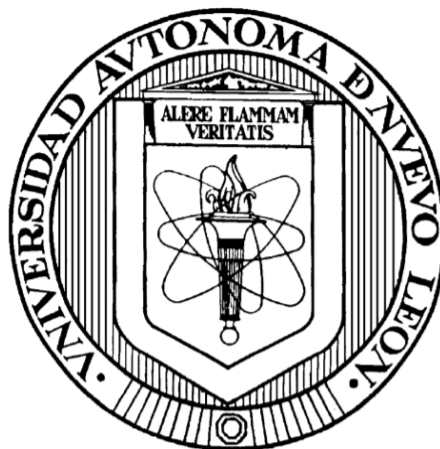


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE AMINOÁCIDOS Y COMPUESTOS
FENÓLICOS DE MIELES DE MÉXICO COMO ESTRATEGIA PARA LA
DETERMINACIÓN DEL ORIGEN GEOGRÁFICO.

Por

Q.C.B. SAMANTHA ARMIJO MARTÍNEZ

Como requisito parcial para obtener el grado de
Maestría en Ciencias con Orientación en Química Biomédica.

JUNIO 2022

“Análisis de los perfiles de aminoácidos y compuestos fenólicos de mieles de México
como estrategia para la determinación del origen geográfico”

Aprobación de la Tesis:



Dra. en C. Norma C. Cavazos Rocha

Directora de Tesis



Dr. en C. David Paniagua Vega

Codirector de Tesis



Dr. en C. Juan Ricardo Lucio Gutiérrez

Miembro de la Comisión



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

COLABORADORES

Dr. en C. Omar Jassiel Portillo Castillo

Dpto. Química Analítica. Facultad de Medicina.

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por nunca abandonarme en el camino de la vida y ser luz en ella.

A mí.

Por aceptar el reto y la oportunidad de demostrarme que soy capaz de realizar lo que me proponga.

A mis padres

Por darme todas las herramientas necesarias para llevar a cabo mis estudios, por su amor incondicional, apoyo moral y emocional.

A mi esposo

Por su apoyo y amor incondicional, por estar a mi lado en todo momento.

A mis hermanos

Por siempre estar conmigo y hacerme reír.

A la Dra. Norma

Por aceptar asesorarme en este proyecto, por la paciencia y escucharme en todo momento.

Al Dr. David Paniagua

Por todas las ideas, aportaciones y las ganas de sacar adelante este proyecto.

Al Dr. Ricardo Lucio

Por todo su tiempo y aprendizaje durante el análisis quimiométrico.

Al Dr. Omar Portillo

Por su tiempo dedicado en este proyecto y sus enseñanzas en el cromatógrafo.

A mis compañeros de trabajo

Por escucharme y motivarme cuando estuve en momento de cansancio.

Gracias a ustedes esta tesis fue posible.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Definición de la miel	1
1.2 Proceso de obtención de la miel	1
1.3 Composición y usos de la miel	2
1.3.1 Aminoácidos en la miel	4
1.3.2 Compuestos fenólicos en la miel	6
1.4 México como productor de miel	7
1.5 Normativa de la miel en México	10
1.6 Problemática de la adulteración de la miel	13
1.7 Metodología para verificar la autenticidad de la miel	14
1.7.1 Autenticidad de la miel en base a su origen geográfico	16
2. JUSTIFICACIÓN	19
3. OBJETIVO GENERAL	20
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
5. MATERIAL Y MÉTODOS	22
5.1 Reactivos	22
5.2 Equipos	23
5.3 Materiales	23
5.4 Metodología	24
5.4.1 Obtención de muestras	24

5.4.2	Confirmación del método cromatográfico	24
5.4.3	Análisis cromatográfico del perfil de aminoácidos	26
5.4.3.1	Tratamiento previo de las muestras para análisis de aminoácidos	26
5.4.3.2	Condiciones del método cromatográfico	27
5.4.4	Análisis cromatográfico del perfil de compuestos fenólicos ...	27
5.4.4.1	Tratamiento previo de las muestras para análisis de compuestos fenólicos	28
5.4.4.2	Condiciones del método cromatográfico	28
5.4.5	Análisis quimiométrico	29
5.4.6	Aplicación de la metodología desarrollada	29
6.	RESULTADOS	31
6.1	Obtención de muestras	31
6.2	Confirmación del método cromatográfico	32
6.3	Análisis cromatográfico del perfil de aminoácidos	43
6.4	Análisis cromatográfico del perfil de compuestos fenólicos	49
6.5	Análisis quimiométrico	55
6.6	Aplicación de la metodología desarrollada	62
7.	DISCUSIÓN	64
8.	CONCLUSIÓN	74
9.	PERSPECTIVAS	75
10.	BIBLIOGRAFÍA	76

LISTA DE TABLAS

Tabla	Nombre	Página
1	Composición nutrimental promedio de la miel	3
2	Especificaciones sensoriales de la miel	11
3	Especificaciones fisicoquímicas de la miel	12
4	Condiciones cromatográficas para el análisis de aminoácidos	27
5	Condiciones cromatográficas para el análisis de compuestos fenólicos	28
6	Identificación de las muestras de miel obtenidas	31
7	Tiempos de retención de aminoácidos presentes en la mezcla estándar.....	35
8	Tiempos de retención de compuestos fenólicos presentes en la mezcla estándar	36
9	Valores de DER de los t_R y áreas del análisis de aminoácidos de la muestra de miel 1 obtenidos para el análisis de repetibilidad	39
10	Valores de DER de los t_R y áreas del análisis de compuestos fenólicos de la muestra de miel 1 obtenidos para el análisis de repetibilidad.....	39
11	Valores de DER de los t_R y áreas del análisis de aminoácidos de la muestra de miel 1 obtenidos para el análisis de reproducibilidad	41
12	Valores de DER de los t_R y áreas del análisis de compuestos fenólicos de la muestra de miel 1 obtenidos para el análisis de reproducibilidad.....	41

13	Aminoácidos en muestras de miel de 8 estados de México	48
14	Compuestos fenólicos en muestras de miel de 8 estados de México....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura	Nombre	Página
1	Producción de miel por entidades federativas 2003 a 2019	9
2	Formas de adulteración en la miel	13
3	Cromatograma de blanco de derivatización obtenido bajo las condiciones cromatográficas del método de análisis de aminoácidos	33
4	Cromatograma de blanco de fase móvil obtenido bajo las condiciones cromatográficas del método de análisis de compuestos fenólicos	33
5	Cromatograma de la mezcla de estándares de aminoácidos	34
6	Cromatograma de la mezcla de estándares de compuestos fenólicos	34
7	Cromatograma del perfil de aminoácidos de muestra de miel 1	37
8	Cromatograma del perfil de compuestos fenólicos de muestra de miel 1..	38
9	Intensidad del área de la señal de alanina de la muestra 1 al día 1, 3 y 8 de análisis por CLAR	42
10	Intensidad del área de la señal de ácido gálico de la muestra 1 al día 1, 3 y 8 de análisis por CLAR	42
11	Cromatograma del perfil de aminoácidos de miel de Sonora	44
12	Cromatograma del perfil de aminoácidos de miel de Yucatán	44
13	Cromatograma del perfil de aminoácidos de miel de Nuevo León	45
14	Cromatograma del perfil de aminoácidos de miel de Tamaulipas	45
15	Cromatograma del perfil de aminoácidos de miel de Jalisco	46
16	Cromatograma del perfil de aminoácidos de miel de Puebla	46

17	Cromatograma del perfil de aminoácidos de miel de Oaxaca	47
18	Cromatograma del perfil de aminoácidos de miel de Quintana Roo.....	47
19	Cromatograma del perfil de compuestos fenólicos de miel de Sonora.....	50
20	Cromatograma del perfil de compuestos fenólicos de miel de Yucatán....	50
21	Cromatograma del perfil de compuestos fenólicos de miel de Nuevo León	51
22	Cromatograma del perfil de compuestos fenólicos de miel de Tamaulipas	51
23	Cromatograma del perfil de compuestos fenólicos de miel de Jalisco	52
24	Cromatograma del perfil de compuestos fenólicos de miel de Puebla.....	52
25	Cromatograma del perfil de compuestos fenólicos de miel de Oaxaca.....	53
26	Cromatograma del perfil de compuestos fenólicos de miel de Q. Roo	53
27	Gráfico de scores obtenido del PCA del perfil de aminoácidos	56
28	Gráfico de scores obtenido del PCA del perfil de compuestos fenólicos...	56
29	Gráfico de los perfiles obtenidos con el vector extendido para 32 muestras	57
30	Gráfico del vector extendido con corrección de escalado y línea base	58
31	Cromatograma de la muestra referencia	59
32	Señal de ácido aspártico antes y después de aplicar el algoritmo cow.....	60
33	Gráfico de scores obtenido del PCA de perfiles combinados	61
34	Gráfico de loadings obtenido del PCA	62
35	Gráfico del modelo de predicción de 5 muestras de miel	63

NOMENCLATURAS Y SÍMBOLOS

Abreviatura	Significado
% p/p	Porcentaje peso/peso
μL	Microlitros
μm	Micrómetros
ACA	Ácido cafeico
ACU	Ácido cumárico
AE	Ácido elágico
AG	Ácido gálico
Ala	Alanina
AP	Ácido protocatehuico
API	Apigenina
AR	Ácido Rosmarínico
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
AT	Ácido transferúlico
C	Catequina
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
Cow	Desplazamiento Optimizado de Correlación
DER	Desviación Estándar Relativa
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
Fig	Figura
FLD	Detector de fluorescencia
FM	Fase móvil
Gaba	Ácido gamma aminobutírico
GEC	Galato de epigalocatequina
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
His	Histidina
HMF	Hidroximetilfurfural
Ile	Isoleucina
IR	Infrarrojo
K	Kaempferol
Kg	Kilogramo
L	Luteolina
Leu	Leucina

Lys	Lisina
M	Mircetina
meq	Miliequivalentes
Met	Metionina
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mS	Micro Siemens
EM	Espectrometría de masas
nm	Nanómetros
Orn	Ornitina
PCA	Análisis de Componentes Principales
PFP	Pentafluorofenil propil
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
Q	Quercetina
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
Ser	Serina
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
tp	Tamaño de partícula
THF	Tetrahidrofurano
Thr	Treonina
t _R	Tiempo de retención
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
UV	Ultravioleta
Val	Valina
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
λ_{ex}	Longitud de onda de excitación

RESUMEN

Introducción: La miel es un alimento al que se le atribuyen propiedades benéficas para la salud, sin embargo, es objeto de múltiples estrategias de adulteración, tanto de su composición como de su origen geográfico, por lo que es necesario el desarrollo de metodologías que permitan su identificación. En este trabajo se realizó el análisis de perfiles de aminoácidos y de compuestos fenólicos de 37 muestras de mieles de México por CLAR aplicando herramientas quimiométricas, como estrategia para la determinación del origen geográfico.

Metodología: Se obtuvo el perfil cromatográfico de aminoácidos y compuestos fenólicos de 37 muestras de miel de 8 estados de México por CLAR. Se realizó un análisis quimiométrico de los datos y se evaluó la orientación de las muestras en base a sus perfiles y la región de origen en el PCA, se observó si existían agrupaciones o señales características por estados del país.

Resultados: Se identificaron al menos 14 aminoácidos y 6 compuestos fenólicos en la mayoría de las muestras. Muestras del estado de Oaxaca y Yucatán presentaron mayor cantidad de Phe, mientras que muestras de Sonora, Nuevo León y Tamaulipas presentaron en mayor proporción la Asp y Asn. La muestra de Jalisco presentó en su mayoría Ala y la de Puebla Leu. En ninguna muestra se identificó la presencia de Val y Lys. Todas las muestras de miel presentaron en su mayoría ácidos fenólicos correspondientes a AG, AR y AT. Las muestras de Sonora, Nuevo León y Jalisco presentaron mayor AR, y las muestras de Yucatán mayor cantidad de AG y AT.

Conclusiones: El análisis quimiométrico de los resultados, permitió observar tendencias en base a señales características que pudieran ayudar en la distinción entre zona sur y norte de México, sin embargo, es necesario incluir mayor número de muestras y regiones que permitan un mayor alcance en la clasificación. Este estudio representa un primer acercamiento en las nuevas estrategias de detección e identificación de marcadores químicos para establecer una huella dactilar en mieles de México.



Dra. en C. Norma C. Cavazos Rocha

Directora de Tesis

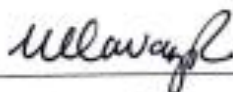
ABSTRACT

Introduction: Honey is a food to which beneficial properties for health are attributed, however, it is subject to multiple adulteration strategies, both in terms of its composition and its geographical origin, which is why it is necessary to develop methodologies that allow its identification. . In this work, the analysis of amino acid profiles and phenolic compounds of 37 honey samples from Mexico was carried out by HPLC applying chemometric tools, as a strategy for determining the geographical origin.

Methodology: The chromatographic profile of amino acids and phenolic compounds of 37 samples of honey from 8 states of Mexico was obtained by HPLC. A chemometric analysis of the data was carried out and the orientation of the samples was evaluated based on their profiles and the region of origin in the PCA, it was observed if there were groupings or characteristic signals by states of the country.

Results: At least 14 amino acids and 6 phenolic compounds were identified in most of the samples. Samples from the state of Oaxaca and Yucatán had a higher amount of Phe, while samples from Sonora, Nuevo León and Tamaulipas had a higher proportion of Asp and Asn. The sample from Jalisco presented mostly Ala and the one from Puebla Leu. The presence of Val and Lys was not identified in any sample. All the honey samples presented mostly phenolic acids corresponding to AG, AR and AT. The samples from Sonora, Nuevo León and Jalisco presented higher AR, and the samples from Yucatán had a higher amount of AG and AT.

Conclusions: The chemometric analysis of the results allowed us to observe trends based on characteristic signals that could help distinguish between the southern and northern zones of Mexico, however, it is necessary to include a greater number of samples and regions that allow a greater scope in the classification. This study represents a first approach in the new strategies of detection and identification of chemical markers to establish a fingerprint in honeys from Mexico.



Dra. en C. Norma C. Cavazos Rocha

Directora de Tesis

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Definición de la miel

La miel según el Codex Alimentarius, es la sustancia dulce natural producida por abejas *Apis mellifera* a partir del néctar de las plantas o de secreciones de partes vivas de éstas, o de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de las mismas y que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, y depositan, deshidratan, almacenan y dejan en el panal para que madure y añeje.

En cuanto a la miel obtenida del néctar de las flores, se puede clasificar según la principal fuente de donde las abejas lo recolectan, y se puede diferenciar en monofloral, cuando en su composición predomina una especie botánica, y en multifloral, cuando en su composición están presentes dos o más especies florales (FAO, 2019).

1.2 Proceso de obtención de la miel

El proceso de obtención desde el néctar hasta la miel es realizado por abejas obreras, las cuales, son atraídas por el néctar de las flores, en donde lo liban a través de su lengua para almacenarlo en el buche y posteriormente viajar a la colmena. Una vez que llegan a la colmena, las abejas receptoras inician la maniobra de aireación, con la finalidad de ir eliminando el agua presente, haciéndolo más viscoso y espeso, y así, estar listo para almacenarse en las celdillas del panal; en este proceso, las abejas también van agregando enzimas que ayudan a la conversión de los azúcares del néctar en otros azúcares, por tanto, la maduración ocurre por procesos físicos y químicos.

Una vez que el contenido de agua es inferior al 20%, las abejas operculan las celdas con una capa de cera, y de esta forma es considerada “madura” y se evita que absorba la humedad que pueda existir dentro de la colmena. Finalmente, cuando la miel ha sido operculada, es maniobra de los apicultores implementar buenas prácticas para llevar a cabo los procesos de desoperculado, extracción, colado, sedimentación y envasado (FAO, 2009).

1.3 Composición y usos de la miel

La composición de la miel puede presentar variabilidad en su color, aroma, sabor, humedad, azúcares, y otros componentes, ya que esto depende de diversos factores durante el proceso de su producción.

La región geográfica y el origen botánico del cual las abejas han extraído el néctar para elaborar la miel, son parte de los principales contribuyentes en la diversidad de la composición fisicoquímica de este alimento. Sin embargo, a pesar de la variabilidad, se han reportado composiciones promedio como se muestra en la Tabla 1 (PROFECO, 2001).

La miel, al ser un producto con alto valor nutricional y presentar beneficios para la salud, se considera como un alimento nutracéutico. Es utilizada como un complemento alimenticio natural y, además, su uso en la industria como ingrediente en productos cosméticos y farmacéuticos ha aumentado, ya que se ha establecido como un potente agente antioxidante y antiinflamatorio (Luchese, 2017).

Tabla 1. Composición nutrimental promedio de la miel.

Nutriente	Cantidad promedio en 100 g
Agua	17.10 g
Carbohidratos (totales)	82.40 g
Fructosa	38.50 g
Glucosa	31.00 g
Maltosa	7.20 g
Sucrosa	1.50 g
Proteínas, aminoácidos, vitaminas y minerales	0.50 g
Grasas (Lípidos)	0.00 g
Vitaminas y Minerales	
Calcio	4.40 – 9.20 mg
Cobre	0.00 – 0.10 mg
Fierro	0.06 – 1.50 mg
Magnesio	1.20 – 3.50 mg
Manganeso	0.02 – 0.40 mg
Fósforo	1.90 – 6.30 mg
Potasio	13.20 – 16.80 mg
Sodio	0.00 – 7.60 mg
Zinc	0.03 – 0.40 mg
Riboflavina	< 0.06 mg
Niacina	< 0.36 mg
Piridoxina (B6)	< 0.32 mg
Ácido ascórbico	2.20 – 2.40 mg

Por otro lado, la medicina moderna ha probado la utilidad de la miel en tratamientos, como por ejemplo, en la cicatrización de heridas, ya que presenta actividad antibacteriana y antifúngica (Haile et al., 2017). Por este motivo, el estudio de los analitos responsables de la actividad funcional de este alimento constituye un área importante para la investigación e innovación.

Actualmente se han reportado más de 300 sustancias bioactivas en la miel, las cuales son responsables de sus propiedades funcionales y características tan específicas, además de intervenir en la calidad de esta; ejemplo de estos compuestos son los aminoácidos y los compuestos fenólicos (Se et al., 2019).

1.3.1 Aminoácidos en la miel

Los aminoácidos son moléculas orgánicas que están conformadas por un grupo amino en uno de los extremos de la molécula, y un grupo carboxilo en el otro extremo, estos grupos están separados entre sí por un único átomo de carbono, que es llamado carbono alfa. Este carbono se une a un átomo de hidrógeno y a una cadena lateral denominada cadena R, y en base a esta cadena, es su naturaleza química y las propiedades que presentarán, como su carga neta, solubilidad, reactividad química y potencial para formar puentes de hidrógeno, o características de cuando forma parte de un polipéptido.

Los aminoácidos pueden clasificarse en base al carácter de sus cadenas laterales como polares con carga, polares sin carga, no polares o cadenas con propiedades únicas; sin embargo, existen otras clasificaciones, como por ejemplo, en base al carácter nutricional (esenciales y no esenciales), y también por la forma en la que se encuentran en la naturaleza, ya que se pueden encontrar de forma libre o formando péptidos y proteínas (Badui, 2006).

Los aminoácidos libres presentan bajo peso molecular, de esta manera, las plantas son capaces de asimilarlos de forma rápida, por tanto, son de gran importancia en la nutrición de estas. Debido a esto, al estar presente de manera libre en las plantas, la aportación y

presencia de estas moléculas en el proceso de la recolección del néctar por parte de las abejas y su posterior transformación en miel es importante, ya que adquiere características del origen de donde se recolectó el néctar.

Los aminoácidos en la miel representan aproximadamente el 1% p/p, donde la cantidad de aminoácidos libres totales corresponde entre 10 y 200 mg/100 g, siendo la prolina el aminoácido que se encuentra en mayor proporción, ya que corresponde aproximadamente a un 50% de este contenido (Iglesias, 2004), de hecho, un contenido de prolina más bajo de lo habitual es un marcador clave para describir la miel adulterada. La legislación europea ha establecido que la miel debe tener un contenido mínimo de prolina superior a 180 mg/kg, y cualquier desviación de este estándar se debe a la falta de maduración o una adulteración de la miel.

Además de la prolina, hay 26 aminoácidos en las mieles, y sus proporciones relativas dependen de su origen (néctar o mielada). Dado que el polen es la principal fuente de aminoácidos de la miel, el perfil de aminoácidos de una miel podría ser característico de su origen botánico y geográfico (Álvarez, 2010). Los principales aminoácidos que han sido identificados en la miel de diferente origen botánico y geográfico son: ácido glutámico (Glu), ácido aspártico (Asp), asparagina (Asn), serina (Ser), glutamina (Gln), histidina (His), glicina (Gly), treonina (Thr), alanina (Ala), arginina (Arg), ácido gamma-aminobutírico (Gaba), prolina (Pro), tirosina (Tyr), valina (Val), metionina (Met), cisteína (Cis), isoleucina (Ile), leucina (Leu), triptófano (Trp), fenilalanina (Phe), ornitina (Orn) y lisina (Lys) (Álvarez, 2010).

1.3.2 Compuestos fenólicos en la miel

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios derivados de plantas, tienen uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático, y son biosintetizados principalmente para la protección contra el estrés y el daño oxidativo. Son considerados un grupo importante en cuanto a las propiedades funcionales de la miel, son compuestos bioactivos que provienen del polen presente en las flores de donde las abejas recolectan el néctar para elaborar la miel, por lo que se ha reportado que estos compuestos son útiles para identificar el origen geográfico y floral de las mieles en procesos de trazabilidad. (Kaškonienė et al, 2010).

Los compuestos fenólicos que predominan en la miel se pueden clasificar en dos familias principales, los ácidos fenólicos y los flavonoides. Los ácidos fenólicos se dividen en dos subclases que son: ácidos benzoicos y ácidos cinámicos, mientras que los flavonoides se dividen en tres clases: flavonoles, flavonas y flavanonas (Ciulu et al., 2016).

Las diferencias cualitativas y cuantitativas en el perfil fenólico de mieles pertenecientes a diferentes fuentes florales son una consecuencia directa de la variabilidad natural de esos compuestos en las plantas de las que se originan, de esta forma, las mieles de diferentes orígenes han mostrado una amplia gama de propiedades promotoras de la salud como actividad antibacteriana, antioxidante, y captadora de radicales; y por otro lado, como se mencionó anteriormente, se han descrito intentos de atribución de origen floral y geográfico de acuerdo con las diferencias en los perfiles fenólicos (Ciulu et al., 2016).

Los compuestos fenólicos que mayormente se han reportado en la composición de la miel son los ácidos fenólicos, como el ácido cafeico, el ácido gálico y el ácido ferúlico (Lawag, 2022), mientras que los flavonoides que predominan son la mircetina, kaempferol, quercetina, pinobanksina y galangina. En cuanto a las flavonas presentes están: genkwanin, luteolina, apigenina y tricetina; y por último como flavanonas se han reportado la pinocembrina y pinostrobina (Rodríguez et al., 2012).

