nanómetro
NaOH	Hidróxido de sodio	N	Normal (normalidad)
HMF	Hidroximetilfurfural	ppm	Partes por millón
h	Hora	SI	Solución indicadora
nD	Índice de refracción	SV	Solución valorada
IC	Intervalo de confianza	t_R	Tiempo de retención
kg	Kilogramo	UV-Vis	Ultravioleta-visible
L	Litro	UFC	Unidades formadoras de colonia

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de la miel

La miel es un alimento de origen natural conocido desde la antigüedad. Históricamente, se sabe del uso tradicional de la miel como edulcorante natural y/o condimento en algunos alimentos, como medicamento para tratar diversas afecciones (principalmente como ingrediente de ungüentos) o como elixir tonificante. Incluso, en algunas culturas se menciona el uso de la miel como componente de “fármacos para alcanzar la inmortalidad” (Siedentopp, 2010). De esta forma, el alto consumo de este producto se ha atribuido esencialmente a sus propiedades nutricionales, medicinales y cosméticas que han sido ampliamente estudiadas y descritas en la literatura.

1.1.1. Definición y descripción

De acuerdo con el Codex Alimentarius (2001), la miel se define como una sustancia dulce producida por las abejas obreras 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 las partes vivas y que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, y que depositan, deshidratan y almacenan en el panal para su maduración.

La miel se compone esencialmente de diferentes azúcares, predominantemente glucosa y fructuosa. En general, el color de la miel varía desde casi incoloro a pardo oscuro. Su consistencia puede ser fluida, viscosa, total o parcialmente cristalizada. Estos factores, así como su aroma y sabor, dependen principalmente de las flores de procedencia, las regiones geográficas y las especies de abejas que participan en su producción, así como de las condiciones climáticas, el procesamiento, la manipulación, el envasado y el tiempo de almacenamiento (Missio da Silva *et al.*, 2016).

1.1.2. Composición química

La composición de los diferentes tipos de miel depende principalmente de las fuentes naturales que utilizan las abejas para su elaboración; sin embargo, poseen algunas similitudes a nivel mundial. De acuerdo con numerosas referencias, la miel se describe como una mezcla de aproximadamente 200 componentes, que incluyen:

- a) *Azúcares*. Los azúcares simples representan aproximadamente el 85% de los sólidos que constituyen la miel: esencialmente es una solución altamente concentrada de azúcares en agua (Ulloa *et al.*, 2010). La glucosa y la fructosa son considerados los principales carbohidratos presentes en la miel, sin embargo, existen informes de la existencia de alrededor de 25 compuestos adicionales en cantidades minoritarias, incluyendo maltosa, sacarosa, maltulosa, turanosa e isomaltosa, entre otras.
- b) *Enzimas*. La mayoría de las enzimas son añadidas a la miel por las abejas; aunque algunas de ellas también proceden directamente de las plantas y son las responsables del proceso de maduración de la miel. La más importante de ellas es la alfa-glucosidasa o invertasa; otras enzimas de importancia son la oxidasa, la catalasa, la fosfatasa ácida y la diastasa (Ulloa *et al.*, 2010).
- c) *Proteínas y aminoácidos*. El contenido proteico de la miel es de aproximadamente 0.5% incluyendo enzimas y aminoácidos. La presencia de las proteínas confiere a la miel una baja tensión superficial, que resulta en la formación de finas burbujas de aire que llegan a formar ligeras espumas. Por otro lado, los aminoácidos libres no representan una gran proporción en la composición de la miel; se han encontrado entre 11 y 21 de ellos, siendo la prolina el aminoácido mayoritario (casi la mitad del total). Otros aminoácidos presentes en la miel son el ácido glutámico, la alanina, la fenilalanina, la tirosina, la leucina y la isoleucina (Ulloa *et al.*, 2010).
- d) *Compuestos fitoquímicos*. Entre los fitoquímicos presentes en la miel, destacan los compuestos fenólicos que pertenecen a las categorías de fenoles libres, ácidos fenólicos, polifenoles (generalmente flavonoides), antocianinas, procianidinas y pigmentos (Oroian, 2017).

Adicionalmente, se ha encontrado la presencia de otros componentes como vitaminas (vitamina B6, tiamina, niacina y riboflavina), minerales (calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, sodio y zinc) y algunos compuestos volátiles (terpenos, cetonas y aldehídos) [Cuadro 1].

Del mismo modo, se ha identificado la presencia de componentes naturales tóxicos en las mieles, transferidos por las abejas al recolectar el polen de las plantas, tales como los alcaloides pirrolizidínicos (AP) y los diterpenoides conocidos como grayanotoxinas (Machado de-Melo *et al.*, 2018).

Cuadro 1. Composición química promedio de la miel (Ball, 2007)

Componente	Contenido promedio (%)	Rango (%)
Agua	17.2	12.2 – 22.9
Fructosa	38.4	30.9 – 44.3
Glucosa	30.3	22.9 – 40.7
Sucrosa	1.3	0.2 – 7.6
Otros disacáridos	7.3	2.7 – 16.0
Azúcares mayores	1.4	0.1 – 3.8
Ácido glucónico	0.57	0.17 – 1.17
Otros ácidos (sin incluir glucónico)	0.43	0.13 – 0.92
Lactonas	0.14	0.0 – 0.37
Minerales	0.17	0.02 – 1.03
Nitrógeno	0.04	0.0 – 0.13

1.1.3. Propiedades fisicoquímicas

Similar a lo que ocurre con la composición química, las propiedades fisicoquímicas de la miel difieren o son semejantes entre los diferentes tipos de miel; también, suelen relacionarse con las propiedades organolépticas de este producto. En la industria, el estudio de estas propiedades fisicoquímicas es la piedra angular de muchos procesos de la tecnología de la miel, tales como la cosecha, el procesamiento y el almacenamiento (Bogdanov, 2011). Estos aspectos incluyen:

Humedad. Esta característica determina la estabilidad de la miel y su resistencia a la fermentación por las levaduras durante el almacenamiento y se determina como la cantidad de agua presente en 100 g de miel.

Fluidez y viscosidad. La miel es un líquido cuya viscosidad generalmente depende de factores como el contenido de agua y la temperatura ambiental. Sin embargo, existen mieles descritas como toxotróficas, es decir, son similares en viscosidad a un gel mientras se encuentran en reposo, pero se vuelven líquidas con la agitación. Esta característica es fundamental para la cosecha y su manejo.

Densidad. La densidad de la miel, dependiente de la cantidad de agua, es mayor que la densidad del agua. Generalmente, las mieles con mayor contenido de agua adquieren una menor densidad.

Higroscopicidad. Se ha determinado que la miel posee una alta capacidad de absorber agua del ambiente, por lo que es un producto muy propenso a incrementar su humedad rápidamente.

Conductividad eléctrica. Los minerales y ácidos en la miel funcionan como electrolitos capaces de conducir la corriente eléctrica. Además, se ha determinado una relación entre el contenido de cenizas y la conductividad eléctrica.

Color. Existe una amplia gama de colores para la miel, que puede variar desde incolora hasta prácticamente negro o marrón oscuro, cubriendo todos los matices del color ámbar, es decir, color naranja amarronado. El color es un aspecto importante para la comercialización y destino final del producto. Para medir el color de la miel destaca la escala Pfund; dicha escala se basa en un método de comparación óptica con unidades desde 0 hasta 140 mm, de modo que el aumento de unidades se refleja en un color más oscuro de la miel (Figura 1).

Rotación óptica. Esta propiedad de la miel se debe principalmente a la presencia de los azúcares, los cuales son sustancias que presentan actividad óptica y son capaces de desviar el plano de la luz polarizada de manera positiva o negativa; la dirección (+ o -) y el ángulo de giro específico (α), dependen de las características quirales de cada uno. En general, el valor de la rotación óptica depende de la concentración de azúcares.



Figura 1. Escala Pfund para la determinación del color de las mieles.

1.2. Mieles mexicanas

La producción de miel en México constituye una tradición que se ha conservado hasta la actualidad. Así, después de China, Argentina, Estados Unidos y Turquía, nuestro país es considerado el quinto productor de miel a nivel mundial, con una producción anual de 55,500 toneladas, de las cuales se exportan alrededor del 44% (Viuda-Martos *et al.*, 2010).

México cuenta con cinco regiones productoras de miel con diferente grado de desarrollo (Figura 2):

- I. *Región Norte*. Integrada por los estados de Baja California Norte, Baja California Sur, Sonora, Chihuahua, Durango, Zacatecas, Coahuila, Nuevo León, parte norte de Tamaulipas y altiplano de San Luis Potosí.
- II. *Región de la Costa del Pacífico*. Integrada por los estados de Sinaloa, Nayarit, poniente de Jalisco y Michoacán, Colima, parte de Guerrero, Oaxaca y Chiapas.
- III. *Región del Golfo*. Integrada por el estado de Veracruz y parte de los estados de Tabasco y Tamaulipas, la región Huasteca de San Luis Potosí, Hidalgo y Querétaro.
- IV. *Región del Altiplano*. Integrada por los estados de Tlaxcala, Puebla, México, Morelos, Ciudad de México, Guanajuato, Aguascalientes; la parte oriente de los estados de Jalisco, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas y la parte poniente de Hidalgo y Querétaro, así como la región media de San Luis Potosí.
- V. *Región Sureste o Península de Yucatán*. Integrada por los estados de Campeche, Yucatán y Quintana Roo y parte de los estados de Chiapas (noreste) y Tabasco (oriente).

De acuerdo con cifras oficiales del periodo de 2000 a 2010 presentadas por SAGARPA en el año 2013, el 33% de la producción nacional de miel se concentra en la Región Sureste, siendo los estados de Yucatán, Campeche y Quintana Roo los que presentan una mayor aportación. Por otro lado, en la región de la Costa del Pacífico, el estado de Jalisco aporta el 10% y en la región del Golfo, el estado de Veracruz aporta el 9% (Martínez y Pérez, 2013) (Figura 3).

La amplia diversidad tanto climática como botánica del país resulta en la existencia de diferentes tipos de mieles con una gran variedad de sabores, aromas y colores que son bien cotizadas en los mercados internacionales. Las clases de miel que más destacan popularmente en el territorio mexicano se resumen en el Cuadro 2.

Cabe destacar que las características conferidas a cada uno de los tipos de miel pueden variar también dependiendo del tipo de abeja que las produce, considerando que actualmente se conocen dos especies de abejas productoras de miel: las abejas europeas (*Apis mellifera*) y las abejas sin aguijón o meliponas.



Figura 2. Distribución geográfica de las regiones productoras de miel en México (Martínez y Pérez, 2013).

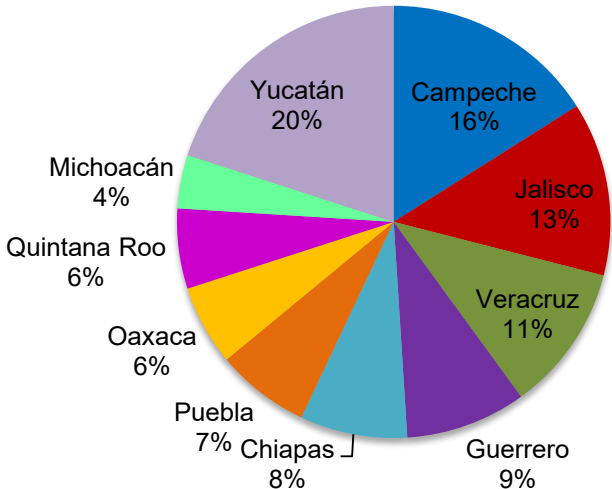


Figura 3. Aportación de los principales estados en la producción nacional de miel (Martínez y Pérez, 2013).

Cuadro 2. Tipos de mieles mexicanas y sus características.
 (tomado de <http://www.apariossanmartin.com/tipos-miel.html>)

Tipo de miel	Origen botánico	Región	Temporada de cosecha	Características
Miel de aguacate	Cultivos de aguacate	Michoacán	Marzo – Junio	Conocida como “el oro negro” de las mieles mexicanas por sus características particulares de color (ámbar oscuro).
Miel de azahar o naranja	Árboles cítricos (naranja, limonero)	Tamaulipas, Nuevo León, Veracruz	Marzo – Mayo	Color anaranjado característico.
Miel de mezquite	Árboles de mezquite	Guanajuato, Puebla, Coahuila, San Luis Potosí	Abril – Junio	Coloración característica muy clara, la cual puede variar dependiendo de su origen multifloral (ámbar claro) o monofloral (blanco).
Miel de tajonal	Flores de tajonal (<i>Viguiera dentata</i>)	Península de Yucatán, suroeste mexicano	Febrero – Abril	Es una clase de miel con identidad prehispánica, producida por una especie de abeja sin aguijón. Se caracteriza por su color dorado y su aroma fuertemente floral.
Miel multifloral	Diversas flores/plantas	Puebla, Guanajuato, Zacatecas, Aguascalientes, Durango, San Luis Potosí, Ciudad de México	Variable	También conocida como “miel de mantequilla” debido a que, al cristalizar, suele tomar una textura espesa y coloración similar a la de dicho producto. Sus características de color y aroma son variables dependiendo del origen botánico.

1.3. Abejas sin aguijón o meliponas

Se sabe que a nivel mundial existen aproximadamente 400 especies de abejas sin aguijón, distribuidas en las áreas Tropical y Subtropical del planeta (en la región comprendida de los 30° latitud norte hasta los 30° latitud sur). Algunas de estas especies han sido utilizadas tradicionalmente para obtener mieles con propiedades medicinales (Ayala, 1999).

Las abejas sin aguijón desempeñan un papel importante en los ecosistemas debido a que, mediante la polinización (transferencia de polen en una misma flor o de una a otra), se lleva a cabo la fertilización que da lugar al desarrollo de frutos y semillas. Así, se asegura la cadena alimentaria y se preserva la vida en las selvas. De forma general, las abejas contribuyen con más del 90% de la polinización y favorecen un mayor desarrollo de frutos en plantas autopolinizables (Cahuich-Muñoz, 2018).

En este sentido, las meliponas representan una alternativa para utilizarse como polinizadoras comerciales, debido principalmente a que no presentan un aguijón funcional y su manejo es más sencillo que el de las abejas melíferas, dado su carácter menos agresivo. Estas abejas se dividen en dos grandes grupos o “tribus”: Meliponini, que incluye géneros como *Melipona* y *Scaptotrigona*, y se encuentran exclusivamente en la zona del neotrópico (Sudamérica, América Central, Caribe, Florida del Sur y zona sur de México) y Trigonini, que consiste en una variedad más amplia de géneros y se pueden encontrar comúnmente en toda la zona del trópico (Ávila, 2018).

1.3.1. Abejas meliponas en México

En México, las abejas meliponas representan una porción relativamente pequeña (alrededor del 2.6%) de la fauna total de abejas, la cual es además altamente diversa. De esta porción de abejas sin aguijón, cerca del 41% han sido ampliamente utilizadas desde la época precolombina, no así en otros países cuya fauna de abejas es más diversa. La abeja melipona jugó un papel de gran importancia en culturas prehispánicas como la maya, ya que su miel era utilizada en sus ceremonias religiosas para la preparación de una bebida denominada *balché*, siendo consumida durante sus rituales; también, la miel se empleaba como un producto medicinal y edulcorante.

En el territorio mexicano, las abejas meliponas generalmente se localizan en las zonas costeras: desde Yucatán hasta el centro de Tamaulipas y desde Chiapas hasta el sur de Sonora. El tipo de zonas donde habitan son arboladas, así como acahuales, manglares y chaparrales, aunque también se encuentran en diversos cultivos de importancia económica y plantas cultivadas.

A nivel nacional, se tienen reportadas un total de 46 especies de abejas sin aguijón distribuidas en 11 géneros. Entre los géneros que presentan un mayor número de especies se encuentran: *Plebeia* con 12 especies, *Trigona* con 9 especies, *Melipona* con 7 especies y *Trigonisca* con 5 especies. Estas abejas responden a exigencias biológicas y adaptativas específicas, por lo cual cada especie está adaptada a los diferentes nichos biológicos existentes en el país (Figura 4) (Cahuich-Muñoz, 2018). Con base en estas consideraciones, las abejas meliponas mexicanas se pueden clasificar en tres grupos ecológicos (Figura 5):

1) *Especies con amplia distribución y asociadas con regiones tropicales y subtropicales.* Este grupo, a su vez, se divide en tres subgrupos de acuerdo con los patrones de distribución que presentan las diferentes especies:

- I. *Distribución tropical y de montaña.* Una sola especie de abeja melipona (*Partamona bilineata*) integra este grupo, distribuido a lo largo de la Sierra Madre del Sur en los estados de Michoacán y Oaxaca, en el sur del Eje Volcánico Transversal, llegando hasta los estados de Sinaloa y San Luis Potosí.
- II. *Distribución costera.* Consta de 4 especies de abejas sin aguijón (*Melipona beecheii*, *Plebeia frontalis*, *Trigona fulviventris* y *Trigonisca pipioli*), distribuidas principalmente a lo largo de las vertientes del Golfo y el Pacífico hasta estados como Nuevo León, San Luis Potosí y Sinaloa, así como en algunas zonas del estado de Chiapas. Este grupo de especies presenta la característica de supervivencia en un margen de temperatura estrecho, pudiendo alcanzar áreas de transición tropical-montañosa.
- III. *Amplia distribución.* Lo integran dos especies (*Nannotrigona perilampoides* y *Frieseomelitta nigra*), distribuyéndose ampliamente a lo largo de la República Mexicana, principalmente en áreas de bosque nuboso. Aparentemente, este grupo se caracteriza principalmente por establecerse en ambientes donde no encuentren limitaciones alimenticias a lo largo de todas las estaciones del año.

2) *Especies con distribución asociada a bosques perennes.* Este grupo comprende alrededor del 50% del total de especies de abejas sin aguijón presentes en México y se divide en 4 subgrupos de acuerdo con sus patrones de distribución:

- I. *Exclusivas del estado de Chiapas*. Solo tres especies integran este grupo (*M. solani*, *T. mayarum* y *T. silvestriana*).
- II. *Distribución limitada en el bosque tropical perenne*. Este grupo consta de algunas especies como *P. llorentei*, *P. melanica*, *P. pulchra*, *S. argyrea* y *T. nigerrima*, las cuales se encuentran en zonas montañosas por arriba de los 1000 m sobre el nivel del mar, alcanzando zonas del centro de Veracruz y el sureste de San Luis Potosí, sin lograr establecerse en la península de Yucatán.
- III. *Distribución en el bosque tropical perenne y áreas secas*. Este grupo es similar al anterior, sin embargo, este sí abarca la península de Yucatán. Lo integran especies como *L. niitkib* y *S. pectoralis*.
- IV. *Distribución en la Costa de Chiapas*. Hasta el momento se han identificado solo dos especies (*Oxytrigona mediorufa* y *Trigonisca schulthessi*) que integren este grupo, encontrándose en las cercanías de Tapachula, en el estado de Chiapas. Se considera que una especie más (*Scaptotrigona mexicana*) puede presentar una buena capacidad de sobrevivencia en esta zona geográfica, así como en el grupo II de esta categoría (Sánchez-Tolentino *et al.*, 2019).

3) *Especies endémicas asociadas a diferentes tipos de bosques*. En México existen 13 especies endémicas. Algunas están estrechamente relacionadas debido a fenómenos de fragmentación de grupos ancestrales a través del surgimiento de barreras naturales, ya sea geológicas o de otra índole (vicarianza). De esta forma, se han reconocido 5 subgrupos de especies vicariantes:

- I. *Región del Istmo*. Tres especies integran este grupo (*C. oaxacana*, *M. yucatanica* y *T. mixteca*), distribuido en la mitad sur del Istmo de Tehuantepec, al igual que en el sur de Yucatán, Belice y Quintana Roo.
- II. *Montañas del sur*. Se conforma por 4 especies (*M. colimana*, *M. fasciata*, *P. fulvopilosa* y *P. manantlensis*), distribuidas en la zona del Eje Volcánico Transversal y la Sierra Madre del Sur, en estados como Guerrero y Oaxaca, el sureste de Jalisco y el norte de Colima.
- III. *Cuenca del Balsas*. Este grupo se integra por 4 especies (*Cephalotrigonae eburneiventer*, *P. mexica*, *T. azteca* y *M. lupitae*), las cuales se distribuyen a través de la cuenca del río Balsas, abarcando los estados de Guerrero, Morelos, Puebla y Michoacán. Estas especies parecen estar estrechamente relacionadas con las de la Región del Istmo.
- IV. *Norte de Nayarit, sur de Sinaloa y sureste de Zacatecas*. Una sola especie conforma este grupo (*Plebeia cora*), la cual parece estar relacionada con una especie perteneciente a la zona de la Cuenca del Balsas.

V. *Costa del Pacífico*. Las 3 especies que integran este grupo (*Scaptotrigona hellwegeri*, *L. chamelensis* y *Geotrigona acapulconis*) se encuentran distribuidas entre el sur de Oaxaca y el estado de Sinaloa; sin embargo, también se han localizado en algunas zonas de la Cuenca del Balsas.

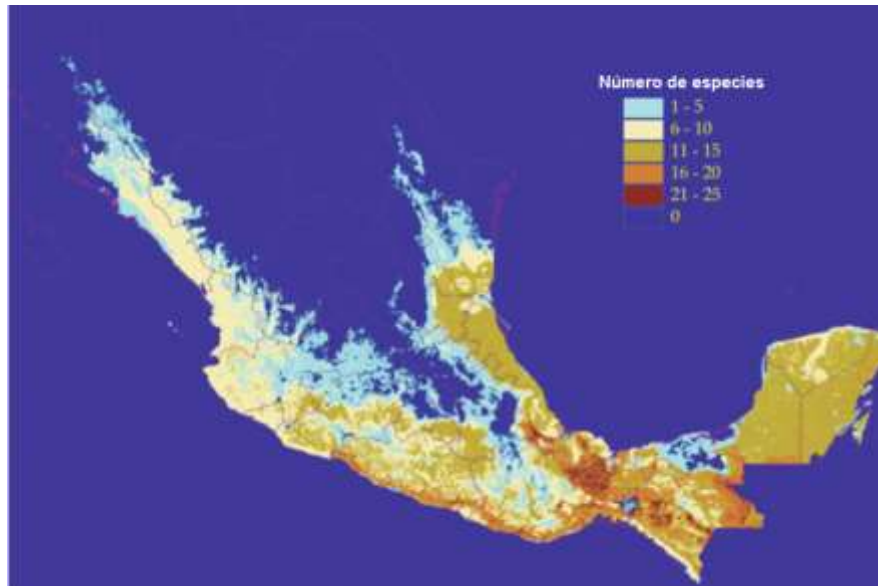


Figura 4. Distribución geográfica de las abejas meliponas en México: densidad relativa del número de especies (Ayala, *et al.*, 2013).



