



Universidad Tecnológica de la Mixteca

Labor et Sapientia Libertas

ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE MIEL PRODUCIDA EN DOS MUNICIPIOS DEL ESTADO DE OAXACA, DURANTE SU ALMACENAMIENTO: PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS, PERFIL POLIFENÓLICO Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

Tesis para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias: Productos Naturales y Alimentos

Presenta:

I.A. Erika López Rodríguez

Directora de tesis:

Dra. Edith Graciela González Mondragón

Co-Directora:

Dra. Luz Hermila Villalobos Delgado

Huajuapán de León, Oaxaca, México. Febrero de 2019

La presente tesis está enmarcada en el Programa de estudios de posgrado de la Maestría en Ciencias: Productos Naturales y Alimentos, que pertenece al Programa Nacional de Posgrado de Calidad (PNPC), del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Las actividades de este proyecto se realizaron en el laboratorio de Biotecnología, así como en el laboratorio de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, ubicados en el Edificio de Productos Naturales y Alimentos, de la Universidad Tecnológica de la Mixteca (UTM), Huajuapán de León, Oaxaca.

Erika López Rodríguez fue apoyada con la beca (799348/616411) financiada por el CONACyT.

El trabajo de investigación fue realizado parcialmente con el apoyo otorgado por el CONACyT por medio del proyecto INFR2015-01 (254019).

ACTIVIDADES ACADÉMICAS Y DE INVESTIGACIÓN

Se participó con el cartel científico “Análisis de los Compuestos Polifenólicos en Muestras de Miel de una Microrregión Oaxaqueña por UHPLC-QToF”. **López Rodríguez E.**, González Mondragón E. G., Villalobos Delgado L. H., en la 19° Feria de Posgrados de Calidad 2018 con sede en la Ciudad de México los días 14 y 15 de Abril del 2018, organizada por el CONACyT.

Asistencia al XXV Congreso Internacional de Actualización Apícola con sede en Querétaro, Querétaro del 16 al 18 de Mayo del 2018, organizado por la Asociación Nacional de Médicos Veterinarios Especialistas en Abejas (ANMVEA).

Participación con el cartel científico “Evaluación de las Propiedades Fisicoquímicas y Actividad Antioxidante en miel durante su almacenamiento”. **López Rodríguez E.**, González Mondragón E. G., Villalobos Delgado L. H., Pozos Salazar O., Güemez Ricalde F. J., Gómez Cansino R. en el 3° Congreso Internacional de Alimentos Funcionales y Nutraceuticos con sede en Mazatlán, Sinaloa del 20 al 22 de junio del 2018.

Participación con el cartel científico “Evaluación de la estabilidad de una bebida funcional híbrida almacenada en refrigeración”. Cortés Morales YR., González Mondragón EG., Santiago Gómez P., **López Rodríguez E.**, Tirado Mendoza RG., Gómez Cansino R. en el 3° Congreso Internacional de Alimentos Funcionales y Nutraceuticos con sede en Mazatlán, Sinaloa del 20 al 22 de junio del 2018.

Participación en la evaluación sensorial de carne molida en el proyecto “Efecto del extracto de epazote (*Teloxys ambrosioides* L.) sobre la vida útil de la carne picada de bovino y porcino durante su almacenamiento en refrigeración”, durante los periodos del 7 al 30 de marzo y del 13 de junio al 6 de julio del 2017; en las instalaciones de la UTM.

Asistencia a los seminarios “Secado por aspersión, microencapsulación de partículas y formación de perlas, capsulas y liofilización” y “Determinación kjendahl y métodos de extracción para análisis bromatológicos y el uso de rotavapor”; impartido por la empresa Equipar S.A. de C.V., en las instalaciones de la UTM los días 7 y 8 de junio de 2017.

Asesoría y supervisión del alumno Omar Pozos Salazar de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP); en la realización de su servicio social, del 22 de mayo al 22 de noviembre del 2017.

Estancia en el Departamento de Ciencias Sociales Económico Administrativas en la Universidad de Quintana Roo, Chetumal, Quintana Roo, del 15 al 17 de febrero del 2017 con el Dr. Francisco Güemez Ricalde.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Tecnológica de la Mixteca por la oportunidad de recibir una formación de calidad y al CONACyT por la beca otorgada.