1.4 México como productor de miel

En México, la producción de miel se desarrolla en todas las entidades federativas, actualmente se encuentra en el octavo lugar a nivel mundial como productor de miel, y en el quinto lugar como exportador, con una producción de 61 mil toneladas y una exportación anual promedio de 33 mil toneladas en el año 2019 (SADER, 2020). Existe gran diversidad de climas y floraciones en México, de manera que se registran diversos grados de desarrollo de los apicultores, con gran variedad en su producción de mieles en cuanto a características como por ejemplo color, aroma, humedad y composición química (SADER, 2010) (Baena-Díaz, 2021). A nivel nacional se reconocen 5 regiones apícolas, clasificadas en base a características similares de este alimento, correspondientes a la Región Norte, Golfo, Costa del Pacífico, Altiplano y la Península de Yucatán.

Región Norte: los estados que la conforman son Baja California, Baja California Sur, Sonora, Chihuahua, Durango, Zacatecas, Coahuila, Nuevo León y partes del norte de Tamaulipas y del altiplano de San Luis Potosí. Representa el 7.4% de la producción nacional promedio, y se caracteriza principalmente por miel de mezquite, de color ámbar extra clara, cuya producción en su mayoría se destina al mercado de Estados Unidos.

Región Golfo: se compone por el estado de Veracruz y parte de los estados de Tabasco, Tamaulipas y la región Huasteca de San Luis Potosí, Hidalgo y Querétaro. Esta región representa en promedio el 9% de la producción nacional. Posee una gran producción de miel de cítricos, de colores ámbar clara, producida principalmente a partir de la flor del naranjo, sin embargo también se obtienen mieles de color oscuro.

Región Costa del Pacífico: la conforman los estados de Sinaloa, Nayarit, poniente de los estados de Jalisco y Michoacán, Colima, así como las regiones costeras de los estados de Guerrero, Oaxaca y Chiapas. Esta región representa en promedio el 21.4% de la producción nacional. Es caracterizada por producir mieles multiflorales y de mangle, de color oscuro principalmente, aunque también se obtienen de color ámbar.

Región Altiplano: la región se compone de los estados de Tlaxcala, Puebla, Morelos, Guanajuato, Aguascalientes, Estado de México, la parte oriente de los estados de Jalisco, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas; parte poniente de Hidalgo y Querétaro; la región media de San Luis Potosí, así como las delegaciones rurales de la Ciudad de México. Esta región representa en promedio el 29.8% de la producción nacional. Se distingue por mieles color ámbar y ámbar clara, algunas son llamadas “miel mantequilla” por su consistencia; el origen principal es multiflora y tiene mucha demanda del mercado europeo.

Región Península de Yucatán: está conformada por los estados de Campeche, Yucatán y Quintana Roo y parte de los estados de Chiapas (Noreste) y Tabasco (Oriente). Esta región representa en promedio el 32.4% de la producción nacional, y es considerada

la más importante en cuanto a volumen de producción de miel, y por ubicar a la mayor parte de las colmenas del país.

En la Fig. 1 se muestra la producción de miel de las entidades federativas con mayor producción durante el periodo 2003 a 2019, considerando la producción de toneladas de miel por año según los datos registrados por el Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Los datos confirman que la mayor producción corresponde a la región de la Península de Yucatán, así mismo es la región que más miel exporta.

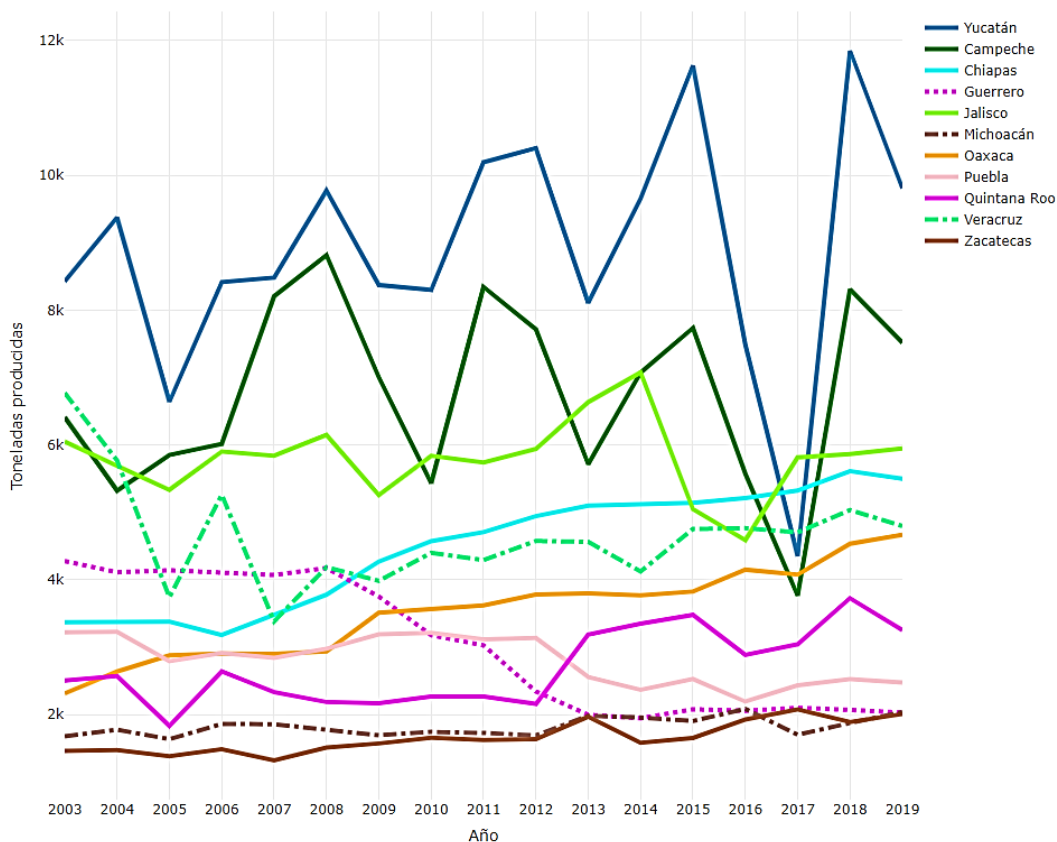


Figura 1. Producción de miel por entidades federativas 2003 a 2019 (SIAP).

En la última década, el valor de las exportaciones de la miel de México ha crecido de forma consistente, sin embargo, el incremento en los precios internacionales contrasta con

el valor de la producción nacional donde en el periodo 2000 - 2014 únicamente se ha incrementado en 1%. Esta realidad genera desincentivos para el primer eslabón de la cadena productiva de la miel. Por tanto, para incrementar la productividad y competitividad del sector apícola, se requiere fortalecer la base y organización productiva de la cadena, mediante el diseño e implementación de acciones y políticas públicas eficientes y eficaces con mayor focalización a la especialización agroindustrial; además, se requiere la participación de las instituciones académicas y de investigación aplicada. (Ramos-Díaz et al., 2016). Por lo anterior, es una necesidad la implementación de un sistema de trazabilidad en este campo, ya que es la base para determinar la autenticidad de la miel, así como determinar su origen geográfico, lo cual conferiría ventaja a productores y comerciantes.

1.5 Normativa de la miel en México

La miel, al ser un producto tan importante desde el punto de vista nutricional y comercial, requiere regulación en cuanto a su control de calidad. Actualmente, a nivel internacional, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO) ha establecido el Codex Alimentarius para la miel, el cual rige las especificaciones que debe cumplir este producto, en donde se contempla la determinación del contenido de humedad, la determinación del contenido de azúcares (suma de fructosa y glucosa), contenido de sacarosa, determinación del contenido de sólidos insolubles en agua, y la determinación de la conductividad eléctrica, como forma de saber su autenticidad. Como factores adicionales de composición y calidad de la miel, se hace referencia a la evaluación de la acidez libre, la cual no podrá superar los 50 meq/kg, la actividad de la diastasa, que

no debe ser inferior a 8 unidades Schade y el contenido de hidroximetilfurfural que no debe ser mayor a 40 mg/kg en regiones no tropicales (FAO, 2019).

En México, se cuenta con la Norma Oficial Mexicana NOM-004-SAG/GAN-2018, producción de miel y especificaciones, de la secretaría de agricultura y ganadería, en donde se establecen las condiciones que debe cumplir la producción y comercialización de miel, la cual incluye características sensoriales, fisicoquímicas y el estudio melisopolinológico de la miel, este último se basa en la concentración de palinomorfos contenidos en la miel previamente diluida en agua, seguido de una acetólisis, para hacer la identificación de los granos de polen de las plantas de donde las abejas recolectan el néctar (NOM-004, 2018).

En cuanto a las especificaciones sensoriales que involucra la normativa mexicana, establece que la miel no debe tener signos de fermentación (excepto la miel de mangle) ni sabores y olores absorbidos de materias extrañas durante su producción, extracción, sedimentación, filtración, envasado y/o almacenamiento, y deberá presentar las siguientes características:

Tabla 2. Especificaciones sensoriales de la miel.

Parámetro	Criterio
Color	Propio característico derivado de la vegetación de origen, variable de: blanco agua, extra blanco, blanco, extra claro, ámbar claro, ámbar y 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.

Además de las especificaciones sensoriales, la miel debe cumplir con las siguientes especificaciones físicas y químicas:

Tabla 3. Especificaciones fisicoquímicas de la miel.

Parámetro	Criterio
Contenido de fructosa y glucosa (suma de ambas).	Mínimo 60 g /100 g.
Contenido de sacarosa % (g/100g).	Máximo 5.00 %
Contenido de Humedad % (g/100g).	Máximo 20.00%
Contenido de Humedad para miel de mangle % (g/100g).	Máximo 21.00%
Sólidos insolubles en agua % (g/100g).	Máximo 0.10 %
Conductividad eléctrica (mS/cm).	Máximo 0.80 mS/cm
Ácidos libres.	Máximo 50.00 meq / kg
Hidroxiacetilfurfural (HMF) de miel de origen declarado procedente de regiones de clima tropical.	Máximo 80.00 mg / kg
Hidroxiacetilfurfural (HMF) de miel en general.	Máximo 40.00 mg / kg
Índice diastásico de miel en general.	8 unidades Schade mín.
Índice diastásico de miel con bajo contenido de enzimas naturales y un contenido de HMF.	No superior a 15 mg / kg Mín. 3 unidades Schade

En cuanto al método melisopalinológico incluido en la normativa mexicana, se puede obtener información acerca del origen botánico y geográfico de las mieles, además de ser una herramienta para detectar contaminación por hollín, polvo, levaduras y otras partículas generalmente no presentes en la miel, ya que se basa en el análisis microscópico cualitativo y cuantitativo de palinomorfos contenidos en la miel, previamente diluida en agua, en donde a través de la identificación taxonómica y conteo de los granos de polen acetolizados y naturales, se llega a la determinación del origen geográfico y botánico, al emplear literatura especializada y comparación con muestras palinológicas de referencia (NOM-004, 2018).

1.6 Problemática de la adulteración de la miel

Debido a su gran valor nutracéutico y a su alta demanda, la miel es blanco de muchas adulteraciones. Se ha encontrado que es el tercer producto más adulterado, lo cual afecta tanto al comercio como a la salud de los consumidores (Olmsted, 2016). Dicha adulteración puede ser mediante tres métodos diferentes y utilizando diferentes adulterantes como se muestra en la Fig. 2 (Se et al., 2019):

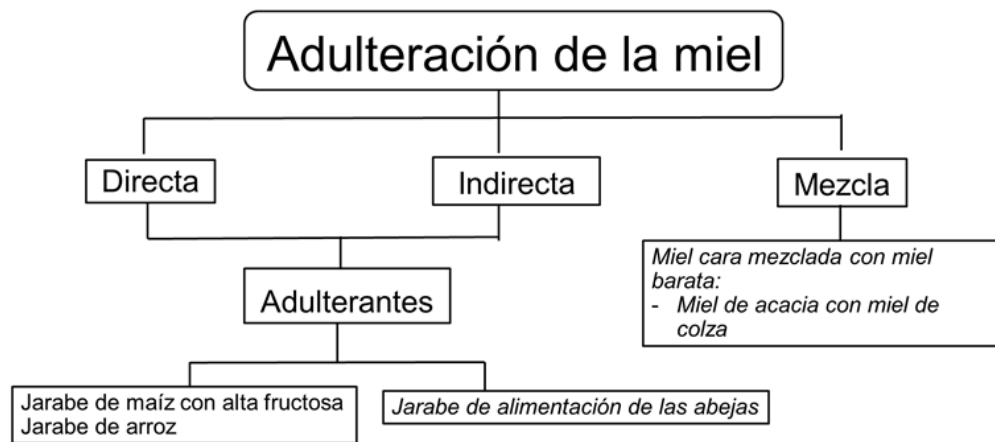


Figura 2. Formas de adulteración en la miel (Se et al., 2019).

La adulteración de manera directa puede resultar por la adición de jarabes de diferentes orígenes a la composición original de la miel; es así como dentro de un origen geográfico específico, la rentabilidad y la disponibilidad de azúcares o edulcorantes son los factores decisivos para su selección como adulterantes. Sin embargo, la miel adulterada no es sólo limitada a la adición directa de azúcares, ya que también puede extenderse a la alimentación indirecta de colonias de abejas melíferas con soluciones concentradas de azúcar durante la temporada principal de flujo de néctar. Por otro lado, la mezcla de miel cara (pura y rara) con una miel más barata (abundante) es otra forma de

adulteración de la miel, tal fraude se ha reportado, por ejemplo, para la miel de acacia, la cual es más costosa, y a menudo se mezcla con miel de colza que tiene un menor valor, esto con la intención de obtener mayores ganancias (Se et al., 2019).

Actualmente, a nivel nacional e internacional, existe otro fraude relacionado con el origen geográfico en la industria apícola, ya que hay miel importada de otros países, principalmente por China, que es re-etiquetada y vendida como producto de origen nacional a un precio muy bajo (Trifković et al., 2017). En consecuencia, la discriminación del origen de la miel en nuestro país y la diferenciación entre una miel adulterada y pura se convierte en un tema muy importante ya que impacta de manera negativa a la industria apícola mexicana afectando la economía de los productores nacionales (Baena-Díaz, 2021). Por este motivo, es necesario el desarrollo de métodos apropiados que garanticen una competencia leal entre los productores de miel y puedan estar protegidos contra el fraude.

1.7 Metodologías para verificar la autenticidad de la miel

La composición de la miel depende de muchos factores, por ejemplo, el tipo de especie de plantas que proporcionan el néctar, el área geográfica, la temporada y la forma de almacenamiento, ya que pueden tener un efecto en la variabilidad de sus componentes químicos.

Las metodologías que más se utilizan para confirmar la autenticidad de la miel, consisten en evaluar parámetros fisicoquímicos, como la cantidad de HMF, la actividad de diastasa, la relación fructosa/glucosa; sin embargo, todos estos parámetros pueden

pasar desapercibidos en algunas mieles adulteradas, debido a que la adulteración no está sujeta solamente a la adición de contaminantes, sino también, a un mal etiquetado y/o a la mezcla de mieles más baratas y de menor calidad.

En ese sentido, se han desarrollado numerosos métodos analíticos utilizando técnicas isotópicas, espectroscópicas, cromatográficas y electroquímicas (Gallardo, 2009) (Tosun, 2013) (Xue, 2013), los cuales están enfocados en la detección de adulterantes como jarabes de maíz de alta fructosa, azúcares invertidos, sucralosa y jarabes de arroz; con la finalidad de complementar la evaluación de los parámetros fisicoquímicos de calidad de la miel. Sin embargo, aún con la aplicación de estos métodos, el producto modificado puede presentar características y propiedades muy similares a la miel no adulterada, y no siempre es posible detectar problemas que surgen constantemente, como la detección de productos adulterados por mezcla de mieles de diferentes orígenes (Se et al., 2019).

Debido a la problemática actual en cuanto a la adulteración y la normativa existente, en donde no se incluyen parámetros que nos guíen hacia la autenticidad de la miel en base a su origen; el reporte de nuevas metodologías para la identificación de su autenticidad ha aumentado a través de los años, ya que se pasó de tener 1500 publicaciones sobre este enfoque en el año 2006, a tener 8000 publicaciones en el 2016 (Trifković et al., 2017).

Las metodologías para determinar la autenticidad de la miel pueden estar orientadas a dos enfoques: mediante la detección de adulterantes o residuos químicos y, por otro lado, mediante la identificación del origen geográfico y/o botánico. En cuanto al primer enfoque de detección de autenticidad, basado en detección de adulterantes o residuos químicos, se

ha reportado que la adición de algunos jarabes emergentes ha sido un gran reto en cuanto a su identificación, debido a que el producto modificado puede mostrar propiedades muy similares a la miel no adulterada (Chin, 2020), de esta manera, se han ido buscando alternativas de autenticidad mediante la identificación del origen geográfico o botánico de la miel.

1.7.1 Autenticidad de la miel en base a su origen geográfico

Debido a las limitaciones de las técnicas de autenticación clásicas mencionadas en el apartado 1.7, se han buscado otros enfoques usando métodos analíticos modernos más fiables para determinar los orígenes botánicos y geográficos de la miel. Los estudios incluyen la medición del perfil de carbohidratos, el contenido mineral, el perfil de compuestos fenólicos, perfil de aroma y el perfil de aminoácidos, utilizando herramientas analíticas como técnicas cromatográficas, técnicas basadas en espectrometría de masas (EM), espectroscopía vibracional como infrarroja (IR) y técnicas Raman, resonancia magnética nuclear (RMN) y análisis de isótopos estables.

La caracterización del perfil de analitos como los aminoácidos y compuestos fenólicos, mediante la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), ha sido útil para la determinación del origen geográfico y botánico (Akbari et al., 2020) (Sun et al., 2017), ya que se puede establecer una huella dactilar del perfil de estos compuestos, mediante el uso de quimiometría, y de esta manera conducir al reconocimiento del patrón de una muestra.

La quimiometría es un campo interdisciplinario que involucra el análisis multivariable, el uso de modelos matemáticos, informáticos y la química analítica para el análisis de datos, en donde, a partir de perfiles cromatográficos, se obtiene un nuevo modelo matemático que consigue que los datos tomen forma a través de las estadísticas y el reconocimiento de patrones, lo cual es útil en la interpretación de la información, y a su vez ayuda a analizar la relación de los diferentes perfiles de analitos como los aminoácidos y compuestos fenólicos con su origen. Este análisis de componentes minoritarios en la miel, combinado con el uso de la quimiometría, ha sido optado por diferentes países, con el fin de contribuir a la identificación del origen geográfico como estrategia de autenticidad de la miel (Sun et al., 2017).

En un estudio publicado en China se obtuvo el perfil de aminoácidos libres de mieles chinas de 5 orígenes florales diferentes aplicando CLAR con detección UV usando análisis de datos con herramientas quimiométricas, en donde se encontró que en la miel de casta predominaba la fenilalanina, a diferencia de las mieles de otro origen, además, se identificó que ningún tipo de muestra contenía los aminoácidos que en su estructura presentan azufre correspondientes a la cisteína y la metionina, por lo que en este estudio se sugiere que pudiera ser un marcador de origen geográfico, al compararlo con mieles francesas y españolas, en donde si están presentes estos compuestos. Bajo estos resultados, los autores concluyen que aunque la mayoría de los contenidos de aminoácidos eran similares, se pudieron encontrar algunas diferencias significativas que pudieran orientarlos sobre su origen (Sun et al., 2017).

En otro estudio se analizó el perfil de ácidos fenólicos y flavonoides de 40 mieles de diferentes países por CLAR con detección UV, en donde se encontró que la miel de Nueva Zelanda presentaba la mayor cantidad de ácidos fenólicos, mientras que la miel de China presentaba la menor cantidad. En cuanto al análisis de flavonoides, se encontró que la miel de España tenía mayor cantidad y la de Hong Kong la menor cantidad, además de determinar que de 19 mieles Chinas, sólo en 5 se detectaron flavonoides, por tanto, a través de los resultados obtenidos concluyeron que ciertos compuestos fenólicos contribuyeron significativamente a la clasificación de muestras de miel, en este caso, el perfil de estos compuestos también pueden utilizarse como marcadores botánicos para identificar la fuente floral y el origen geográfico de las muestras de miel (Cheung et al., 2019).

Por otro lado, algunos reportes enfocados en el estudio de un grupo de analitos minoritarios, como los aminoácidos o los compuestos fenólicos, para establecer una estrategia de análisis de la autenticidad de la miel, establecen que el estudio del perfil de un solo grupo de metabolitos puede llevar a resultados ambiguos. Por tanto, resultaría complementario para una mayor sensibilidad al momento de la clasificación, el análisis y la relación de dos o más perfiles de grupos de metabolitos (Mădaş et al., 2020).

2. JUSTIFICACIÓN

La miel es un alimento al cual se le han atribuido una gran diversidad de propiedades benéficas para la salud y que, por su alta demanda a nivel mundial, es objeto de múltiples adulteraciones. Por tanto, es de interés desarrollar estrategias analíticas en conjunto con análisis quimiométricos, que, con base a los perfiles de grupos de analitos minoritarios como lo son los aminoácidos y compuestos fenólicos, permitan una mejor clasificación del origen geográfico de la miel. Un avance en las metodologías, podría ser el estudio combinado de estos perfiles, ya que permitiría obtener más información para agrupar este alimento según su origen geográfico.

México es uno de los principales productores de miel en el mundo, que también se enfrenta al problema de adulteración de miel por su origen. Por este motivo, resulta necesario la búsqueda de nuevos procedimientos que complementen el análisis dirigido a la identificación del origen geográfico como parte de su control de calidad. Es importante considerar que hay poca información al respecto y que hasta ahora no se han encontrado artículos publicados con este tipo de investigación.