Figura 5. Distribución geográfica de las abejas meliponas en México: áreas de endemismo de algunas especies mexicanas (Ayala, *et al.*, 2013).

1.3.2. Meliponicultura

La meliponicultura se define como el cuidado y la crianza de abejas nativas sin aguijón y abarca todos los procesos involucrados en el manejo de las colmenas. Previo a la llegada de las abejas melíferas a México, la meliponicultura era una actividad intensamente desarrollada por diferentes culturas mesoamericanas. Se tiene conocimiento de la práctica de esta actividad por la cultura Olmeca, alcanzando su auge con la cultura Maya, que fácilmente podía compararse con la apicultura tradicional de cualquier país europeo. En un principio los miembros de estas comunidades tomaban los panales silvestres de las abejas meliponas y procedían a colgarlos afuera de sus viviendas; posteriormente, comprendieron la necesidad de proveer a las abejas de recursos florales y protección contra los factores ambientales (Márquez-Luna, 1994). De esta forma, se realizaban siembras de plantas poliníferas y nectaríferas en las zonas aledañas a los “troncos colmena” o “jobones”, que consistían en trozos de madera hueca diseñados especialmente para albergar a las abejas, permitiendo además una mejor manipulación de los panales con el menor daño en los nidos. Esto les permitía producir grandes cantidades de miel (hasta 2 kg de miel por colonia al año). En contraste, otras áreas del México antiguo también presentaron actividades referentes a la meliponicultura de un modo más modesto. En algunas zonas de Puebla y Veracruz, grupos étnicos como los nahuas, totonacas y chontales desarrollaron sus propias técnicas de cultivo de abejas, sustituyendo los troncos huecos por dos vasijas de barro unidas por los bordes con una mezcla de ceniza húmeda para formar las colmenas. Esta diferencia en las técnicas se atribuye esencialmente a los recursos naturales disponibles para las diferentes poblaciones meliponicultoras (Quezada-Euán *et al.*, 2001) (Figura 6).

Actualmente, existen dos tipos de cultivos de abejas de importancia económica en el país: la apicultura (cultivos de *A. mellifera*) y la meliponicultura (cultivos principalmente de *M. beecheii*). Esta última es la de menor importancia y no ha presentado cambios significativos en cuanto a su técnica con respecto a sus antepasados. Algunas de las causas por las que la meliponicultura se encuentra prácticamente en el abandono son:

- a) *Introducción de los cultivos de A. mellifera*. Esta abeja europea tiene niveles de producción mucho mayores que los de las abejas meliponas (*A. mellifera* llega a producir hasta 20 litros de miel por cosecha). Por esta misma razón, se otorgó un mayor impulso económico a la apicultura.
- b) *Crecimiento de la industria azucarera*. Inicialmente la miel era utilizada como edulcorante natural, sin embargo, el uso del azúcar proveniente de

las cañas tomó popularidad gradualmente. De esta forma, el uso de la miel de melipona se relegó únicamente para ocasiones excepcionales.

- c) *Deforestación irracional*. En los últimos años ha habido una destrucción acelerada de los hábitats naturales de las abejas sin aguijón.

Es claro que la meliponicultura es una actividad que se encuentra en peligro de desaparecer, aún con las ventajas y desventajas que presenta el sistema meliponicultor (Cuadro 3). No obstante, aún existen comunidades que conservan la meliponicultura como actividad regular, principalmente para el autoconsumo (Márquez-Luna, 1994).



Figura 6. Técnicas de meliponicultura tradicional. Reservorios para las colmenas: (A) “Mancuernas” poblanas. Extracción de productos de la abeja por meliponicultores: (B) y (C). (D) “Jobones” mayas.

Cuadro 3. Ventajas y desventajas del sistema meliponicultor.

Desventajas	Ventajas
<ul style="list-style-type: none"> × Desconocimiento del destino de la producción. × Bajo interés en la formación de organizaciones productoras. × Pérdida de diversas técnicas de manejo a través del tiempo. × Baja producción y por tanto, bajos ingresos. × Falta de difusión y promoción de la meliponicultura. × Contacto escaso entre productores e investigadores para el estudio de los productos resultantes. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Conservación debida al arraigo tradicional proveniente de diversas culturas. ✓ Requiere poca inversión de capital y mano de obra. ✓ Posible comercialización a precios mayores que los productos de <i>A. mellifera</i>. ✓ Facilidad para trabajar con las abejas, dada su docilidad y su carencia de aguijón.

Es importante destacar que de todas las especies de abejas sin aguijón existentes en México, solo una sigue utilizándose actualmente para su cultivo y manejo en huertos y solares: *Melipona beecheii*, cuyo nombre en maya es *Xunaan Kaab* o *Colel Kab*. Otras especies que, a pesar de considerarse menos productivas que *M. beecheii*, igualmente se aprovechan son: *Scaptotrigona mexicana*, *Nannotrigona perilampoides*, *Scaptotrigona pectoralis* y *Tetragonisca angustula*. Sin embargo, la mayoría de ellas no son trasladadas a meliponarios para su cuidado y manejo adecuado (Figura 7).



Figura 7. Especies de abejas meliponas en México. **(A)** *Melipona beecheii*; **(B)** *Scaptotrigona mexicana*; **(C)** *Scaptotrigona pectoralis*; **(D)** *Tetragonisca angustula*; **(E)** *Nannotrigona perilampoides*.

1.4. Miel de abejas meliponas

1.4.1. Usos y propiedades

La miel, específicamente la proveniente de abejas sin aguijón, es un producto muy apreciado por sus usos medicinales más que alimenticios. De acuerdo con diversas fuentes, principalmente expertos locales, el producto puede utilizarse para tratar múltiples afecciones. Por ejemplo, en la medicina tradicional maya se emplea para estimular la concepción, acelerar el parto, como cicatrizante al aplicarse sobre el cordón umbilical del recién nacido y como edulcorante para las bebidas de atole de maíz que se dan a las mujeres después del parto.

Otro uso importante está descrito para el tratamiento del resfriado, tos, bronquitis y otras enfermedades respiratorias en mezcla con diferentes plantas medicinales y otros ingredientes, tales como jugo de limón, mezcal de agave, etanol y pulpa de frutos de tomatillo. También, se usa como antiséptico, aplicándose directamente sobre las zonas infectadas, particularmente en los ojos y lesiones cutáneas. Un uso menos difundido es como antiinflamatorio, para tratar la fatiga muscular y esguinces, aplicándose vía tópica en las partes afectadas (Quezada-Euán, 2018; Reyes-González *et al.*, 2014).

1.4.2. Composición y propiedades fisicoquímicas

En comparación con la miel de *A. mellifera*, las propiedades fisicoquímicas y organolépticas de la miel de abeja melipona son distintas. La miel de melipona, en general, se caracteriza por tener un sabor agrídulce, una mayor fluidez debida a la mayor humedad del producto y su cristalización lenta. La gama de colores que puede presentar la miel de melipona no difiere demasiado con respecto a la miel de melífera, ya que puede presentar coloraciones ámbar claro, amarillo intenso y hasta café oscuro.

De acuerdo con algunos estudios, la miel proveniente de abejas sin aguijón presenta una alta conductividad, pH ácido y alta acidez libre, alta higroscopicidad y humedad y una menor actividad de diastasa. El perfil de carbohidratos, aunque generalmente se muestra similar al de *A. mellifera*, a menudo suele ser más bajo en azúcares reductores (Chuttong *et al.*, 2016; Ávila, 2018).

1.5. Calidad de la miel

El control de calidad es necesario para garantizar la presencia de los diferentes componentes que le confieren a la miel sus diversas propiedades terapéuticas y nutrimentales.

De acuerdo con el Codex Alimentarius (2001), para que una miel sea considerada como tal, no debe añadirse ningún ingrediente alimentario, incluidos los aditivos, ni se le hará ninguna otra adición que no sea de otra miel; no deberá tener ninguna materia, sabor, aroma o mancha observable proveniente de materias extrañas durante su procesamiento y almacenamiento; no deberá haber comenzado a fermentar ni a efervescer; no debe eliminarse el polen o algún otro constituyente

particular, excepto cuando esto sea inevitable en la eliminación de materia inorgánica u orgánica extraña; no se deberá calentar ni procesar hasta el punto de que se modifique su composición esencial y/o se deteriore y no se utilizarán tratamientos químicos o bioquímicos que influyan en la cristalización de la miel.

La calidad de la miel se define evaluando los parámetros físicos, químicos y bioquímicos más significativos, los cuales se pueden clasificar basándose en su contribución a la calidad de la miel (Cuadro 4).

Cuadro 4. Clasificación de los parámetros de calidad para la miel.
(Pita-Calvo *et al.*, 2017)

Propiedad relacionada	Parámetro
Preservación	Humedad pH Acidez libre y acidez total
Frescura	Diastasa Invertasa 5-hidroxi-metil-furfural
Madurez	Prolina Humedad Sucrosa
Origen botánico	Contenido de cenizas Humedad Color Conductividad eléctrica Rotación específica Fructosa/glucosa Glucosa/humedad pH Acidez libre y acidez total Prolina Composición de azúcares
Adulteración	Sucrosa Perfil glucosa-fructosa-sucrosa Prolina 5-hidroxi-metil-furfural
Cristalización	Fructosa/glucosa Glucosa/humedad

La Comisión Internacional de la miel (*International Honey Commission*, IHC) recomienda diferentes métodos para realizar el análisis de rutina y determinar los parámetros de calidad de las mieles. En el año 2009, este organismo internacional publicó una recopilación denominada “*Métodos Armonizados de la IHC*”, que incluye métodos analíticos antiguos y modernos que, de acuerdo con el estado actual de conocimiento, se consideran suficientes para determinar la calidad de la

miel. Todos estos métodos recopilados han sido producto de diversos estudios colaborativos y en su mayoría se han publicado como métodos de referencia. Sin embargo, existe una constante actualización de los mismos debido al continuo desarrollo y mejoría de las técnicas instrumentales con el paso del tiempo.

1.5.1. Calidad de la miel de abejas melíferas

En México, la normatividad (Norma Mexicana NMX-F-036-981, Miel de abeja. Especificaciones; Norma Oficial Mexicana NOM-004-SAG/GAN-2018, Producción de miel y especificaciones) establece como criterios de calidad de la miel los límites de ciertos parámetros fisicoquímicos, que se resumen en el Cuadro 5. Del mismo modo, se incluyen especificaciones para las propiedades sensoriales (Cuadro 6) y, en concordancia con la normatividad europea, los límites de contaminantes permitidos para evitar riesgos sanitarios, (Cuadro 7).

Cuadro 5. Especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas de la miel de abeja melífera.

Especificaciones	% Mínimo	% Máximo
<i>Fisicoquímicas</i>	<i>Unidades: g/100g</i>	
Azúcares reductores	63.88	-
% Sacarosa	-	5.00
% Glucosa	-	38.00
Humedad	-	20.00
Sólidos insolubles en agua	-	0.30
Cenizas	-	0.60
Acidez (mEq de ácido cítrico/kg)	-	40.00
Hidroximetilfurfural (mg/kg) (más de 6 meses)	-	80.00
Hidroximetilfurfural (mg/kg) (menos de 6 meses)	-	40.00
Índice de diastasa	-	8.00
<i>Microbiológicas</i>	<i>Unidades: UFC/g</i>	
Cuenta bacteriana total	-	1000
Hongos	-	100
Levaduras	-	100

Cuadro 6. Especificaciones sensoriales de la miel de abeja melífera.

Propiedad	Descripción
Color	Propio característico derivado de la vegetación de origen, variable desde un tono blanco agua al ámbar oscuro.
Olor	Propio característico derivado de la vegetación de origen.
Sabor	Propio característico derivado de la vegetación de origen.
Consistencia	Fluida, viscosa, total o parcialmente cristalizada.

Cuadro 7. Límites permisibles de contaminantes en miel de abeja melífera.

Sustancia	Límite de tolerancia (ppm)
<i>Medicamentos/antibióticos</i>	
Dibromobenzofenol	0.1
Flumetrina	0.005
Fluvalinato	0.05
Estreptomicina	0.02
Sulfonamidas	0.05
Tetraciclina	0.02
Timol	0.8
<i>Pesticidas</i>	
Amitraz	0.2
Bromopropilato	0.1
Cimiazol	0.5
Cipermetrina	0.5
<i>Otras sustancias</i>	
1,4-diclorobenzol	0.01

1.5.2. Calidad de la miel de abejas meliponas

A pesar de la existencia de las normas de calidad establecidas a nivel nacional e internacional para la miel proveniente de *A. mellifera*, diversos estudios han demostrado que la miel de abeja sin aguijón no cumple con estas especificaciones de calidad (Chuttong *et al.*, 2016; Biluca *et al.*, 2016; Vit *et al.*, 2004). De hecho, existen diferencias notorias en los parámetros de calidad entre mieles de la misma naturaleza provenientes de áreas geográficas distintas.

Dado que existe información limitada con respecto a la composición y las propiedades fisicoquímicas de la miel proveniente de abejas sin aguijón, ésta no se encuentra regulada por las autoridades correspondientes para el control de alimentos y, en consecuencia, se dificulta la detección de adulteraciones en los productos al alcance del consumidor. Por esta razón, es necesaria la creación de estándares armonizados a nivel internacional que sean aplicables para este producto.

Existen numerosos estudios que pretenden homogeneizar los límites de los parámetros medidos en mieles de diferentes géneros de abejas meliponas, sin lograr aún el objetivo principal. De acuerdo con todos los resultados disponibles hasta el año 2017, se han propuesto los estándares de calidad aplicables a mieles de diferentes países, como Malasia, Guatemala, México y Venezuela; dichos

resultados permitieron establecer que los estándares propuestos por la IHC no son adecuados para determinar la calidad de la miel de las abejas meliponas (Cuadro 8).

Dado que la determinación de los parámetros de calidad también podría ser de gran utilidad en los estudios relacionados con el origen floral y geográfico de las mieles (melisopalinología), es de suma importancia el establecimiento de una regulación eficiente.

Cuadro 8. Estándares de calidad para la miel de abeja melipona vs miel producida por *A. mellifera* (Nordin *et al.*, 2018).

Parámetro	Estándares IHC (<i>A. mellifera</i>)	Estándares para Guatemala, México y Venezuela* (melipona)	Estándares de Malasia (melipona)
% Humedad (g/100 g)	Máx. 20	Máx. 30	Máx. 35
% Fructosa + Glucosa (g/100 g)	Mín. 60	Mín. 50	Máx. 85
Sucrosa (g/100 g)	Máx. 5	Máx. 6	Máx. 7.5
Maltosa (g/100 g)	No aplica	No aplica	Máx. 9.5
Acidez libre (mEq/100g)	Máx. 50	Máx. 85	No aplica
Contenido de cenizas (g/100 g)	Máx. 0.5	Máx. 0.5	Máx. 1.0
HMF (mg/kg)	Máx. 40	Máx.40	Máx. 30
Diastasa (actividad)	Mín. 8	Mín. 3	No aplica
pH	No aplica	No aplica	2.5 – 3.8
Presencia de compuestos fenólicos de plantas	No aplica	No aplica	Presente

* Vit, *et al.*, 2004.

1.6. Métodos quimiométricos

La química analítica tiene una estrecha relación con la estadística, debido a que esta es una de sus principales herramientas auxiliares en la identificación y cuantificación de los analitos. Esta relación ha dado lugar al desarrollo de la quimiometría, que se define como la disciplina que describe los enfoques estadísticos y matemáticos utilizados para optimizar el diseño de experimentos y extraer información útil de conjuntos de datos grandes y complejos (Varmuza & Filzmoser, 2009). Actualmente, esta disciplina ha ganado importancia debido a la

gran cantidad de información que es posible obtener mediante los distintos equipos instrumentales. De este modo, la quimiometría ha permitido encaminar la química analítica hacia diferentes áreas de investigación basadas en tres aspectos fundamentales:

1) *Diseño de experimentos*. Consiste en encontrar condiciones para realizar un análisis químico de forma óptima, con el fin de obtener la mejor respuesta posible y, en consecuencia, un aumento de la sensibilidad y disminución del límite de detección. Idealmente, las condiciones de trabajo óptimas deberían obtenerse de manera confiable y con el mínimo esfuerzo.

2) *Análisis descriptivo*. Este aspecto consiste en la elaboración de modelos matemáticos con base en las propiedades de un sistema químico, con la finalidad de comprender posibles relaciones entre ellas que no sean fácilmente perceptibles. El resultado de estos modelos es una capacidad de discriminar diferentes muestras y asignarlas por grupos, lo cual representa una solución a los denominados “problemas de clasificación”.

3) *Estudios predictivos*. Este aspecto involucra la obtención de modelos matemáticos para las propiedades de un sistema que permitan predecir el comportamiento de una muestra cualquiera en situaciones nuevas, sin necesidad de medir directamente los valores de dichas propiedades.

Es importante destacar que las aplicaciones de los métodos quimiométricos son diversas debido a la variedad de métodos instrumentales con los cuales se pueden obtener datos relacionados con las propiedades de los sistemas químicos. Algunos problemas que pueden manejarse con éxito mediante estos métodos son:

- Determinación de la concentración de un compuesto de interés en una mezcla compleja (habitualmente a partir de datos de espectroscopía infrarroja).
- Clasificación del origen de las muestras (a partir de datos químicos analíticos o espectroscópicos).
- Predicción de una propiedad o actividad específica de un compuesto químico (a partir de datos relativos a la estructura molecular).
- Reconocimiento de presencia o ausencia de subestructuras de un compuesto orgánico novedoso (a partir de datos espectroscópicos).

De acuerdo con Bona *et al.* (2018), para realizar la selección adecuada de un método quimiométrico que permita extraer satisfactoriamente la información de un conjunto de datos, es necesario conocer primero la dimensionalidad de los datos para clasificarlos en orden cero, primero, segundo u orden superior:

Datos de orden cero. Se obtienen cuando se obtiene un valor escalar único, es decir, un solo resultado experimental para una muestra (por ejemplo, un valor de pH o humedad). Posteriormente, este valor escalar se obtiene para cada muestra en datos de orden cero, que también se denominan “univariados”.

Datos de primer orden. Se obtienen generando un vector para cada muestra (por ejemplo, un espectro) y estos datos se denominan “multivariantes”.

Datos de segundo orden. Se obtiene una matriz de resultados experimentales para cada muestra (por ejemplo, un cromatograma con detección por matriz de diodos).

Datos de orden superior. Se obtiene un tensor de resultados experimentales para cada muestra (por ejemplo, una cromatografía bidimensional acoplada a espectrometría de masas).

Los datos de primer orden son los que se generan con una mayor frecuencia para el desarrollo de experimentos. Los principales métodos quimiométricos empleados para problemas de carácter lineal aplicados al análisis exploratorio, clasificación y calibración son: análisis de componentes principales (PCA), mínimos cuadrados parciales con análisis discriminante (PLS-DA) y regresión de mínimos cuadrados parciales (PLSR), respectivamente. Los métodos quimiométricos que se aplican para problemas no lineales son los mapas autoorganizados (SOM), la clasificación de vectores de soporte (SVC) y la regresión de vectores de soporte (SVR).

1.6.1. Estado actual de la quimiometría aplicada en el campo de las mieles

Es de suma importancia recordar que tanto los compuestos químicos como las reacciones, muestras y los procesos tecnológicos son de naturaleza multivariante, por lo tanto, para una buena caracterización, se requiere considerar un gran número de variables. El análisis de datos multivariados considera muchas variables; con este análisis frecuentemente se obtiene una mayor calidad en la evaluación de datos (Varmuza & Filzmoser, 2009). Actualmente, el uso de técnicas que involucran este tipo de análisis de datos ha destacado debido al éxito empírico que presentan dichos métodos en la discriminación y autenticación de alimentos y otros productos, tales como el arroz, bebidas alcohólicas, dulces, café, jugos, frutas y drogas ilícitas, entre otros. Así, para solucionar los problemas en las mieles como la determinación de su origen botánico, la verificación de su autenticidad y la identificación de adulteraciones del producto, se ha planteado el

uso de análisis de datos multivariados en conjunto con técnicas de extracción de datos y algoritmos de aprendizaje automático.

Diversos estudios han demostrado que los datos más utilizados para determinar el origen de la miel son aquellos obtenidos a partir de métodos de espectroscópicos, como Raman, espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (TF-IR), espectroscopía de infrarrojo cercano (IR) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN). Del mismo modo, los parámetros fisicoquímicos son variables descriptivas muy populares, especialmente la humedad, la actividad de agua, el pH, el color y la conductividad eléctrica. Entre las técnicas más utilizadas para la clasificación y exploración de datos se encuentran: el análisis de componentes principales, el análisis discriminante y el análisis de conglomerados; también, se han aplicado con éxito las combinaciones de técnicas para determinar los orígenes de la miel, como es el caso de la PCA-DA.

Un enfoque común de los métodos quimiométricos es utilizar cada técnica de análisis como complemento de otra, debido a que cada técnica tiene sus propias fortalezas y debilidades para cumplir el objetivo de descubrir y clasificar patrones en los datos. Gracias a los grandes avances tecnológicos para la recopilación, almacenamiento y procesamiento de datos, las bases de datos de alimentos (incluyendo a la miel) se han enriquecido de manera gradual incorporando variables más complejas, por lo que algunos recursos como los algoritmos de aprendizaje automático han comenzado a ganar popularidad para su utilización en conjunto con las técnicas tradicionales de análisis de datos multivariados (Maione *et al.*, 2019).

2. HIPÓTESIS

El análisis de diferentes mieles mexicanas producidas por abejas meliponas mediante técnicas quimiométricas, basadas en la determinación de sus propiedades fisicoquímicas, permitirá clasificar las mieles de acuerdo con su origen geográfico y botánico.