A la Dra. Edith G. González Mondragón por darme la oportunidad de realizar esta tesis de Maestría en un tema de mi total interés, gracias por la dirección, paciencia y apoyo, gracias por integrarme en el grupo de trabajo. De igual manera a la Dra. Luz H. Villalobos Delgado, codirectora de este proyecto de investigación; por su apoyo, enseñanzas y colaboración para la culminación del trabajo.

A los integrantes del comité revisor de esta tesis: Dra. Laura Márquez de Santis, Dra. Aída Irma Gómez Sánchez, Dra. Mirna Patricia Santiago Gómez y Dra. Paula Cecilia Guadarrama Mendoza quienes a través de sus revisiones, observaciones y comentarios contribuyeron en el desarrollo del presente trabajo; así como al Dr. Francisco Javier Güemez Ricalde por su apoyo para direccionar el presente trabajo de tesis desde su inicio, por realizar sus comentarios y observaciones en el menor tiempo posible.

A la Sociedad Cooperativa Apicultores de Huajuapán S.C. de C.V. de R.L. por la donación de las muestras de miel de ambos orígenes y al profesor Octaviano López Cruz por el apoyo en la metodología y obtención de las mieles.

A la M.C. Alma Yadira Salazar Govea y Dra. M. Patricia Santiago Gómez por el apoyo con los equipos: cámara climática y espectrofotómetro UV-visible utilizados para la realización del trabajo. Además, a la Dra. Patricia por su valioso apoyo en la estimación del tiempo de estabilidad de la miel y en la revisión del documento final de tesis.

Al Q.F.B. Omar Pozos Salazar, estudiante de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por su apoyo en la metodología durante su servicio social y a la M.C. Eunice Ordaz Díaz por su participación en la obtención de los extractos de miel y procesamiento en el UHPCL-QToF; así también a la Dra. Rocio Gómez Cansino (Cátedra CONACyT), por su apoyo con bibliografía, en parte experimental y sugerencias para la mejora del presente trabajo. Gracias al M.C. Francisco Gómez Castillo y al I.A. Tenoch Santiago Castro por su apoyo durante la realización de este trabajo de tesis.

Así mismo al M.C. Edgar T. Vázquez Ramos y al Ing. Jorge A. Váldez Amezcua, personal del soporte técnico de la empresa Waters S.A. de C.V.

Gracias por la colaboración de todas las personas que me brindaron su apoyo, conocimiento y ayuda, sin ellas esta tesis no se habría podido realizar.

DEDICATORIAS

A mis padres por haberme forjado como la persona que soy, todos mis logros se los debo a ustedes; me formaron con reglas y libertades, me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos y estuvieron a mi lado brindándome sus consejos, apoyo y cariño.

Los amo demasiado, Gracias.

No ha sido sencillo el camino hasta ahora, pero gracias a su apoyo, ayuda y amor, lo complicado para lograr esta meta se ha notado menos, les agradezco y amo, mi hermosa familia: Jazmin, Aleida, Alan y Dayra.

A Miguel, por apoyarme cuando lo necesitaba, por los momentos en los que siempre estuviste incondicionalmente junto a mi, las palabras de motivación y cariño que nunca faltaron, pero sobre todo por tu amor.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo por objetivo estudiar la estabilidad de la miel producida en los municipios de Huajuapán de León (MH) y Putla Villa de Guerrero (MP), Oaxaca, México. Para lo cual se analizaron parámetros de calidad de la miel mediante pruebas de vida acelerada, utilizando una cámara climática artificial a las condiciones siguientes: 30, 40 y 50°C a 70 % HR durante 5 semanas. También se realizó a condiciones del medio ambiente ($22.12 \pm 1.75^\circ\text{C}$ y 63.00 ± 7.61 % HR), durante 32 semanas. Los parámetros analizados fueron: porcentaje de humedad, conductividad eléctrica, concentración de hidroximetilfurfural (HMF) e índice de diastasa (ID), empleando los métodos indicados en la NMX-F-036-NORMEX-2006 y el CODEX STAN 12-1981; además del pH y el cambio de color. Igualmente, se monitoreó en ambas muestras de miel el contenido de polifenoles totales (CPT) por el método de Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante (AA) por el método del DPPH•. Se establecieron las condiciones para la cuantificación del HMF por UHPLC-QToF en las mieles almacenadas en la prueba acelerada. De igual modo, se implementaron las condiciones para la identificación de polifenoles en extractos de miel empleando un UPLC-QToF y el software Progenesis QIR, además se realizó el análisis comparativo del perfil polifenólico de las mieles de ambos orígenes. Se evaluó la significancia estadística de los factores: origen, temperatura y tiempo, así como, las correlaciones múltiples de Pearson entre los parámetros evaluados a condiciones aceleradas.