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar por métodos quimiométricos la combinación de perfiles cromatográficos de aminoácidos y compuestos fenólicos con la finalidad de agrupar mieles mexicanas de acuerdo a su origen geográfico.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.** Confirmar el desempeño del método analítico para la determinación del perfil de aminoácidos y compuestos fenólicos por CLAR/UV y FLD.
- 2.** Obtener el perfil cromatográfico de aminoácidos y compuestos fenólicos por CLAR/ UV y FLD de muestras de miel multifloral de diferentes estados.
- 3.** Analizar los perfiles y su relación por medio del análisis quimiométrico con el propósito de agrupar las mieles de acuerdo a su origen geográfico.
- 4.** Aplicar la metodología desarrollada en el análisis de mieles de diferentes regiones.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Reactivos

Para llevar a cabo el presente trabajo se utilizaron los siguientes reactivos:

- *Estándares de aminoácidos*: ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), asparagina (Asn), serina (Ser), histidina (His), glicina (Gly), arginina (Arg), treonina (Thr), alanina (Ala), tirosina (Tyr), metionina (Met), valina (Val), triptófano (Trp), fenilalanina (Phe), isoleucina (Ile), leucina (Leu) y lisina (Lys), Sigma-Aldrich.
- *Estándares de compuestos fenólicos*: catequina (C), ácido gálico (AG), ácido protocatechuico (AP), ácido cafeico (ACA), mircetina (M), ácido cumárico (ACU), quercetina (Q), ácido transferúlico (AT), ácido rosmarínico (AR), kaempferol (K), ácido elágico (AE), luteolina (L), apigenina (API) y galato de epigallocatequina (GEC), Sigma-Aldrich.
- Ortoftaldehído, Sigma-Aldrich.
- 2-Mercaptoetanol, Sigma-Aldrich.
- Tetrahidrofurano, Tedia.
- Acetonitrilo, J.T. Baker.
- Metanol grado cromatográfico, J.T. Baker.
- Borato de sodio, Analytyka.
- Fosfato ácido de potasio anhidro, J.T. Baker.
- Ácido Clorhídrico, Fermont.
- Hidróxido de sodio, Fermont.
- Ácido fórmico, J.T. Baker.

5.2 Equipos

Para llevar a cabo el presente trabajo se utilizaron los siguientes equipos:

- Potenciómetro, Orion EA 940.
- Baño de ultrasonido, ULTRASONIK 208H.
- Equipo para filtración de solventes Millipore, Pall Corporation.
- Balanza analítica, OHAUS.
- Centrífuga, Eppendorf 5415 C
- Campana de extracción
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Hewlett Packard 1100, equipado con desgasificador de línea, bomba cuaternaria, inyector automático, controlador de temperatura de columna y detector de fluorescencia y UV-Vis de longitud de onda variable.
- Columna Atlantis T₃, 150 mm x 2.1 mm, 3 μ m de tp.
- Columna Hypersil gold PFP, 150 mm x 2.1 mm, 3 μ m de tp.

5.3 Materiales

Para llevar a cabo el presente trabajo se utilizó el siguiente material:

- Pipeta automática de volumen variable (10 - 100 μ L y 100 a 1000 μ L)
- Viales ámbar de 2 mL de tapa de rosca
- Insertos de vidrio de 250 μ L
- Filtros PVDF 13 mm de 0.45 μ m y 0.2 μ m, Thermo Scientific.
- Filtros de membrana de nylon 47 mm 0.45 μ m, CTR.
- Tubos Eppendorf de 2 mL.

5.4 Metodología

Para llevar a cabo el presente trabajo se siguió la siguiente metodología:

5.4.1 Obtención de muestras

Se obtuvieron 37 muestras de miel multifloral de 8 estados de México, correspondientes a Jalisco, Nuevo León, Oaxaca, Sonora, Yucatán, Tamaulipas, Quintana Roo y Puebla, las cuales fueron facilitadas por apicultores. Las muestras fueron recolectadas durante agosto del 2020 a octubre del 2021, y fueron almacenadas a temperatura ambiente y protegidas de la luz hasta su análisis. De las 37 muestras de miel, 32 fueron utilizadas para la calibración y 5 muestras se seleccionaron al azar para evaluar la aplicabilidad del método.

5.4.2 Confirmación del método cromatográfico

Para la obtención de los perfiles de aminoácidos y compuestos fenólicos de las muestras de miel, se trabajó con métodos cromatográficos que previamente fueron validados, sin embargo, antes de realizar el estudio de los perfiles, y con la finalidad de garantizar que el método se encontrara bajo control, de tal manera, que los cambios que se observaran en los perfiles se debieran únicamente a la naturaleza de la muestra, se llevó a cabo una confirmación trabajando con una muestra de miel seleccionada al azar. Para llevar a cabo la confirmación de ambos métodos se evaluaron los siguientes parámetros:

Selectividad: se evaluó por medio del análisis de blancos de derivatización de muestra en el caso del método para la obtención del perfil de aminoácidos, y por medio del análisis de blancos de fase móvil en el método para la obtención del perfil de compuestos

fenólicos. Se obtuvo el cromatograma de ambos blancos y se observó que no hubiera presencia de señales que pudieran interferir con el análisis de los perfiles cromatográficos de las muestras. El proceso de derivatización para el análisis de aminoácidos se describe en el apartado 5.4.4

Repetibilidad: para evaluar la repetibilidad se eligió una muestra de miel al azar la cual fue tratada con las metodologías establecidas para el tratamiento previo de la muestra y obtención del perfil de aminoácidos y del perfil de compuestos fenólicos (5.4.3.1 y 5.4.4.1) Se realizó por triplicado, el mismo día, el análisis de las muestras bajo las condiciones cromatográficas de cada uno de los métodos, y se evaluó la desviación estándar relativa (DER) del tiempo de retención (t_R) y del área de los analitos que se encontraron como parte del perfil. Se estableció un criterio de aceptación $DER \leq 6\%$ (AOAC, 2019).

Reproducibilidad: de la misma muestra seleccionada de miel, se realizó el tratamiento de las muestras para el análisis de aminoácidos y compuestos fenólicos por las metodologías establecidas (5.4.3.1 y 5.4.4.1). Se realizó el análisis de las muestras bajo las condiciones para cada método (5.4.3.2 y 5.4.4.2), y se evaluó la desviación estándar relativa (DER) del tiempo de retención y del área de los analitos que componen el perfil. Se estableció un criterio de aceptación $DER \leq 11\%$ (AOAC, 2019). Este procedimiento se realizó por triplicado en 3 días no consecutivos.

Estabilidad de las muestras previo al análisis: para llevar a cabo la evaluación de la estabilidad, se trabajó con las muestras utilizadas el primer día para el análisis de

aminoácidos y compuestos fenólicos, estas muestras previamente tratadas fueron almacenadas a 4°C, y se realizó el análisis cromatográfico al día 1, 3 y 8. Se obtuvieron los perfiles cromatográficos y se compararon las intensidades de las señales de los analitos obtenidas en los diferentes días, con las del día 1, esto con la finalidad de observar si existían variaciones en las intensidades, lo cual indicaría si la muestra puede ser almacenada, o no, sin mostrar cambios en su perfil cromatográfico.

5.4.3 Análisis cromatográfico del perfil de aminoácidos

Una vez confirmado el método cromatográfico, se realizó el análisis del perfil de aminoácidos por CLAR/FLD de cada una de las muestras. Una vez obtenido el perfil cromatográfico de cada una de las 37 muestras, se llevó a cabo la identificación de los analitos que componen el perfil de aminoácidos por medio del tiempo de retención y el orden de elución, ya que por la naturaleza química de los aminoácidos se pueden presentar algunos desplazamientos en sus señales.

5.4.3.1 Tratamiento previo de las muestras para análisis de aminoácidos

La preparación de cada una de las muestras de miel consistió en una extracción asistida con ultrasonido, seguido de una derivatización utilizando ortoftaldehído como solución derivatizante, esto con la finalidad de obtener derivados isoindólicos que pudieran ser detectados por fluorescencia.

Todas las muestras fueron homogenizadas, posteriormente se pesaron 2 gramos de cada una y se añadieron 10 mL de agua/metanol en relación 1:1. La solución se llevó a baño de ultrasonido por 15 minutos, se tomó una alícuota de 3 mL y se pasó a tubos

ependorf para centrifugar por 10 minutos a 8000 rpm, el sobrenadante obtenido se filtró a través de filtros de nylon de 0.2 μm de tamaño de poro, y se recuperó el filtrado para posteriormente realizar una reacción de derivatización. Se tomaron 10 μL de la muestra filtrada, se añadieron 30 μL de solución de ortoftaldehído y 60 μL de agua bidestilada, se agitó exactamente por un minuto y se recuperó la muestra en un vial con inserto para ser inyectada en el cromatógrafo a los 3 minutos después de la reacción.

5.4.3.2 Condiciones cromatográficas del método

Todas las muestras fueron analizadas en el cromatógrafo de líquidos HP-1100 con detección de fluorescencia bajo las condiciones mostradas en la Tabla 4:

Tabla 4. Condiciones cromatográficas para el análisis de aminoácidos.

	Condiciones
Fase móvil A	Metanol/Buffer fosfatos/THF (12:85:3)
Fase móvil B	Metanol/Buffer fosfatos/THF (55:42:3)
Columna	Atlantis T ₃ 150 x 2.1 mm 3 μm t.p.
Flujo	0.2 mL/min.
Vol. inyección	5 μL
Temperatura	37°C
Detección	Fluorescencia $\lambda_{\text{ex}} = 356 \text{ nm.}$ y $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm.}$

5.4.4 Análisis cromatográfico del perfil de compuestos fenólicos

Una vez confirmado el método cromatográfico, se obtuvo el análisis del perfil de compuestos fenólicos por CLAR/UV de cada una de las muestras, por lo que se realizó un tratamiento previo. Una vez obtenido el perfil cromatográfico de cada una de las 37 muestras, se llevó a cabo la identificación de los analitos que componen el perfil de

compuestos fenólicos por medio del tiempo de retención y el orden de elución de cada una de las señales cromatográficas observadas.

5.4.4.1 Tratamiento previo de las muestras para análisis de compuestos fenólicos

La preparación de las muestras de miel para el análisis del perfil de compuestos fenólicos consistió en una extracción asistida con ultrasonido, por lo que se homogenizó cada una de las muestras. Se pesaron 3 gramos de cada una en balanza analítica. Posteriormente se añadieron 10 mL de una solución constituida por ácido fórmico 0.15% y metanol en proporción 70:30, se llevó a baño de ultrasonido por 15 minutos y, enseguida, se centrifugó una alícuota de 5 mL a 8000 rpm, por 10 minutos. El sobrenadante obtenido fue filtrado con acrodiscos de filtro de nylon de 0.2 μm de tamaño de poro, y se recuperó en un vial para su posterior análisis cromatográfico.

5.4.4.2 Condiciones cromatográficas del método

Todas las muestras fueron analizadas en un cromatógrafo de líquidos HP-1100 con detección ultravioleta bajo las condiciones mostradas en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones cromatográficas para el análisis de compuestos fenólicos.

	Condiciones
Fase móvil A	Ácido fórmico 0.15%
Fase móvil B	Metanol
Columna	Hypersil gold PFP 150 x 2.1 mm. 3 μm t.p
Flujo	0.2 mL/min.
Vol. inyección	5 μL
Temperatura	35°C
Detección	Ultravioleta $\lambda = 260$ nm.

5.4.5 Análisis quimiométrico

A partir de cada uno de los cromatogramas obtenidos de los perfiles de las muestras, se obtuvo un vector de datos en formato csv.

Los datos en formato csv fueron exportados a una hoja de Excel, la cual incluía los tiempos del análisis cromatográfico en filas y las muestras en columnas. Posteriormente los datos se importaron al Software Matlab y a la PLS Toolbox como herramienta de apoyo para el análisis quimiométrico. Una vez importados los datos, se observaron artefactos y se realizaron pretratamientos de corrección de escalado, línea base y corrección de desplazamiento optimizado de correlación para corregir estos artefactos.

La corrección de escalado de todos los perfiles se llevó a cabo utilizando la función $\text{dataout} = \text{scaledata}(\text{datain}, \text{minval}, \text{maxval})$ con la finalidad de que el eje Y tuviera un rango entre 0 y 1 para todas las muestras, siendo “datain” la matriz a utilizar, 0 el valor mínimo de escala (minval) y 1 el máximo valor (maxval). Posteriormente, se corrigió la línea base de todos los datos utilizando la función $[\text{bldata}, \text{wts}, \text{baseline}, \text{vweights}] = \text{wlsbaseline}(\text{dataout}, \text{n})$, siendo “dataout” la matriz, y “n” el número del polinomio a utilizar para la alineación.

La corrección de los desplazamientos observados en los tiempos de retención de las muestras se realizó con el algoritmo de desplazamiento optimizado de correlación (cow) utilizando la función $[\text{Warping}, \text{XWarped}, \text{Diagnos}] = \text{cow}(\text{T}, \text{X}, \text{Seg}, \text{Slack}, \text{Options})$ (Tomasi, G. 2004), donde “T” corresponde al vector objetivo o de referencia, “X” a la matriz, “Seg” a la longitud del segmento entre base y base de dos picos correspondientes

a la misma señal, “Slack” al rango máximo resultante de la longitud del segmento entre alturas de dos picos correspondientes a la misma señal. Para aplicar el algoritmo de cow, se aplicó primero la función $[ref,refs,N] = ref_select(X,varlabels,options)$, con la finalidad de obtener un perfil combinado de referencia, donde “X” corresponde a la matriz y “varlabels” a los niveles de las variables para graficar. Posteriormente, fue necesaria la búsqueda de valores óptimos de segmentos (Seg) y desplazamientos (Slack) analizando los valores mínimos y máximos de algunas señales representativas en los cromatogramas, para aplicar la función $[optim_pars,OS,diagnos]=optim_cow(X,optim_space,options,ref)$, donde “X es la matriz”, “optim_space” es el espacio de optimización de los valores mínimos y máximos obtenidos del segmento y los valores mínimos y máximos de la longitud de altura de picos. A partir de esto, se aplicó el algoritmo de cow y se realizó un alineamiento detallado de los perfiles. Después se realizó una normalización área unidad y un centrado a la media para posteriormente construir un modelo multivariante de Análisis de Componentes Principales (PCA), y así observar si existían tendencias o agrupaciones entre los datos en base al origen geográfico de acuerdo al contenido de aminoácidos y compuestos fenólicos.

5.4.6 Aplicación de metodología desarrollada

De las 37 muestras analizadas, la aplicabilidad del método se evaluó con 5 muestras no usadas en la calibración. A partir de los cromatogramas obtenidos de estas muestras se importaron los datos al Software Matlab y a la PLS Toolbox, para evaluar la aplicabilidad del modelo construido. Posteriormente, se realizó la proyección de las muestras en el modelo construido, para observar si estas eran descritas de forma correcta en el gráfico de scores.

6. RESULTADOS

6.1 Obtención de muestras

Se recolectaron 37 muestras de miel de 8 estados del país durante el periodo de agosto del 2020 a octubre del 2021, las cuales se almacenaron a temperatura ambiente y fueron protegidas de la luz hasta su análisis. En la Tabla 6 se muestra la identificación de cada una de las muestras, así como datos de la región de su procedencia.

Tabla 6. Identificación de las muestras de miel obtenidas.

ID	Estado	Región
1	Jalisco	Ocotlán
2	Nuevo León	Montemorelos
3	Nuevo León	Linares
4	Oaxaca	Oaxaca
5	Sonora	Hermosillo
6	Sonora	Hermosillo
7	Sonora	Costa Hermosillo
8	Sonora	Mátope
9	Sonora	Caborca
10	Yucatán	Xocén
11	Yucatán	Homún
12	Yucatán	Maxcanú
13	Yucatán	Mérida
14	Yucatán	San Nicolás
15	Yucatán	Kanasín
16	Yucatán	Kunché
17	Yucatán	Kunché
18	Yucatán	Mérida

19	Tamaulipas	Soto La Marina
20	Tamaulipas	Soto La Marina
21	Yucatán	Valladolid
22	Tamaulipas	Soto La Marina
23	Tamaulipas	Soto La Marina
24	Quintana Roo	Tepich
25	Yucatán	Hunucmá
26	Yucatán	Umán
27	Yucatán	Izamal
28	Yucatán	Mérida
29	Puebla	Puebla
30	Oaxaca	Oaxaca
31	Oaxaca	Oaxaca
32	Oaxaca	Oaxaca
33	Oaxaca	Oaxaca
34	Oaxaca	Oaxaca
35	Oaxaca	Oaxaca
36	Oaxaca	Oaxaca
37	Oaxaca	Oaxaca

6.2 Confirmación del método cromatográfico

Previo al análisis cromatográfico del perfil de aminoácidos y compuestos fenólicos de las muestras de miel, se evaluó la selectividad, repetibilidad y reproducibilidad de ambos métodos cromatográficos, así como la estabilidad del tratamiento de las muestras para su análisis. En la figura 3 se muestra el cromatograma de un blanco de derivatización para el análisis de aminoácidos por CLAR/FLD, mientras que en la Fig. 4 se muestra el

cromatograma de un blanco de FM (ácido fórmico 0.15%/metanol) para el análisis de compuestos fenólicos por CLAR/UV.

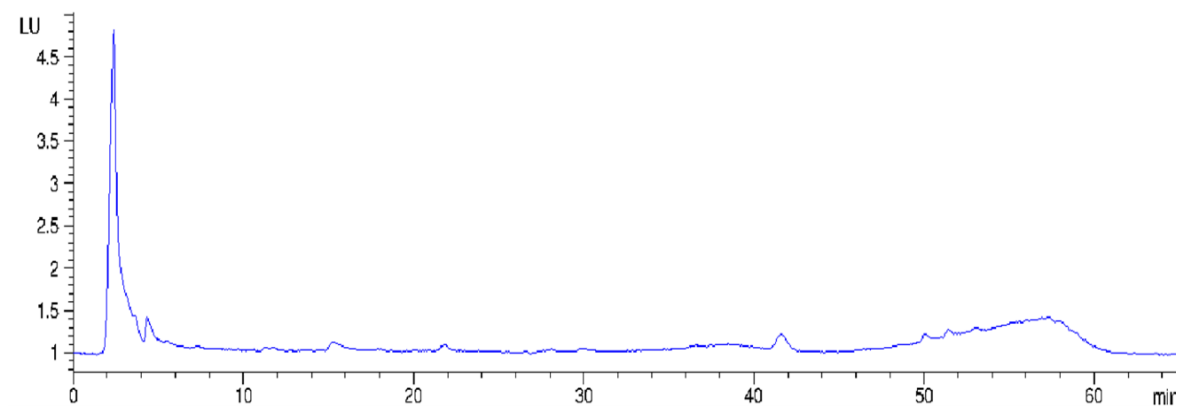


Figura 3. Cromatograma de blanco de derivatización obtenido bajo las condiciones cromatográficas del método de análisis de aminoácidos. (Detección por FLD $\lambda_{ex} = 356$ nm. y $\lambda_{em} = 450$ nm.)

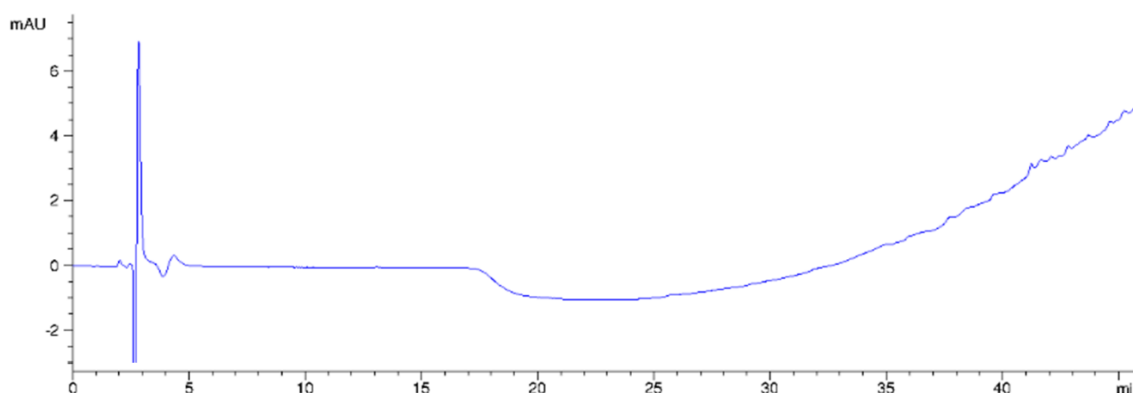


Figura 4. Cromatograma de blanco de fase móvil obtenido bajo las condiciones cromatográficas del método de análisis de compuestos fenólicos. (Detección por UV $\lambda=260$ nm.)

En las Fig. 5 y 6 se muestra el cromatograma obtenido a partir del análisis de una mezcla de estándares de aminoácidos y compuesto fenólicos.

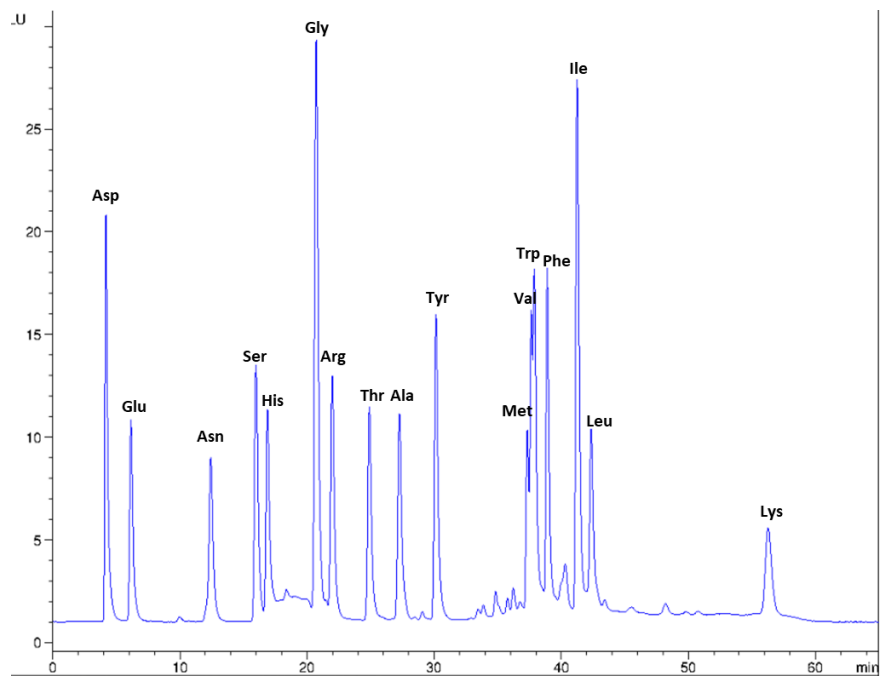


Figura 5. Cromatograma de la mezcla de estándares de aminoácidos.
(Detección por FLD $\lambda_{ex} = 356 \text{ nm.}$ y $\lambda_{em} = 450 \text{ nm.}$)

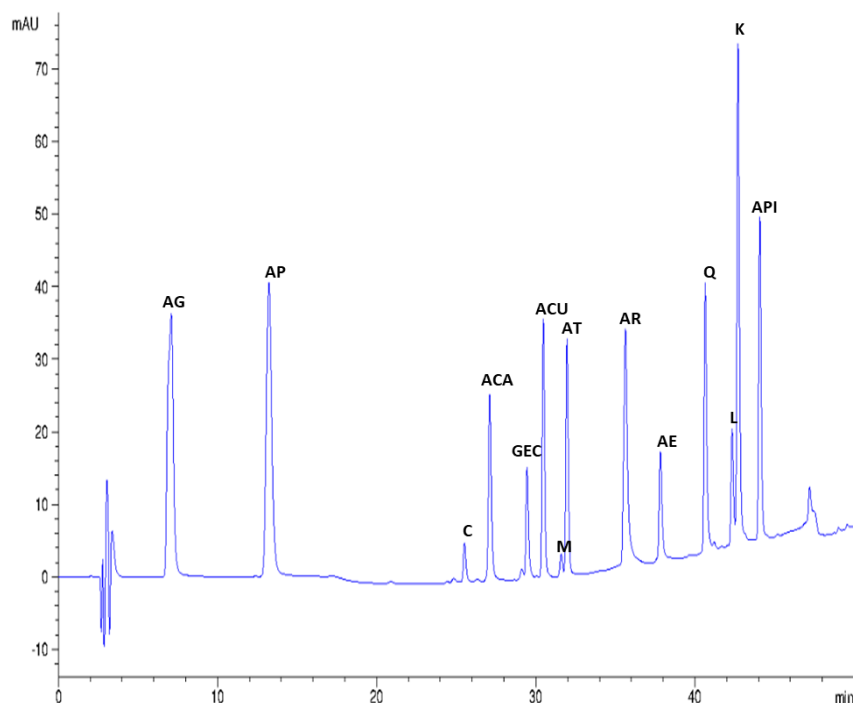


Figura 6. Cromatograma de la mezcla de estándares de compuestos fenólicos.
(Detección por UV $\lambda = 260 \text{ nm.}$)

En las Tablas 7 y 8 se muestran los t_R para cada uno de los aminoácidos y compuestos fenólicos presentes en la mezcla de estándares utilizados.