3. JUSTIFICACIÓN

Los países europeos son los principales consumidores de miel; para su comercialización, las mieles deben cumplir con la normatividad establecida por los distintos organismos internacionales. No obstante, la buena calidad en sabor y aroma de las mieles mexicanas, su valor agregado es bajo debido a que los productores mexicanos comercializan su producto a granel sin establecer la denominación de origen geográfico y botánico. Este requisito se cumpliría si se lograra establecer una certificación del origen a través de métodos de tipificación como el análisis palinológico, análisis sensorial, análisis fisicoquímico y aplicación de métodos instrumentales modernos (IR, RMN, etc.) en conjunto con la quimiometría para la interpretación de los datos obtenidos.

Desde el punto de vista industrial, el análisis de la miel involucra la correlación de sus constituyentes químicos con sus propiedades fisicoquímicas, mismos que tienen influencia en su almacenamiento, textura, sabor y calidad nutritiva. Los criterios de calidad establecidos por la IHC incluyen parámetros como el contenido de humedad, conductividad eléctrica, contenido de azúcares reductores, contenido de sacarosa, cantidad de minerales, acidez y contenido de 5-hidroxi-metil-furfural (HMF), además de límites enzimáticos. La determinación de estos parámetros es especialmente útil para establecer el cumplimiento de las especificaciones para tener la calidad deseada. Cabe mencionar que en México existen diferentes especies de abejas sin aguijón que se crían de manera tradicional en diversas comunidades indígenas y producen mieles con diferentes usos medicinales. Un ejemplo de estas abejas son las pertenecientes al género *Scaptotrigona*, cuya miel es apreciada por sus propiedades terapéuticas que, sin embargo, no han sido exploradas a profundidad.

Con base en lo antes expuesto, resulta evidente que en México se han realizado pocos estudios conducentes a clasificar y determinar las propiedades de las mieles que se producen, especialmente de aquellas provenientes de abejas sin aguijón.

4. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo es establecer un método que permita correlacionar las propiedades físicas y químicas con el origen botánico mediante la generación de un modelo estadístico (quimiometría).

Para el cumplimiento de este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

1. Determinar el contenido de azúcares reductores directos mediante el método volumétrico descrito por Lane y Eynon.
2. Estimar el contenido de humedad mediante la determinación del índice de refracción.
3. Valorar la acidez total de las mieles mediante un análisis volumétrico en pequeña escala.
4. Determinar la coloración de la miel empleando para ello la escala Pfund.
5. Generar un modelo estadístico que describa y/o correlacione la variación entre los parámetros de calidad y el origen de las mieles.
6. Demostrar la adecuabilidad del modelo estadístico estableciendo una relación orden-categoría entre los parámetros de calidad predichos por el modelo y los valores experimentales obtenidos con muestras adicionales de miel.
7. Desarrollar y validar un método analítico para cuantificar al 5-hidroximetil-furfural (HMF) en las diversas muestras de miel.

5. PARTE EXPERIMENTAL

Se realizó la determinación de las propiedades fisicoquímicas de 54 muestras de miel de abejas melíponas y 4 muestras de miel de abejas melíferas, provenientes de diferentes regiones de los estados de Veracruz, Puebla, Oaxaca y Michoacán. Para ello, se aplicaron los métodos de análisis descritos por la Norma Mexicana NMX-F-036-981 y la Directiva 2014/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, así como los descritos en las guías de la IHC.

Previo al análisis se revisó la homogeneidad de cada muestra; aquellas que presentaron gránulos se calentaron en un baño maría a una temperatura de 50 °C durante aproximadamente 30 min, con la finalidad de obtener muestras cristalinas y homogéneas. Este procedimiento se omitió para la determinación de HMF.

5.1. Determinación del contenido de humedad

Esta determinación se realizó empleando un refractómetro de Abbe ATAGO® NAR-1T LIQUID acoplado a un baño de circulación Thermo Scientific® NESLAB RTE-7, ajustado a una temperatura de 20 °C. El refractómetro se calibró empleando agua destilada como blanco (su índice de refracción a 20 °C tiene un valor de 1.3330, o bien, 0.0 °Brix).

En primer lugar, se aseguró la limpieza y sequedad del prisma antes de colocar la muestra. Previa homogeneización de la muestra, se colocó una gota sobre la superficie del prisma para formar una película delgada. Antes de tomar la lectura se verificó la distribución uniforme de la muestra. El índice de refracción y los grados Brix se registraron mediante el ajuste de las escalas que contiene el refractómetro. La determinación para cada muestra se realizó por quintuplicado, limpiando minuciosamente el prisma entre cada lectura. Para la expresión de los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de humedad de acuerdo con la ecuación de Wedmore. El resultado final se expresó con una cifra decimal.

5.2. Determinación colorimétrica

Para esta determinación se empleó un colorímetro para mieles marca HANNA® HI96785 y celdas de plástico de 1 cm × 4.5 cm × 1 cm. El colorímetro se calibró empleando glicerol como blanco de ajuste.

La muestra cristalina previamente homogeneizada se colocó cuidadosamente dentro de la celda; cada celda se llenó hasta tres cuartas partes de su capacidad evitando la formación de burbujas en las paredes de la misma. Posteriormente, se introdujo la celda en el equipo y se leyó el resultado obtenido en mm; esta medición se realizó una sola vez para cada muestra.

Para la expresión de los resultados, se comparó el valor de mm obtenido con la escala Pfund disponible en diversas fuentes bibliográficas. El resultado final se expresó describiendo el color correspondiente.

5.3. Determinación de la acidez libre

Esta determinación se realizó mediante un análisis volumétrico. Para este propósito se prepararon dos soluciones volumétricas (SV) de acuerdo con el procedimiento descrito en la edición vigente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

SV DE ÁCIDO CLORHÍDRICO 0.1 N

En un matraz volumétrico de 1000 mL, se depositaron 200 mL de agua y se agregaron lentamente 8.5 mL de ácido clorhídrico. El matraz se enfrió a temperatura ambiente y se llevó a volumen con agua. La solución se valoró de acuerdo con el siguiente procedimiento: 100 mg de carbonato de sodio anhidro (previamente seco a 207 °C durante 1 h) se disolvieron en 20 mL de agua hasta disolución completa. Enseguida, se agregó 0.1 mL de SI de anaranjado de metilo y se tituló con la solución de ácido clorhídrico hasta obtener un vire a amarillo rojizo.

Una vez observado el cambio en la coloración de la solución, ésta se calentó a ebullición durante 2 min. Enseguida se enfrió. La titulación se suspendió cuando la coloración amarillo rojizo no desaparecía después del calentamiento. Con los resultados obtenidos, se calculó la normalidad considerando que cada mililitro de

SV de ácido clorhídrico 0.1 N o 0.1 M es equivalente a 5.3 mg de Na_2CO_3 anhidro. Para esta determinación se realizaron tres réplicas simultáneas.

SV DE HIDRÓXIDO DE SODIO 0.1 N

En un matraz volumétrico de 1000 mL se disolvieron 4.2 g de NaOH en agua libre de dióxido de carbono (hervida). Esta solución fue valorada, antes de su uso, titulando 20 mL de la solución SV de HCl 0.1 N y utilizando fenolftaleína como indicador. Con los datos generados se determinó la normalidad de la solución de NaOH. Esta solución se empleó como titulante.

Una vez preparada la solución titulante se determinó la acidez en las muestras mediante dos metodologías: una convencional y otra en pequeña escala.

5.3.1. Método convencional

Esta metodología se aplicó para mieles con cantidades de muestra mayores a 15 g.

5 g de muestra disueltos en 75 mL de agua destilada libre de dióxido de carbono (recién hervida y fría) se valoraron con SV de NaOH 0.1 N utilizando 3 gotas de fenolftaleína como indicador. El punto final de la titulación se observó hasta un vire levemente rosáceo del indicador. El análisis se realizó por triplicado y los resultados se expresan en unidades de mEq/kg; en todos los casos se calculó el CV para cada determinación.

5.3.2. Método en pequeña escala

Esta metodología se aplicó para mieles con cantidades de muestra menores a 15 g.

Para este método se utilizó 1 g de miel. La muestra se analizó de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado **5.3.1.**

5.4. Determinación del contenido de azúcares reductores

Esta determinación se realizó mediante análisis volumétrico.

Para este procedimiento se prepararon los reactivos de Fehling A y B, una solución patrón de azúcar invertido y una solución de crema de alúmina.

- *Reactivo de Fehling A*: en un matraz volumétrico de 1000 mL se disolvieron 69.28 g de sulfato de cobre pentahidratado con agua destilada. La solución debe almacenarse durante 24 h antes de la titulación.
- *Reactivo de Fehling B*: en un vaso de precipitado de 1000 mL se disolvieron 346 g de tartrato de sodio y potasio y 100 g de NaOH con agua destilada; una vez fría la solución y se trasvasó cuantitativamente a un matraz volumétrico de 1000 mL y se llevó a volumen con agua destilada.
- *Solución patrón de azúcar invertido (10 g/L)*: para preparar esta solución se 9.5 g de sacarosa pura (pesada con exactitud) y 5.0 mL de HCl puro (36.5% p/p, aproximadamente) y se disolvieron con aproximadamente 100 mL de agua destilada. La solución resultante se transfirió a un matraz volumétrico de 1000 mL y se conservó en reposo a temperatura ambiente durante 3 días. Una vez terminado este periodo de reposo, se llevó a volumen con agua destilada.
- *Crema de alúmina*: para este reactivo se preparó una solución saturada de sulfato de aluminio y potasio dodecahidratado en agua y se añadió hidróxido de amonio, poco a poco, con agitación constante, hasta obtener una solución alcalina (el pH aproximado se verificó empleando tiras reactivas). Una vez que el precipitado generado sedimentó, se realizaron lavados por decantación con agua, hasta que el agua procedente de los lavados mostró solo ligeros indicios de sulfato al ser tratada con una solución de cloruro de bario al 12%. Se retiró el agua sobrante y la crema resultante se conservó en un contenedor hasta el día de uso.

Una vez preparada la solución patrón de azúcar invertido, se tomó una alícuota de aproximadamente 200 mL para su neutralización. Para ello, se agregaron 3 gotas de fenolftaleína como indicador y poco a poco se adicionó NaOH 1 N, hasta obtenerse un vire del indicador de incoloro a levemente rosáceo. La solución neutra se colocó en una bureta de 50 mL para utilizarse como titulante.

Posteriormente, se realizó la normalización de los reactivos de Fehling y la solución patrón de azúcar invertido. Para este propósito, en un matraz Erlenmeyer de 250 mL provisto con un agitador magnético y cuerpos de ebullición se adicionaron 5 mL de reactivo de Fehling A, 5 mL de reactivo de Fehling B y 50 mL

de agua destilada a ebullición. El matraz se colocó sobre una parrilla caliente, con agitación constante y se adicionaron 0.5 mL de la solución titulante. La solución resultante se calentó a ebullición. Se adicionaron 5 gotas de azul de metileno al 0.2% al inicio de la ebullición y la titulación se continuó, procurando que la reacción se llevara a cabo en un tiempo no mayor a 3 min. El punto final de la valoración se observó cuando el indicador cambió de azul intenso a incoloro, con la aparición de un precipitado rojizo. Este análisis se realizó por triplicado y en cada muestra se determinó el CV.

Con los resultados obtenidos se estimó el Factor Fehling, dato requerido en el algoritmo de cálculo para las determinaciones de contenido de azúcares reductores en muestras de miel.

Debido a que la cantidad de muestra disponible para una gran parte de las muestras analizadas era pequeña, las determinaciones de azúcares reductores se realizaron mediante dos metodologías en pequeña escala. Dicho escalamiento se planteó de tal manera que ambas metodologías presentaran una equivalencia con la metodología convencional descrita en la Norma Mexicana NMX-F-036-981.

5.4.1. Método en pequeña escala para muestras con posible sedimentación

Este procedimiento se aplicó para las mieles cuyo aspecto no era totalmente cristalino. En un matraz volumétrico de 20 mL se pesaron 5 g de muestra y se disolvieron con un poco de agua. Antes de completar el volumen con agua destilada la solución se trató con 5 mL de crema de alúmina. La solución resultante se filtró por gravedad a través de un disco de papel filtro. De la solución filtrada se tomó una alícuota de 5 mL y se diluyó con agua destilada hasta obtener 250 mL. La solución final se colocó en una bureta de 50 mL para ser utilizada como titulante.

Las valoraciones se realizaron de acuerdo con el siguiente procedimiento: en un matraz Erlenmeyer de 250 mL provisto con un agitador magnético y cuerpos de ebullición se adicionaron 5 mL de reactivo de Fehling A, 5 mL de reactivo de Fehling B y 50 mL de agua destilada a ebullición. El matraz se colocó sobre una parrilla caliente, con agitación constante y se adicionaron 0.5 mL de la solución contenida en la bureta. De nueva cuenta, la solución resultante se calentó a ebullición y se adicionaron 5 gotas de azul de metileno al 0.2% al inicio de la ebullición; la titulación se continuó, procurando que la reacción se llevara a cabo en un tiempo no mayor a 3 min. El punto final de la valoración se observó cuando

el indicador cambió de azul intenso a incoloro, con la aparición de un precipitado rojizo. Este análisis se realizó por triplicado.

Con los resultados obtenidos, se calculó el porcentaje de azúcares reductores directos (%ARD) y se estimó el CV para cada muestra analizada.

5.4.2. Método en pequeña escala para muestras sin sedimentación

Este procedimiento se aplicó para las mieles cuyo aspecto era totalmente cristalino. En un matraz volumétrico de 100 mL se pesó 1 g de muestra, que se disolvió con un poco de agua y enseguida se llevó a volumen con agua destilada. La solución resultante se filtró por gravedad, a través de un disco de papel filtro. Esta solución se colocó en una bureta de 50 mL para ser utilizada como titulante.

El procedimiento de valoración y la expresión de los resultados finales se realizaron bajo las condiciones descritas en el apartado **5.4.1**.

5.5. Determinación de Hidroximetilfurfural

La determinación del contenido de HMF se realizó por cromatografía de líquidos de alta eficiencia, en armonía con los métodos publicados por la IHC.

Preparación de muestra

En un matraz volumétrico de 5 mL se pesaron 200 mg de muestra y se disolvieron con un poco de agua Milli-Q[®] previamente filtrada; enseguida, se llevaron a volumen con agua. La solución se filtró a través de un acrodisco de 0.45 μm . La solución filtrada se colocó en un vial de vidrio para su posterior inyección.

Preparación de solución stock de estándar (400 $\mu\text{g/mL}$) y soluciones estándar diluidas (40 $\mu\text{g/mL}$ y 20 $\mu\text{g/mL}$).

10 mg de un estándar de HMF (Sigma-Aldrich), se disolvieron en 25 mL de agua Milli-Q[®] previamente filtrada. A partir de esta solución stock (400 $\mu\text{g/mL}$) se prepararon dos diluciones.

En un matraz volumétrico de 5 mL se transfirió una alícuota de 0.5 mL de la solución stock y se llevó a volumen con agua Milli-Q[®] previamente filtrada, para obtener una concentración de 40 µg/mL. 2.5 mL de esta solución se transfirieron a un matraz volumétrico de 5 mL y se llevó a volumen con agua Milli-Q[®] previamente filtrada; la concentración nominal de esta solución es de 20 µg/mL. Ambas soluciones se filtraron a través de un acrodisco de 0.45 µm y se colocaron en viales de vidrio para su posterior inyección (Figura 8).

Los perfiles cromatográficos se obtuvieron empleando un sistema de HPLC en fase reversa marca SHIMADZU (Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japón), equipado con un detector UV-visible dual SPD-10A; inyector automático SIL-10AD (VP); bomba LC-10AT (VP); horno para columna CTO-10A; desgasificador DGU 14A y un sistema de control SCL-10A (VP), acoplado a un equipo de cómputo. El volumen de inyección para cada muestra fue de 30 µL y la elución se realizó sobre una columna Purospher[®] STAR RP-18 endcapped Hibar[®] RT (5 µm; 150 × 4.6 mm; No. de columna 829989, Merck KGaA); se empleó una fase móvil binaria: ácido fórmico acuoso 1% (A) y MeOH (B), en una proporción 90:10 (A:B), con un tiempo de corrida de 60 min, temperatura de columna de 35 °C y flujo de 0.3 mL/min; la detección de compuestos se configuró para las longitudes de onda de 254 y 284 nm. El control del equipo y procesamiento de los datos se realizó con el programa LabSolution/LCSolutions (SHIMADZU).

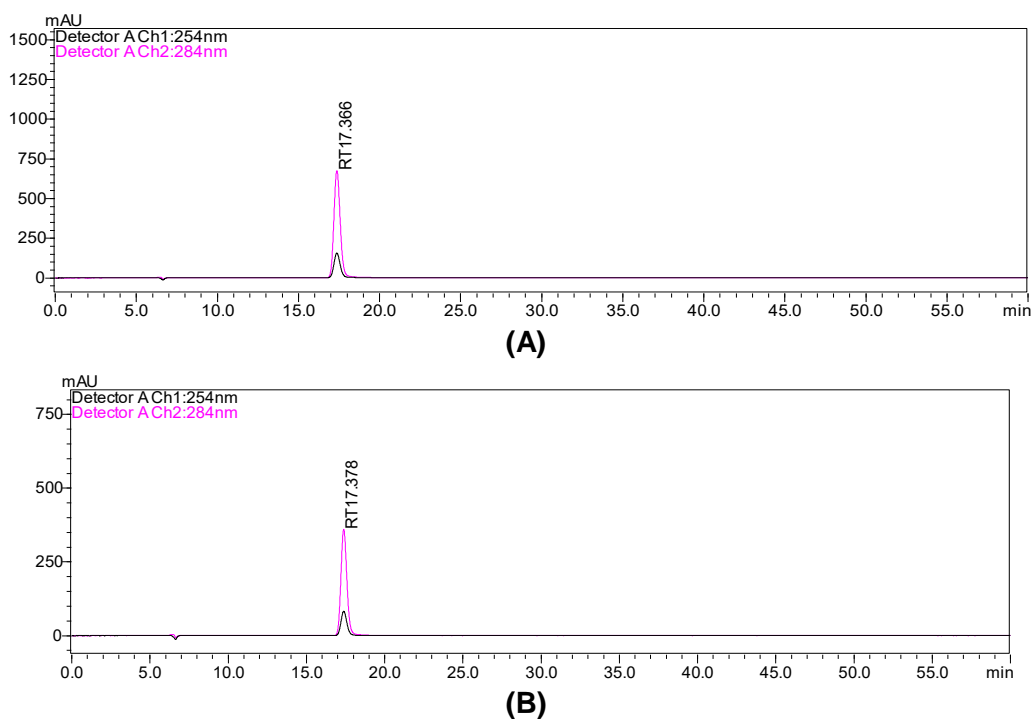


Figura 8. Cromatogramas generados, estándares de HMF: **(A)** 40 µg/mL; **(B)** 20 µg/mL.

5.6. Análisis estadístico

Con los resultados obtenidos se realizó un análisis multivariado y un análisis de componentes principales (PCA). Para ello, se utilizó el software estadístico Statgraphics Centurion 18, versión 18.1.12.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluaron cuatro parámetros de calidad de 58 muestras de miel de orígenes diferentes de acuerdo con las metodologías descritas en el apartado 5.

6.1. Determinación de humedad

El índice de refracción de una sustancia es la relación que existe entre la velocidad de la luz en el aire y en la sustancia que se analiza. Se define también como la relación entre el seno del ángulo de incidencia de un haz de luz en el aire, y el seno del ángulo de dicho haz refractado en la sustancia en análisis. Antes de realizar las determinaciones se verificó el refractómetro de Abbe, con agua, a 20 °C. Las lecturas de cada muestra de (valores de índice de refracción y °Brix) se resumen en el Cuadro 9.

Los valores experimentales de índice de refracción para las mieles no se compararon de manera directa con las tablas existentes en la literatura debido a que no presentan una coincidencia exacta con los valores teóricos. De esta forma, para la expresión de los resultados en porcentaje de humedad, se utilizó la ecuación descrita por Wedmore (Sesta y Lusco, 2008):

$$\frac{-0.2681 - \log(nD - 1)}{0.002243}$$

Los resultados experimentales obtenidos permiten estimar que el rango en porcentaje de humedad de las muestras oscila entre un 15.8% y un 32.1%. La distribución de los valores, en 10 clases, permite establecer que 47 muestras contienen entre un 24.0% y un 28.0% de humedad; 6 muestras se encuentran por debajo de dicho intervalo y 5 contienen más del 28.0% de humedad (Cuadro 10, Figura 9). En un estudio realizado por Nordin *et al.* (2018), con mieles provenientes de abejas meliponas se determinó que el contenido de humedad para este tipo de miel debe ser inferior al 35%. Este hallazgo se encuentra en armonía con la mayoría de los valores experimentales obtenidos para las muestras analizadas durante este trabajo. Por otra parte, la especificación establecida por la IHC para las mieles provenientes de abejas melíferas corresponde con un límite de 20% de humedad. Así, las muestras S40-S43, cuyo origen es melífero, cumplen de manera satisfactoria con el límite establecido. En

consecuencia, el porcentaje de humedad entre estos dos tipos de miel es significativamente diferente.

Cuadro 9. Determinación del porcentaje de humedad en mieles mexicanas.