Los resultados de todos los parámetros analizados mostraron que el HMF fue el parámetro crítico de calidad para ambas mieles y se utilizó para evaluar el tiempo de estabilidad, el cual fue de 12.9 y 6.4 años para MP y MH, respectivamente; dichos valores son mayores a los reportados para este producto. Por otro lado, las concentraciones del HMF en la MH determinadas por UHPLC-QToF, presentaron la misma tendencia pero de un orden de magnitud menor en comparación con el método espectrofotométrico. Para la MP no fue posible determinar la concentración de HMF por el método cromatográfico, por lo que se tendrá que estudiar la posible causa de este hecho. El CPT registró valores por arriba de 25 mg EAG/100 g_{miel} durante todo su almacenamiento, encontrándose entre los valores reportados. Para la miel de los dos orígenes a los 50°C se observó un incremento con respecto al tiempo, motivo por el cual se analizó el perfil polifenólico, identificándose 72 compuestos los cuales registraron una variación durante el tiempo analizado. Respecto a la AA, las mieles almacenadas a 30 y 40°C mostraron una disminución menor al 4 % de inhibición, sin embargo, a los 50°C se registró un incremento debido posiblemente a la síntesis de melanoidinas asociada a las reacciones de Maillard. Finalmente, el análisis estadístico mostró que la mayoría de los factores y sus interacciones fueron diferentes para cada uno de los parámetros. La MH mostró un aumento en la correlación de Pearson entre el HMF e ID con respecto a la temperatura, lo que se reflejó en su mayor inestabilidad en comparación con la MP.

ABSTRACT

The aim of this work was to study the stability of honey produced in the municipalities of Huajuapán de León (HH) and Putla Villa de Guerrero (PH), in the state of Oaxaca, Mexico. In order to do so, the parameters of honey quality were analyzed by accelerated tests, using an artificial climatic chamber to the following conditions: 30, 40 and 50°C at 70 % relative humidity (RH) for 5 weeks, as well as under ambient conditions ($22.12 \pm 1.75^\circ\text{C}$ and 63.00 ± 7.61 % RH), for 32 weeks. The following parameters were measured: humidity percentage, electrical conductivity, hydroxymethylfurfural concentration (HMF) and diastase index (DI) using the methods as indicated in NMX-F-036-NORMEX-2006 and CODEX STAN 12-1981, as well as pH and color change. In addition, the total polyphenol content (TPC) was monitored in both honey samples using the Folin-Ciocalteu method and the antioxidant activity (AA) by means of the DPPH[•] method. The conditions for the quantification of HMF by means of UHPLC-QToF were established in the honeys stored in accelerated stability tests. Similarly, the conditions were established for the identification of polyphenols in the honey extracts employed UPLC-QToF and Progenesis QI[®] software, as well as for the comparative analysis of the polyphenolic profile of the honey from both origins. Furthermore, the statistical significance of the factors was evaluated: origin, temperature and time, as well as Pearson's multiple correlations between the parameters evaluated at accelerated shelf conditions.