Tabla 7. Tiempos de retención de aminoácidos presentes en la mezcla estándar.

Aminoácido	Tiempo de retención (t_R) (min)
Ac. Aspártico (Asp)	4.17
Ac. Glutámico (Glu)	6.06
Asparagina (Asn)	12.48
Serina (Ser)	16.10
Histidina (His)	17.24
Glicina (Gly)	20.96
Arginina (Arg)	22.20
Treonina (Thr)	25.75
Alanina (Ala)	27.38
Tirosina (Tyr)	30.28
Metionina (Met)	39.31
Valina (Val)	39.74
Triptófano (Trp)	40.13
Fenilalanina (Phe)	41.66
Isoleucina (Ile)	45.54
Leucina (Leu)	47.48
Lisina (Lys)	51.00

Tabla 8. Tiempos de retención de compuestos fenólicos presentes en la mezcla estándar.

Compuesto fenólico	Tiempo de retención (t_R) (min)
Ac. Gálico (AG)	7.11
Ac. Protocatechuico (AP)	13.20
Catequina (C)	25.50
Ac. Cafeico (ACA)	27.12
Galato Epigallocatequina (GEC)	29.47
Ac. Cumárico (ACU)	30.49
Mircetina (M)	31.62
Ac. Transferúlico (AT)	32.00
Ac. Rosmarínico (AR)	35.73
Ac. Elágico (AE)	37.94
Quercetina (Q)	40.72
Luteolina (L)	42.40
Kaempferol (K)	42.77
Apigenina (A)	44.12

En base a los resultados obtenidos de los cromatogramas de los blancos mostrados en las Fig. 3 y 4 se puede observar que no existen señales que pudieran interferir con el perfil de aminoácidos y compuestos fenólicos de las muestras, ya que no se identificó ninguna señal en los t_R correspondientes a los mismos (Tabla 7 y 8) lo cual nos indica que ambos métodos son selectivos para los analitos de interés.

Para la evaluación de la repetibilidad del método cromatográfico de aminoácidos y compuestos fenólicos, se realizó el análisis de la muestra 1 (miel de Ocotlán, Jalisco) por triplicado en un mismo día. En la Fig. 7 se muestra uno de los cromatogramas obtenidos del perfil de aminoácidos de la muestra 1 en donde se identificaron 14 aminoácidos correspondientes al ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, serina, histidina, glicina, arginina, treonina, alanina, tirosina, triptófano, fenilalanina, isoleucina y leucina. Así mismo, en la Fig. 8 se muestra uno de los cromatogramas obtenidos del perfil de compuestos fenólicos en donde se identificaron 3, correspondientes al ácido gálico, catequina y ácido rosmarínico. La identificación de los aminoácidos y compuestos fenólicos se hizo por el tiempo de retención y orden de elución. Se calculó la DER de los t_R y las áreas obtenidas para cada uno de los analitos identificados.

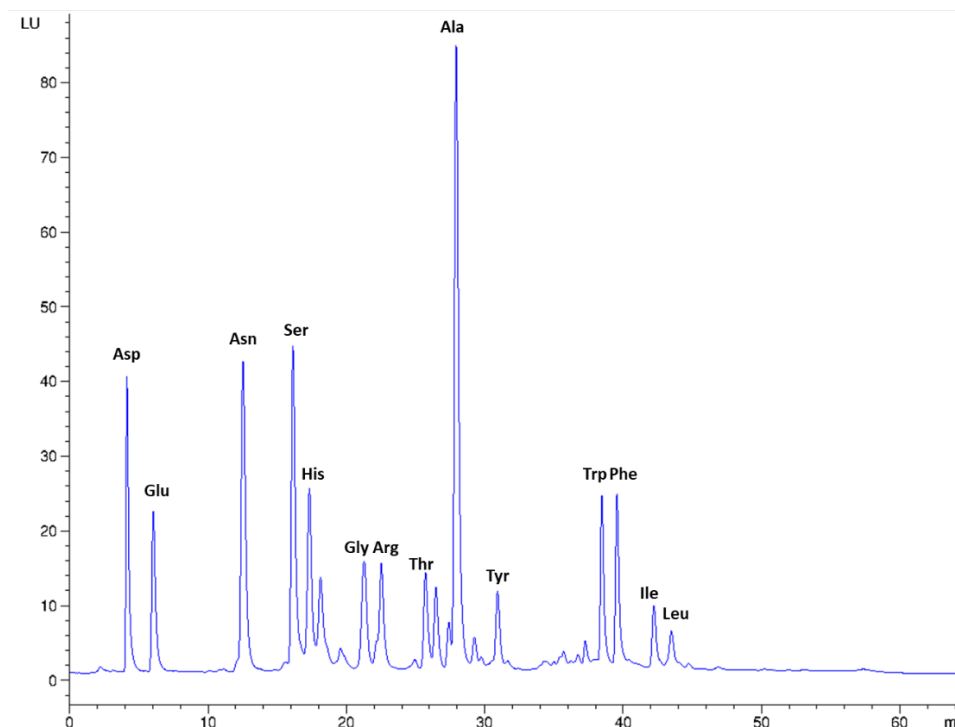


Figura 7. Cromatograma del perfil de aminoácidos de muestra de miel 1. (Detección por FLD $\lambda_{ex} = 356$ nm. y $\lambda_{em} = 450$ nm.)

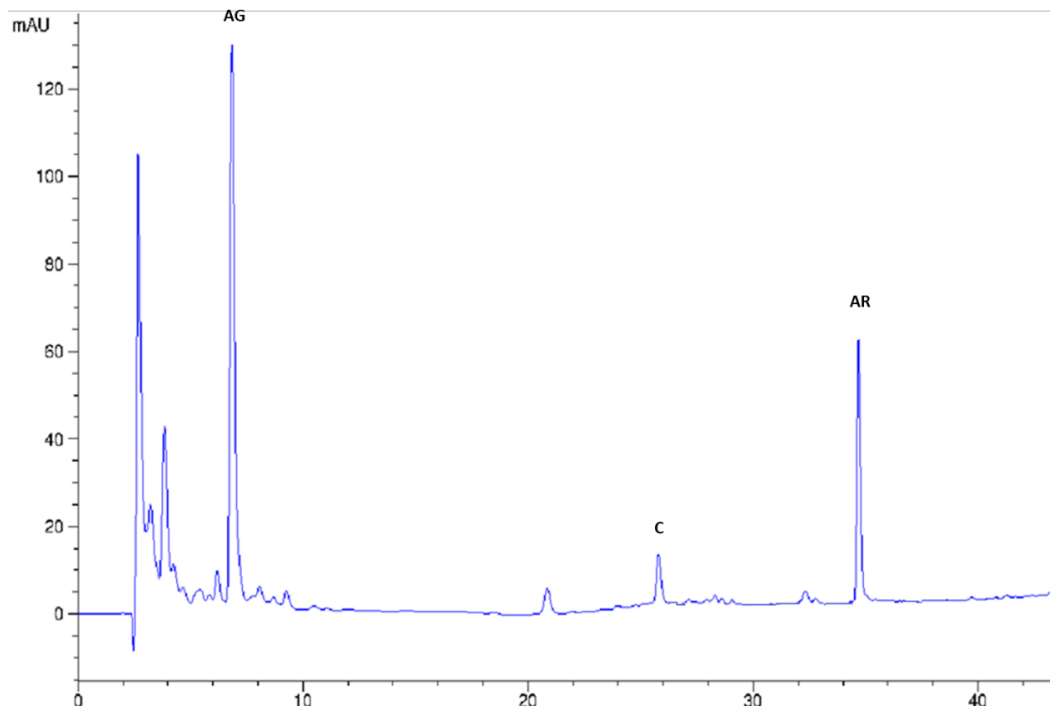


Figura 8. Cromatograma del perfil de compuestos fenólicos de muestra de miel 1.
(Detección por UV $\lambda = 260$ nm.)

En las Tablas 9 y 10 se muestran los valores de DER de los t_R y áreas de los cromatogramas obtenidos por triplicado del perfil de aminoácidos y compuestos fenólicos identificados, en donde se observa que el rango de DER de los t_R y áreas para los aminoácidos fue de 0.5 a 1.9% y de 0.7 a 4.9% respectivamente, mientras que el rango de DER de los t_R y áreas para los compuestos fenólicos fue de 0.005 a 0.21% y de 2.2 a 5.3% respectivamente. Los valores obtenidos de DER para la evaluación de la repetibilidad de ambos métodos fueron menor al criterio establecido por la AOAC del 6%, por lo que se confirma la repetibilidad de ambos métodos.

Tabla 9. Valores de DER de los t_R y áreas del análisis de aminoácidos de la muestra de miel 1 obtenidos para el análisis de repetibilidad. (n =3)

Aminoácido	t_R (min)	DER t_R (%)	DER área (%)
Ac. Aspártico (Asp)	4.17	1.8	4.4
Ac. Glutámico (Glu)	6.06	1.7	0.7
Asparagina (Asn)	12.48	1.9	2.5
Serina (Ser)	16.10	1.4	3.6
Histidina (His)	17.24	1.3	2.2
Glicina (Gly)	20.96	1.5	1.4
Arginina (Arg)	22.20	1.6	4.7
Treonina (Thr)	25.75	0.5	4.8
Alanina (Ala)	27.38	1.9	4.3
Tirosina (Tyr)	30.28	1.9	4.9
Triptófano (Trp)	38.02	0.7	4.9
Fenilalanina (Phe)	39.05	0.8	2.3
Isoleucina (Ile)	41.92	0.9	2.6
Leucina (Leu)	42.59	1.0	4.0

Tabla 10. Valores de DER de los t_R y áreas del análisis de compuestos fenólicos de la muestra de miel 1 obtenidos para el análisis de repetibilidad. (n =3)

Compuesto fenólico	t_R (min)	DER t_R (%)	DER área (%)
Ac. gálico (AG)	6.85	0.21	5.09
Catequina (C)	25.93	0.005	2.18
Ac. rosmarínico (AR)	35.76	0.012	5.33

Para la evaluación de la reproducibilidad del método cromatográfico de aminoácidos y compuestos fenólicos, se realizó el análisis de la muestra 1 (miel de Ocotlán, Jalisco) por triplicado en días diferentes no consecutivos.

En las Tablas 11 y 12 se adjuntan los valores de DER de los t_R y áreas de los cromatogramas obtenidos por triplicado en días diferentes del perfil de aminoácidos y compuestos fenólicos identificados, en donde se observa que el rango de DER de los t_R y áreas para los aminoácidos fue de 0.7 a 2.2% y 3.7 a 10.9% respectivamente, mientras que el rango de DER de los t_R y áreas para los compuestos fenólicos fue de 0.005 a 0.14% y 1.9 a 4.8% respectivamente. Los valores obtenidos de DER para la evaluación de la reproducibilidad de ambos métodos fueron menores al criterio establecido por la AOAC del 11%, por lo que se confirma la reproducibilidad de ambos métodos.

Para evaluar la estabilidad de las muestras tratadas, se realizó el análisis cromatográfico de aminoácidos y de compuestos fenólicos de la muestra 1, al día 3 y al día 8 de ser almacenadas a 4°C. En la Fig. 9 se muestra el gráfico del porcentaje de intensidad del área de la señal de alanina al día 1, 3 y 8, en este caso se observó una disminución de la intensidad de la señal a partir del día 3 de análisis. En la Fig. 10 se muestra el gráfico del porcentaje de intensidad del área de ácido gálico al día 1, 3 y 8, en este caso no se observaron cambios en la intensidad de la señal hasta el día 8 de análisis

Tabla 11. Valores de DER de los t_R y áreas del análisis de aminoácidos de la muestra de miel 1 obtenidos para el análisis de reproducibilidad. (n =3)

Aminoácido	t_R (min)	DER t_R (%)	DER área (%)
Ac. Aspártico (Asp)	4.17	2.2	10.2
Ac. Glutámico (Glu)	6.06	1.9	7.8
Asparagina (Asn)	12.48	2.2	6.3
Serina (Ser)	16.10	1.9	7.0
Histidina (His)	17.24	1.9	5.2
Glicina (Gly)	20.96	1.2	10.9
Arginina (Arg)	22.20	1.3	4.9
Treonina (Thr)	25.75	2.0	9.3
Alanina (Ala)	27.38	1.2	4.9
Tirosina (Tyr)	30.28	1.3	10.7
Triptófano (Trp)	38.02	0.7	5.0
Fenilalanina (Phe)	39.05	0.7	10.1
Isoleucina (Ile)	41.92	1.0	3.7
Leucina (Leu)	42.59	1.2	9.0

Tabla 12. Valores de DER de los t_R y áreas del análisis de compuestos fenólicos de la muestra de miel 1 obtenidos para el análisis de reproducibilidad. (n =3)

Compuesto fenólico	t_R (min)	DER t_R (%)	DER área (%)
Ac. gálico (AG)	6.85	0.147	3.63
Catequina (C)	25.93	0.005	1.95
Ac. rosmarínico (AR)	35.76	0.011	4.76

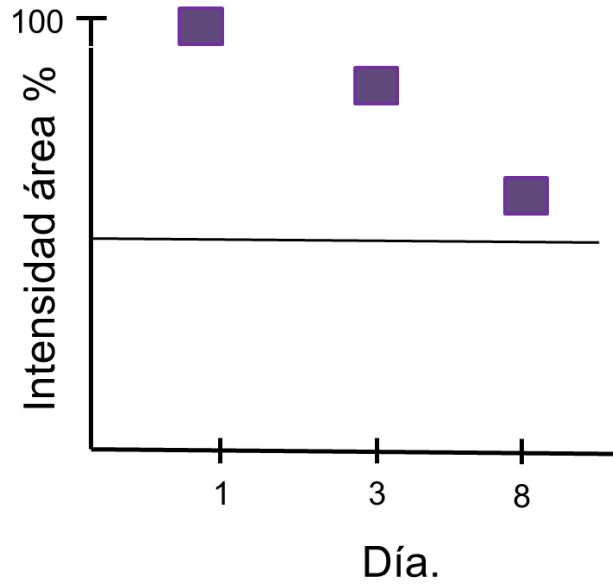


Figura 9 . Gráfico del porcentaje de intensidad del área de la señal de alanina de la muestra 1 al día 1, 3 y 8 de análisis de aminoácidos por CLAR/FLD.

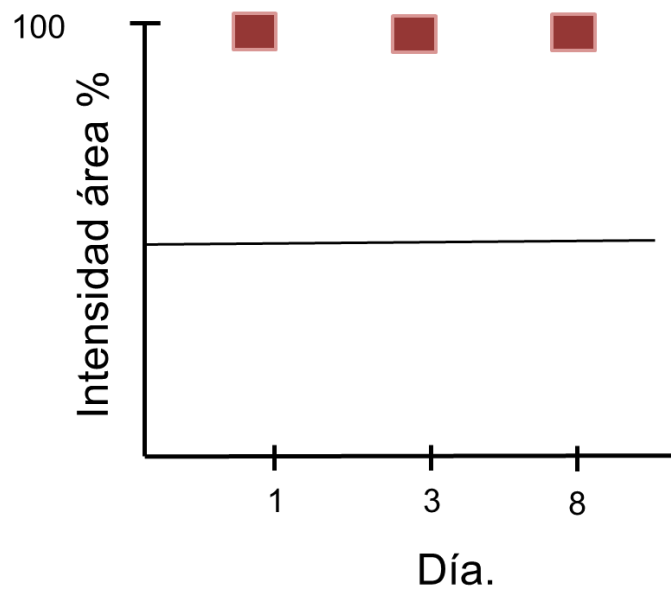


Figura 10 . Gráfico del porcentaje de intensidad del área de la señal de ácido gálico de la muestra 1 al día 1, 3 y 8 de análisis de compuestos fenólicos por CLAR/UV.

6.3 Análisis cromatográfico del perfil de aminoácidos

Una vez confirmados los parámetros de selectividad, repetibilidad, reproducibilidad y estabilidad de las muestras tratadas para evaluar el desempeño del método cromatográfico para el análisis de aminoácidos en muestras de miel, se realizó el análisis de las 37 muestras bajo las condiciones del método establecidas en la Tabla 4.

En la Fig. 11 se muestra como ejemplo, el cromatograma del perfil de aminoácidos obtenido de la muestra 5 correspondiente al estado de Sonora, mientras que en la Fig. 12 se adjunta el cromatograma de la muestra 17 correspondiente al estado de Yucatán. En la Fig. 13, 14, 15, 16, 17 y 18 se muestran los cromatogramas obtenidos del perfil de aminoácidos de muestras representativas del estado de Nuevo León, Tamaulipas, Jalisco, Puebla, Oaxaca y Quintana Roo. La identificación de los aminoácidos y compuestos fenólicos presentes en las muestras se llevó a cabo en base al tiempo de retención y al orden de elución.

En la Tabla 13 se muestran los aminoácidos presentes en las muestras de miel de los 8 estados del país, resaltando en amarillo los mayoritarios.

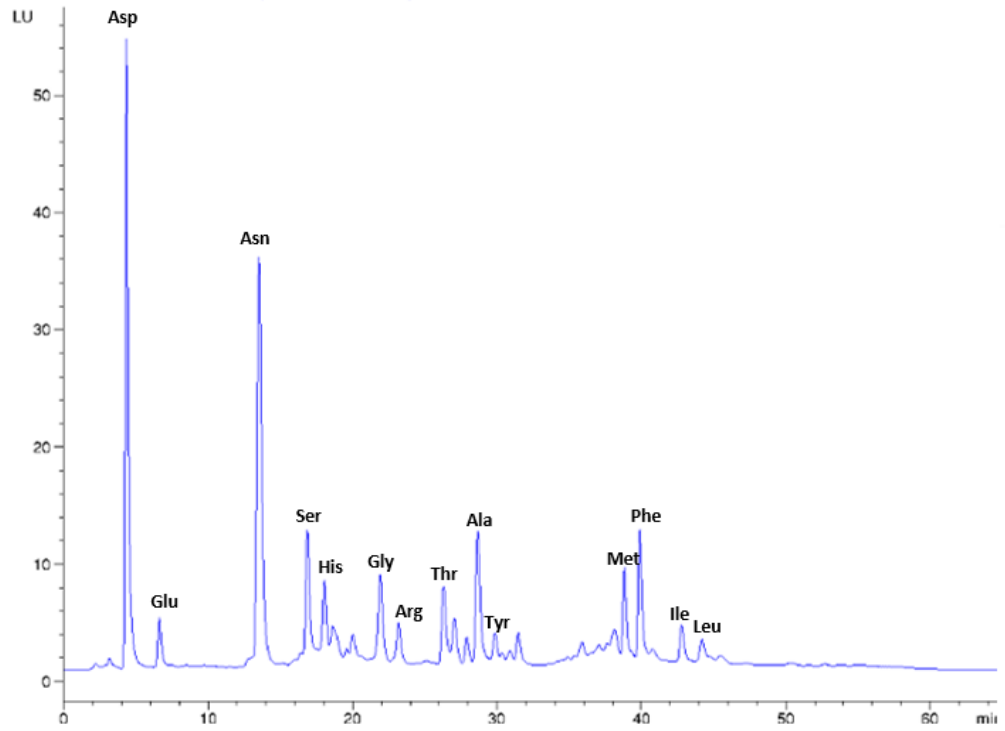


Figura 11. Cromatograma del perfil de aminoácidos de miel de Sonora.
(Detección por FLD $\lambda_{ex} = 356 \text{ nm.}$ y $\lambda_{em} = 450 \text{ nm.}$)

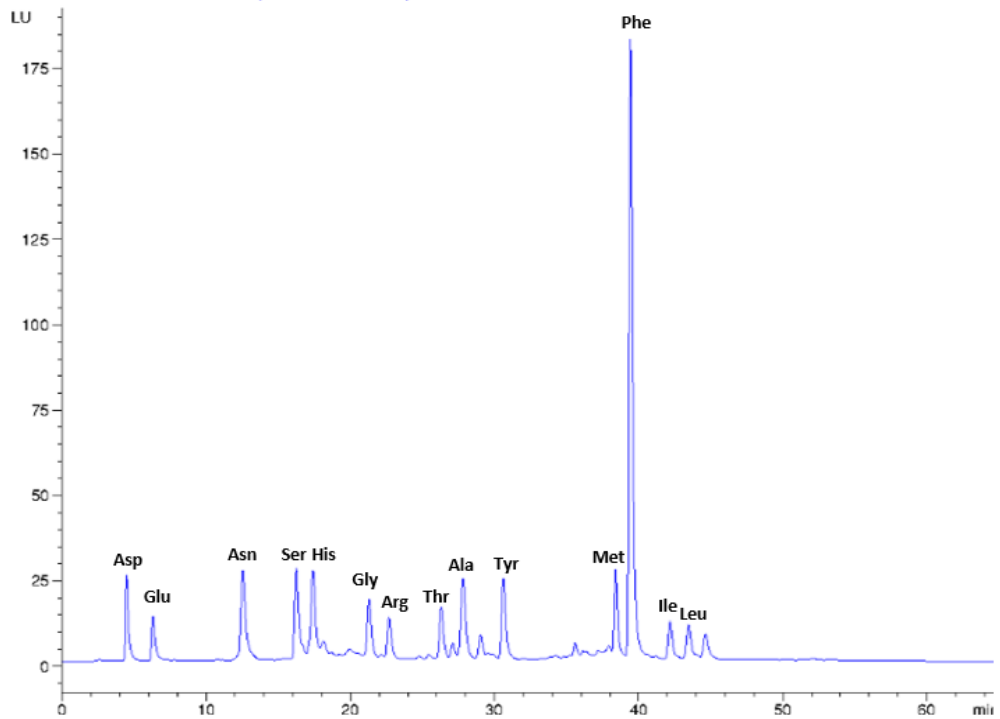


Figura 12. Cromatograma del perfil de aminoácidos de miel de Yucatán.
(Detección por FLD $\lambda_{ex} = 356 \text{ nm.}$ y $\lambda_{em} = 450 \text{ nm.}$)