Código de muestra*	nD	°Brix	%Humedad	Código de muestra	nD	°Brix	%Humedad
S29-10	1.470	72.0	26.7	H13	1.474	73.5	25.0
S30-8	1.475	73.9	24.7	H14	1.459	67.5	31.2
S27-6	1.472	72.5	25.8	H15	1.473	73.0	25.4
S31-5	1.471	72.3	26.2	H16	1.472	72.5	25.8
S33-18	1.470	72.0	26.7	H17	1.474	73.3	25.2
S34-15	1.472	72.5	25.8	H18	1.469	71.5	27.1
S20-7	1.475	74.0	24.6	H19	1.471	72.3	26.3
S25-12	1.460	67.3	30.8	H20	1.473	73.0	25.4
S23-11	1.474	73.5	25.0	H21	1.472	72.5	26.0
S32-19	1.469	71.5	27.1	H22	1.467	70.5	28.1
S21-13	1.472	72.5	25.9	H23	1.475	74.0	24.6
S17-21	1.471	72.3	26.3	H24	1.468	71.0	27.5
S28-9	1.472	72.5	25.8	H25	1.475	73.8	24.8
S26-4	1.473	73.0	25.4	H26	1.475	74.0	24.6
S19-20	1.472	72.5	25.9	H27	1.475	74.0	24.6
S24-14	1.472	72.5	25.9	H28	1.471	72.3	26.3
S18-3	1.477	74.5	23.9	H29	1.473	73.0	25.4
S22-1	1.471	72.3	26.3	H30	1.476	74.0	24.4
H1	1.469	71.5	27.1	H31	1.473	73.0	25.4
H2	1.472	72.8	25.8	H32	1.478	75.0	23.4
H3	1.473	73.0	25.4	H33	1.473	73.0	25.4
H4	1.474	73.4	25.1	MC1	1.473	73.0	25.4
H5	1.472	72.5	25.8	MC2	1.472	72.9	25.7
H6	1.476	74.3	24.2	MC3	1.466	70.3	28.3
H7	1.476	74.0	24.4	S40	1.495	81.5	16.6
H8	1.472	72.5	25.8	S41	1.497	82.4	15.8
H9	1.473	73.0	25.4	S42	1.491	79.8	18.2
H10	1.472	72.5	26.0	S43	1.489	79.5	19.0
H11	1.457	66.5	32.1	* Proporcionado por los productores, correspondiente al origen de las muestras.			
H12	1.472	72.5	26.0				

Cabe destacar que la importancia de determinar el contenido de humedad en las mieles, como parámetro de calidad, reside esencialmente en el hecho de que la humedad es un factor determinante en el proceso de almacenamiento. Entre más elevado sea el contenido de humedad mayor es la probabilidad de deterioro del producto y, en consecuencia, se observa una fermentación causada por levaduras. Por lo tanto, la IHC propone que los valores de humedad bajos (por ejemplo, de aproximadamente 19.0%) aseguran una mejor vida de anaquel para las mieles comerciales.

Por otro lado, el rango en los valores de °Brix fue de 66.5 a 82.4. Al distribuir el total de los valores, en 10 clases, se observó que 48 muestras presentan valores entre 71.0 y 75.0; 6 muestras se encuentran por debajo de este intervalo y las 4 últimas rebasan este intervalo (Cuadro 11, Figura 10). Los °Brix se emplean comúnmente como una medida de la cantidad de sólidos solubles en una muestra. En el caso de las mieles los sólidos solubles son principalmente los carbohidratos, seguidos por las proteínas, los lípidos y los minerales y los ácidos orgánicos, en cantidades menores. Así, la lectura de °Brix proporcionaría una medida aproximada del porcentaje de azúcares presentes en una muestra de miel, considerando, para ello, que 1 °Brix = 1 g de sacarosa por cada 100 g de solución. Sin embargo, esta medida no puede considerarse definitiva debido a que la sacarosa no es el único carbohidrato presente en la miel. Por este motivo, en el presente trabajo se realizó un análisis específico (determinación de azúcares reductores) para estimar este parámetro de calidad.

Cuadro 10. Frecuencia de valores para %Humedad en muestras de mieles mexicanas.

Clase	Intervalo	Frecuencia
1	14.0 – 16.0	1
2	16.0 – 18.0	1
3	18.0 – 20.0	2
4	20.0 – 22.0	0
5	22.0 – 24.0	2
6	24.0 – 26.0	36
7	26.0 – 28.0	11
8	28.0 – 30.0	2
9	30.0 – 32.0	2
10	32.0 – 34.0	1

Cuadro 11. Frecuencia de valores para °Brix en muestras de mieles mexicanas.

Clase	Intervalo	Frecuencia
1	65.0 – 67.0	1
2	67.0 – 69.0	2
3	69.0 – 71.0	3
4	71.0 – 73.0	33
5	73.0 – 75.0	15
6	75.0 – 77.0	0
7	77.0 – 79.0	0
8	79.0 – 81.0	2
9	81.0 – 83.0	2
10	83.0 – 85.0	0

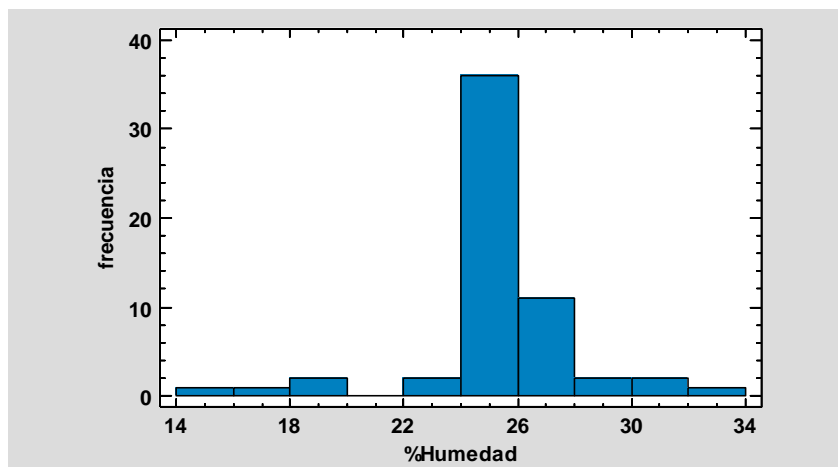


Figura 9. Histograma de %Humedad en muestras de mieles mexicanas.

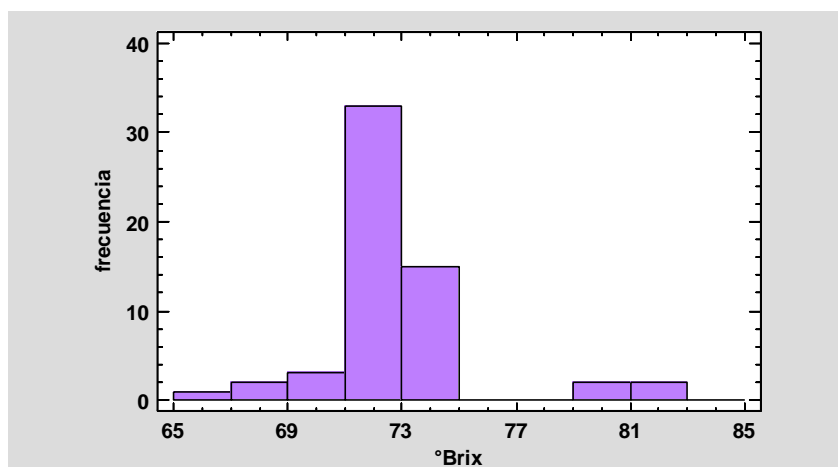


Figura 10. Histograma de °Brix en muestras de mieles mexicanas.

6.2. Determinación colorimétrica

El color es una característica de la miel que depende de factores como el origen botánico, la composición del néctar, el proceso de obtención, la temperatura y tiempo de almacenamiento. Este parámetro se considera de suma importancia para la clasificación y el establecimiento del valor comercial de la miel. De acuerdo con estudios realizados por Delmoro *et al.* (2010), se ha encontrado una correlación entre el color y las propiedades organolépticas de la miel, por ejemplo, entre más oscura es la miel, más fuerte se percibe el sabor. En consecuencia, hay una mayor comercialización de mieles de colores más claros que de mieles con colores más oscuros.

El color de las 58 muestras de miel determinó en mm de acuerdo con la metodología descrita en el apartado 5.2. Los resultados obtenidos se compararon con la escala Pfund para expresar los colores (Cuadro 12) de cada una de las muestras de miel.

Cuadro 12. Determinación colorimétrica de mieles mexicanas.

Código de muestra	mm Pfund	Color	Código de muestra	mm Pfund	Color
S29-10	66	Ámbar ligero	H13	90	Ámbar
S30-8	64	Ámbar ligero	H14	85	Ámbar ligero
S27-6	76	Ámbar ligero	H15	74	Ámbar ligero
S31-5	67	Ámbar ligero	H16	61	Ámbar ligero
S33-18	84	Ámbar ligero	H17	66	Ámbar ligero
S34-15	59	Ámbar ligero	H18	79	Ámbar ligero
S20-7	64	Ámbar ligero	H19	98	Ámbar
S25-12	30	Blanco	H20	60	Ámbar ligero
S23-11	70	Ámbar ligero	H21	71	Ámbar ligero
S32-19	92	Ámbar	H22	64	Ámbar ligero
S21-13	70	Ámbar ligero	H23	58	Ámbar ligero
S17-21	96	Ámbar	H24	63	Ámbar ligero
S28-9	87	Ámbar	H25	95	Ámbar
S26-4	52	Ámbar ligero	H26	66	Ámbar ligero
S19-20	70	Ámbar ligero	H27	86	Ámbar
S24-14	75	Ámbar ligero	H28	54	Ámbar ligero
S18-3	62	Ámbar ligero	H29	91	Ámbar
S22-1	37	Ámbar extra ligero	H30	89	Ámbar
H1	35	Ámbar extra ligero	H31	80	Ámbar ligero
H2	44	Ámbar extra ligero	H32	66	Ámbar ligero
H3	56	Ámbar ligero	H33	25	Blanco
H4	71	Ámbar ligero	MC1	86	Ámbar
H5	93	Ámbar	MC2	89	Ámbar
H6	72	Ámbar ligero	MC3	150	Ámbar oscuro
H7	62	Ámbar ligero	S40	11	Extra blanco
H8	40	Ámbar extra ligero	S41	150	Ámbar oscuro
H9	53	Ámbar ligero	S42	63	Ámbar ligero
H10	57	Ámbar ligero	S43	82	Ámbar ligero
H11	94	Ámbar			
H12	59	Ámbar ligero			

Como se deduce de los resultados obtenidos, existe una variedad de colores entre las muestras analizadas (Cuadro 13, Figura 11). Los colores predominantes fueron el ámbar ligero y el ámbar (36 y 13 muestras, respectivamente). En el Cuadro 13 también, se observa que 7 muestras tienen un color más claro y solo 2 presentan una coloración oscura. Sin embargo, en el caso de la muestra MC3, visualmente no se apreció una tonalidad oscura, a diferencia de la muestra S41 que sí la presentó. Considerando que el equipo empleado para determinar el color es un fotómetro que genera lecturas de transmitancia de luz, el valor en mm para la muestra MC3 es atribuible a la cantidad de sólidos presentes. Al ser menos translúcida la muestra, permitirá un menor paso de la luz y, por lo tanto, el instrumento generará una lectura más alta de mm Pfund y al compararse con la tabla de valores expresada en la literatura, resulta en un color más oscuro de la muestra, aunque dicha coloración no se aprecie visualmente.

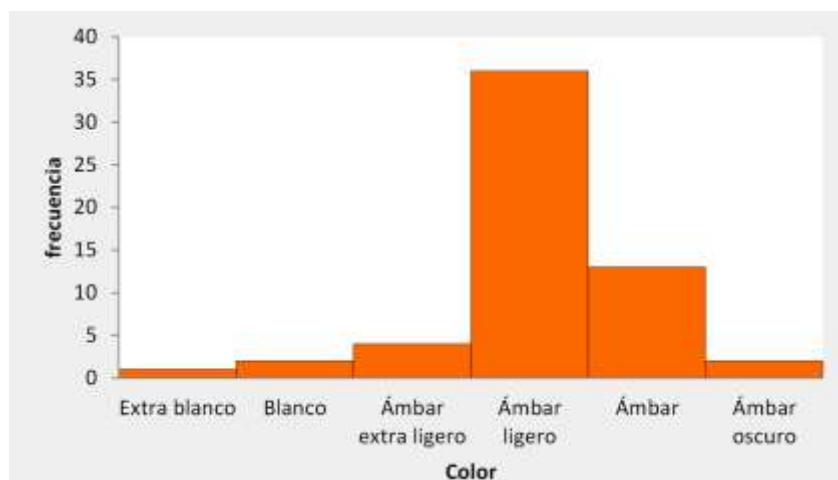


Figura 11. Gráfico de frecuencia de colores en muestras de mieles mexicanas.

Cuadro 13. Frecuencia de colores en muestras de mieles mexicanas.

Color	Frecuencia
Extra blanco	1
Blanco	2
Ámbar extra ligero	4
Ámbar ligero	36
Ámbar	13
Ámbar oscuro	2

6.3. Determinación de la acidez libre

El nivel de acidez en las mieles es importante para determinar su estabilidad ante los microorganismos. Además, se sabe que los ácidos presentes en la miel poseen un efecto destacado en el sabor y el aroma, por lo que se considera un parámetro para medir la frescura de la miel. Los valores superiores a los establecidos en las especificaciones indican una mayor presencia de ácido debida principalmente a la fermentación por desarrollo de microorganismos y/o a un sobrecalentamiento durante el proceso de análisis.

Como se deduce del procedimiento experimental, la prueba requiere del empleo de dos soluciones volumétricas: NaOH 0.1 N y HCl 0.1 N. y ambas deben estandarizarse. Los resultados obtenidos durante la estandarización del NaOH 0.1 N y HCl 0.1 N se resumen en el Cuadro 14 y permiten concluir que las soluciones cumplen con la especificación para soluciones volumétricas, ya que el CV entre las réplicas no es mayor a 0.2%.

El algoritmo de cálculo empleado para estimar la acidez de las muestras fue el siguiente:

$$\frac{\text{gasto} \times N \times 1000}{\text{masa de la muestra}} = \text{acidez libre (mEq/kg)}$$

donde:

N = normalidad exacta de la solución de NaOH

Cuadro 14. Estandarización de las soluciones valoradas.

HCl 0.1 N			
Solución	Masa del Na₂CO₃ (g) MM 106	Volumen de HCl (mL) MM 36.5	Normalidad
A ¹	101.2	18.9	0.10103
	90.6	16.9	0.10116
	110.5	20.6	0.10120
		Promedio	0.1011
		CV	0.1
B ²	110.8	20.6	0.10148
	91.4	17.0	0.10144
	100.4	18.6	0.10184
		Promedio	0.1016
		CV	0.2
C ³	110.6	20.75	0.10057
	100.5	18.90	0.10033
	90.5	17.00	0.10044
		Promedio	0.1004
		CV	0.1

NaOH 0.1 N			
Solución	Volumen de HCl 0.1 N (mL)	Volumen de NaOH (mL) MM 40	Normalidad
A ¹	10.0	20.1	0.10161
	10.0	20.1	0.10161
	10.0	20.1	0.10161
		Promedio	0.1016
		CV	0.0
B ²	10.0	19.9	0.10109
	10.0	19.9	0.10109
	10.0	19.9	0.10109
		Promedio	0.1011
		CV	0.0
C ³	10.0	20.1	0.10090
	10.0	20.1	0.10090
	10.0	20.1	0.10090
		Promedio	0.1009
		CV	0.0

¹ Solución preparada para el análisis de las muestras S29-10, S30-8, S27-6, S31-5, S33-18, S34-15, S20-7, S25-12, S23-11, S32-19, S21-13, S17-21, S28-9, S26-4, S19-20, S24-14, S18-3, S22-1 y S40-S43.

² Solución preparada para el análisis de las muestras H1-H33.

³ Solución preparada para el análisis de las muestras MC1-MC3.

6.3.1. Optimización del método

Tomando en cuenta la cantidad de muestra disponible el análisis se realizó en dos partes. Para muestras ≥ 15 g (22), el análisis volumétrico se realizó conforme al procedimiento indicado en el apartado **5.3.1**. Debido a que las 36 muestras restantes presentaban una masa < 15 g se decidió realizar una optimización del método indicado por la Norma Mexicana para dicha determinación. Esta optimización consistió en la reducción de la masa de la muestra y el consiguiente uso de una solución de NaOH 0.025 N. Esta solución se preparó por dilución a partir de una solución valorada de concentración 0.1 N.

LINEALIDAD DEL MÉTODO

Para evaluar este parámetro de calidad del método en menor escala se empleó una miel de prueba y se realizó una curva de linealidad con 5 niveles experimentales (cantidades de muestra de 5.0, 4.0, 3.0, 2.0 y 1.0 g). Las determinaciones se realizaron en 3 días consecutivos (2 repeticiones por día) para una mayor aleatorización de los datos. El ajuste de los datos obtenidos (Cuadro 15, Figura 12) se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple. Los parámetros estadísticos calculados se resumen en el Cuadro 16.

Como se deduce del análisis estadístico el valor del coeficiente de correlación sugiere una relación lineal fuerte entre la cantidad de muestra y el volumen de NaOH 0.025 N. El coeficiente de determinación (r^2) permite establecer que el 99.9927% de la variabilidad en la respuesta se encuentra explicada por el modelo propuesto. Finalmente, en el Cuadro 17 se observa que el valor P en el Análisis de varianza es menor que 0.05, por lo tanto, existe una relación estadísticamente significativa entre el gasto de NaOH 0.025 N y la masa de la muestra con un nivel de confianza del 95%. Además, el intervalo calculado para la ordenada al origen incluye el cero, mientras que el intervalo para la pendiente no está incluido.

Cuadro 15. Curva de linealidad para escalamiento del método convencional.

Masa de la muestra (g)	Vol. de NaOH 0.025 N (mL)	Acidez (mEq/kg)	CV
5.0629	7.58	37.5	0.2
5.0131	7.50	37.5	
5.0198	7.52	37.6	
5.0254	7.56	37.7	
5.0666	7.60	37.6	
5.0038	7.50	37.6	
4.0577	6.06	37.4	0.1
4.0687	6.08	37.5	
4.0646	6.08	37.5	
4.0959	6.12	37.5	
4.0701	6.08	37.5	
4.0758	6.10	37.5	
3.0697	4.58	37.4	0.6
3.0502	4.56	37.5	
3.0101	4.54	37.8	
3.0812	4.64	37.8	
3.0660	4.58	37.4	
3.0382	4.60	38.0	
2.0084	3.00	37.4	0.3
2.0664	3.06	37.1	
2.0017	2.98	37.3	
2.0333	3.02	37.2	
2.0225	3.00	37.2	
2.0341	3.02	37.2	
1.0449	1.56	37.4	0.2
1.0854	1.62	37.4	
1.0116	1.52	37.7	
1.0420	1.56	37.5	
1.0432	1.56	37.5	
1.0021	1.50	37.5	
	Promedio	37.5	0.5
	s	0.1782316	

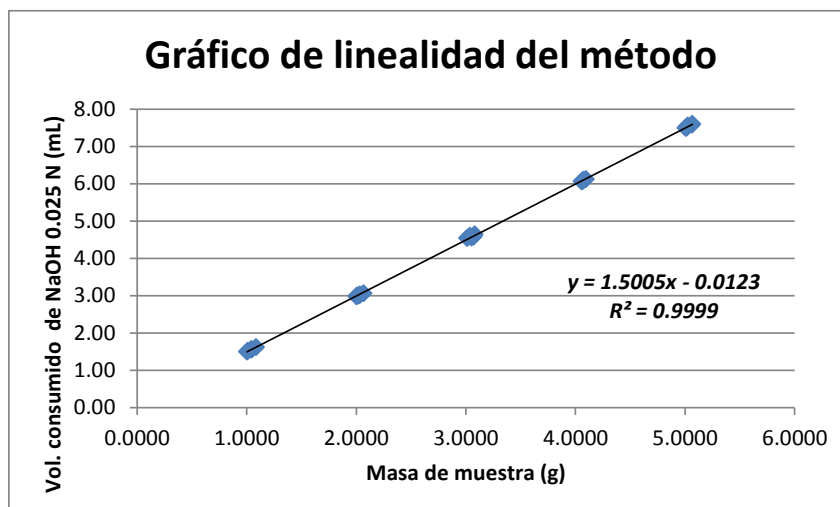


Figura 12. Curva de linealidad para el escalamiento del método convencional.

Cuadro 16. Parámetros estadísticos del análisis de regresión lineal simple.

Parámetro	Valor
Ordenada al origen (β_0)	-0.012291
Pendiente de la recta (β_1)	1.5005
Coefficiente de correlación (r)	0.999963
Coefficiente de determinación (r^2)	0.999927

Cuadro 17. Análisis de varianza de la regresión lineal simple.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F	Valor-P
Regresión	1	136.001526	136.001526	381023.703	1.9996E-59	0.000
Residuos	28	0.00999424	0.00035694			
Total	29	136.01152				

	ET ¹	T ²	P ³	Inf. 95%	Sup. 95%	Inf. 95.0%	Sup. 95.0%
Intercepción	0.00817	-1.50531	0.14344	-0.02902	0.00443	-0.02902	0.00443
Masa de muestra (g)	0.00243	617.27117	0.00000	1.49552	1.50548	1.49552	1.50548

¹ Error típico ² Estadístico t ³ Probabilidad

PRECISIÓN DEL MÉTODO

La precisión de un método analítico expresa la concordancia entre una serie de mediciones independientes. La precisión puede ser evaluada a través de los siguientes niveles: precisión del sistema, precisión del método y precisión intermedia (FEUM, 2014). La precisión en este trabajo se evaluó a través de la repetibilidad y la precisión intermedia. Este parámetro se estimó considerando la dispersión de los 30 datos y se expresó en términos de coeficiente de variación (CV). En el Cuadro 14 se observa que el coeficiente de variación obtenido, en todos los casos, fue menor al 2.0%. Por lo tanto, el sistema es preciso.

Es importante destacar, que un punto crítico para esta optimización del método reside en la preparación de la solución titulante. El NaOH 0.01 N y 0.025 N deben prepararse el día de uso debido a la baja estabilidad que presentan las soluciones diluidas.

Con base en los resultados obtenidos se decidió realizar la determinación de la acidez libre para muestras <15 g con una solución de NaOH 0.025 N y una masa de 1.0 g.

Los resultados generados para todas las muestras analizadas se resumen en el Cuadro 18; cada valor se encuentra expresado con su respectivo intervalo de confianza (IC) al 95% y CV. Así, se observa que todos los resultados obtenidos son confiables debido a que cumplen con la especificación para métodos volumétricos, presentando un CV no mayor a 2.0%.

Los resultados experimentales obtenidos presentan un rango de acidez que comprende desde 10.8 hasta 203.1 mEq/kg. Al distribuir el total de los valores en 12 clases, se observa que la mayor parte de las muestras (37 de ellas) presentan valores entre 68.3 y 119.6 mEq/kg, mientras que 12 de ellas se encuentran por debajo de este intervalo y 9 más lo rebasan (Cuadro 19, Figura 13). De acuerdo con Vit *et al.* (2004), la especificación para la acidez libre de las mieles provenientes de abejas meliponas con un valor máximo de 85 mEq/kg, por lo que solamente 28 de las muestras analizadas durante este trabajo son congruentes con dichos estándares, mientras que las 30 restantes poseen valores de acidez superiores al del estándar propuesto. En contraste con las especificaciones establecidas por la IHC para las mieles provenientes de abejas melíferas, se observa que la mayoría de las muestras analizadas tampoco cumplen con dicho estándar (máximo 50 mEq/kg), con excepción de las etiquetadas con los códigos S40–S43, que corresponden a este origen.