The results of all the parameters analyzed showed that the HMF was the critical quality parameter for both honeys and was used to evaluate the stability time, which was 12.9 and 6.4 years for PH and HH, respectively. These values are higher than those previously reported for this product. On the other hand, the HMF concentrations in the HH determined using UHPLC-QToF presented the same tendency but at a lower order of magnitude compared with the spectrophotometric method. Regarding PH, it was not possible to determine the concentration of HMF by means of the chromatographic method, so the reasons for this will have to be analyzed. The TPC showed values above 25 mg GAE/100 g_{honey} during storage, which corresponds with the reported values in other studies. For the honey from both origins, an increase in TPC was registered at 50°C with regard to time, during which the polyphenolic profile was analyzed, identifying 72 compounds that showed a variation during the time analyzed. Regarding AA, the honeys stored at 30 and 40°C showed a decrease of less than 4 % inhibition. However, at 50°C, an increase was recorded possibly due to the synthesis of melanoidins associated with the Maillard reactions. Finally, the statistical analysis showed that most of the factors and their interactions were different for each of the parameters. HH showed an increase in Pearson's correlation between the HMF and DI with regard to temperature, which was reflected in its greater instability compared to the PH.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Generalidades de la miel	3
2.1.1 Definición.....	4
2.1.2 Clasificación	5
2.1.3 Composición.....	5
2.2 Parámetros de calidad	6
2.2.1 Fisicoquímicos.....	7
2.2.2 Frescura de la miel.....	9
2.3 La miel como alimento funcional	12
2.3.1 Polifenoles.....	12
2.3.2 Clasificación	14
2.3.3 Polifenoles en miel.....	15
2.3.4 Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas.....	16
2.3.5 Actividad Antioxidante.....	19
2.4 Estabilidad de la miel	20
2.4.1 Factor crítico de calidad.....	20
3. ESTADO DEL ARTE	25
4. JUSTIFICACIÓN	28
5. OBJETIVOS	30
5.1 Objetivo general.....	30
5.2 Objetivos específicos	30
6. METAS	32
7. MATERIALES Y MÉTODOS	33
7.1 Origen de la miel.....	33
7.2 Reactivos	34
7.3 Materiales.....	34
7.4 Equipos	35
7.5 Evaluación de la estabilidad de la miel.....	35
7.5.1 Diseño experimental.....	35
7.6 Obtención de la miel	36
7.7 Extracción de la miel del panal	36

7.8 Almacenamiento	37
7.9 Acondicionamiento de la miel para su análisis	37
7.10 Determinación de parámetros fisicoquímicos de calidad	37
7.10.1 NMX-F-036-NORMEX-2006	37
7.10.2 Cuantificación de hidroximetilfurfural (HMF) por un método espectrofotométrico	39
7.10.3 Cuantificación de hidroximetilfurfural por UHPLC-QToF	40
7.10.4 Otros parámetros	42
7.11 Caracterización de la miel como <i>alimento funcional</i>	42
7.11.1 Obtención del extracto metanólico	42
7.11.2 Contenido de polifenoles totales (CPT) por el método de Folin-Ciocalteu	43
7.11.3 Análisis del perfil polifenólico por UHPLC-QToF	43
7.11.4 Actividad antioxidante mediante método de DPPH'	45
7.12 Estabilidad de la miel	45
7.13 Análisis estadístico	46
8. RESULTADOS Y DISCUSIONES	47
8.1 Caracterización de la miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero	47
8.2 Estabilidad de la miel.....	48
8.2.1 Pruebas aceleradas	48
8.2.2 Pruebas a condiciones ambiente.....	59
8.2.3 Estimación del tiempo de estabilidad.....	62
8.3 Estabilidad de la miel como <i>alimento funcional</i>	64
8.3.1 Pruebas aceleradas	64
8.3.2 Pruebas a condiciones ambiente.....	66
8.4 Perfil polifenólico durante el almacenamiento a 50°C	67
8.5 Evaluación de la significancia estadística de los factores: lugar de origen, temperatura y tiempo	71
8.6 Correlaciones de Pearson entre parámetros a las tres temperaturas evaluadas	73
9. CONCLUSIONES	75
10. PERSPECTIVAS	77
11. REFERENCIAS.....	79
ANEXO I	89

ANEXO II	95
ANEXO III	97
ANEXO IV	98
ANEXO V	102
ANEXO VI	104
ANEXO VII	105
ANEXO VIII	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rutas para la formación del 5-hidroximetilfurfural.	11
Figura 2. Ruta metabólica del ácido shiquímico.	13
Figura 3. Ruta de síntesis de los poliacetatos.	14
Figura 4. Clasificación de los compuestos polifenólicos.	15
Figura 5. Esquema de la formación de iones y su trayectoria hacia el espectrómetro de masas.	17
Figura 6. Esquema y principio de operación de un analizador cuadrupolar.	17
Figura 7. Esquema de un espectrómetro de masas con analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo (QToF).	18
Figura 8. Localización de los Municipios: Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca, México.	34
Figura 9. Corte del opérculo del panal en mesa de extracción.	36
Figura 10. Parámetros de calidad evaluados en miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca.	49
Figura 11. Parámetros de calidad no estipulados en NMX-F-036-NORMEX-2006, evaluados en miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca.	51
Figura 12. Escala de ΔE para la miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca.	52
Figura 13. Índice de diastasa en miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca.	53
Figura 14. Hidroximetilfurfural en miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca.	54
Figura 15. Cromatogramas del estándar de hidroximetilfurfural (HMF) empleando un UPLC-QToF.	56
Figura 16. Cromatograma para la identificación de la m/z del hidroximetilfurfural (HMF) en miel de Huajuapán de León, Oaxaca, almacenada a 50°C y 70 % HR.	57
Figura 17. Parámetros fisicoquímicos de calidad indicados en la NMX.	60
Figura 18. Parámetros de frescura de miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca.	61
Figura 19. Contenido de Polifenoles Totales y Actividad Antioxidante.	64