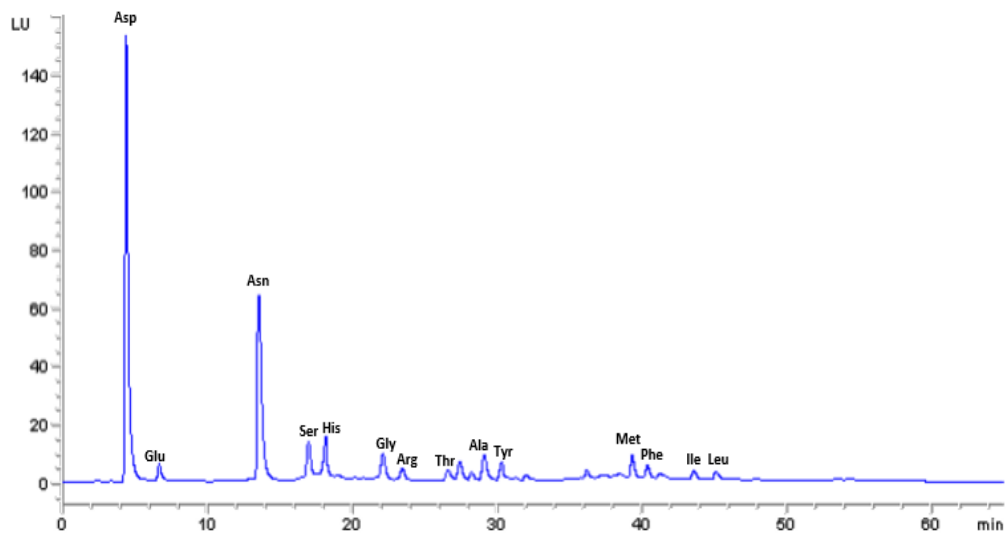


Figura 13. Cromatograma del perfil de aminoácidos de miel de Nuevo León.
(Detección por FLD $\lambda_{ex} = 356 \text{ nm.}$ y $\lambda_{em} = 450 \text{ nm.}$)

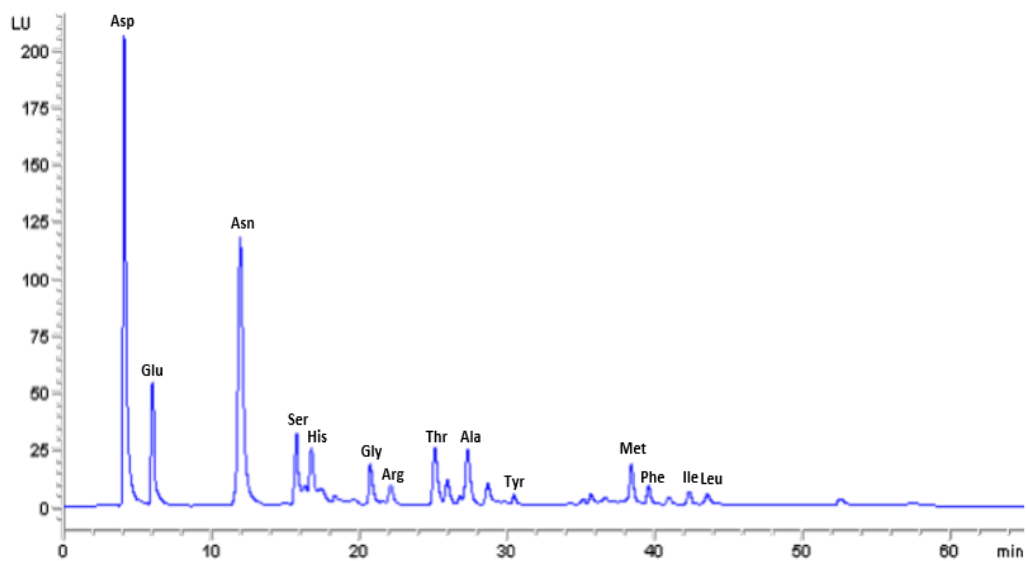


Figura 14. Cromatograma del perfil de aminoácidos de miel de Tamaulipas.
(Detección por FLD $\lambda_{ex} = 356 \text{ nm.}$ y $\lambda_{em} = 450 \text{ nm.}$)

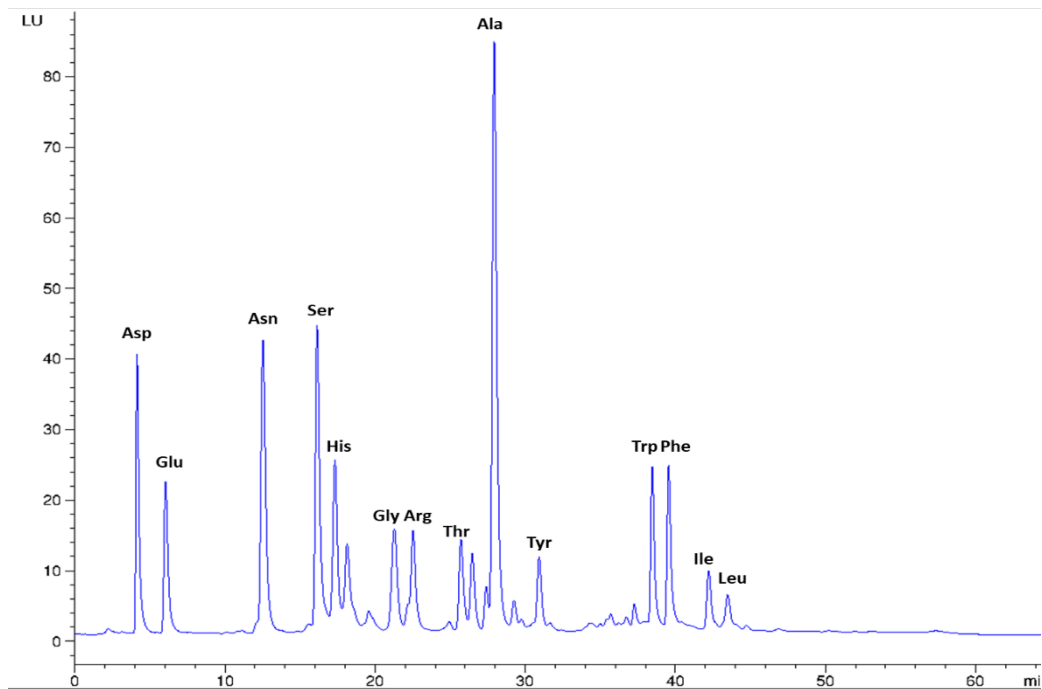


Figura 15. Cromatograma del perfil de aminoácidos de miel de Jalisco.
(Detección por FLD $\lambda_{ex} = 356$ nm. y $\lambda_{em} = 450$ nm.)

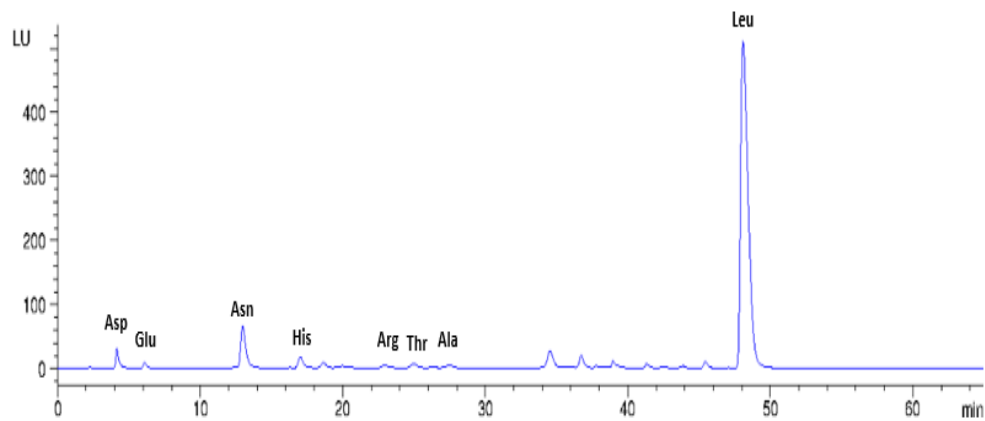


Figura 16. Cromatograma del perfil de aminoácidos de miel de Puebla.
(Detección por FLD $\lambda_{ex} = 356$ nm. y $\lambda_{em} = 450$ nm.)

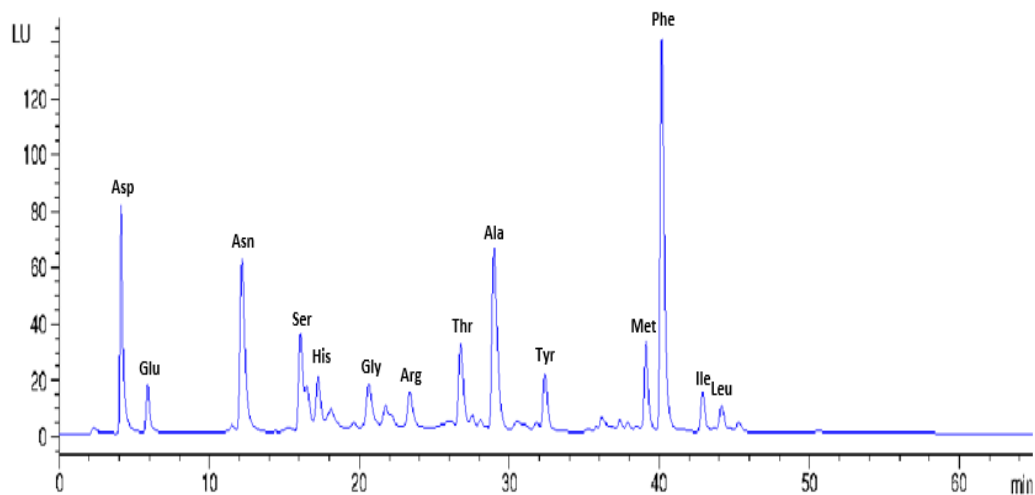


Figura 17. Cromatograma del perfil de aminoácidos de miel de Oaxaca.
(Detección por FLD $\lambda_{ex} = 356$ nm. y $\lambda_{em} = 450$ nm.)

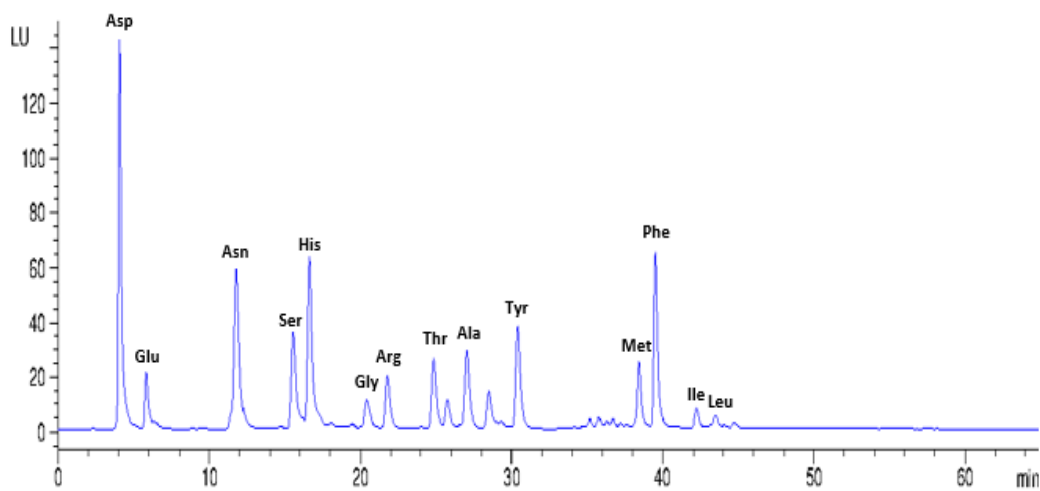


Figura 18. Cromatograma del perfil de aminoácidos de miel de Quintana Roo.
(Detección por FLD $\lambda_{ex} = 356$ nm. y $\lambda_{em} = 450$ nm.)

Tabla 13. Aminoácidos en muestras de miel de 8 estados de México.

t_R (min)	Aminoácido	Sonora	Nuevo León	Tamaulipas	Jalisco	Puebla	Oaxaca	Yucatán	Q. Roo
4.17	Asp	*	*	*	*	*	*	*	*
6.06	Glu	*	*	*	*	*	*	*	*
12.48	Asn	*	*	*	*	*	*	*	*
16.10	Ser	*	*	*	*	*	*	*	*
17.24	His	*	*	*	*	*	*	*	*
20.96	Gly	*		*	*		*	*	*
22.20	Arg	*	*	*	*	*	*	*	*
25.75	Thr	*		*	*	*	*	*	*
27.38	Ala	*	*	*	*	*	*	*	*
30.28	Tyr	*	*	*	*		*	*	*
39.31	Met	*	*	*			*	*	*
39.74	Val								
40.13	Trp				*				
41.66	Phe	*	*	*	*		*	*	*
45.54	Ile	*	*	*	*		*	*	*
47.48	Leu	*	*	*	*	*	*	*	*
51.00	Lys								

6.4 Análisis cromatográfico del perfil de compuestos fenólicos

Una vez confirmados los parámetros de selectividad, repetibilidad, reproducibilidad y estabilidad de las muestras tratadas para evaluar el desempeño del método cromatográfico para el análisis de compuestos fenólicos en muestras de miel, se realizó el análisis de las 37 muestras bajo las condiciones del método establecidas en la Tabla 5.

En la Fig. 19 se adjunta el cromatograma del perfil de compuestos fenólicos de la muestra 5 correspondiente al estado de Sonora, mientras que en la Fig. 20 se adjunta el cromatograma de la muestra 17 correspondiente al estado de Yucatán.

En la Fig. 21, 22, 23, 24, 25 y 26 se muestran los cromatogramas obtenidos del perfil de compuestos fenólicos de muestras representativas del estado de Nuevo León, Tamaulipas, Jalisco, Puebla, Oaxaca y Quintana Roo.

En la Tabla 14 se muestran los compuestos fenólicos presentes en las muestras de miel de los 8 estados del país, resaltando en amarillo los compuestos fenólicos que se observaron mayoritarios.

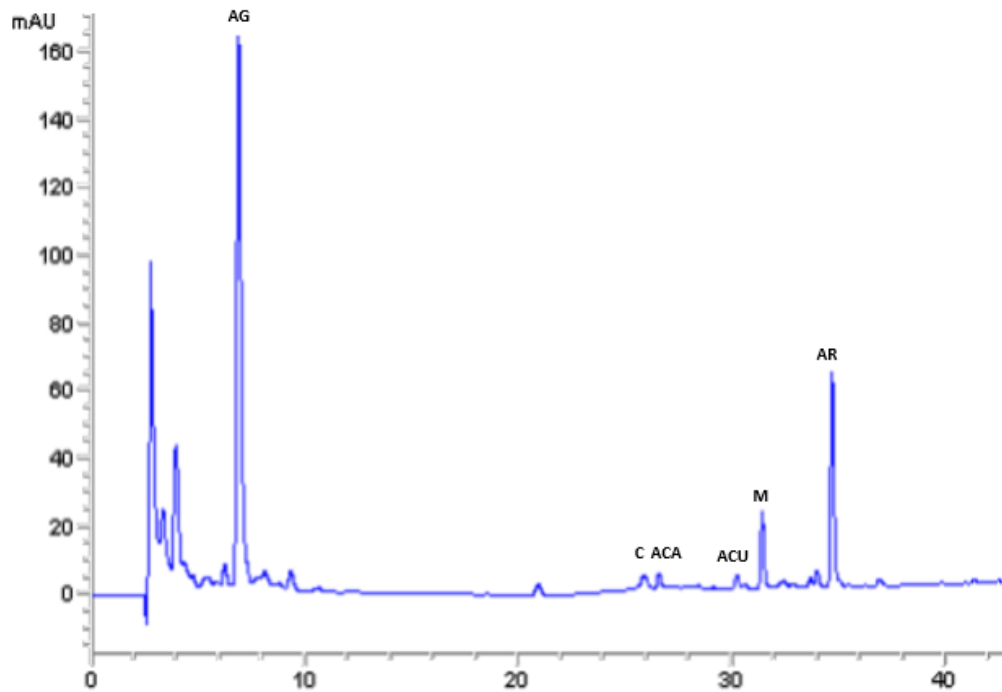


Figura 19. Cromatograma del perfil de compuestos fenólicos de miel de Sonora.
(Detección por UV $\lambda = 260$ nm.)

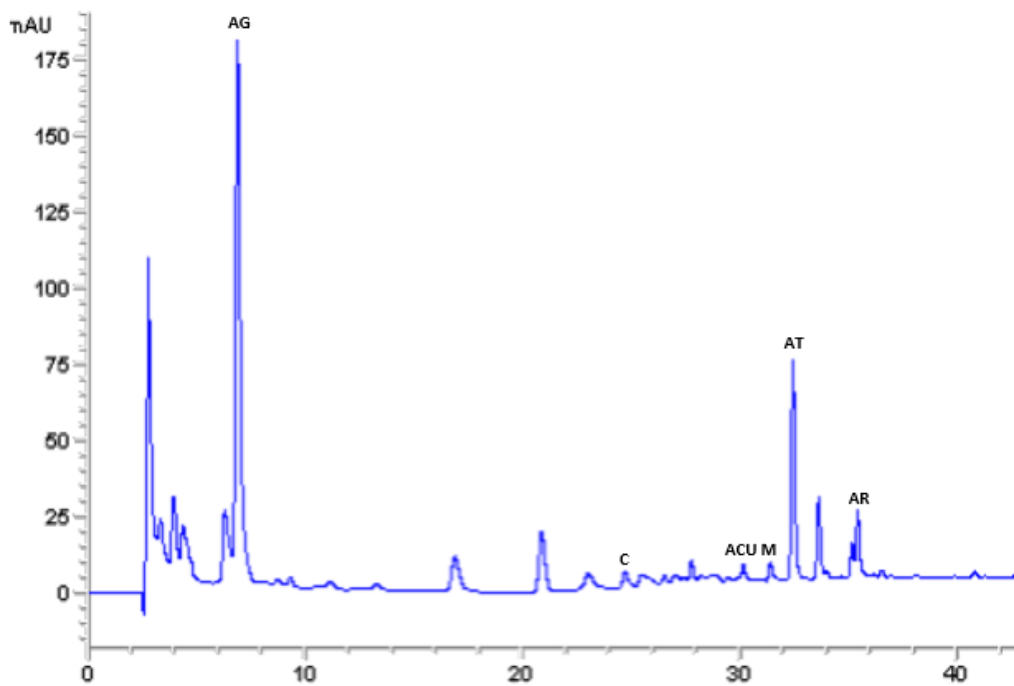


Figura 20. Cromatograma del perfil de compuestos fenólicos de miel de Yucatán.
(Detección por UV $\lambda = 260$ nm.)

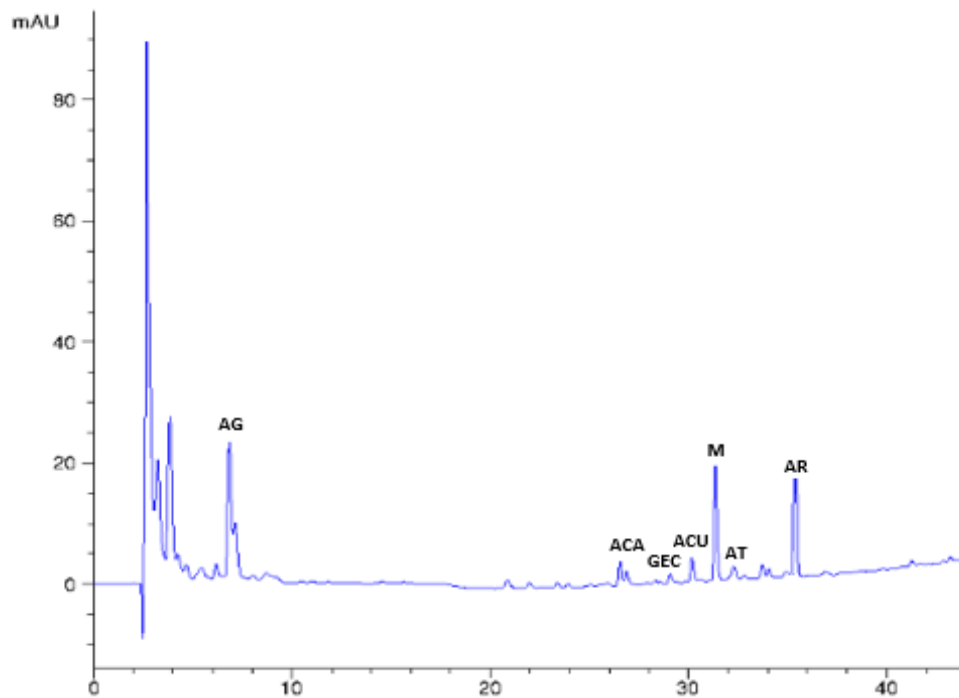


Figura 21. Cromatograma del perfil de compuestos fenólicos de miel de Nuevo León.
(Detección por UV $\lambda = 260$ nm.)