Cuadro 18. Determinación de la acidez libre de mieles mexicanas.

Código de muestra	Método de análisis	Acidez (mEq/kg) ± IC	CV	Código de muestra	Método de análisis	Acidez (mEq/kg) ± IC	CV	
S29-10	A*	81.9 ± 1.1	0.6	H9	B*	118.5 ± 3.7	1.3	
S30-8		71.2 ± 1.5	0.8	H10		118.1 ± 1.5	0.5	
S27-6		79.0 ± 0.6	0.3	H11		203.1 ± 0.5	0.1	
S31-5		82.6 ± 0.8	0.4	H12		121.4 ± 0.04	0.01	
S33-18		66.6 ± 1.3	0.8	H13		83.9 ± 0.2	0.1	
S34-15		58.2 ± 1.3	0.9	H14		172.7 ± 0.3	0.1	
S20-7		51.5 ± 2.2	1.7	H15		98.4 ± 0.8	0.3	
S25-12		144.7 ± 3.2	0.9	H16		79.6 ± 0.8	0.4	
S23-11		47.6 ± 0.6	0.5	H17		76.8 ± 0.6	0.3	
S32-19		70.1 ± 0.5	0.3	H18		117.6 ± 0.4	0.1	
S21-13		90.7 ± 1.1	0.5	H19		108.0 ± 0.7	0.3	
S17-21		64.8 ± 2.1	1.3	H20		76.2 ± 0.5	0.2	
S28-9		89.2 ± 1.1	0.5	H21		140.0 ± 0.9	0.3	
S26-4		78.4 ± 1.1	0.6	H22		175.7 ± 0.6	0.1	
S19-20		89.3 ± 3.6	1.6	H23		63.1 ± 1.1	0.7	
S24-14		83.6 ± 3.7	1.8	H24		159.8 ± 0.8	0.2	
S18-3		69.9 ± 1.0	0.6	H25		75.6 ± 3.3	1.8	
S22-1		100.4 ± 1.7	0.7	H26		81.6 ± 0.3	0.1	
S40			10.8 ± 0.2	0.9		H27	131.5 ± 0.6	0.2
S41			44.9 ± 0.7	0.6		H28	107.0 ± 1.1	0.4
S42		33.2 ± 0.6	0.8	H29	118.2 ± 0.7	0.2		
S43		46.6 ± 0.6	0.5	H30	71.4 ± 0.5	0.3		
H1	B*	127.1 ± 0.7	0.2	H31	92.3 ± 0.5	0.2		
H2		113.7 ± 0.8	0.3	H32	53.5 ± 0.2	0.1		
H3		106.7 ± 1.4	0.5	H33	42.4 ± 0.1	0.1		
H4		114.4 ± 0.6	0.2	MC1	97.5 ± 0.4	0.2		
H5		105.7 ± 0.04	0.01	MC2	89.0 ± 0.6	0.3		
H6		78.1 ± 0.5	0.3	MC3	93.4 ± 1.7	0.7		
H7		88.8 ± 1.0	0.4	*A: método convencional *B: método en pequeña escala				
H8		100.5 ± 0.4	0.2					

Cuadro 19. Frecuencia de valores de acidez libre en mieles mexicanas.

Clase	Intervalo	Frecuencia
1	0.0 – 17.1	1
2	17.1 – 34.2	1
3	34.2 – 51.3	4
4	51.3 – 68.3	6
5	68.3 – 85.4	16
6	85.4 – 102.5	11
7	102.5 – 119.6	10
8	119.6 – 136.7	3
9	136.7 – 153.8	2
10	153.8 – 170.8	1
11	170.8 – 187.9	2
12	187.9 – 205.0	1

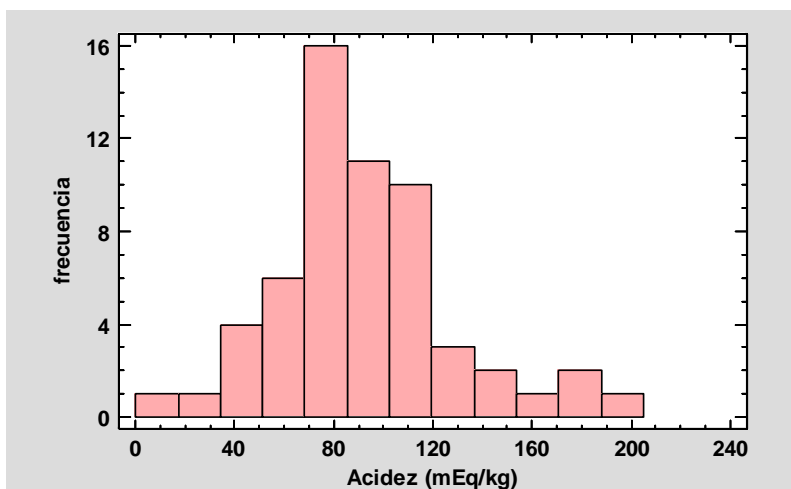


Figura 13. Histograma de acidez libre en muestras de mieles mexicanas.

6.4. Determinación del contenido de azúcares reductores

Es bien sabido que uno de los constituyentes mayoritarios de la miel son los azúcares dado que representan una proporción de entre el 95% y el 99% del contenido del producto. Los azúcares reductores encontrados naturalmente en la miel son resultado de la inversión de la sacarosa por efecto de la enzima invertasa; aportada por el organismo de la abeja en el proceso de elaboración. Así, los azúcares principales son la glucosa y la fructosa y se encuentran en proporciones aproximadamente iguales.

Los azúcares reductores representan un parámetro importante para detectar adulteraciones en la miel ya que permiten evidenciar la adición de endulzantes derivados de la caña de azúcar al producto terminado, o bien, de suplementos preparados por los apicultores para la alimentación de las abejas. Además, la calidad nutricional de la miel está estrechamente ligada a este parámetro. Dado que los azúcares reductores son más fácilmente digeribles y asimilables por el organismo, una menor cantidad de ellos implica una reducción en la calidad nutricional (Solares, 2013; Velásquez, 2016; Huidobro y Simal, 1984).

Para establecer el contenido de azúcares reductores (%ARD) las muestras fueron analizadas de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 5.4. Debido a que algunas muestras presentaron sedimentos se realizó un procedimiento de “limpieza” empleando para ello crema de alúmina. Del mismo modo que para la determinación de la acidez libre, una limitante para esta determinación fue la cantidad de muestra disponible. Por este motivo, se planteó una adecuación del método convencional descrito en la Norma Mexicana enfocado en la reducción de la cantidad de muestra y determinando la influencia de la limpieza de la muestra con distintos volúmenes de crema de alúmina (Figura 14).

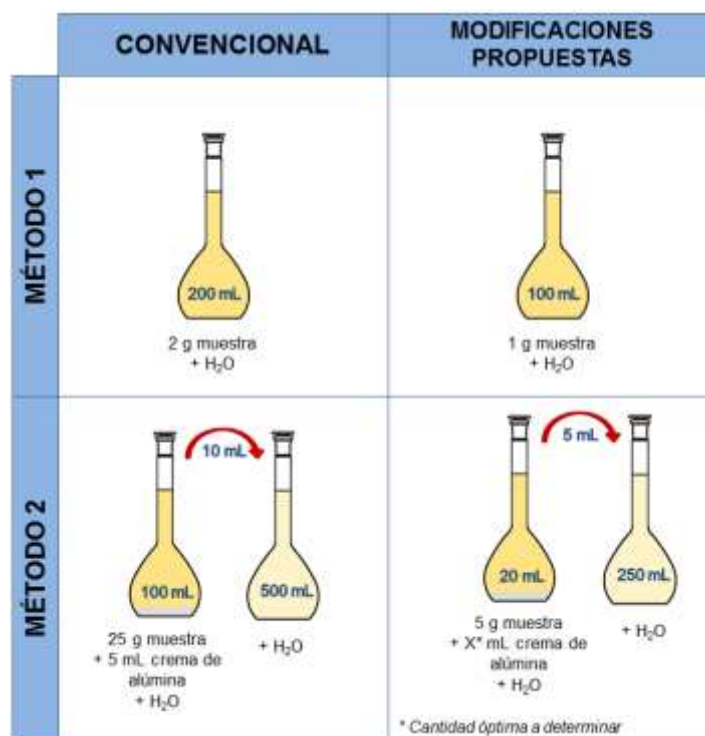


Figura 14. Modificaciones propuestas para la determinación de %ARD.

Así, para evaluar el efecto de la limpieza de la muestra se realizó una curva con 5 puntos experimentales (5 g de muestra tratados con 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 y 10.0 mL de crema de alúmina) y utilizando las modificaciones propuestas (Método 2). El agente titulante para este procedimiento consistió en una solución de miel con evidentes señales de cristalización. Los algoritmos de cálculo empleados para estimar el contenido de azúcares reductores son:

Para el Método 1 convencional y modificado:

$$\%ARD = \frac{\text{aforo}}{\text{masa de la muestra}} \times \frac{\text{Factor Fehling}}{\text{gasto}} \times 100\%$$

Para el Método 2 convencional:

$$\%ARD = \frac{100 \text{ mL}}{\text{masa de la muestra}} \times \frac{500 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times \frac{\text{Factor Fehling}}{\text{gasto}} \times 100\%$$

Para el Método 2 modificado:

$$\%ARD = \frac{20 \text{ mL}}{\text{masa de la muestra}} \times \frac{250 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times \frac{\text{Factor Fehling}}{\text{gasto}} \times 100\%$$

En todos los casos, el Factor Fehling (Cuadro 20) se calculó mediante la normalización de una solución patrón de azúcar invertido y los reactivos de Fehling, de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 5.4. El algoritmo de cálculo para este factor es:

$$\text{Factor Fehling} = \frac{\text{masa de estándar} \times \frac{360.312 \text{ g/mol}}{342.296 \text{ g/mol}}}{1000 \text{ mL}} \times \text{gasto}$$

La aplicación repetida del método permitió la generación de resultados confiables para la determinación de %ARD, ya que en todos los casos el CV no es mayor a 2.0% (Cuadro 21). Con base en estos resultados se concluye que la metodología propuesta cumple con la precisión requerida para métodos volumétricos.

Por otro lado, en la Figura 15 se ilustra que la cantidad de crema de alúmina añadida y el porcentaje de azúcares reductores siguen un comportamiento asintótico: conforme se añade una mayor cantidad de crema de alúmina disminuye el %ARD en la muestra. Sin embargo, no se observa una diferencia significativa

entre el resultado obtenido agregando 5 mL y el obtenido agregando 10 mL. Por lo tanto, se determinó que la cantidad óptima de crema de alúmina a adicionar para lograr una mejor “limpieza” de la muestra es de 5 mL.

Cuadro 20. Determinación del Factor Fehling para azúcares reductores.

Solución	Masa del estándar de sacarosa (g)	Volumen de solución estándar neutralizada (mL)	Factor Fehling
1 ^a	9.5011	5.9	0.059
		5.9	0.059
		5.9	0.059
		Promedio	0.059
		CV	0.0
2 ^b	9.5006	6.0	0.060
		6.0	0.060
		6.0	0.060
		Promedio	0.060
		CV	0.0

^a Solución preparada para el análisis de las muestras S29-10, S30-8, S27-6, S31-5, S33-18, S34-15, S20-7, S25-12, S23-11, S32-19, S21-13, S17-21, S28-9, S26-4, S19-20, S24-14, S18-3, S22-1, S40-S43, H13, H30 y H33.

^b Solución preparada para el análisis de las muestras H1-H12, H14-H29, H31, H32 y MC1-MC3.

Cuadro 21. % ARD utilizando el Método 2 y diferentes cantidades de crema de alúmina.

Crema de alúmina adicionada (mL)	%ARD	CV
0.5	84.7	0.4
1.0	84.5	0.4
2.0	84.1	0.4
5.0	83.9	0.4
10.0	83.7	0.4

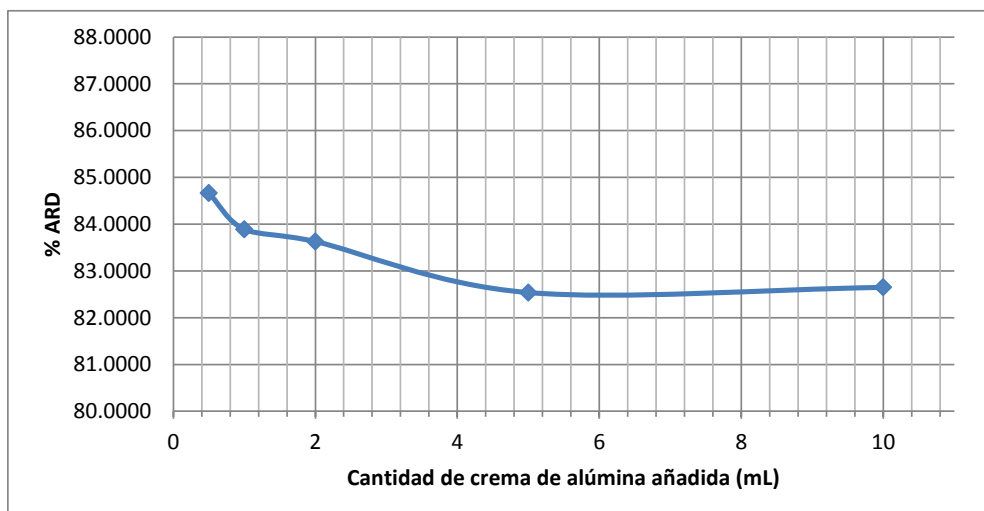


Figura 15. Cantidad de crema de alúmina y % ARD utilizando el Método 2.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de modificación del Método 2, se realizó una comparación de los resultados generados con las modificaciones introducidas para ambos métodos. Para determinar la influencia de la limpieza de la muestra se seleccionaron 3 mieles con tamaño de muestra ≥ 15 g y con evidente cristalización. En todos los casos los %ARD obtenidos fueron confiables ya que presentan un CV menor al 2.0%. Con los resultados obtenidos (Cuadro 22) se calculó la diferencia entre %ARD promedio empleando los métodos modificados 1 y 2. Las diferencias obtenidas resultaron ser menores a una unidad, por lo tanto, se comprobó que la limpieza de las muestras puede omitirse para determinar %ARD en muestras de tamaño pequeño.

Cuadro 22. Comparación de métodos modificados para evaluar el efecto del proceso de limpieza en la muestra.

Código de muestra	Método	%ARD promedio	CV	Diferencia
S41	1	76.6	0.8	0.3973
	2	77.0	0.4	
S34-15	1	73.0	0.7	0.7382
	2	72.2	0.4	
S32-19	1	71.5	0.7	0.6770
	2	70.9	0.3	

Una vez establecidas las condiciones de análisis para modificar el método convencional, se analizaron 37 muestras mediante el Método 1 y 21 mediante el Método 2. En el Cuadro 23 se resumen los resultados obtenidos con su respectivo valor de intervalo de confianza (IC) al 95% y los coeficientes de variación. En todos los casos, el coeficiente de variación obtenido fue menor al 2.0%. Por consiguiente, la variación obtenida se encuentra dentro del límite establecido para métodos volumétricos.

Cuadro 23. Determinación de %ARD en mieles mexicanas.

Código de muestra	Método de análisis	%ARD ± IC	CV	Código de muestra	Método de análisis	%ARD ± IC	CV
S29-10	2	68.2 ± 0.6	0.3	H13	1	67.6 ± 1.1	0.7
S30-8	2	69.7 ± 0.6	0.3	H14	1	55.5 ± 0.7	0.5
S27-6	2	69.0 ± 0.6	0.3	H15	1	68.7 ± 1.2	0.7
S31-5	2	70.7 ± 0.6	0.3	H16	1	67.8 ± 1.2	0.7
S33-18	2	72.6 ± 0.6	0.4	H17	1	69.5 ± 1.2	0.7
S34-15	2	72.2 ± 0.6	0.4	H18	1	67.7 ± 0.0	0.0
S20-7	2	73.0 ± 0.7	0.4	H19	1	67.4 ± 1.1	0.7
S25-12	1	56.7 ± 0.8	0.6	H20	1	66.8 ± 1.1	0.6
S23-11	2	72.6 ± 0.6	0.4	H21	1	68.3 ± 1.1	0.7
S32-19	2	70.9 ± 0.6	0.3	H22	1	63.1 ± 1.0	0.6
S21-13	2	69.3 ± 0.6	0.3	H23	1	67.5 ± 1.1	0.7
S17-21	2	72.5 ± 0.6	0.4	H24	1	64.3 ± 1.0	0.6
S28-9	1	66.1 ± 1.1	0.7	H25	1	68.4 ± 1.1	0.7
S26-4	2	70.5 ± 0.6	0.3	H26	1	68.6 ± 1.2	0.7
S19-20	2	71.4 ± 0.6	0.4	H27	1	59.0 ± 0.8	0.6
S24-14	2	70.9 ± 0.6	0.3	H28	1	70.6 ± 1.2	0.7
S18-3	2	69.7 ± 0.6	0.3	H29	1	67.0 ± 1.1	0.7
S22-1	2	67.2 ± 0.6	0.3	H30	1	66.5 ± 1.1	0.7
H1	1	65.4 ± 0.0	0.0	H31	1	70.1 ± 1.2	0.7
H2	1	67.2 ± 1.1	0.7	H32	1	70.9 ± 1.2	0.7
H3	1	67.0 ± 1.1	0.7	H33	1	68.5 ± 0.0	0.0
H4	1	67.6 ± 1.1	0.7	S40	2	88.5 ± 1.0	0.4
H5	1	67.5 ± 1.1	0.7	S41	2	77.0 ± 0.7	0.4
H6	1	70.0 ± 1.2	0.7	S42	2	78.2 ± 0.8	0.4
H7	1	72.1 ± 1.3	0.7	S43	2	78.2 ± 0.7	0.4
H8	1	69.2 ± 1.2	0.7	MC1	1	66.2 ± 1.0	0.6
H9	1	68.2 ± 0.0	0.0	MC2	1	67.2 ± 0.0	0.0
H10	1	66.3 ± 1.1	0.7	MC3	2	68.3 ± 0.6	0.3
H11	1	57.8 ± 0.8	0.6				
H12	1	66.4 ± 1.1	0.7				

De acuerdo con los valores de %ARD resumidos en el Cuadro 23, los datos se encuentran en un rango de 55.5% a 88.5%. Distribuyendo el total de los valores en 9 clases, se observa que 47 de las muestras analizadas presentan valores entre 66.0% y 74.0%; 7 muestras se encuentran por debajo de este intervalo y 4 rebasan dicho intervalo (Cuadro 24; Figura 16).

Cuadro 24. Frecuencia de valores de %ARD en mieles mexicanas.

Clase	Intervalo	Frecuencia
1	54.0 – 58.0	3
2	58.0 – 62.0	1
3	62.0 – 66.0	3
4	66.0 – 70.0	33
5	70.0 – 74.0	14
6	74.0 – 78.0	1
7	78.0 – 82.0	2
8	82.0 – 86.0	0
9	86.0 – 90.0	1

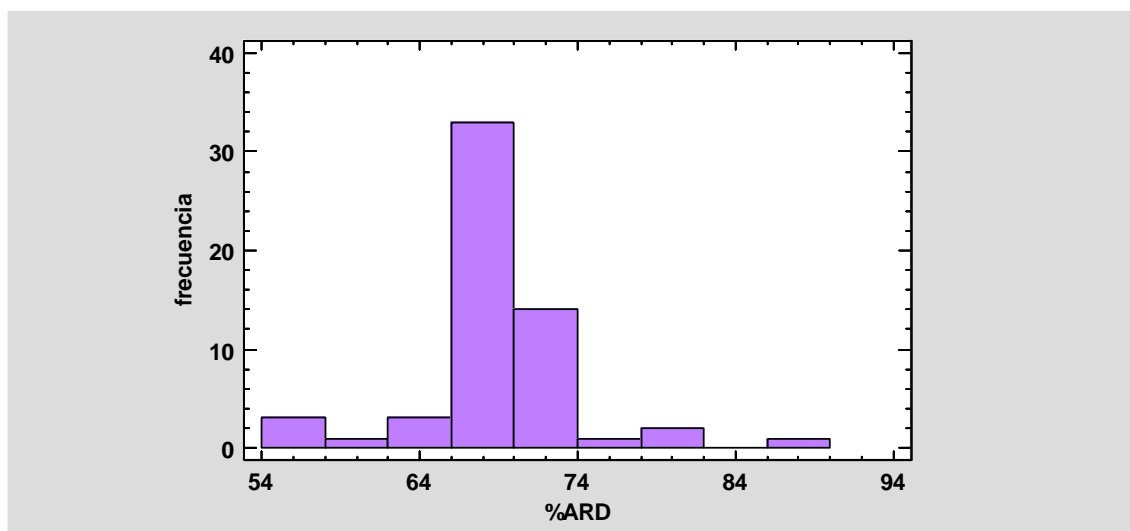


Figura 16. Histograma de %ARD en mieles mexicanas.

Es importante destacar que los resultados reportados para %ARD se encuentran expresados con respecto a la suma de fructosa y glucosa. Esta relación se encuentra considerada en algoritmo de cálculo para estimar el Factor de Fehling. De acuerdo con los límites propuestos por Nordin y Vit, todas las muestras de mieles analizadas cumplen con la especificación planteada presentando %ARD mayores a 50% y no mayores a 85% (Nordin *et al.*, 2018; Vit *et al.*, 2004).

Finalmente, al comparar los resultados de este parámetro con el rango de °Brix se deduce que esta última medida (66.5 – 82.4) podría proporcionar información preliminar acerca de los azúcares presentes en una muestra de miel, sin embargo, no se considera una medida exacta y definitiva.

6.5. Determinación de hidroximetilfurfural

El HMF es un compuesto que se forma como consecuencia de la degradación de los azúcares. Se trata de un aldehído cíclico, producto de la deshidratación de las azúcares (glucosa y fructosa) en un medio ácido y en presencia de temperatura elevada (Figura 17). 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 de HMF para la miel pura no debe ser superior a 40 mg/kg, mientras que para mieles de origen tropical y mezclas máximo puede llegar a 80 mg/kg (Fallico *et al.*, 2004).