Figura 20. Contenido de Polifenoles Totales y Actividad Antioxidante almacenada a condiciones ambiente.	66
Figura 21. Cromatogramas de los extractos metanólicos de miel de A) Huajuapán de León y B) Putla Villa de Guerrero, Oaxaca.	68
Figura 22. Perfil de abundancia estandarizada de la apigenina-7-ramnósido-4'rutinósido.	69
Figura 23. Número de compuestos polifenólicos identificados en miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca.	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especificaciones de calidad indicadas en Norma para el producto miel.	7
Tabla 2. Parámetros evaluados en la miel de dos municipios del estado de Oaxaca al tiempo cero.	47
Tabla 3. Valores de ΔE para miel de diferentes orígenes.	52
Tabla 4. Concentración de hidroximetilfurfural ($\text{mg}/\text{kg}_{\text{miel}}$) para la miel de Huajuapán de León cuantificada por UHPLC-QToF.	58
Tabla 5. Cinética de formación de hidroximetilfurfural (HMF) en mieles de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca.	62
Tabla 6. Energía de activación (E_a) y factor Q_{10} para mieles de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca.	63
Tabla 7. Evaluación del tiempo de estabilidad para mieles de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca.	63
Tabla 8. Significancia de los factores evaluados y sus interacciones, de las mieles de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca.	72

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AA	Actividad Antioxidante
AD	Agua desionizada
CE	Conductividad eléctrica
CEM	Comisión Europea de la Miel
CPT	Contenido de Polifenoles Totales
DAD	Detector de arreglo de diodos, por sus siglas en inglés <i>Diode Array Detector</i>
DPPH*	Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo
EAG	Equivalente de ácido gálico
ESI	Ionización por electrospray, por sus siglas en inglés <i>Electrospray ionization</i>
HMF	Hidroximetilfurfural
HPLC	Cromatografía de líquidos de alto desempeño, por sus siglas en inglés <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ID	Índice de diastasa
LC/MS	Cromatografía de líquidos/espectrometría de masas
MH	Miel de Huajuapán de León
MP	Miel de Putla Villa de Guerrero
mV	Milivolts
pH	Potencial de hidrógeno
Tn	Toneladas
t _R	Tiempo de retención
UD	Unidad de Diastasa
UHPLC- QToF	Cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplado a un espectrómetro de masas con analizador cuadrupolo tiempo de vuelo, por sus siglas en inglés <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography-Quadrupole Time of Flight</i>
UPLC- QToF	Cromatógrafo de líquidos de ultra resolución acoplado a un espectrómetro de masas con analizador cuadrupolo tiempo de vuelo, por sus siglas en inglés <i>Ultra-performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry</i>
UV-vis	Ultravioleta-visible
V	Volts
ΔE	Cambio de color total

1. INTRODUCCIÓN

Por definición, la miel es un producto de naturaleza dulce constituido principalmente de fructosa y glucosa, la cual es producida por abejas de las especies *Apis mellifera* (*Meliponini* (abeja sin aguijón), *Apis mellifera scutellata* (abeja africana), *Apis mellifera*, entre otras; la *Apis mellifera* debido a su alto grado de domesticación es la empleada en la producción de la miel de mayor consumo y comercialización a nivel mundial. Por otro lado, la miel ha sido referida como un *alimento funcional* porque su ingesta conlleva beneficios en la salud del consumidor asociados a la presencia de compuestos como los del grupo de los polifenoles, los cuales poseen actividades biológicas como: antibacterial, antiinflamatoria y antioxidante (Ajibola, Chamunorwa, y Erlwanger, 2012). Por lo anterior, es importante evaluar durante el almacenamiento el cambio en los biocompuestos así como las propiedades biológicas conferidas a la miel como la actividad antioxidante.