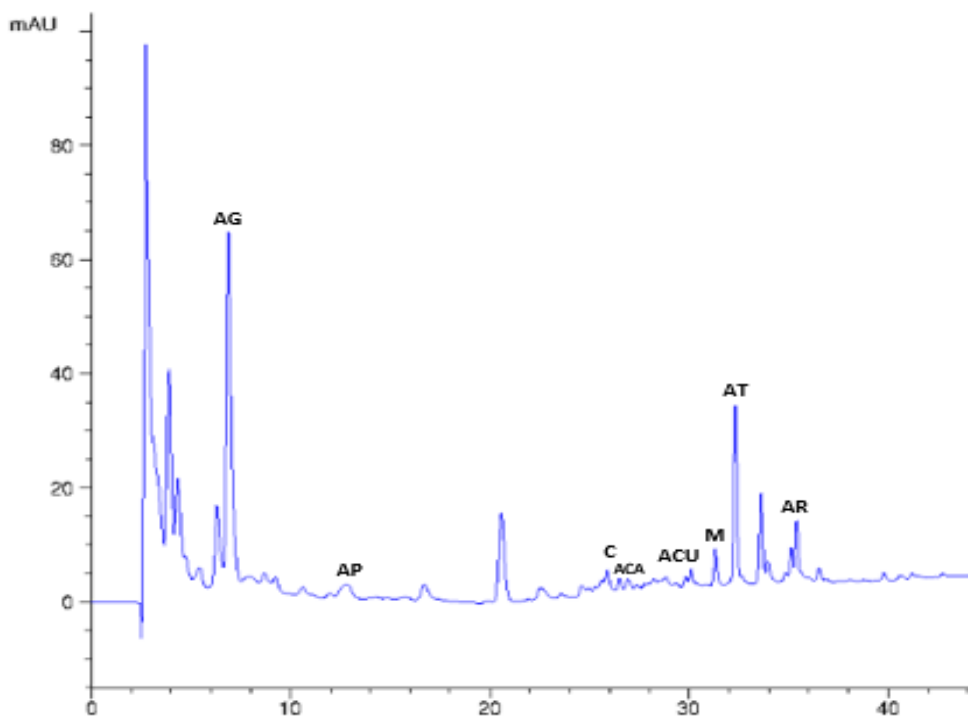


Figura 22. Cromatograma del perfil de compuestos fenólicos de miel de Tamaulipas.
(Detección por UV $\lambda = 260$ nm.)

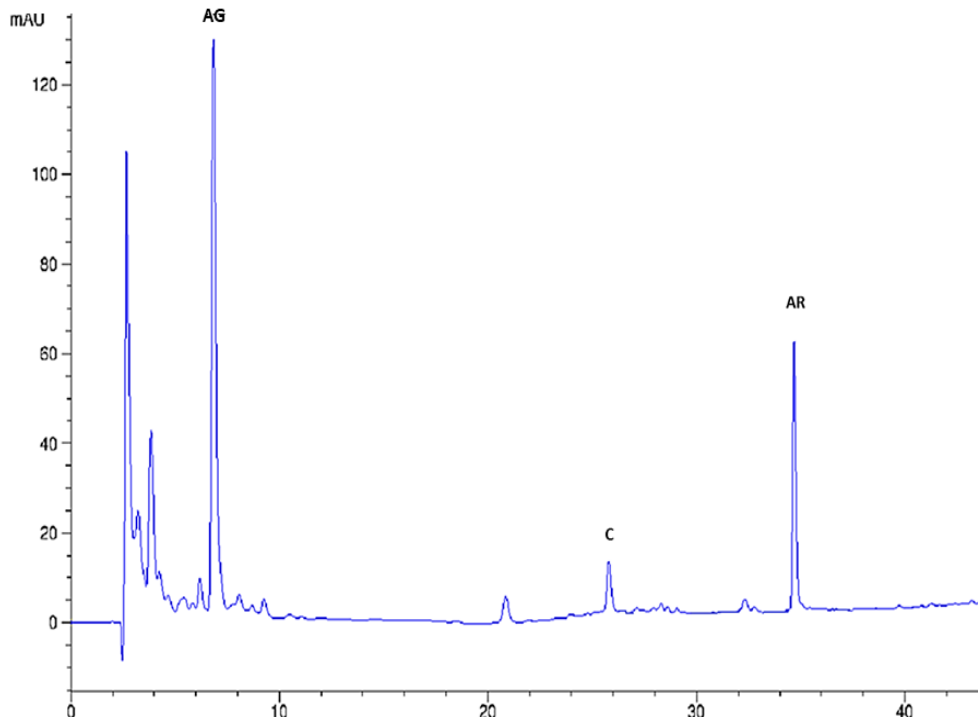


Figura 23. Cromatograma del perfil de compuestos fenólicos de miel de Jalisco.
(Detección por UV $\lambda = 260$ nm.)

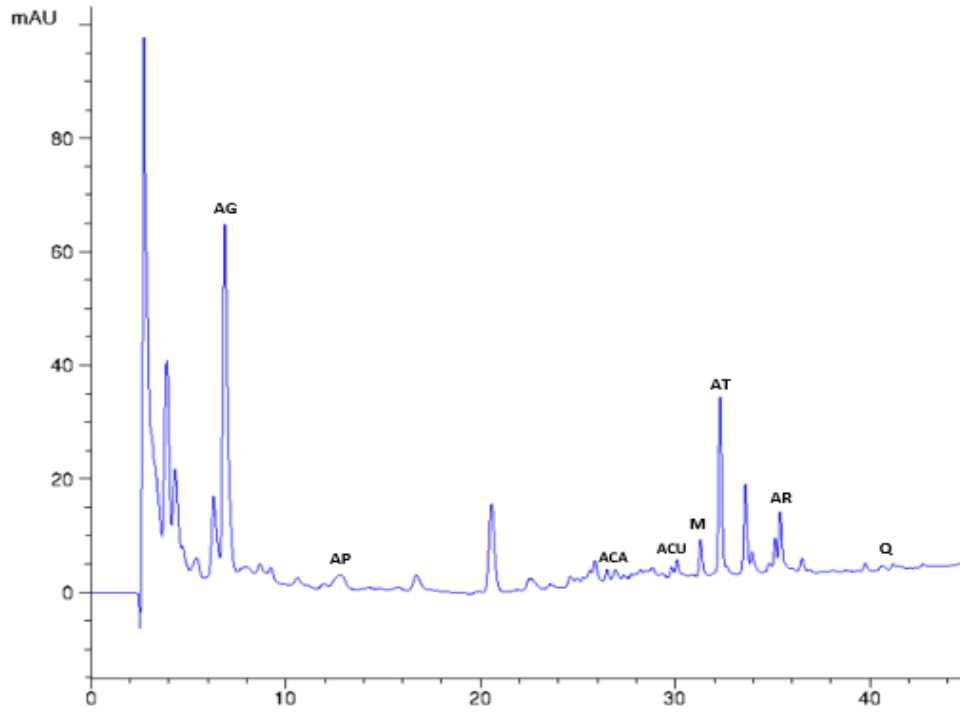


Figura 24. Cromatograma del perfil de compuestos fenólicos de miel de Puebla.
(Detección por UV $\lambda = 260$ nm.)

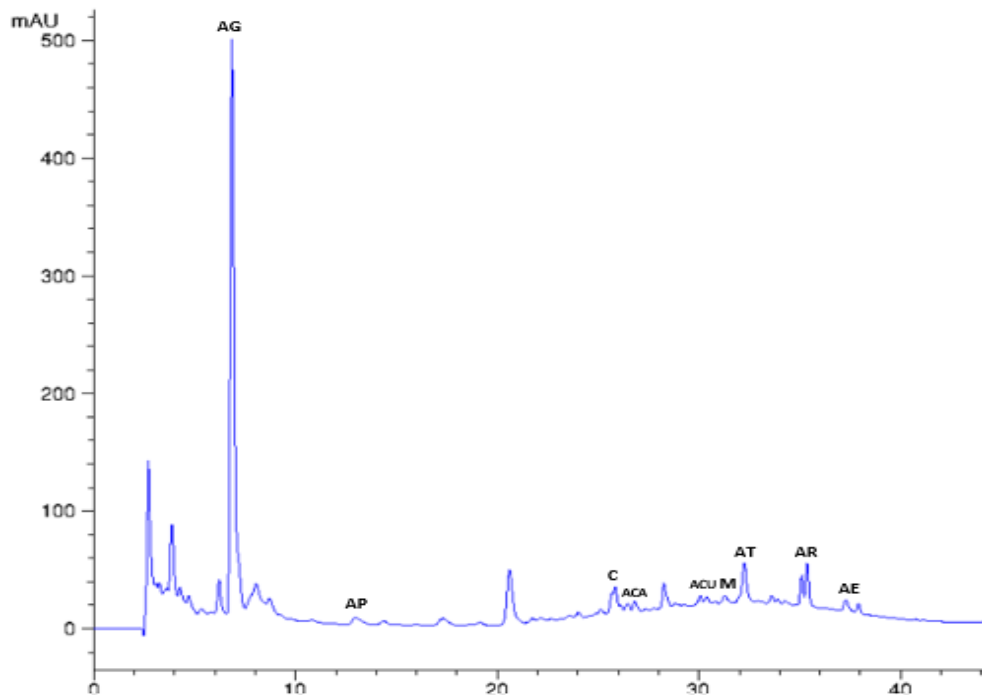


Figura 25. Cromatograma del perfil de compuestos fenólicos de miel de Oaxaca. (Detección por UV $\lambda = 260$ nm.)

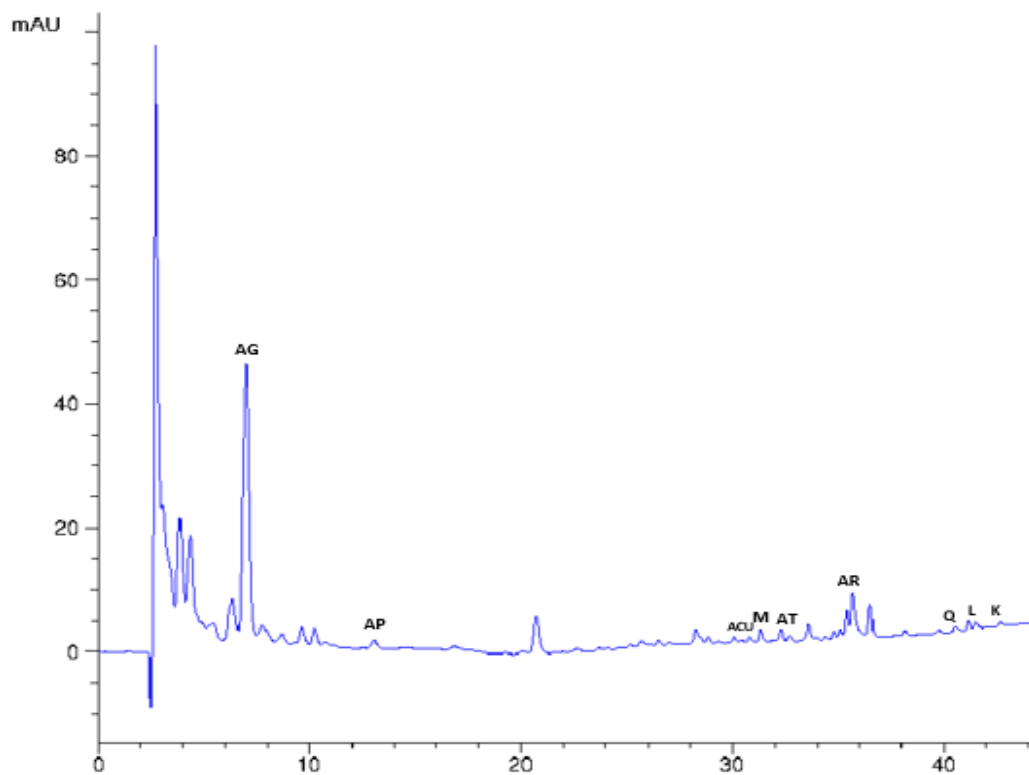


Figura 26. Cromatograma del perfil de compuestos fenólicos de miel de Quintana Roo. (Detección por UV $\lambda = 260$ nm.)

Tabla 14. Compuestos fenólicos en muestras de miel de 8 estados de México.

t_R (min)	Compuesto fenólico	Sonora	Nuevo León	Tamaulipas	Jalisco	Puebla	Oaxaca	Yucatán	Q. Roo
7.11	AG	*	*	*	*	*	*	*	*
13.2	AP			*		*	*	*	*
25.5	C	*		*	*		*	*	
27.12	ACA	*	*	*		*	*	*	
29.47	GEC		*						
30.49	ACU	*	*	*		*	*	*	*
31.62	M	*	*	*		*	*	*	*
32.00	AT		*	*		*	*	*	*
35.73	AR	*	*	*	*	*	*	*	*
37.94	AE						*		
40.72	Q					*		*	*
42.40	L								*
42.77	K								*
44.12	A								

6.5 Análisis quimiométrico

Para llevar a cabo el análisis quimiométrico, se utilizaron los cromatogramas obtenidos a partir del análisis del perfil de aminoácidos y compuestos fenólicos de 32 muestras de miel, los cuales fueron exportados en formato csv a una hoja de Excel, para posteriormente ser importados al Software Matlab y a la PLS Toolbox. Una vez importados los datos, se revisaron y se observaron algunos artefactos como línea base y desplazamientos. Posteriormente, se aplicaron pretratamientos para corregir los artefactos, como el escalado, la línea base y corrección de desplazamiento optimizado de correlación. Después se realizó una normalización área unidad y un centrado a la media para posteriormente construir un modelo multivariante de PCA, esto para observar si existían tendencias o agrupaciones entre los datos en base al origen geográfico de acuerdo al contenido de aminoácidos y compuestos fenólicos.

Primero se importaron los perfiles de aminoácidos y de compuestos fenólicos de manera individual, se aplicaron los pretratamientos, y se construyó el modelo de PCA, del cual se obtuvieron 2 componentes principales. Para este modelo, se realizó la Validación Cruzada, y se obtuvo una varianza explicada alcanzada de 66.72%, un valor de Raíz Media Cuadrada del Error de Calibración (RMSEC) de 0.0002784 y un valor de Raíz Media Cuadrada del Error en la Validación Cruzada (RMSECV) de 0.0005409. Posteriormente se obtuvo el gráfico de scores, el cual nos permite identificar las agrupaciones de las muestras en base a su perfil. En la Fig. 27 se muestra el gráfico de scores obtenido a partir del perfil de aminoácidos de las 32 muestras de miel, en el cual se observó que había dispersión de las muestras del mismo origen, por lo que no se observaron agrupaciones claras.

En la Fig. 28 se muestra el gráfico de scores obtenido a partir del perfil de compuestos fenólicos de las 32 muestras de miel, en el cual se observó menos dispersión en las muestras de Sonora, sin embargo aún había dispersión en muestras de otras regiones.

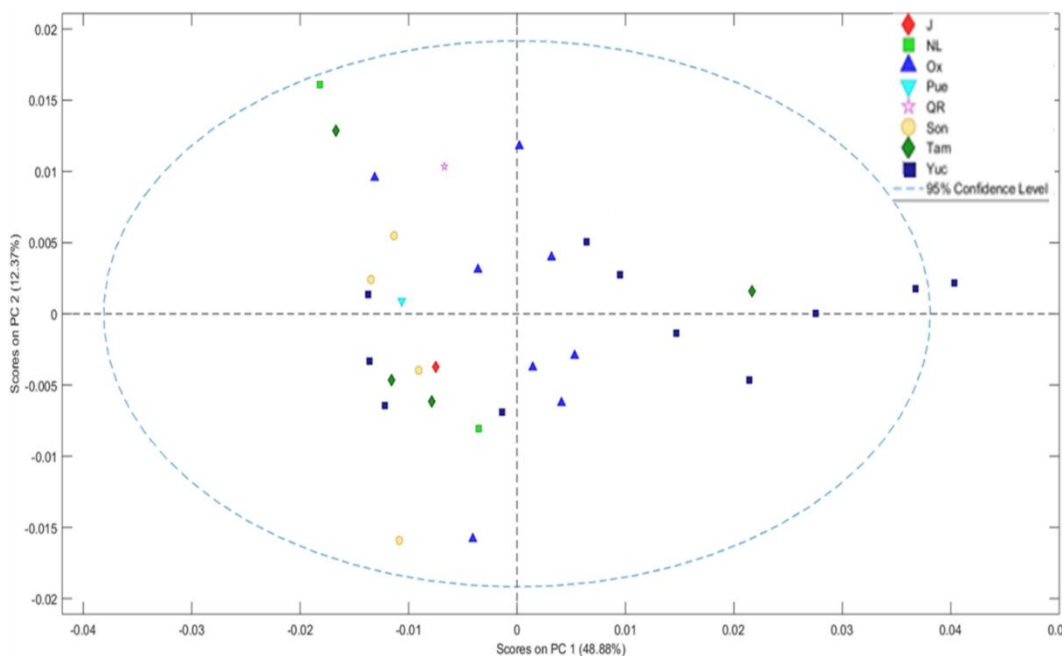


Figura 27. Gráfico de scores obtenido del PCA del perfil de aminoácidos.

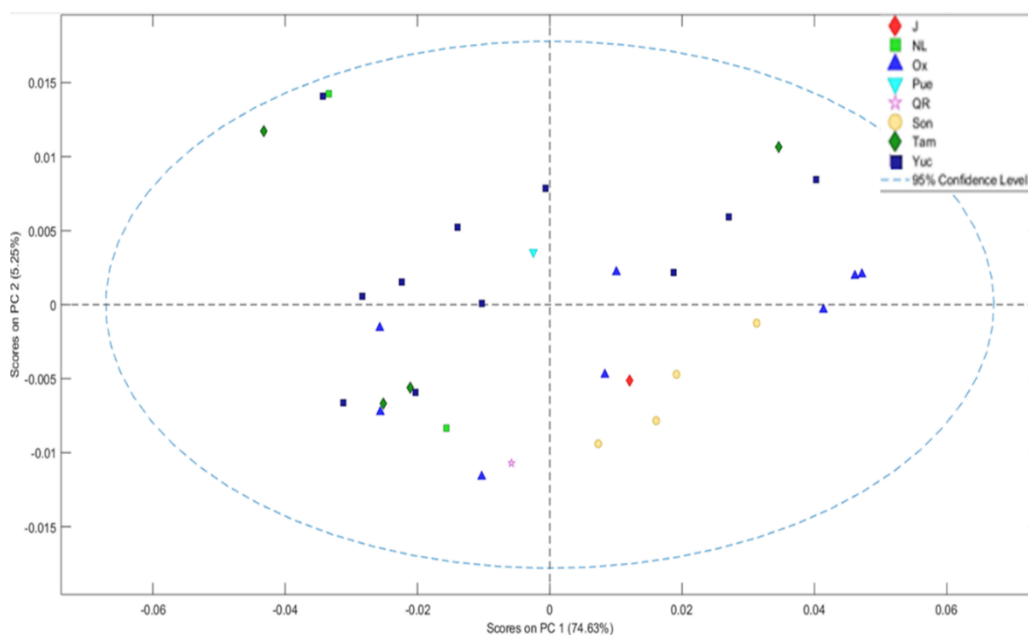


Figura 28. Gráfico de scores obtenido del PCA del perfil de compuestos fenólicos.

Posteriormente se combinaron ambos perfiles para obtener un vector extendido de datos. En la Fig. 29 se muestra el gráfico de los perfiles obtenidos con el vector extendido para todas las muestras (32 muestras x 6513 variables). En esta figura se representa en el eje de las X el número de variable, y en el eje de las Y la respuesta obtenida de las 32 muestras para ambos análisis cromatográficos.

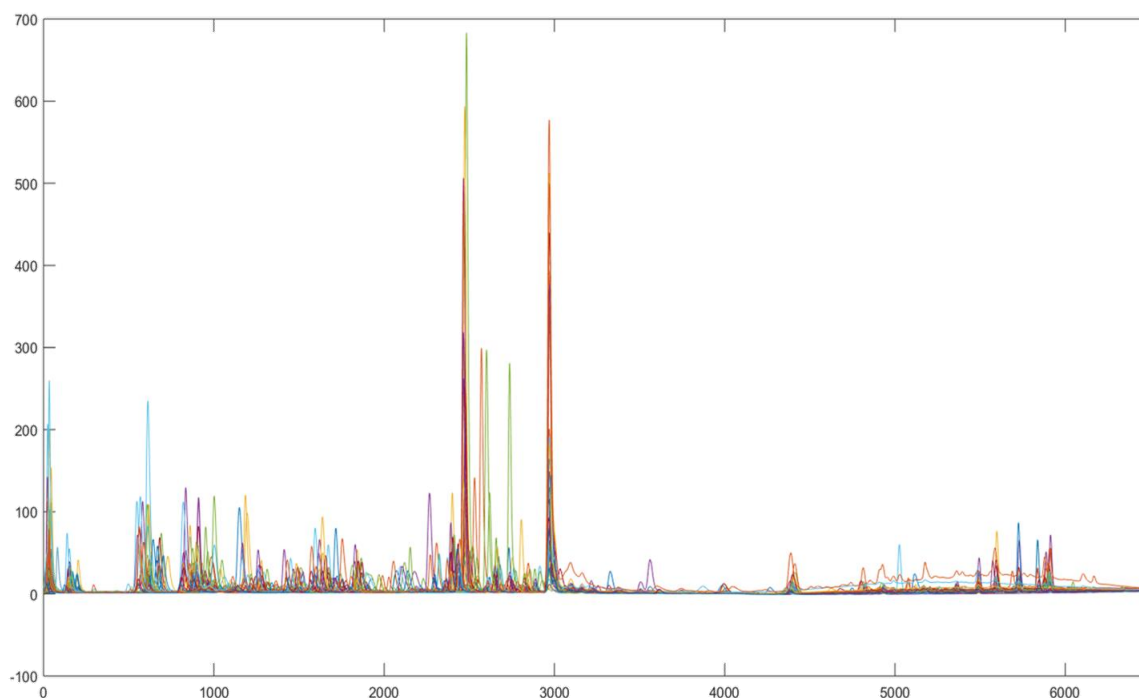


Figura 29. Gráfico de los perfiles obtenidos con el vector extendido para 32 muestras.

A partir del vector de datos extendido (Fig. 29), se realizó un nuevo escalado en el eje Y del gráfico, utilizando la función `bldata = scaledata (bldata,0,1)`. Posteriormente, se corrigió la línea base de todos los cromatogramas utilizando la función `[bldata,wts,baseline,vweights] = wlsbaseline (dataout,5)`, y se observó que la mejor corrección de línea base se obtenía al utilizar un polinomio de 5.

En la Fig. 30 se muestra el gráfico del vector extendido obtenido con las correcciones de escalado y línea base.