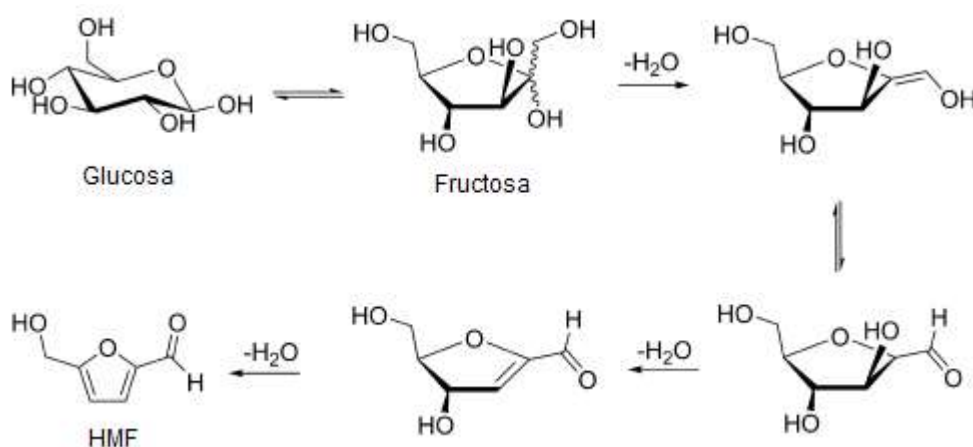


Figura 17. Formación del HMF, vía cíclica (Van Putten *et al.*, 2013).

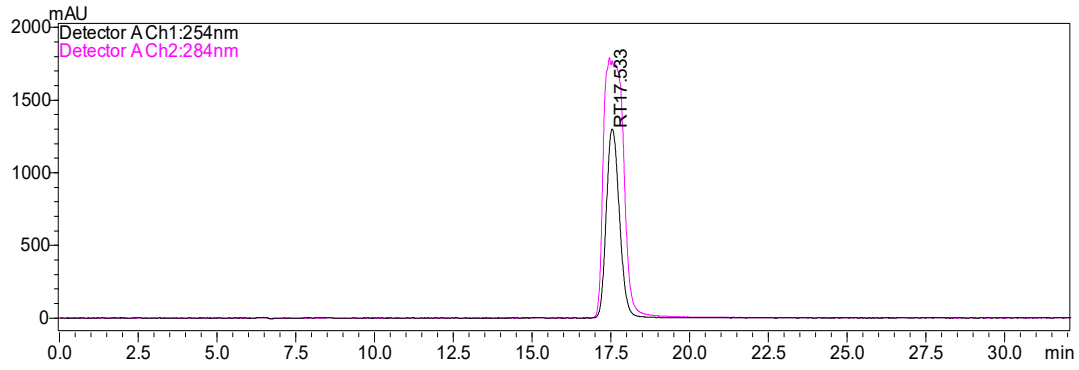
El contenido de HMF se considera como un indicador importante de calidad y frescura, debido a que generalmente este compuesto no se encuentra presente (y si se encuentra, en concentraciones apenas detectables) en las mieles recién colectadas; también se ha demostrado que su concentración tiende a aumentar durante el proceso de acondicionamiento o por envejecimiento debido al

almacenamiento prolongado. Es muy común que, durante su acondicionamiento, las mieles sean calentadas a temperaturas de entre 25 y 50 °C con el fin de disminuir su viscosidad y prevenir la granulación o fermentación, proceso que favorece la formación de HMF. Sin embargo, diversos estudios han informado la presencia de concentraciones altas de HMF en mieles que no fueron sometidas a ciclos de calentamiento y que fueron almacenadas a temperatura ambiente. Por lo tanto, la formación de este compuesto no se limita únicamente al sobrecalentamiento, sino que también se encuentra estrechamente ligada a otros factores; algunos de ellos son intrínsecos, como el pH, la humedad, la acidez y/o la fuente floral de obtención del néctar, aunque también influyen factores externos como el tipo de recipiente en que se almacenan las mieles (Shapla *et al.*, 2018).

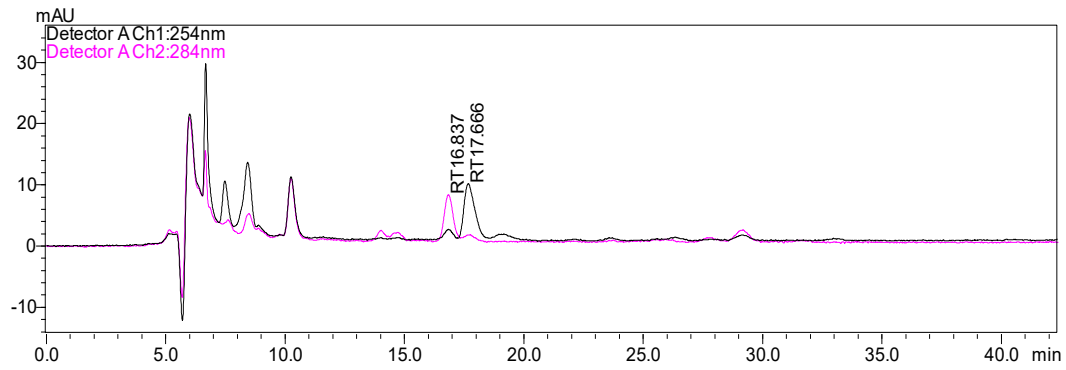
Para el desarrollo del método analítico se tomaron como base los métodos descritos por Ghramh (2020) y Harun (2021). En función de las condiciones cromatográficas previamente descritas, se evaluaron diferentes sistemas de elución y diferentes modificadores de pH hasta obtener las condiciones cromatográficas que permitieron observar un pico con características similares a un comportamiento gaussiano (Cuadro 25). El efecto de los factores seleccionados se evaluó a través de la resolución de la señal correspondiente al HMF en la matriz de trabajo. Los resultados de estas pruebas (Figura 18) permitieron establecer que la mayor resolución se obtiene empleando 0.1% de ácido fórmico y 10% de metanol en la fase móvil.

Cuadro 25. Condiciones cromatográficas propuestas para determinar el contenido de HMF en mieles de *S. mexicana*.

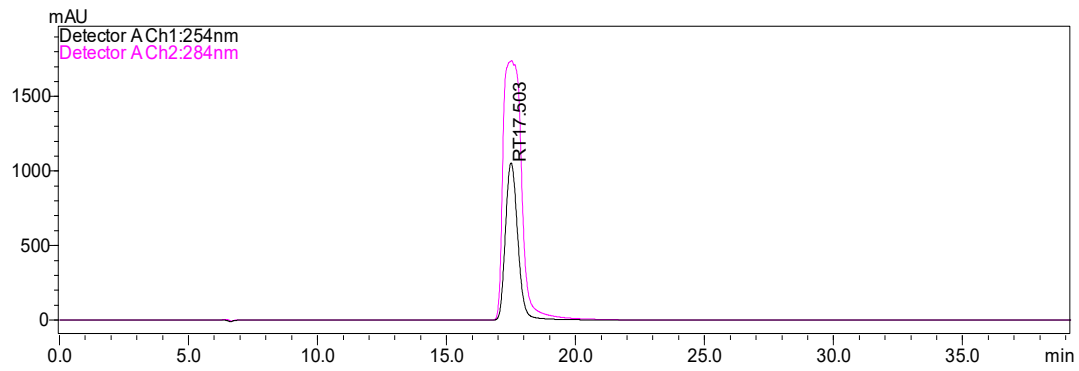
Método	Componente A	Componente B	Proporción (A:B)	Flujo	Temperatura de la columna
1	Ácido acético acuoso 1%	MeOH	90:10	0.3 mL/min	35 °C
2	Ácido fórmico acuoso 1%				
3	Ácido acético acuoso 1%	ACN	90:10	0.3 mL/min	35 °C
4	Ácido fórmico acuoso 1%				



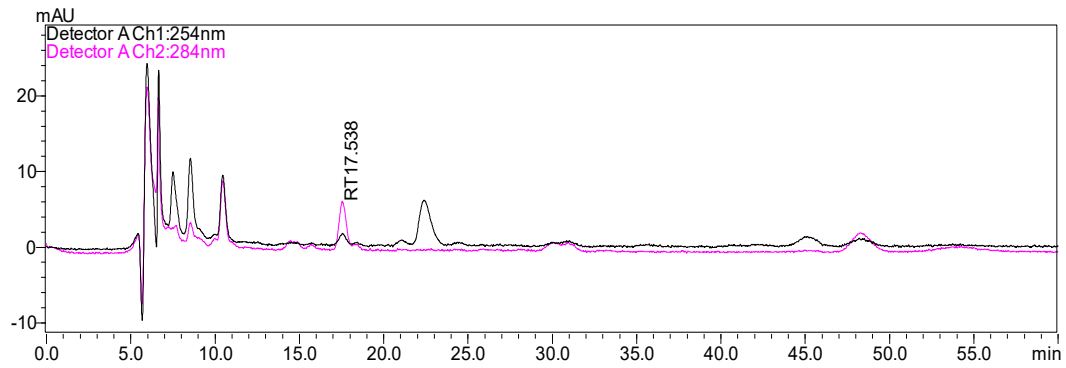
(A)



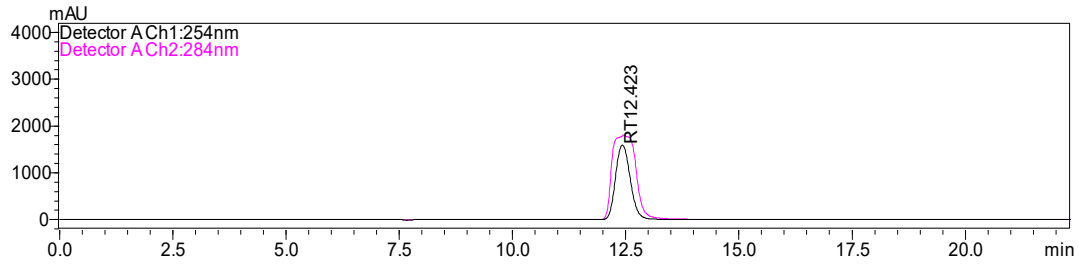
(B)



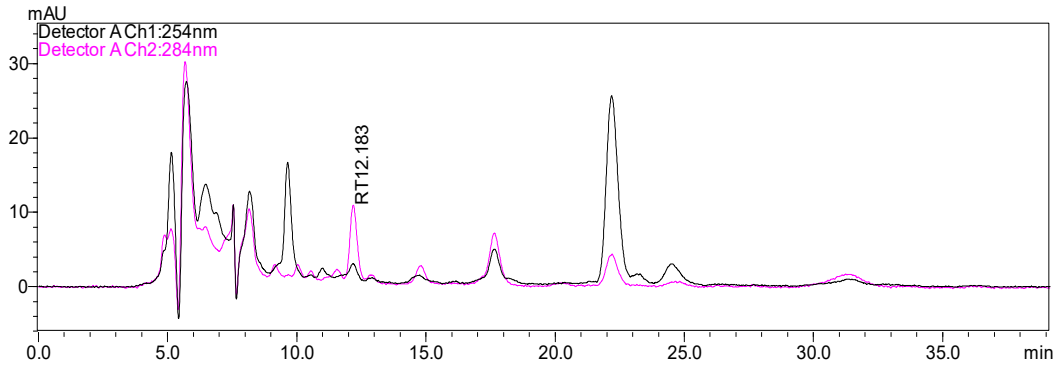
(C)



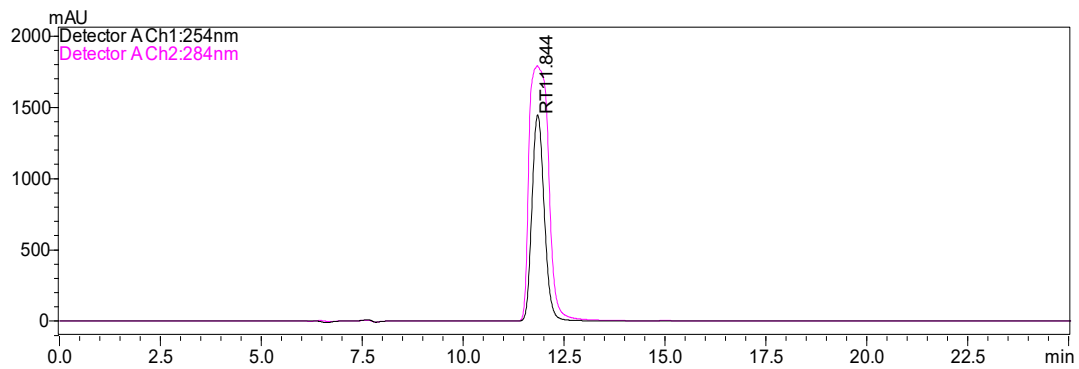
(D)



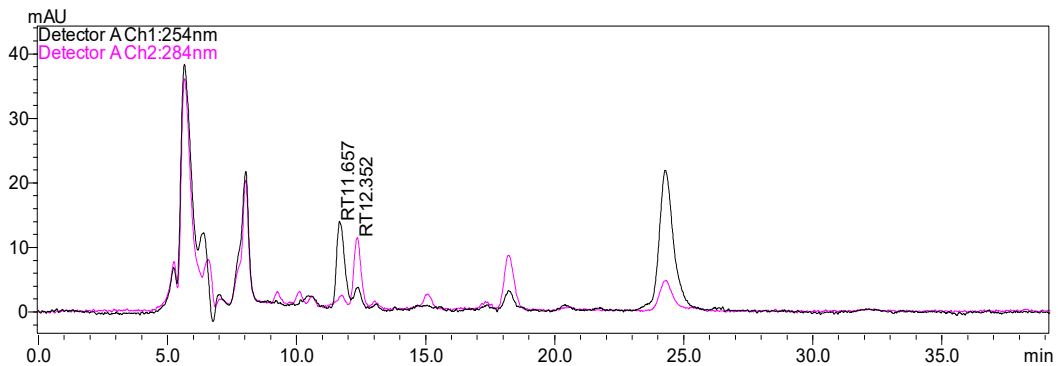
(E)



(F)



(G)

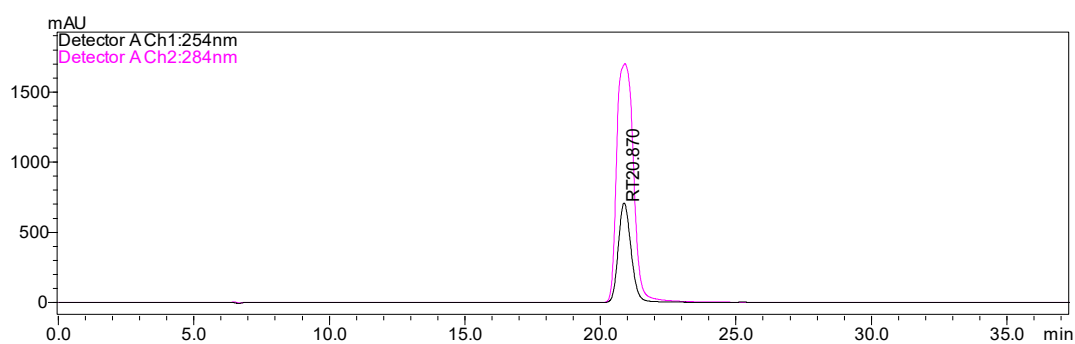


(H)

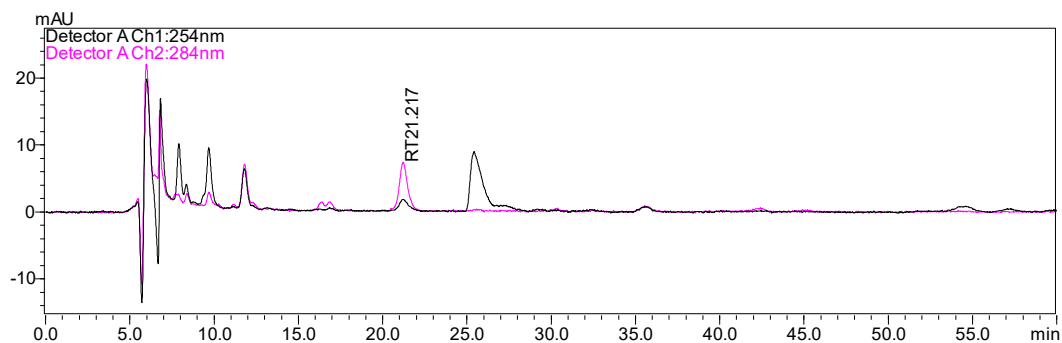
Figura 18. Perfiles para establecer las condiciones cromatográficas del método para determinar el contenido de HMF en mieles de *S. mexicana*: Estándar de HMF, método 1 (A), método 2 (C), método 3 (E) y método 4 (G); Muestra S24-14, método 1 (B), método 2 (D), método 3 (F) y método 4 (H).

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas se analizaron 5 muestras con el propósito de comparar sus perfiles cromatográficos y corroborar la presencia y/o ausencia del HMF. En la Figura 18 se observa que los cromatogramas obtenidos con las muestras H33, S17-21, S42 y S29-10 presentan un pico con t_R de 21.2 min atribuible a la presencia del HMF. En contraste, la muestra MC3, de colecta reciente, presenta una señal de baja intensidad en el mismo t_R a una $\lambda=254$ nm, correspondiente al HMF. Este resultado se encuentra en armonía con la información disponible en las diferentes fuentes bibliográficas, que establecen la baja o inexistente concentración de HMF en las mieles frescas.

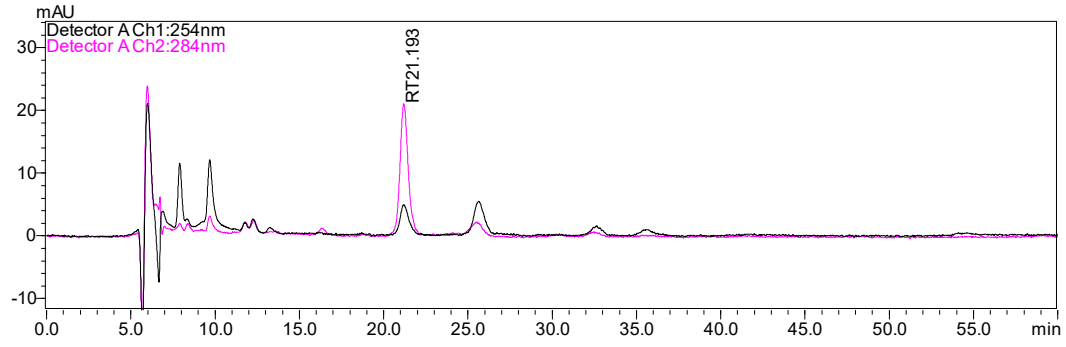
Es importante destacar, que un punto crítico para el desarrollo del método reside en la preparación de la fase móvil. Para evitar el desplazamiento del pico correspondiente al HMF (Figura 18A y 19A), la solución acuosa ácida debe prepararse el día de uso.



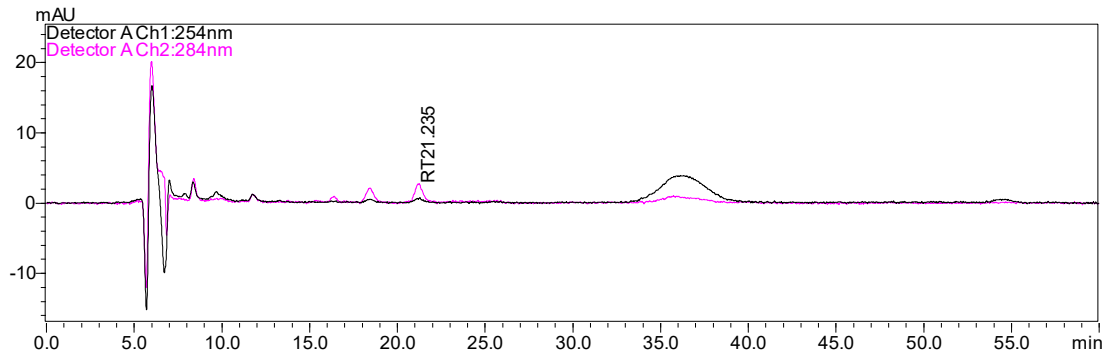
(A)



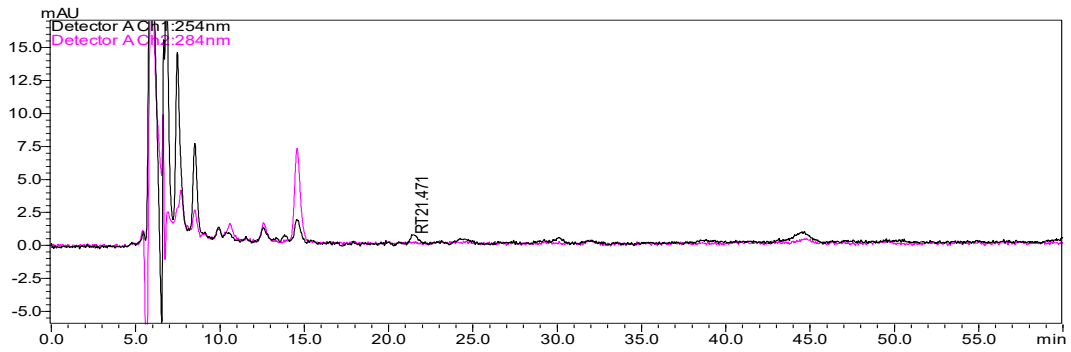
(B)



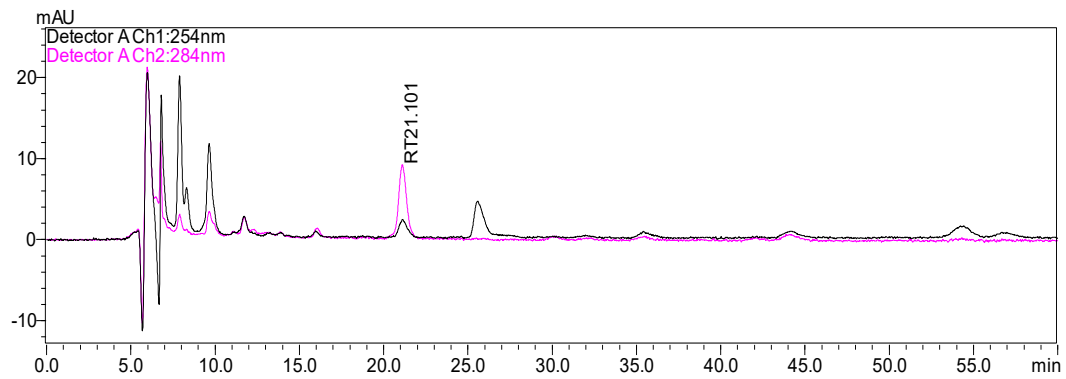
(C)



(D)



(E)



(F)

Figura 19. Análisis preliminar del contenido de HMF en mieles mexicanas: **(A)** Estándar de HMF, **(B)** Muestra S29-10, **(C)** Muestra S42, **(D)** Muestra H33, **(E)** Muestra MC3 y **(F)** Muestra S17-21.