En el 2017 la producción de miel fue de 51,065.7 y 4,077.7 Tn en México y Oaxaca (quinto lugar a nivel nacional), respectivamente (SIAP, 2017); esto es un indicador del potencial de la apicultura y la comercialización de la miel en dicho estado.

Como se sabe, la aceptación de un alimento por el consumidor depende de que conserve sus propiedades fisicoquímicas, microbiológicas, sensoriales y biológicas, asociadas a la calidad del producto. En el caso de la miel, por ejemplo, el hidroximetilfurfural (HMF) se produce por la degradación de los azúcares presentes y su incremento durante el almacenamiento es un indicador de la disminución de su frescura. En general es importante determinar la estabilidad de un alimento, esto es, estimar el período de tiempo finito después de la producción y el envasado durante el cual conserva el nivel de calidad requerido en condiciones de almacenamiento definidas (Nicoli, 2012).

El objetivo del presente proyecto de tesis fue estudiar por primera vez la estabilidad durante el almacenamiento de miel producida en dos municipios del estado de Oaxaca, tanto en condiciones ambiente como aceleradas. Se evaluaron los principales parámetros fisicoquímicos de calidad; además, por primera vez se cuantificó el hidroximetilfurfural en miel durante su almacenamiento empleando un

cromatógrafo de líquidos de ultra alta resolución acoplado a un espectrómetro de masas con analizador cuadrupolo tiempo de vuelo (UPLC-QToF). De igual modo, se determinó el contenido de polifenoles totales (ensayo de Folin-Ciocalteu) así como su actividad antioxidante (ensayo del DPPH^{*}), siendo el primer estudio que muestra la variación del perfil polifenólico de las mieles analizadas empleando UHPLC-QToF. Finalmente, se usaron métodos estadísticos para determinar la relación entre los factores evaluados durante el presente trabajo así como el efecto de la temperatura en los diferentes parámetros analizados y la correlación entre estos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades de la miel

La abeja europea *Apis mellifera* fue introducida en el continente americano durante la colonia, la cual ofrecía ventaja sobre otras especies como: una alta producción de miel, fácil domesticación y resistencia a enfermedades. En México, la apicultura moderna se inició después de 1920 y se caracterizó por la introducción de la abeja italiana y de las colmenas modernas o cajas de marcos móviles. Debido a una alta demanda mundial de miel, a partir de 1950 se implementó el uso de abejas de fácil domesticación y más productivas; se realizaron las primeras exportaciones de miel y se importó de los Estados Unidos nueva tecnología como: colmenas, extractores, plantas de purificación de miel y abejas (Claridades Agropecuarias, 2011).

La formación de la miel inicia cuando la abeja ingiere a través de las piezas bucales el néctar o mielada (miel de secreciones de partes extraflorales de las plantas), y lo transporta en su estómago hasta la colmena. Posteriormente ya en la colmena, se iniciará la fase de elaboración.

El estómago también es llamado “saco o bolsa de la miel”, se encuentra entre el esófago y el intestino; la función de este órgano es recibir, almacenar y transportar en su interior el líquido libado hasta la colmena, además de mezclar con secreciones ricas en enzimas provenientes de las abejas. Por otro lado, el proventrículo que es un órgano ubicado en el interior del estómago desde la parte del intestino, tiene la función de retener y aglomerar en la vellosidad interna las materias sólidas de 0.5-100 micras, como los granos de polen (Peng y Marston, 1986), para después pasarlas en forma de paquetes o glomérulos al intestino medio.

La elaboración comienza cuando una abeja procedente de la recolección entra en la colmena y remite a una abeja del interior una gota de la materia prima recolectada la cual se intercambiará de una abeja a otra; el número de intercambios (3-10 veces) dependerán de la fuerza de la colonia y de la cantidad de néctar recolectado. Si el volumen de materia prima que entra en la colmena es alto, deberá ser rápidamente almacenado, entonces, el número de intercambios será menor al igual que las secreciones enzimáticas (diastasa, glucosa invertasa y glucosa oxidasa) totales

añadidas al néctar original en cada succión y recepción, provenientes de las glándulas situadas en la cabeza y tórax de las obreras.