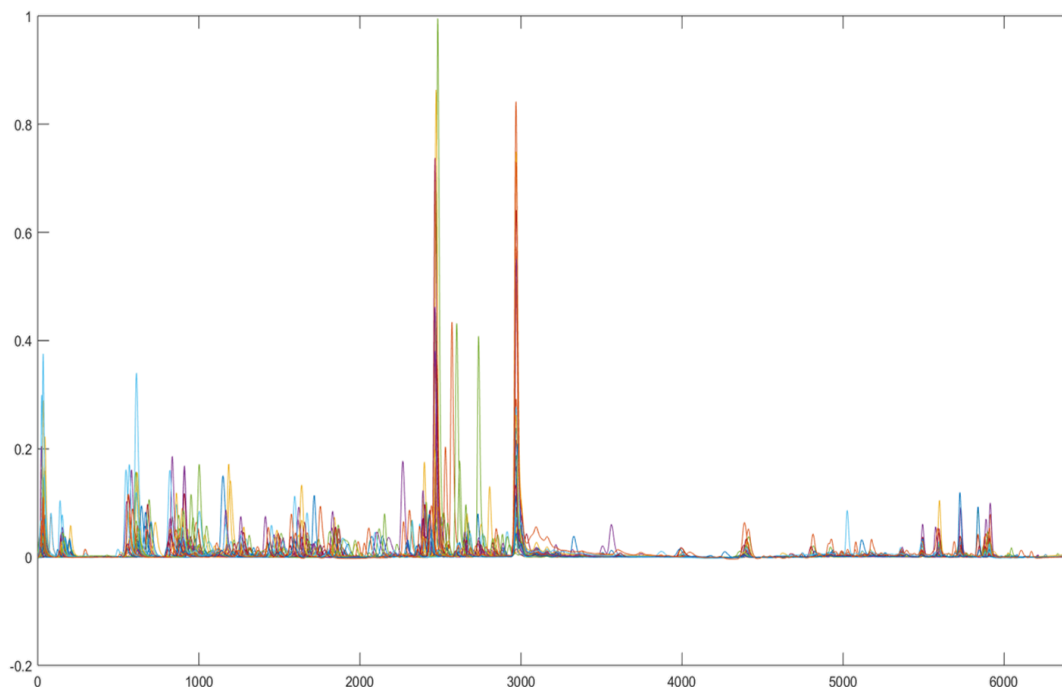


Figura 30. Gráfico del vector extendido con corrección de escalado y línea base.

Con el vector extendido obtenido a partir de las correcciones de escalado y línea base (Fig. 30) se corrigieron algunos desplazamientos observados en los tiempos de retención de las muestras, por lo que se utilizó el algoritmo de cow con la función $[Warping, XWarped, Diagnos] = cow(T, X, Seg, Slack, Options)$. Para aplicar el algoritmo de cow, primero se obtuvo un perfil combinado de referencia, dando como resultado el de la muestra 31 del estado de Oaxaca, el cual se muestra en la Fig. 31.

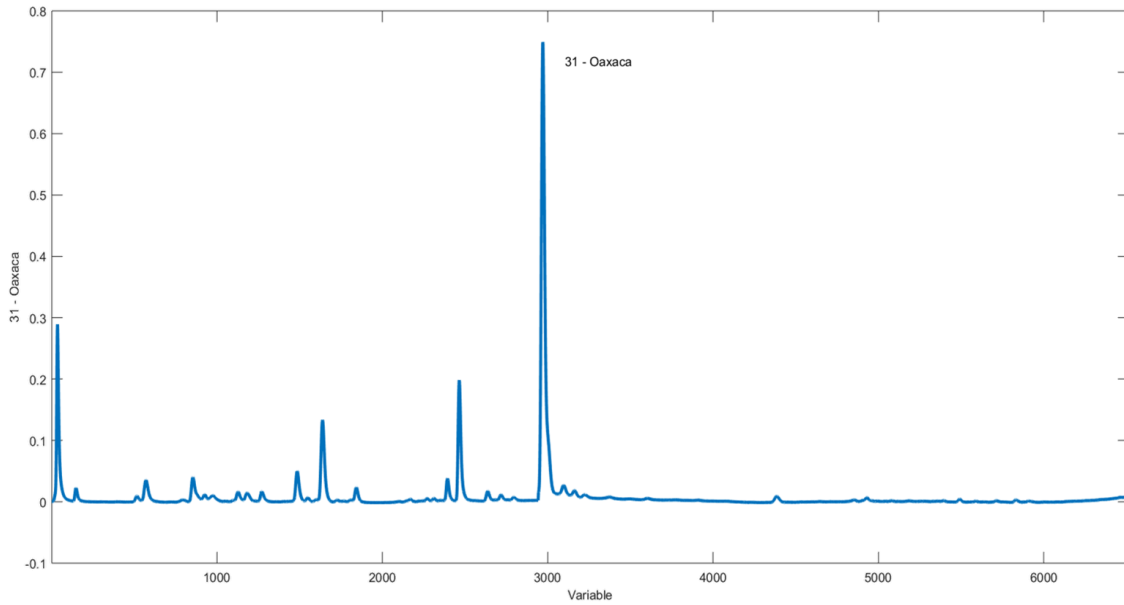


Figura 31. Cromatograma de la muestra referencia.

Posteriormente, fue necesaria la búsqueda de valores óptimos de segmentos y desplazamientos analizando los valores mínimos y máximos de algunas señales representativas de la matriz mostrada en la Fig. 26, en donde los rangos utilizados fueron [32 88 22 115] para aplicar la función $[\text{optim_pars}, \text{OS}, \text{diagnos}] = \text{optim_cow}(\text{X}, \text{optim_space}, \text{options}, \text{ref})$ dando como resultado los valores de 89 y 22.

A partir de esto, se aplicó el algoritmo de cow y se realizó un alineamiento detallado de los perfiles en donde se observó que se corrigieron algunos desplazamientos de las señales, en la Fig. 32 se muestra el ejemplo de la señal de ácido aspártico.

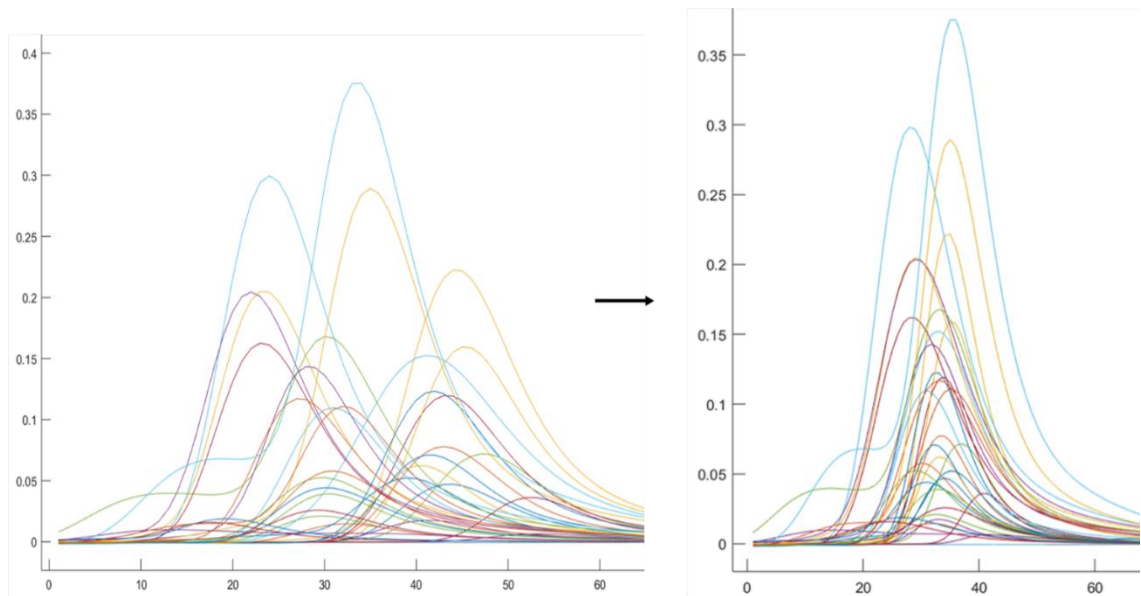


Figura 32. Señal de ácido aspártico antes y después de aplicar el algoritmo cow.

Una vez corregidos los artefactos de los perfiles (línea base y desplazamientos) se construyó un modelo de PCA utilizando la matriz de 32 x 6513 variables, para lo cual los datos fueron pretratados con la función de normalización de área unidad seguido de un centrado a la media, lo cual nos proporcionó el gráfico de scores mostrado en la Fig. 33. En este gráfico se observó la orientación de la mayoría de las mieles del estado de Oaxaca y Yucatán hacia valores positivos de la componente 2, mientras que las muestras de los demás estados se orientan hacia valores negativos de la misma componente, sin embargo, 5 muestras del estado de Yucatán y 1 muestra del estado de Oaxaca también se orientaron a valores negativos de la primera y segunda componente. Todas las muestras de Sonora se orientaron a valores positivos de la componente uno y a valores negativos de la componente dos, mientras que las muestras de Nuevo León y Tamaulipas se orientaron a valores negativos de la componente uno y dos, a excepción de una muestra.

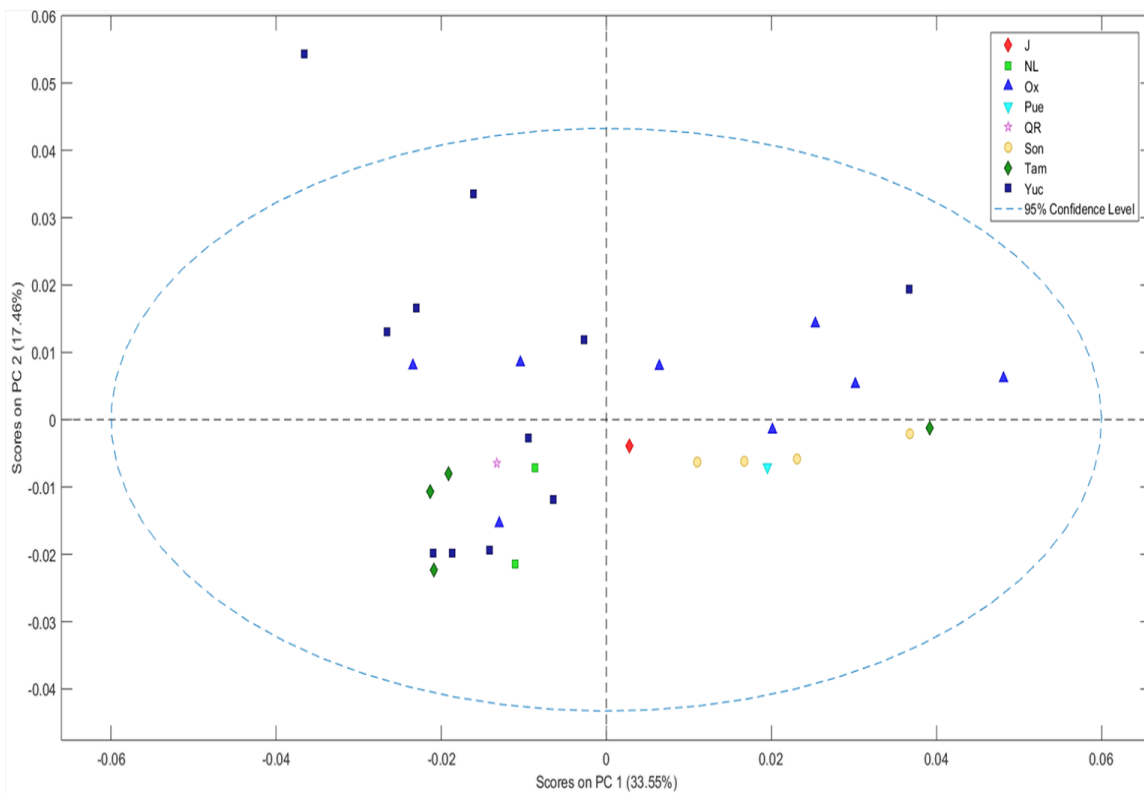


Figura 33. Gráfico de scores obtenido del PCA de perfiles combinados.

Finalmente, se obtuvo el gráfico de loadings observado en la Fig. 34 para identificar las señales responsables de la orientación de las 32 muestras en el gráfico de scores obtenido a partir del PCA. La identificación de las señales en el gráfico de loadings se llevó a cabo por medio del número de variable de las señales marcadas en la Fig. 34, y se compararon con el perfil obtenido de las muestras, dando como resultado la fenilalanina y el ácido gálico como señales responsables de que las muestras se orientaran a valores positivos de la componente 2, y las señales de ácido aspártico, asparagina y ácido rosmarínico como señales responsables que algunas muestras se orientaran a valores negativos de la misma componente.

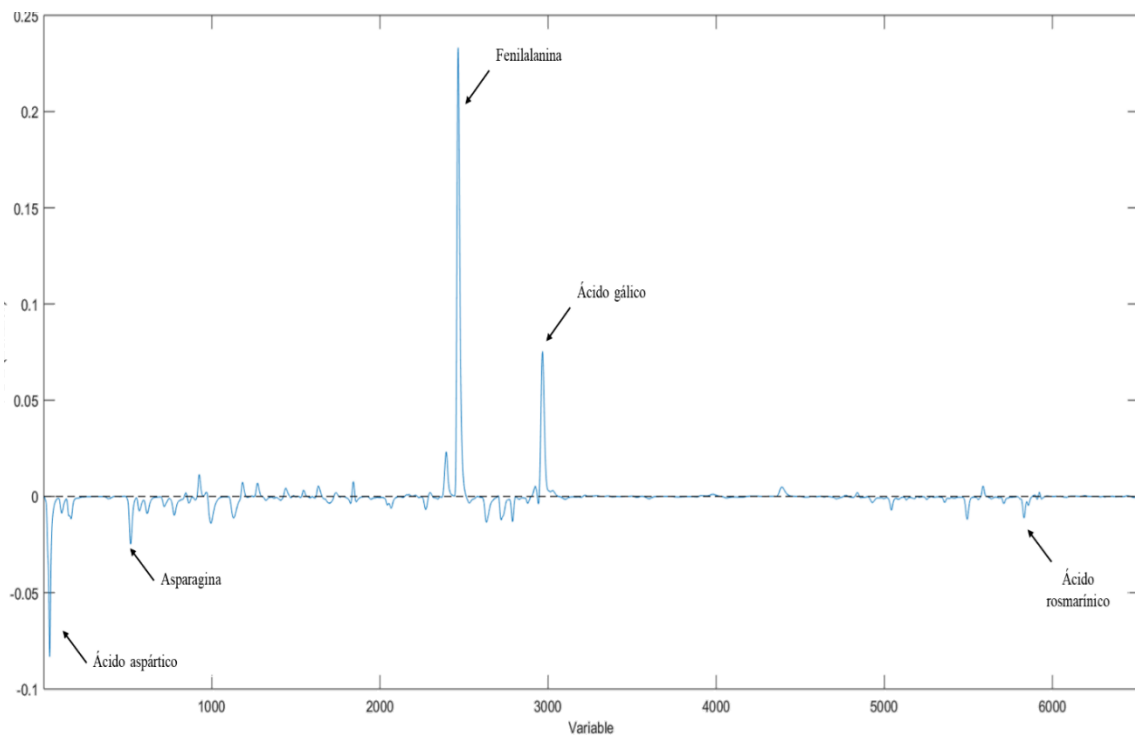


Figura 34. Gráfico de loadings obtenido del PCA.

6.6 Aplicación de la metodología desarrollada

Finalmente, se evaluó la aplicabilidad de la metodología desarrollada por medio del análisis de aminoácidos y compuestos fenólicos de 5 muestras de mieles de México. Posteriormente, se realizó el análisis quimiométrico para encontrar la posible relación en el perfil de estos analitos con su origen geográfico.

Para esta evaluación, se obtuvieron 5 muestras de miel correspondientes a la muestra 7 del estado de Sonora, muestras 14, 21 y 28 del estado de Yucatán, y la muestra 30 del estado de Oaxaca. A partir de los cromatogramas obtenidos de ambos perfiles, se obtuvo una matriz en el software Matlab, la cual fue aplicada en el modelo de predicción del PCA

construido de la Fig. 33 Cabe resaltar que, previo al modelo de predicción, los datos de esta matriz fueron tratados de igual manera como se describe en el punto 6.5.

En la Fig. 35 se adjunta el modelo de predicción obtenido a partir del perfil de aminoácidos y compuestos fenólicos de las 5 muestras de miel para evaluar la aplicabilidad de la metodología desarrollada, así mismo, se señala la identificación de cada una de las muestras en el PCA construido. Se observó que la muestra 7 correspondiente al estado de Sonora, se orienta a valores positivos de la componente 1 y a valores negativos de la componente 2, lo que la orienta a muestras de su misma zona geográfica; por el otro lado, las muestras 14, 21, 28 y 30 provenientes del estado de Yucatán y Oaxaca, se distribuyen a valores positivos de la componente dos, lo cual las ubica con muestras de su misma zona.

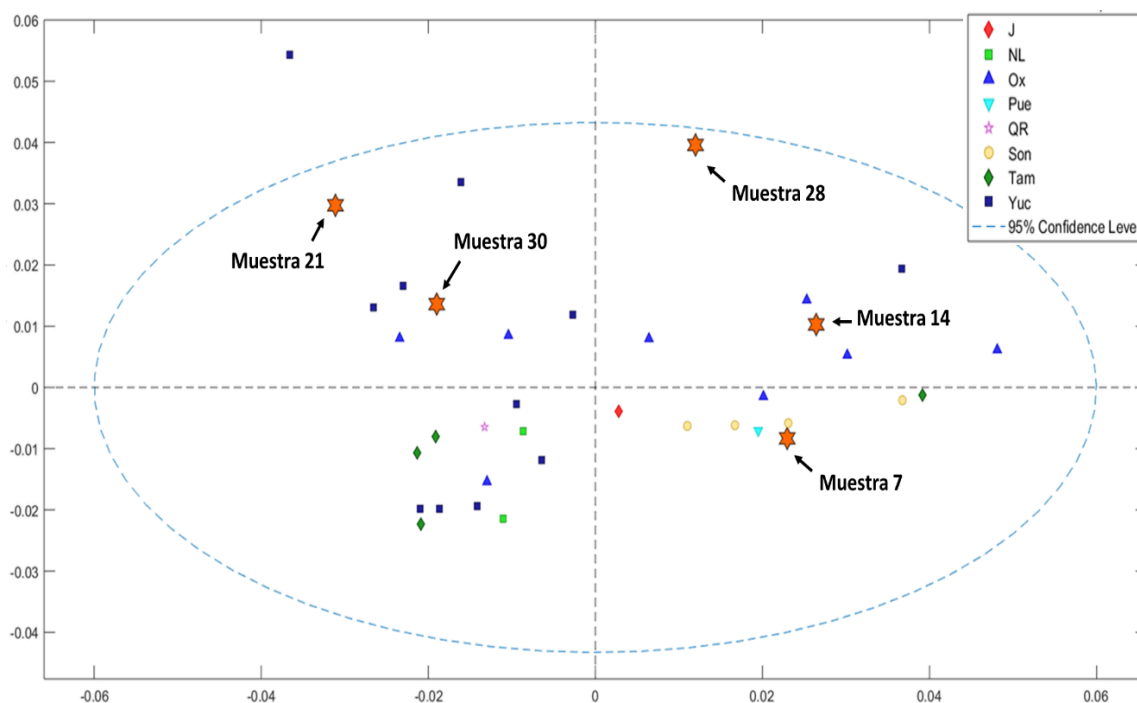


Figura 35. Gráfico del modelo de predicción de 5 muestras de miel.

7. DISCUSIÓN

El objetivo general del trabajo fue evaluar por métodos quimiométricos la combinación de perfiles cromatográficos de aminoácidos y compuestos fenólicos para agrupar mieles mexicanas de acuerdo a su origen geográfico, por lo cual se recolectaron 37 muestras de miel de 8 estados del país, correspondientes a 5 muestras del estado de Sonora, 2 muestras del estado de Nuevo León, 4 muestras del estado de Tamaulipas, 1 muestra del estado de Jalisco, 1 muestra del estado de Puebla, 1 muestra del estado de Quintana Roo, 9 muestras del estado de Oaxaca y 14 muestras del estado de Yucatán. Todas las muestras fueron recolectadas en un periodo de 14 meses (agosto del 2020 a octubre del 2021) y se almacenaron a temperatura ambiente y protegidas de la luz; la identificación de la región de cada muestra se adjunta en la Tabla 6.

Previo al análisis cromatográfico del perfil de aminoácidos y compuestos fenólicos de las muestras se llevó a cabo la confirmación de cada uno de los métodos con la finalidad de garantizar que ambos métodos se encontraran bajo control, de tal manera que, los cambios que se observaran en los perfiles de muestras de miel se debieran únicamente a la naturaleza de la muestra, y para ello, se partió de métodos analíticos previamente validados, en donde se analizaron mezclas de estándares con 17 aminoácidos y 14 compuestos fenólicos con los métodos cromatográficos desarrollados y validados. El orden de elución y los t_R de cada analito se muestran en las Tablas 7 y 8.

Para la confirmación de los métodos, se evaluó primeramente la selectividad que indica el grado en que el método puede cuantificar el analito objetivo en presencia de otros

analitos, matrices u otros materiales que puedan interferir (AOAC, 2019). En las Fig. 3 y 4 se muestran los blancos utilizados para ambos métodos, en donde se observó que en el cromatograma del blanco de derivatización para el análisis de aminoácidos, había presencia de señales procedentes de los reactivos que componen la solución derivatizante, sin embargo, ninguna de las señales intervino en la identificación de los analitos de interés, al tratarse de señales muy pequeñas. Es importante mencionar que es fundamental cuidar los tiempos de reacción para evitar señales de mayor intensidad en los cromatogramas de las muestras, ya que se corre el riesgo de no haber completado la reacción y podrían aparecer residuos de los reactivos sin reaccionar, lo cual afectaría en la identificación de los analitos de interés, así como en la reproducibilidad de los análisis de las muestras. En el caso del blanco de fase móvil para el análisis de compuestos fenólicos no se observaron señales que pudieran interferir con el análisis de las muestras, sin embargo, se observaron cambios en la línea base, esto debido al cambio de gradiente del método, pero esto no interfiere con la identificación de las señales de los analitos de interés.

La repetibilidad de los métodos se refiere al grado de concordancia de los resultados cuando las condiciones se mantienen lo más constantes posible con el mismo analista, reactivos, equipos e instrumentos realizados en un periodo de tiempo corto (AOAC, 2019). Por otro lado, la reproducibilidad se refiere al grado de concordancia de los resultados cuando las condiciones de operación son tan diferentes como sea posible, para este caso, la evaluación se llevó a cabo de la misma manera que se evaluó la repetibilidad a diferencia de la variación en las réplicas y días de análisis. En este caso, la muestra 1 fue tratada y analizada por triplicado en días diferentes no consecutivos. En ambos casos, los valores de DER obtenidos fueron menores al 6% y 11% (Tablas 9, 10, 11 y 12) esto nos

indica que los resultados obtenidos a partir del análisis de los perfiles de estudio por triplicado en las muestras tendrán concordancia cuando las condiciones se mantengan lo más constantes posibles con el mismo analista, reactivos, equipos e instrumentos si se realiza en un mismo día o en días diferentes no consecutivos, lo cual confirma la repetibilidad y reproducibilidad del método. Esto es importante, debido a que la finalidad del trabajo es establecer una metodología que permita ayudar a la autenticidad de la miel a través del análisis cromatográfico del perfil de aminoácidos y compuestos fenólicos con ayuda de métodos quimiométricos para establecer una huella dactilar de su origen geográfico, por lo que el grado de concordancia de los resultados entre análisis es indispensable.