El área de la señal obtenida con los estándares en concentraciones de 40 y 20 $\mu\text{g/mL}$ (apartado 5.5.), permitió estimar de manera preliminar la concentración aproximada de HMF en las 5 mieles analizadas (Cuadro 26). A partir de los resultados obtenidos, se puede observar que la muestra H33 tiene la menor concentración de HMF, mientras que la muestra S42 tiene la mayor concentración. Los análisis preliminares realizados hasta el momento permiten observar que las mieles analizadas se encuentran en armonía con los datos descritos por Nordin y colaboradores en el año 2018, quienes proponen que el contenido de HMF en muestras de mieles provenientes de abejas meliponas debe tener un valor máximo de 40 $\mu\text{g/mL}$ (Nordin *et al.*, 2018; Vit *et al.*, 2004). Es importante mencionar que la metodología desarrollada no pudo validarse.

Cuadro 26. Concentraciones aproximadas de HMF en mieles mexicanas.

Muestra	Área ($\lambda=284$ nm)	Concentración estimada de HMF ($\mu\text{g/g}$)
Estándar (20 $\mu\text{g/mL}$)	9378547	---
	3146332	---
H33	36030	1.9
S17-21	280061	14.9
S42	687999	35.1
S29-10	218442	11.4
MC3	---	---

6.6. Análisis estadístico

Con el propósito de resumir la información presente en un gran conjunto de datos, además de caracterizar gráficamente las diferentes variables para detectar agrupaciones en las mieles, se realizó un análisis multivariado de los datos obtenidos en el presente trabajo.

El control estadístico de procesos multivariados resulta ser una herramienta útil para el control simultáneo de varias características de calidad relacionadas. Para analizar los datos, en primer lugar, se realizó un gráfico multivariado de promedios móviles exponencialmente ponderados (EWMA) con la finalidad de identificar las posibles correlaciones entre las variables que afectan directamente la calidad de las mieles (humedad, acidez libre y %ARD). En el Cuadro 27 se resume el análisis para el gráfico multivariado (Figura 20), que ilustra la presencia de 4 puntos por

encima del límite superior de control. Las muestras corresponden a mieles provenientes de las regiones de Valle Guarachanillo, Zamora y Veracruz (Cuadro 28). Comparando sus valores de T-cuadrada con el resto de los puntos se observa que sus valores son más altos. Estos hallazgos permitieron concluir que, con base en sus características fisicoquímicas, estas muestras se agrupan de forma diferente.

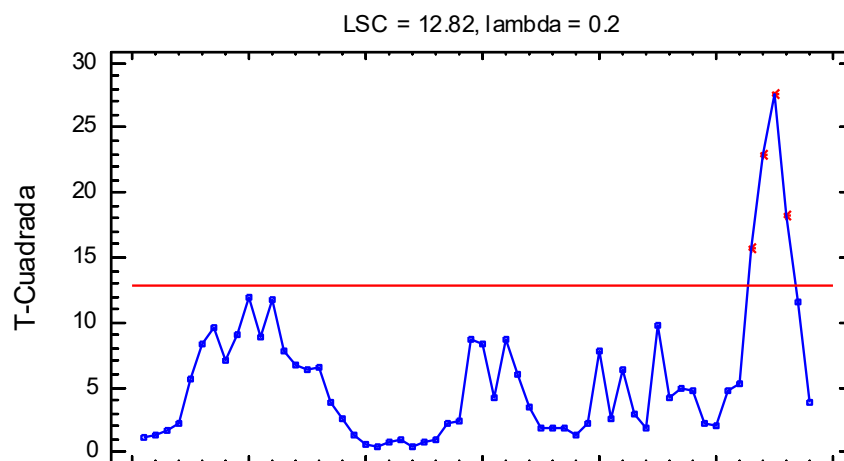


Figura 20. Gráfico multivariado EWMA para el análisis de mieles mexicanas.

Cuadro 27. Resumen de análisis para gráfico multivariado EWMA.

Fase 1 - covarianza estimada a partir de los datos actuales usando el estimador agrupado				
Gráfico	Alfa	LIC	LSC	Fuera de Límites
T-Cuadrada	0.0027	0.0	12.8247	4

Cuadro 28. Reporte de Gráfico Multivariado EWMA.

Observación	T-Cuadrada	Acidez Libre	ARD	Humedad
Atzalan	1.11193	90.2628	68.6041	25.6545
Atzalan	1.2429	86.4502	68.8233	25.4636
Atzalan	1.69156	84.9602	68.8586	25.5309
Atzalan	2.15324	84.4881	69.2269	25.6647
Mecatlan	5.7093	80.9105	69.9015	25.8718
Atzalan	8.42389	76.3684	70.3612	25.8574
Atzalan	9.68459	71.3947	70.889	25.6059
Altotonga	7.11102	86.0558	68.0512	26.6447
Atzalan	8.99637	78.3646	68.9609	26.3158
Veracruz	11.9589	76.7117	69.3488	26.4726
Atzalan	8.93398	79.5094	69.339	26.3581
Veracruz	11.8445	76.5675	69.9712	26.3465

Atzalan	7.81551	79.094	69.197	26.2372
Altotonga	6.70644	78.9552	69.4576	26.0698
Veracruz	6.27687	81.0242	69.8461	26.0358
Atzalan	6.51521	81.5393	70.0568	26.0086
Atzalan	3.85301	79.2115	69.9855	25.5869
Altotonga	2.56557	83.4492	69.4284	25.7295
Altotonga	1.23918	92.1793	68.6227	26.0036
Veracruz	0.637977	96.4835	68.3382	25.9629
Atzalan	0.340788	98.5268	68.0705	25.8503
Atzalan	0.768993	101.701	67.9764	25.7003
Papantla	0.895723	102.501	67.8811	25.7202
Zozocolco	0.382686	97.6209	68.3049	25.4162
Atzalan	0.75987	95.8567	69.0639	25.2129
Atzalan	1.00391	96.7854	69.0911	25.3303
Altotonga	2.18161	101.128	68.9129	25.3443
Atzalan	2.46977	104.523	68.3903	25.4754
Misantla	8.69809	124.238	66.2723	26.8003
Altotonga	8.36999	123.67	66.2978	26.6403
Atzalan	4.26342	115.716	66.5582	26.3122
Atzalan	8.78472	127.113	64.3466	27.2898
Zozocolco	6.04707	121.37	65.2173	26.9118
Altotonga	3.44401	113.016	65.7338	26.6895
Atzalan	1.79484	105.773	66.4871	26.3916
Mecatlan	1.93465	108.138	66.7296	26.5333
Atzalan	1.89458	108.111	66.8637	26.4866
Tenochtitlan	1.32667	101.729	66.851	26.2693
Atzalan	2.18781	109.383	67.1408	26.2154
Tenochtitlan	7.74305	122.646	66.3326	26.5923
Tenochtitlan	2.5785	110.737	66.5661	26.1939
Altotonga	6.29985	120.55	66.1129	26.4551
Zozocolco	2.95786	111.56	66.5703	26.1241
Veracruz	1.81607	105.568	66.9762	25.8193
Puebla	9.76385	110.754	65.381	25.5754
Atzalan	4.27027	110.003	66.4248	25.7203
Zozocolco	4.89755	111.643	66.5398	25.6563
Altotonga	4.80183	103.594	66.5319	25.405
San Luis Potosí	2.23962	101.335	67.2455	25.404
(Sin información)	2.12189	91.7683	67.9764	25.0032
Oaxaca	4.81078	81.8946	68.0811	25.0826
San Luis Potosí	5.36577	67.6757	72.1649	23.3861
Valle Guarachanillo	* 15.7828	63.1206	73.0519	21.8688
Zamora	* 22.8322	57.1364	74.0815	21.1351
Zamora	* 27.5229	55.0292	74.9052	20.7081
Veracruz	* 18.2485	63.5233	73.1642	21.6464
Veracruz	11.5861	68.6187	71.9713	22.4572
Veracruz	3.89741	73.5749	71.2371	23.6257

Debido a que en el gráfico multivariado EWMA (Figura 20) se observaron 4 puntos por encima del límite superior, se decidió analizar los datos por medio de un gráfico de elipse. Para ello, se seleccionaron las variables humedad y %ARD. En dicho gráfico se observan de nueva cuenta 4 puntos fuera de la elipse que representan muestras con altos porcentajes de azúcares reductores y bajo contenido de humedad (Figura 21). Enseguida, y para analizar el comportamiento de los datos utilizando 3 variables simultáneas (humedad, %ARD y acidez libre), se utilizó el gráfico de elipse tridimensional (Figura 22). De nueva cuenta, en este gráfico, se observan 4 puntos fuera del espacio del elipsoide que corresponden a muestras de miel con bajo contenido de humedad y acidez libre y altos porcentajes de azúcares reductores.

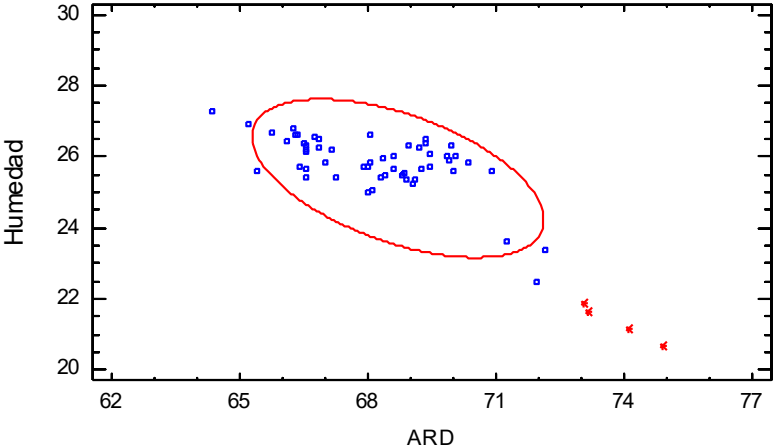


Figura 21. Gráfico de elipse 2-D de control para el análisis multivariado de mieles mexicanas.

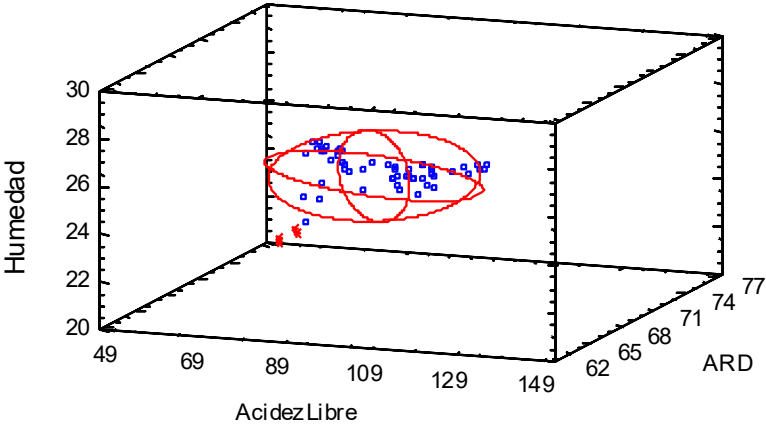


Figura 22. Gráfico 3-D (elipsoide de control) para el análisis multivariado de mieles mexicanas.

Finalmente, se analizó la descomposición EWMA para el estadístico T-cuadrada. Este análisis se realizó con el objetivo de estimar la contribución de cada variable en los valores observados de T-cuadrada para los datos agrupados fuera de los límites (Cuadro 29). Los resultados obtenidos permiten observar que la humedad disminuye en las muestras correspondientes a la región de Zamora; el %ARD aumenta para las muestras correspondientes a las regiones de Valle Guarachanillo y Veracruz; y la acidez libre es baja en muestras correspondientes a la región de Zamora y de Veracruz.

Cuadro 29. Descomposición T-Cuadrada para el análisis multivariado de mieles mexicanas.

<i>Contribución Relativa a la Señal T-Cuadrada</i>				
Observación	T-Cuadrada	Acidez Libre	ARD	Humedad
Valle Guarachanillo	15.7828	0.00821758	0.406694	8.61953
Zamora	22.8322	0.044937	0.370022	12.0356
Zamora	27.5229	0.415085	0.0393246	13.5142
Veracruz	18.2485	0.100565	0.473058	10.8667

Debido a que en los gráficos multivariantes de EWMA, presentados anteriormente, se encontraron puntos fuera de límite, se utilizó el análisis de componentes principales (PCA) para explicar las interacciones entre las variables de estudio que no pueden interpretarse directamente a partir de los resultados de los análisis físicoquímicos, sin un tratamiento multivariado (Fermín, *et al.*, 2009). En este caso, el PCA también permitiría clasificar el origen de las muestras de acuerdo con su origen geográfico. En este trabajo se extrajeron 3 componentes principales; los resultados se muestran en el Cuadro 30 y la Figura 23. Así, se observa que el primer componente explica el 85.6% de la variación en los datos entre las 3 variables seleccionadas (humedad, acidez libre y %ARD), ya que su valor propio (eigenvalor) es >1 y visualmente se aprecia la formación de una recta a partir del segundo componente principal.

Cuadro 30. Análisis de componentes principales para la determinación del número de componentes principales.

Componente	Eigenvalor	Porcentaje de Varianza	Porcentaje Acumulado
1	2.56683	85.561	85.561
2	0.27209	9.070	94.631
3	0.16108	5.369	100.000

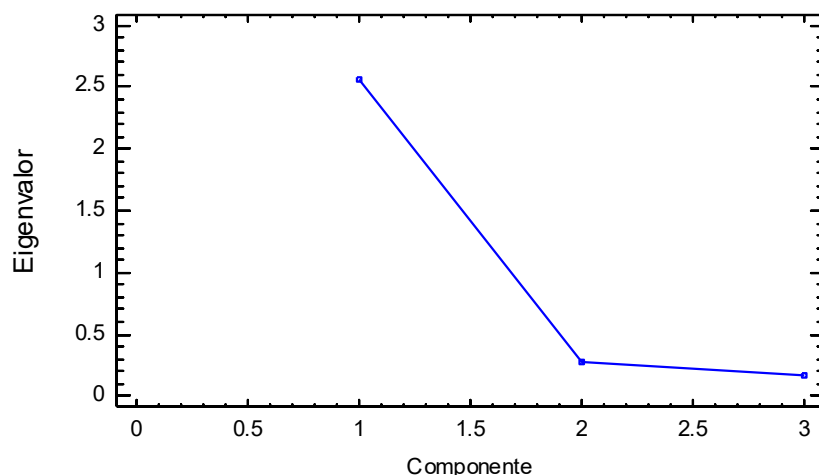


Figura 23. Gráfica de sedimentación para el análisis de componentes principales.

Adicionalmente, a través de la tabla de pesos de los componentes (Cuadro 31) se establecieron las asociaciones entre los componentes principales y las variables analizadas. Asimismo, se observa que los componentes se encuentran ponderados de la siguiente manera: el componente 1 presenta la mayor asociación negativa con %ARD, sin embargo, las asociaciones positivas con el resto de las variables muestran magnitudes similares; el componente 2 presenta la mayor asociación positiva con la humedad y el componente 3 presenta una gran asociación positiva con %ARD. Por lo tanto, el primer componente puede describir la relación las 3 variables en conjunto, el segundo componente puede diferenciar los datos basándose en los valores de humedad y el tercer componente inequívocamente puede diferenciar los datos en función del %ARD. Los coeficientes correspondientes a los diferentes pesos de los componentes mostrados en el Cuadro 31 también pueden ser de utilidad para construir las ecuaciones de los componentes principales, para estimar las puntuaciones de una observación. Por ejemplo, el componente 1 presenta la siguiente ecuación:

$$PC_1 = 0.572411 * \text{Acidez Libre} - 0.590408 * \text{ARD} + 0.569003 * \text{Humedad}$$

Cuadro 31. Tabla de pesos de los componentes para el análisis de componentes principales.

	Componente 1	Componente 2	Componente 3
Acidez Libre	0.572411	-0.675582	0.464688
ARD	-0.590408	0.0536806	0.805318
Humedad	0.569003	0.735328	0.368142

De esta manera, se generó una tabla que muestra las puntuaciones de los componentes principales para cada una de las muestras analizadas (Cuadro 32). Con estos valores se construyeron los gráficos de dispersión en 2 y 3 dimensiones (Figuras 24 y 25), para evaluar la estructura de los datos y detectar conglomerados, valores atípicos y tendencias.

Así, en el gráfico de 2 dimensiones, se distinguen 3 distribuciones principales de los datos:

Grupo 1. Este grupo se conforma por 4 muestras que presentan valores de puntuación bajos, tanto para el componente 1 como para el componente 2 (Cuadro 32, sombreado color rojo). Estas muestras son originarias de las zonas geográficas de San Luis Potosí, Valle Guarachanillo y Zamora. Cabe resaltar que estas muestras corresponden a mieles provenientes de abejas melíferas.

Grupo 2. En este grupo se distribuye la mayor parte de las muestras, originarias de diferentes localidades y provenientes de abejas meliponas (Cuadro 32, sombreado color verde).

Grupo 3. Este grupo lo conforman 3 muestras que presentan los valores de puntuación altos, tanto para el componente 1 como para el componente 2 (Cuadro 32, sombreado color azul). Estas muestras provienen de abejas meliponas y son originarias de las localidades de Misantla, Atzalan y Altotonga.

Por lo tanto, es posible concluir que los valores incluidos en el grupo 3 requieren ser analizados con detalle, ya que existe una posibilidad de que puedan incluirse en el grupo 2 realizando un mayor número de determinaciones con diferentes muestras originarias de las mismas poblaciones, que permitan identificar con certeza el origen de dicha agrupación.

Complementando la información obtenida a través del gráfico en 2 dimensiones, el gráfico de 3 dimensiones permite visualizar de una forma más sencilla las relaciones entre los 3 componentes. En el gráfico 3D se distinguen aproximadamente 3 distribuciones principales de los datos, siendo la distribución ubicada en el centro la que contiene la mayor cantidad de los datos.

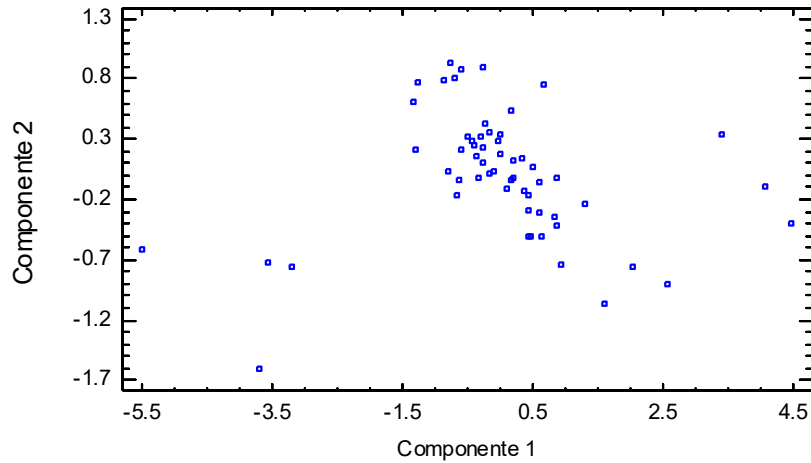


Figura 24. Gráfico de dispersión 2-D para el análisis de componentes principales para mieles mexicanas, acorde a la zona geográfica.

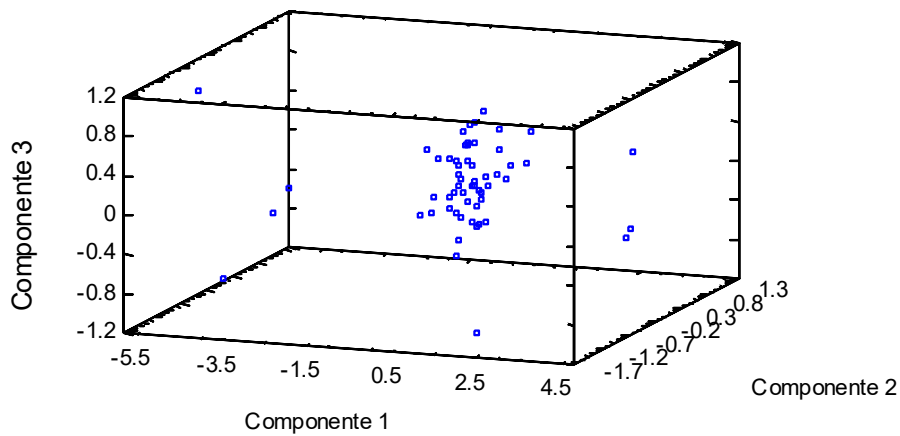


Figura 25. Diagrama de dispersión 3-D para el análisis de componentes principales para mieles mexicanas, acorde a la zona geográfica.

Cuadro 32. Tabla de componentes principales, datos de puntuaciones para casos individuales.