Por otro lado, para la evaluación de la estabilidad de las muestras, se observó si existían cambios en la intensidad de las señales de los analitos identificados cuando el análisis se llevaba a cabo el día en que se preparaba la muestra, y cuando esa muestra era almacenada a 4°C para su análisis. En cuanto al análisis de aminoácidos, se observó una disminución en las señales desde el día 3 de análisis, sin embargo, la disminución fue variable dependiendo del aminoácido, ya que fue más notorio en la señal de alanina como se muestra en la Fig. 9, en donde se observó que al día 8 ya había disminuido casi al 50% su respuesta. Si bien, es importante mencionar que existen diferentes clasificaciones de los aminoácidos, una de ellas es en base al carácter de sus cadenas laterales, ya que se dividen en polares con carga, polares sin carga, no polares y aquellos con propiedades únicas (Ferrier, 2017); estas características son importantes debido a que existen diferentes interacciones intramoleculares o intermoleculares entre ellos, y es debido a esto, que juega un papel muy importante la estabilidad de los aminoácidos al estar en solución. Con los

resultados obtenidos, se observó que la estabilidad de las muestras tratadas para el análisis de aminoácidos es baja, por lo que se debe realizar el análisis cromatográfico el mismo día que se lleva a cabo el tratamiento de la muestra. Por otro lado, de igual manera se llevó a cabo la evaluación de la estabilidad de la muestra tratada para el análisis de compuestos fenólicos, en donde no se observaron cambios en las áreas de las señales de los analitos identificados, en la Fig. 10 se representa un gráfico de la intensidad del área del ácido gálico a los días 1, 3 y 8 de análisis, en donde el porcentaje de intensidad de área se mantiene estable después del almacenamiento de la muestra a 4°C por 8 días, por lo que se mostró la estabilidad de la muestra tratada para el análisis de compuestos fenólicos; de esta manera, es posible realizar el análisis cromatográfico sin presentar cambios en las intensidades de las áreas de los analitos después de almacenar la muestra tratada hasta 8 días.

Una vez confirmados los parámetros de selectividad, repetibilidad, reproducibilidad y estabilidad de las muestras tratadas para evaluar el desempeño de los métodos cromatográficos, se realizó el análisis de las 37 muestras bajo las condiciones del método establecidas en la Tabla 4 para el análisis de aminoácidos por CLAR/FLD y en la Tabla 5 para el análisis de compuestos fenólicos por CLAR/UV. De esta manera, se obtuvo el perfil cromatográfico de todas las muestras de miel de diferentes estados de México, en donde cada uno se analizó a detalle para identificar el perfil de aminoácidos y compuestos fenólicos en función del tiempo de retención y el orden de elución.

En el caso del perfil de aminoácidos se mostraron variaciones notables en la composición dependiendo del origen geográfico de las muestras. Cabe mencionar que el

análisis de aminoácidos se llevó a cabo por una derivatización en donde reaccionan con el OPA en presencia de un reductor fuerte, en condiciones alcalinas, dando un compuesto isoindólico que puede ser detectado por fluorescencia, sin embargo, esta metodología sólo aplica para aminoácidos con grupos amino primario, por lo que en este estudio no fue posible detectar la presencia de prolina por tener un grupo amino secundario. En las Fig. 11 – 18 se muestran cromatogramas representativos de algunas muestras de diferentes regiones de la República Mexicana y en la Tabla 13 se muestra un resumen de los aminoácidos encontrados en las muestras evaluadas por estados del país. Se observó que los aminoácidos más abundantes presentes en las muestras fueron Asp, Glu, Asn, His, Ala, Phe y Leu, así mismo también se detectaron Ser, Gly, Arg, Thr, Met e Ile, pero en cantidades menores. Por otro lado, se observó que, en muestras de miel del estado de Sonora, Nuevo León y Tamaulipas predominaron el ácido aspártico y la asparagina, mientras que en muestras de Yucatán, Oaxaca y Quintana Roo, fue característica la presencia de fenilalanina. Cabe resaltar que, entre los resultados obtenidos, en todas las muestras no hubo presencia de los aminoácidos Val y Lys, además de no observar presencia de Trp a excepción de la muestra de Jalisco, en donde cabe resaltar que en este estado fue donde se encontró la mayor cantidad de Ala, por lo que podría sugerir alguna característica importante al momento de clasificar las muestras por origen geográfico. Por otro lado, en la muestra de Puebla, se identificó en mayor proporción la Leu, lo que también podría contribuir en su clasificación. Es importante mencionar que a nivel internacional se han reportado diferencias entre el contenido de aminoácidos de mieles de diferentes países, en el estudio de Sun, Z. y colaboradores (Sun, 2017), se identificó que el aminoácido que estaba en mayor proporción en las mieles de China era la Phe, sin embargo, también se demostró que en ninguna muestra había presencia de Met ni Cis, por

lo que lo utilizó como marcador para diferenciar entre mieles de España y Francia, en donde sí estaban presentes estos aminoácidos, comparando estos resultados, en nuestro estudio si se logró identificar la presencia de metionina, por lo que se pudiera sugerir una diferencia con las mieles de origen Chino. Por otro lado, en el estudio de Hermosin, I. y colaboradores (Hermosin, 2003), se identificaron como aminoácidos mayoritarios en mieles de España, la Phe y la Lys; esto muestra una diferencia de nuestro trabajo, ya que en ninguna de las muestras se identificó la Lys, por lo que pudiera resultar interesante la diferenciación entre mieles de México y de España.

Por otro lado, el estudio del perfil de compuestos fenólicos de las muestras mostró algunas variaciones en la composición dependiendo del origen geográfico de las muestras. En las Fig. 19 – 26 se muestran cromatogramas representativos de algunas muestras de diferentes regiones del país, mientras que en la Tabla 14 se muestra un resumen de los compuestos fenólicos encontrados en las muestras evaluadas por cada uno de los estados. Se observó que los compuestos fenólicos más abundantes en todas las muestras fueron el AG, M, AT y AR, así mismo, se detectaron en menores cantidades el AP, C, ACA, GEC y ACU. En los resultados obtenidos, se observó que en las muestras del estado de Sonora, Nuevo León y Tamaulipas es característica la presencia de AG, M y AR. Por otro lado, en los estados de Jalisco, Puebla, Oaxaca, Yucatán y Q. Roo siempre predomina la señal de AG, sin embargo, existen diferencias en la cantidad de compuestos fenólicos presentes, ya que, en los estados de Oaxaca, Yucatán y Q. Roo se identificaron 9 compuestos fenólicos, lo cual representa una mayor cantidad a diferencia de los demás estados, en donde sólo se identificaron 3 compuestos fenólicos en la muestra del estado de Jalisco y 8 en la muestra del estado de Puebla. Cabe resaltar, que en las muestras del estado de

Yucatán predominó aparte de la señal de AG, la presencia de AT y AR. En todas las muestras analizadas, no se identificó la A, y solamente en la muestra del estado de Q. Roo se identificó la señal de K y L, mientras que el GEC sólo se identificó en el estado de Nuevo León y el AE en el estado de Oaxaca, lo que pudiera ayudar en su clasificación por regiones. Durante la última década, la medición de compuestos fenólicos en la miel ha sido de mucho interés, lo que se atribuye a su amplio espectro de actividad farmacológica beneficiosa y su potencial para abordar cuestiones relacionadas con la autenticidad y el origen de la miel (Hanim, 2022). En este análisis de perfiles de compuestos fenólicos, se observó que los compuestos fenólicos mayoritarios eran los ácidos fenólicos, lo cual coincide con otros estudios a nivel internacional (Kaškonienė, 2009) (Cianciosi, 2018). Por otro lado, en el estudio de Lawag, I. y colaboradores (Lawag, 2022) mencionan que China, Italia y Turquía son los principales centros de investigación de compuestos fenólicos de la miel, y hasta la fecha, se han informado 161 compuestos fenólicos individuales pertenecientes a cinco grupos principales de compuestos, siendo el ácido cafeico, el ácido gálico, el ácido ferúlico y la quercetina los más ampliamente informados entre ellos, cabe señalar que todos los estudios han sido enfocados a mieles de Europa y Asia mayoritariamente, mientras que en América el estudio se ha enfocado a mieles de Estados Unidos, Brasil y Argentina, por lo que nuestro estudio contribuye a la identificación de estos compuestos fenólicos, lo cual es útil en casos de denominación de origen protegida, ya que es un objetivo que cada vez está siendo más utilizado para confirmar la autenticidad de la miel frente al problema de la adulteración de este alimento. Para lograr este objetivo, muchos estudios han ido enfocados en el análisis de un solo componente químico en la miel, sin embargo, el proporcionar una huella dactilar por

origen geográfico es una estrategia que podría resultar con ayuda del análisis de perfiles combinados.

En nuestro trabajo además de identificar el contenido de aminoácidos y compuestos fenólicos mayoritarios en muestras de miel, se evaluó por métodos quimiométricos la combinación de los perfiles para observar agrupaciones de las mieles mexicanas de acuerdo a su origen geográfico, por lo que se realizó un PCA en el software Matlab usando la PLS Toolbox con los datos obtenidos del análisis cromatográfico de 32 muestras. En las Fig. 27 y 28 se muestra el gráfico de scores obtenido del PCA del perfil de aminoácidos y del perfil de compuestos fenólicos, en ambos casos se mostró dispersión de las muestras de mismas regiones, por lo que no se apreciaron agrupaciones claras en base al contenido de estos analitos con su origen geográfico. Cabe mencionar que a pesar de mostrar dispersión en las muestras de mismas zonas como por ejemplo en las muestras de Oaxaca, hay similitud en su contenido químico, sin embargo, la presencia de señales como ácido aspártico que también están presentes en muestras de otras zonas, son responsables de que se observe esta dispersión en el modelo y se ubiquen en cuadrantes del gráfico de otras regiones.

En la Fig. 33 se muestra el gráfico de scores obtenido al combinar ambos perfiles, en donde se observó que hubo menos dispersión de las muestras en base al contenido de aminoácidos y compuestos fenólicos con su origen geográfico. En este gráfico se aprecia la orientación de la mayoría de las mieles del estado de Oaxaca y Yucatán hacia valores positivos de la componente 2, mientras que las muestras de los estados de Sonora, Tamaulipas, Nuevo León, Quintana Roo, Jalisco y Puebla se orientan hacia valores

negativos de la misma componente, sin embargo, 5 muestras del estado de Yucatán (10, 11, 15, 26 y 27) y 1 muestra del estado de Oaxaca (34) también se orientaron a valores negativos de la primera y segunda componente. Todas las muestras de Sonora se orientaron a valores positivos de la componente uno y a valores negativos de la componente dos, mientras que las muestras de Nuevo León y Tamaulipas se orientaron a valores negativos de la componente uno y dos, a excepción de la muestra 23. El gráfico de loadings de la Fig. 34 nos indica las señales responsables de la orientación de las muestras; en el caso de las muestras que se encuentran a valores positivos de la componente dos, se puede apreciar que el contenido de Phe y el contenido de AG son los indicativos para que la mayoría de las muestras del estado de Yucatán y Oaxaca se orienten de esta manera en el gráfico, mientras que las señales de Asp, Asn y AR son las responsables de que las muestras de los demás estados se orienten a valores negativos de la segunda componente. Cabe señalar, que estos resultados coinciden con el análisis de los cromatogramas obtenidos de las muestras, sin embargo, algunas muestras del estado de Yucatán presentaron además de las señales de Phe y AG, las señales de Asp y Ans, lo cual las orienta hacia los valores negativos de la componente dos. En la Fig. 35 se muestra el modelo de predicción obtenido a partir del perfil de aminoácidos y compuestos fenólicos de la muestra 7, 14, 21, 28 y 30 para evaluar la aplicabilidad de la metodología desarrollada, en este gráfico se observa que la muestra 7 correspondiente al estado de Sonora, se orienta a valores positivos de la componente 1 y a valores negativos de la componente 2, lo que la orienta a muestras de su misma zona geográfica; por el otro lado, las muestras 14, 21, 28 y 30 provenientes del estado de Yucatán y Oaxaca, se distribuyen a valores positivos de la componente dos, lo cual las ubica con muestras de su misma zona.

Con los resultados obtenidos, se pudiera mencionar que las señales identificadas en la Fig. 34 representan una posible diferenciación entre el perfil de aminoácidos y compuestos fenólicos de mieles de la zona norte y sur de México que ayude a identificar el origen geográfico al momento de querer saber su autenticidad, ya que se observan tendencias en las orientaciones de las muestras en base al contenido de estos analitos en la Fig. 33. Si bien, esta diferenciación entre zonas es importante debido a la gran diversidad de flora que puede encontrarse en ambas regiones, y que contribuyen en el contenido de estos analitos en la miel (Castañón, 2009) (Martínez et al., 2020), no se lograron observar agrupaciones claras que permitan diferenciarlas en este estudio, por lo que se sugiere incluir mayor número de muestras para cubrir regiones que no se incluyeron en el trabajo con la finalidad de enriquecer la información y lograr una mejor clasificación que permita implementarse como una herramienta de detección fácil y rápida que pudiera respaldar los análisis incluidos en las normativas existente para contribuir en la autenticación de la miel.

8. CONCLUSIÓN

1. En esta primera aproximación del estudio combinado de aminoácidos y compuestos fenólicos se lograron observar tendencias en base a señales características que pudieran ayudar en la distinción entre zona norte y sur de México.
2. El análisis quimiométrico es una herramienta útil para la evaluación del análisis combinado del perfil de aminoácidos y compuestos fenólicos de mieles de México como estrategia para la determinación del origen geográfico.
3. La combinación de perfiles proporcionó una mejor distribución de las muestras en base al contenido de aminoácidos y compuestos fenólicos con su origen.
4. Con la finalidad de enriquecer la información hasta ahora obtenida, es necesario analizar mayor número de muestras abarcando más regiones del país.
5. Este estudio representa un primer acercamiento en las nuevas estrategias de análisis, detección e identificación de estos analitos utilizando la CLAR para establecer una huella dactilar en mieles de la República Mexicana.

9. PERSPECTIVAS

- Analizar el contenido de aminoácidos y compuestos fenólicos de muestras de miel de todos los estados del país para establecer una agrupación de mayor alcance.
- Analizar el contenido de aminoácidos y compuestos fenólicos en diferentes periodos de tiempo para establecer una mejor agrupación y observar variaciones por periodos de cosecha.
- Aplicar la metodología desarrollada utilizando muestras de miel de diferentes países.

10. BIBLIOGRAFIA

- Ahmed, S., Sulaiman, S. A., Baig, A., Ibrahim, M., Liaqat, S., Fatima, S., Jabeen, S., Shamim, N., & Othman, N. H. (2018). Honey as a Potential Natural Antioxidant Medicine: An Insight into Its Molecular Mechanisms of Action. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8367846>
- Akbari, E., Baigbabaei, A., & Shahidi, M. (2020). Determination of the floral origin of honey based on its phenolic profile and physicochemical properties coupled with chemometrics. *International Journal of Food Properties*, 23(1), 506–519. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1740249>
- Álvarez-Suárez, JM, Tulipani, S., Romandini, S. et al.. (2010). Contribution of honey in nutrition and human health: A review Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Mediterr J Nutr Metab* 3, 15–23 (2010). <https://doi.org/10.1007/s12349-009-0051-6>
- AOAC International. (2019). Guideline for Dietary Supplements and Botanical (Appendix K). AOAC Official Method Analysis, 8,9,11. www.AOAC.
- Baena-Díaz, F., Chévez, E., Ruiz, F. & Porter-Bolland, L. (2021). *Apis mellifera* en México: producción de miel, flora melífera y aspectos de polinización. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v13i2.5960>
- Badui, S., Bourges, H. & Anzaldúa, A. (2006). *Química de los alimentos*. Editorial Alhambra Mexicana, 1, 453–502.
- Castañón, C. (2009). Mieles diferenciadas de la Península de Yucatán y su mercado. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). *Corredor Biológico Mesoamericano México*. <https://biblioteca.ecosur.mx/>

- Cheung, Y., Meenu, M., Yu, X., & Xu, B. (2019). Phenolic acids and flavonoids profiles of commercial honey from different floral sources and geographic sources. *International Journal of Food Properties*, 22(1), 290–308. <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1579835>
- Chin, N. L. , & Sowndhararajan, K. (2020). A Review on Analytical Methods for Honey Classification, Identification and Authentication. In V. de Alencar Arnaut de Toledo, & E. D. Chambó (Eds.), *Honey Analysis - New Advances and Challenges*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90232>
- Cienciosi, D., Forbes-Hernández, T. Y., Afrin, S., Gasparri, M. et al. (2018). Phenolic Compounds in Honey and Their Associated Health Benefits: A Review. *Molecules* (Basel, Switzerland), 23(9), 2322. <https://doi.org/10.3390/molecules23092322>
- Ciulu, M., Spano, N., Pilo, M. I., & Sanna, G. (2016). Recent Advances in the Analysis of Phenolic Compounds in Unifloral Honeys. *Molecules*, 21(4). <https://doi.org/10.3390/molecules21040451>
- Ferrier, D. R., & Jameson, B. A. (2017). *Bioquímica*. Barcelona: Wolters Kluwer.
- Food and Agriculture Organization, FAO. (2009). Bees and their role in forest livelihoods. A guide to the services provided by bees and the sustainable harvesting, processing and marketing of their products. *Production and Trade of Beeswax* (Chap 10) 51–53.
- Food and Agriculture Organization, FAO. (2019). Norma para la miel. *Comisión Del Codex Alimentarius*, 8(5), 8. <https://www.fao.org>.
- Gallardo-Velazquez, T., Osorio-Revilla, G., et al. (2009). Application of FTIR-HATR spectroscopy and multivariate analysis to the quantification of adulterants in Mexican honeys. *Food Res. Int.* 42, 313 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.11.010>

- García, N. (2018). The Current Situation on the International Honey Market. *Bee World*, 95, 1-6. <https://doi.org/10.1080/0005772X.2018.1483814>
- Haile, G., Asrese, N. M., & Furgasa, W. (2017). Review on Medicinal and Nutritional Value of Bee's Honey : Senior Seminar on Animal Health. *Biomedicine and Nursing* 2017;3(1). <https://doi.org/10.7537/marsbnj030117.08>
- Hanim, N., Cacciola, F., Sing, N., Arena, K. & Foo, Y. (2022) An updated review of extraction and liquid chromatography techniques for analysis of phenolic compounds in honey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2022;114(1). <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104751>.
- Hermosín, I., Chicón, R., & Cabezudo, M.D. (2003). Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 83, 263-268. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00089-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00089-X)
- Iglesias, M. T., De Lorenzo, C., Del Carmen Polo, M., Martín-Alvarez, P. J., & Pueyo, E. (2004). Usefulness of amino acid composition to discriminate between honeydew and floral honeys. Application to honeys from a small geographic area. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(1), 84–89. <https://doi.org/10.1021/jf030454q>
- Kaškonienė, V., Maruska, A., Kornysova, O. & Charczun, N. (2009). Quantitative and qualitative determination of phenolic compounds in honey. *Cheminé Technologija*. 2009. Nr. 3 (52) 1392-1231. <https://hdl.handle.net/20.500.12259/43285>
- Kaškonienė, V., & Venskutonis, P. R. (2010). Floral Markers in Honey of Various Botanical and Geographic Origins: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(6), 620–634. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00130.x>

- Lawag, I. L., Lim, L.-Y., Joshi, R., Hammer, K. A., & Locher, C. (2022). A Comprehensive Survey of Phenolic Constituents Reported in Monofloral Honeys around the Globe. *Foods*, 11(8), 1152. <http://doi.org/10.3390/foods11081152>
- Luchese, R. H. , Prudêncio, E. R. , & Guerra, A. (2017). Honey as a Functional Food. In (Ed.), *Honey Analysis*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/67020>
- Mădaş, M. N., Mărghiţaş, L. A., Dezmirean, D. S. et al (2020). Labeling Regulations and Quality Control of Honey Origin: A Review. *Food Reviews International*, 36(3), 215–240. <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1636063>
- Martínez, M., Ulloa, C. Salgado, S., et al. (2020). Geographical study and identification of plants with apicultural potential in Nayarit, México. *Abanico Agroforestal*. 2:1-9. <http://doi.org/10.37114/abaagrof/2020.8>
- NORMA Oficial Mexicana NOM-004-SAG/GAN-2018, Producción de miel y especificaciones. <https://www.dof.gob.mx/>
- Olmsted., L. (2016). *Real Food/Fake Food*. Chapel Hill, Carolina del Norte: Libros Algonquin de Chapel Hill, 2016.
- Procuraduría Federal del Consumidor (PROFECO). (2001). Calidad de miel de abeja. *Revista Del Consumidor*, 287, 1–5.
- Ramos-Díaz, A. L., Uc-Vázquez, A., García-Muñoz, Y., Antonio, K.-C., & Cano-Sosa, J. (2016). Producción de miel y sus derivados en México: Desafíos y oportunidades para la exportación. <https://ciatej.mx/>
- Rodríguez, B.A., Mendoza, S., Iturriga, M.H. (2012), Quality Parameters and Antioxidant and Antibacterial Properties of Some Mexican Honeys. *Journal of Food Science*, 77: C121-C127. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02487.x>

- Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER). (2010). Situación Actual y Perspectiva de la Apicultura en México. *Claridades Agropecuarias*, 199, 3–34.
- Secretaria de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Producción de Miel de las Entidades Federativas más productoras, 2003 - 2019. Estadísticas gráfico 5.2. <https://atlas-abejas.agricultura.gob.mx/>
- Se, K., Wahab, R., Syed Yaacob, S. N., & Ghoshal, S. K. (2019). Detection techniques for adulterants in honey: Challenges and recent trends. *Food Research International*. 80. 16-32. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.04.001>
- Sun, Z., Zhao, L., Cheng, N., Xue, X., Wu, L., Zheng, J., & Cao, W. (2017). Identification of botanical origin of Chinese unifloral honeys by free amino acid profiles and chemometric methods. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 7(5), 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2017.06.009>
- Tomasi, G., Van den Berg, F. & Andersson, C. (2004). Correlation optimized warping and dynamic time warping as preprocessing methods for chromatographic Data. *Journal of Chemometrics* 18(2004)231-241
- Tosun, M., (2013). Detection of adulteration in honey samples added various sugar syrups with $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio analysis method. *Food Chem.* 138, 1629–1632. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.068>
- Trifković, J., Andrić, F., Ristivojević, P., Guzelmeric, E., & Yesilada, E. (2017). Analytical methods in tracing honey authenticity. *Journal of AOAC International*, 100(4), 827–839. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0142>
- Xue, X., Wang, Q., Li, Y., Wu, L. et al. (2013). 2-acetylfuran-3-glucopyranoside as a novel marker for the detection of honey adulterated with rice syrup. *J. Agric. Food Chem.* 61, 7488–7493. <https://doi.org/10.1021/jf401912u>