Fila	Etiqueta	Componente 1	Componente 2	Componente 3
1	Atzalan	0.165825	0.544797	-0.0408984
2	Atzalan	-0.601335	0.222974	-0.207287
3	Atzalan	-0.163605	0.36517	-0.0706593
4	Atzalan	-0.224291	0.423561	0.305494
5	Mecatlan	-0.601374	0.881168	0.473022
6	Atzalan	-0.876302	0.792428	0.177485
7	Atzalan	-1.3292	0.603541	0.0578202
8	Altotonga	3.39258	0.342036	-0.533601
9	Atzalan	-1.26052	0.780863	-0.0035366
10	Veracruz	-0.259954	0.904742	0.29722

11	Atzalan	0.00883385	0.174511	0.143389
12	Veracruz	-0.701872	0.806066	0.379376
13	Atzalan	0.343903	0.141283	-0.407874
14	Altotonga	-0.434886	0.284685	0.110411
15	Veracruz	-0.26291	0.223614	0.465319
16	Atzalan	-0.294725	0.325834	0.310317
17	Atzalan	-0.789285	0.0315034	-0.332317
18	Altotonga	0.49693	0.0767077	-0.016679
19	Altotonga	1.30493	-0.230815	0.146686
20	Veracruz	0.60522	-0.30941	0.0884497
21	Atzalan	0.433411	-0.287414	-0.0889215
22	Atzalan	0.422663	-0.507321	0.0676942
23	Papantla	0.441622	-0.155129	0.0331447
24	Zozocolco	-0.631047	-0.0390713	-0.136685
25	Atzalan	-0.667438	-0.164416	0.369419
26	Atzalan	0.156584	-0.0385982	0.240943
27	Altotonga	0.479691	-0.497248	0.258669
28	Atzalan	0.824259	-0.348196	0.0268655
29	Misantla	4.46782	-0.397677	0.578707
30	Altotonga	0.865175	-0.409422	0.0859168
31	Atzalan	-0.0861413	0.0415278	-0.341914
32	Atzalan	4.06656	-0.0915612	-0.310253
33	Zozocolco	0.0987821	-0.112355	0.0786184
34	Altotonga	-0.011522	0.340887	-0.257217
35	Atzalan	-0.383532	0.250094	-0.0993617
36	Mecatlan	0.879865	-0.0266218	0.395816
37	Atzalan	0.59476	-0.0646239	0.11441
38	Tenochtitlan	-0.0307518	0.286277	-0.517403
39	Atzalan	0.93712	-0.740085	0.635186
40	Tenochtitlan	2.56443	-0.903212	0.540513
41	Tenochtitlan	-0.490583	0.325152	-0.682304
42	Altotonga	2.04222	-0.752071	0.447266
43	Zozocolco	-0.355695	0.152868	-0.347173
44	Veracruz	-0.325249	-0.0122591	-0.263899
45	Puebla	1.61288	-1.05803	-1.17066
46	Atzalan	0.198805	-0.0111972	0.619689
47	Zozocolco	0.617377	-0.504539	0.0604238
48	Altotonga	-0.280859	0.103646	-0.76351
49	San Luis Potosí	-0.165032	0.0179295	0.226141
50	<i>(Sin información)</i>	-1.29859	0.219087	-0.41854
51	Oaxaca	-0.773305	0.942786	-0.68102
52	San Luis Potosí	-5.49225	-0.620843	0.958136
53	Valle Guarachanillo	-3.70093	-1.60915	-0.634468
54	Zamora	-3.57662	-0.72293	-0.202835
55	Zamora	-3.1951	-0.759912	0.0793323
56	Veracruz	0.381228	-0.122352	-0.337964
57	Veracruz	0.189198	0.129933	-0.245836
58	Veracruz	0.672225	0.760783	0.340938

Adicionalmente, se generaron los gráficos de influencias en 2 y 3 dimensiones (Figuras 26 y 27) con el objetivo de identificar las variables con el mayor efecto sobre los componentes. De esta manera, se observa que el %ARD tiene poca influencia sobre el componente 2, pero influye considerablemente a los componentes 1 y 3; la acidez libre influye medianamente en los 3 componentes, mientras que la humedad influye considerablemente sobre el componente 2 y presenta una menor influencia sobre los componentes 1 y 3. De esta forma, se interpreta que la humedad y la acidez libre están inversamente relacionadas, por lo que basta una de ellas para lograr una diferenciación entre muestras y puede apreciarse que el %ARD se relaciona inversamente con el binomio humedad-acidez libre.

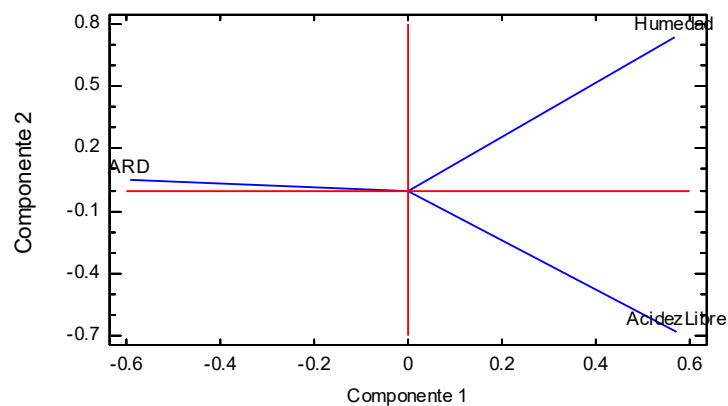


Figura 26. Gráfico de influencia 2-D de componentes para el análisis de componentes principales para mieles mexicanas.

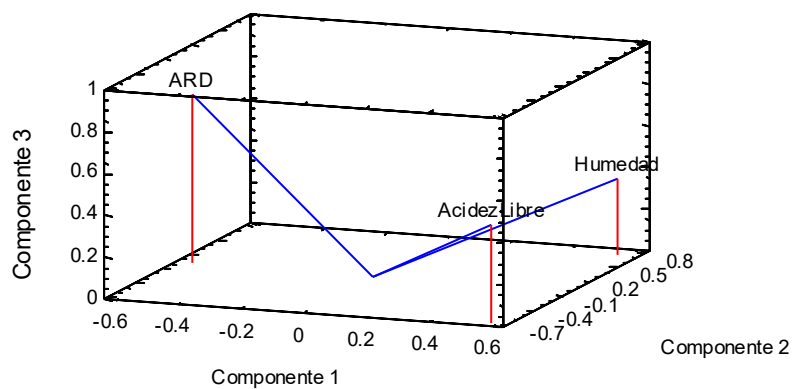


Figura 27. Gráfico de influencia 3-D de componentes para el análisis de componentes principales para mieles mexicanas.

Finalmente, se analizaron los gráficos de doble proyección (Figuras 28 y 29), en los que se superponen los gráficos de dispersión y de influencias con la finalidad de evaluar simultáneamente la estructura de los datos y las influencias de los componentes. Puede observarse que la agrupación de la mayoría de los datos en el centro de los gráficos mantiene una armonía entre las 3 variables analizadas, mientras que los puntos que se encuentran fuera de esta agrupación presentan dicho comportamiento debido a la fuerte influencia de las variables por separado. Además, los gráficos confirman que las diferentes muestras de mieles mexicanas forman diferentes agrupaciones con respecto a sus propiedades fisicoquímicas, y que éstas están relacionadas entre sí.

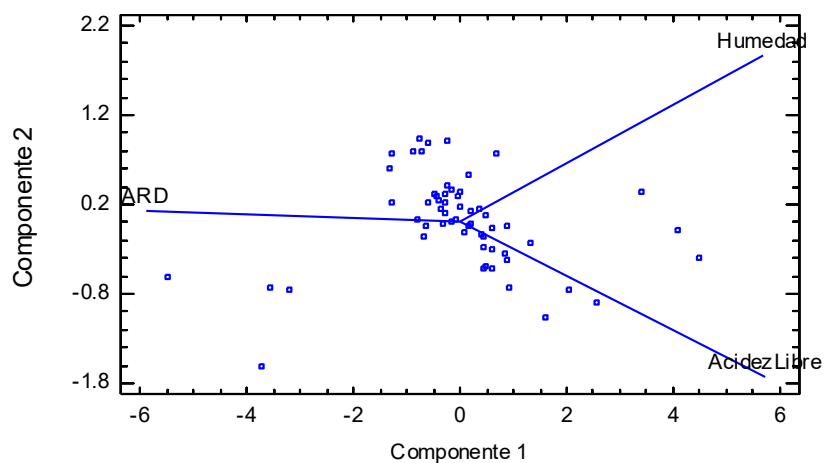


Figura 28. Gráfico de doble proyección para el análisis de componentes principales para mieles mexicanas.

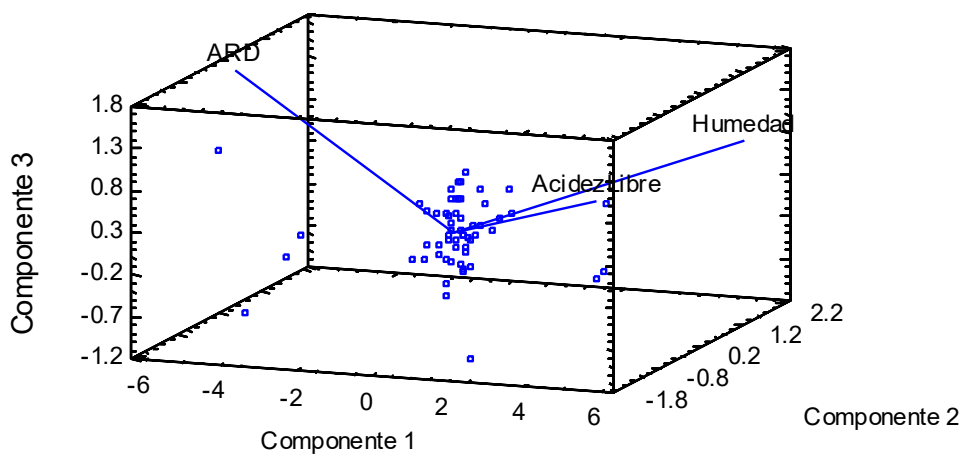


Figura 29. Gráfico de doble proyección 3-D para el análisis de componentes principales para mieles mexicanas.

7. CONCLUSIONES

- El presente trabajo permitió la implementación de métodos volumétricos en pequeña escala para la determinación de la acidez libre y el contenido de azúcares reductores en las mieles provenientes de *S. mexicana*.
- Se desarrolló un método analítico por HPLC para la cuantificación del contenido de hidroximetilfurfural en mieles meliponas mexicanas.
- La determinación de las características fisicoquímicas de las mieles permitió diferenciar las mieles provenientes de abeja melífera de las provenientes de abeja melipona, dado que los criterios de calidad para ambas difieren entre sí. Este trabajo representa una contribución para establecer los límites de calidad (inexistentes) para este tipo de mieles.
- El análisis por componentes principales (PCA) de las variables fisicoquímicas estudiadas revela que al menos dos variables (humedad y %ARD, o bien, acidez libre y %ARD) permiten proponer una clasificación de las mieles mexicanas en correlación con la zona geográfica.

8. PERSPECTIVAS

- Validar la metodología desarrollada para determinar el contenido de HMF en las muestras e incorporar los resultados obtenidos en el modelo estadístico generado.
- Determinar el índice de diastasa mediante el método espectrofotométrico descrito por Hadom.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Ávila, S.; Beux, M. R.; Ribani, R. H.; Zambiasi, R.C. (2018). ***Stingless bee honey: Quality parameters, bioactive compounds, healthpromotion properties and modification detection strategies***. Trends in FoodScience&Technology, 81, pp. 37-48.
- Ayala, R. (1999). ***Revisión de las abejas sin aguijón de México (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)***. Folia Entomológica Mexicana, 106, 128.
- Ayala, R.; González, V. H.; Engel, M. S. (2013). ***Mexican Stingless Bees (Hymenoptera: Apidae): Diversity, Distribution, and Indigenous Knowledge***. En Pot-Honey. A Legacy of Stingless Bee(pp. 135-148). Nueva York, Estados Unidos: Springer.
- Ball, D. W. (2007). ***The Chemical Composition of Honey***. Journal of Chemical Education, 84, 10, pp. 1643-1645.
- Biluca, F. C.; Braghini, F.; Gonzaga, L. V.; Oliveira-Costa, A. C.; Fett, R. (2016). ***Physicochemical profiles, minerals and bioactive compounds of stingless bee honey (Meliponinae)***. Journal of Food Composition and Analysis, 50, pp. 61-69.
- Bogdanov, S. (2011). ***The Honey Book***. Recuperado en 2020, de Bee-Hexagon Sitio web: <https://www.bee-hexagon.net/english/bee-products/downloads-honey-book/>
- Bona, E.; Março, H.; Valderrama, P. (2018). ***Chemometrics Applied to Food Control***. En Food Control and Biosecurity. Academic Press, pp. 105-129.
- Cahuich-Muñoz, O. (2018). ***Las abejas meliponas en la polinización de cultivos de importancia económica***. Memorias del 1er. Coloquio de Meliponicultura: liderazgo, territorio y tradición. Universidad Intercultural Maya de Quintana Roo, Quintana Roo, México, pp. 20-22.
- Chuttong, B.; Chanbang, Y.; Sringarm, K.; Burgett, M. (2016). ***Physicochemical profiles of stingless bee (Apidae: Meliponini) honey from South East Asia (Thailand)***. Food Chemistry, 192, pp. 149-155.
- Codex Alimentarius. (2001) Revised Codex Standards for Honey. Codex Standard 12–1981, Rev. 2.
- Da Silva, P. M.; Gauche, C.; Valdemiro G., L.; Oliveira C., A. C. (2016). ***Honey: Chemical composition, stability and authenticity***. Food Chemistry, 196, pp. 309-323.
- Dardón, M. J.; Enríquez, E. (2008). ***Caracterización fisicoquímica y antimicrobiana de la miel de nueve especies de abejas sin aguijón (Meliponini) de Guatemala***. Interciencia, 33, 12, pp. 916-922.

- Delmoro, J.; Muñoz, D.; Nadal, V.; Clementz, A.; Pranzetti, V. (2010). ***El color en los alimentos: determinación de color en mieles***. INVENIO, 13, 25, pp. 145-152.
- Fallico, B.; Zappalà, M.; Arena, E.; Verzera, A. (2004). ***Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys***. Food Chemistry, 85, pp. 305-313.
- Fermín, J. S.; Valdiviezo, M.; Giampaolo, O.; Simón, B. (2009). ***Control estadístico de procesos multivariantes en la industria Alimentaria: implementación a través del estadístico T²-hotelling***. Agroalimentaria, 15, 28, pp. 91-105.
- Gela, A.; Hora, Z. A.; Kebebe, D.; Gebresilassie, A. (2021). ***Physico-chemical characteristics of honey produced by stingless bees (Meliponulabeccarii) from Wers Showa zone of Oromia Region, Ethiopia***. Heliyon, 7, pp. 1-7.
- Ghramh, H. A.; Khan, K. A.; Zubair, A.; Ansari, M. J. (2020). ***Quality evaluation of Saudi honey harvested from the Asir province by using high-performance liquid chromatography (HPLC)***. Saudi Journal of Biological Sciences, 27, 8, pp. 2097-2105.
- Harun, K.; Edita S.; Nevzeta, A.; Nađa, M. (2021). ***Determination of Hydroxymethylfurfural Content (HMF) in Fresh Bee Honey Produced in Bosnia and Herzegovina (B&H) by HPLC DAD Method***. International Journal of Environmental Sciences and Natural Resources, 26, 5, pp. 154-159.
- Huidobro, J. F.; Simal, J. (1984). ***Contribución a la determinación de azúcares en la miel***. Anales de Bromatología, 36, 2, pp. 247-264.
- Lozano, V. A.; Boeris, M. S.; Scoles, G. E.; Pattacini, S. H.; Marchevsky, E. J.; Camiña, J. M. (2006). ***Evaluación de parámetros físicos y químicos en miel a través del uso de análisis de componentes principales***. Afinidad: Revista de química teórica y aplicada, 63, 521, pp. 40-44.
- Machado De-Melo, A. A.; Bicudo de Almeida-Muradian, L.; Sancho, M. T.; Pascual-Maté, A. (2018). ***Composition and properties of Apismellifera honey: A review***. Journal of Apicultural Research, 57, 1, pp. 5-23.
- Maione, C.; Barbosa, F. Jr.; Barbosa, R. M. (2019). ***Predicting the botanical and geographical origin of honey with multivariate data analysis and machine learning techniques: A review***. Computers and Electronics in Agriculture, 157, pp. 436-445.
- Márquez-Luna, J. (1994). ***Meliponicultura en México***. Dugesiana, 1, pp.3-12.
- Martínez González, E. G.; Pérez López, H. (2013). ***La producción de miel en el trópico húmedo de México: avances y retos en la gestión de la innovación***. México: Universidad Autónoma de Chapingo.
- Méndez P., K.; López V., E.; Portilla M., M. (2011). ***Estudio comparativo de las propiedades fisicoquímicas de miel natural y miel sometida a proceso comercial***. @Limentech Ciencia y Tecnología Alimentaria, 9, 1, pp. 14-21.

- Michener, C. D. (autor). Vit, P.; Pedro, S. R. M.; Roubik, D. W. (editores). (2013). **Pot-Honey. A legacy of stingless bees**. Nueva York, Estados Unidos: Springer Science + Business Media.
- Mohtar, L.; Hernández, N.; Maidana, J.; Leal, I.; Yegres, F. (2011). **Evaluación de la calidad de las mieles expendidas en Coro, estado Falcón, Venezuela**. *Multiciencias*, 11, 3, pp. 225-234.
- Nordin, A.; Sainik, N. Q. A. V.; Chowdhury, S. R.; Saim, A. B.; Idrus, R. B. H. (2018). **Physicochemical properties of stingless bee honey from around the globe: A comprehensive review**. *Journal of Food Composition and Analysis*, 73, pp. 91-102.
- Norma Mexicana NMX-F-036-981. Miel de abeja. Especificaciones. Diario Oficial de la Federación, Ciudad de México, 1981.
- Olivieri, A. C.; Rivas, G. A. (2011). **La química analítica en el siglo XXI**. *Ciencia Hoy*, 21, 124, pp. 51-56.
- Ormeño L., J. (2019). **Valoraciones melitopalínológicas, físico-químicas y sensorial de mieles obtenida por Apis mellifera L. (Hymenoptera: Apoidea) en ecosistemas de la cuenca del Bajo Mayo-San Martín**. Tesis doctoral. Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto, Escuela de Posgrado, Facultad de Ciencias Agrarias. Repositorio Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto.
- Oroian, M.; Sorina, R. (2017). **Honey authentication based on physicochemical parameters and phenolic compounds**. *Computers and Electronics in Agriculture*, 138, pp. 148-156.
- Pita-Calvo, C.; Guerra-Rodríguez, M. E.; Vázquez, M. (2017). **Analytical Methods Used in the Quality Control of Honey**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, pp. 690-703.
- Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-004-SAG/GAN-2018, Producción de miel y especificaciones. Diario Oficial de la Federación, Ciudad de México, 13 de septiembre de 2018.
- Quezada-Euán, J. J. G. (2018). **The Past, Present, and Future of Meliponiculture in Mexico**. En *Stingless Bees of Mexico. The Biology, Management and Conservation of an Ancient Heritage* (pp. 243-266). Estados Unidos: Springer, Cham.
- Quezada-Euán, J. J. G.; May-Itzá, W. J.; González-Acereto, J. A. (2001). **Meliponiculture in Mexico: problems and perspective for development**. *Bee World*, 82, 4, pp. 160-166.
- Reyes-González, A.; Camou-Guerrero, A.; Reyes-Salas, O.; Argueta, A.; Casas, A. (2014). **Diversity, local knowledge and use of stingless bees (Apidae: Meliponini) in the municipality of Nocupétaro, Michoacan, Mexico**. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 10, 47, pp. 1-11.

- Sánchez-Contreras, A.; Martínez-Benavidez, E. (2017). **Productos Apícolas: Miel y Polen**. En Inocuidad y Trazabilidad en los Alimentos Mexicanos (pp. 106-118). México: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.
- Sánchez-Tolentino, L.A.; Pérez-Sato, J.A.; Trejo-Téllez, L. I.; Sánchez-Páez, R.; Contreras-Oliva, A.; Hernández-Cázares, A. S.; Gómez-Merino, F. C. (2019). **Análisis distribucional de la abeja sin aguijón *Scaptotrigona mexicana* (Apidae: Meliponini) en México: Información de referencia para Veracruz**. Agro Productividad, 12, 8, pp. 67-72.
- Sesta, G.; Lusco, L. (2008). **Refractometric determination of water content in royal jelly**. Apidologie, Springer Verlag, 39, 2, pp. 225-232.
- Shapla, U. M.; Solayman, Md.; Alam, N.; Khalil, Md. I.; Gan, S. H. (2018). **5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health**. Chemistry Central Journal, 12, 35, pp. 1-18.
- Siedentopp, U. (2010). **La miel: producto alimenticio y medicinal eficaz contra la inflamación, la tos y la ronquera**. Revista Internacional de Acupuntura, 4, pp. 48-51.
- Simal, J.; Huidobro, J. F. (1984). **Parámetros de calidad de la miel: III. pH, acidez total, acidez láctica, total; relaciones e índice de formol**. Offarm, 3, 9, pp. 523-532.
- Solares L., C. K. (2013). **Estudio comparativo de los niveles de sacarosa y azúcares reductores (glucosa + fructosa) de la miel de abeja (*Apis mellifera*)**. Tesis de licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Repositorio del Sistema Bibliotecario de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Ulloa, J. A.; Mondragón-Cortez, P. M.; Rodríguez-Rodríguez, R.; Reséndiz-Vázquez, J. A.; Rosas-Ulloa, P. (2010). **La miel de abeja y su importancia**. Revista Fuente, 2, 4, pp. 11-17.
- Van Putten, R.-J.; Van der Waal, J. C.; De Jong, E.; Rasrendra, C. B.; Heeres, H. J.; De Vries, J. G. (2013). **Hydroxymethylfurfural, A Versatile Platform Chemical Made from Renewable Resources**. Chemical Reviews, 113, 3, pp. 1499-1597.
- Varmuza, K.; Filzmoser, P. (2009). **Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics**. Estados Unidos: Taylor & Francis Group.
- Velásquez, C. A.; Gil, J. H.; Urrego, J. F.; Durango, D.; Castañeda, I. M. (2016). **Análisis palinológico y fisicoquímico de miel de abejas (*Apis mellifera* L.) procedente de algunos municipios del oriente y suroeste de Antioquia (Colombia)**. Revista de la Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, 5, 2, pp. 65-87.

- Vit, P.; Medina, M.; Enríquez, M. E. (2004). **Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela**. Bee World, 85, 1, pp. 2-5.
- Viuda-Martos, M.; Ruiz-Navajas, Y.; Zaldivar-Cruz, J. M.; Kuri, V.; Fernández-López, J.; Carbonell-Barrachina, A. A.; Pérez-Álvarez, J. Á. (2010). **Aroma profile and physico-chemical properties of artisanal honey from Tabasco, Mexico**. International Journal of Food Science and Technology, 45, pp. 1111-1118.
- Zandamela, E. M. F. (2008). **Caracterización físico-química y evaluación sanitaria de la miel de Mozambique**. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària. Dipòsit Digital de Documents de la UAB, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Zappalà, M.; Fallico, B.; Arena, E.; Verzera, A. (2005). **Methods for the determination of HMF in honey: a comparison**. Food Control, 16, pp. 273-277.