La gota de materia prima diluida y mezclada ya con las secreciones, debe ser transformada en un producto apto para la conservación, eliminando agua y finalmente almacenado como reserva. Las abejas ocupadas en la preparación de la miel, regurjitan el contenido de su estómago, lo recogen bajo la trompa, lo exponen al calor de la colmena y vuelven a absorberlo; esta maniobra se repite rápidamente durante varios minutos, evaporando agua y añadiendo nuevas secreciones glandulares enzimáticas. Este producto es depositado en la parte interna superior de la celdilla, desde donde descenderá por gravedad a la parte inferior, lo que favorecerá nuevamente la evaporación de agua. Cuando el néctar ya se ha transformado y ha alcanzado la humedad correcta, las abejas vuelven a transportar materia prima repitiendo el ciclo hasta llenar totalmente la celdilla (Peng y Marston, 1986). Durante todo el proceso se producen modificaciones químicas del néctar siendo las más importantes la disminución del contenido de agua hasta un 13-20 % y las sufridas por los azúcares bajo la influencia de las secreciones enzimáticas.

2.1.1 Definición

La Norma Oficial Mexicana NMX-F-036-NORMEX-2006 define a la miel como “La sustancia dulce natural producida por las abejas a partir del néctar de las flores o de secreciones o de otras partes vivas de la planta, que las abejas recogen, transforman, combinan con sustancias específicas propias y almacenan en panales; de los cuales se extrae el producto sin ninguna adición”. Por otro lado, en el Codex Alimentarius la norma CODEX STAN 12-198 la define como una “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”. Como puede observarse la única diferencia entre ambas definiciones de miel es que el Codex Alimentarius la refiere únicamente a la que produce *Apis mellifera*.

Cabe señalar que la composición de la miel depende de factores como: estado fisiológico de la colonia, de la especie de abeja, la naturaleza del suelo así como de las flores a partir de las cuales extraen el néctar, y aún para una misma especie botánica puede presentar diferencias (Bachmann, 2007).

2.1.2 Clasificación

Se clasifica con base en su origen floral (Gozálvez, 1990) como:

- Monofloral: Miel en la que al menos el 45 % del total de sus granos de polen corresponden a una misma especie vegetal.
- Bifloral: Miel que presenta polen de dos especies vegetales, alcanzando un valor mínimo del 50 % en su conjunto, y un porcentaje no mayor al 5 % de diferencia entre ellas.
- Polifloral: Miel que presenta en su composición granos de polen de tres o más especies vegetales, sin que ninguna de ellas alcance un porcentaje mayor o igual al 45 %.

También se clasifica con base a su estado físico (CODEX STAND, 2001; NMX-F-036-NORMEX-2006) en:

- Miel de panal: Es la que no ha sido extraída de su almacén natural de cera y puede consumirse como tal.
- Miel líquida: Es la que ha sido extraída de los panales y que se encuentra en estado líquido, sin presentar cristales visibles.
- Miel cristalizada: Es la que se encuentra en estado sólido o semisólido granulado, como resultado del fenómeno natural de cristalización de los azúcares que la constituyen.

2.1.3 Composición

La miel está compuesta principalmente por fructosa y glucosa (60-80 %) como azúcares predominantes, así como de maltosa y sacarosa (7-10 %), y aproximadamente del 18 % de agua (Solayman et al., 2016; Habib et al., 2014b). Además, contiene de 180 a 200 compuestos como: aminoácidos, proteínas, enzimas (diastasa, invertasa y glucosa oxidasa), polifenoles, ácidos orgánicos,

vitaminas, minerales (potasio, calcio, sodio, hierro y magnesio) y compuestos aromáticos (Habib et al., 2014b; Özcan y Ölmez, 2014; Satarupa y Subha, 2014; Kamboj, Bera y Nanda, 2013). También contiene melanoidinas los cuales son productos de reacciones de Maillard (Brudzynski y Miotto, 2011a,b; Wang, Qian y Yao, 2011).

Como ya se expuso, la composición de la miel varía de acuerdo al origen botánico del néctar, siendo el factor más importante (Özcan y Ölmez, 2014), las condiciones ambientales y de las secreciones de las abejas (Salayman et al., 2016; Silva, Videira, Monteiro, Valentão y Andrade, 2009).

2.2 Parámetros de calidad

La miel es un alimento que debe cumplir con las especificaciones (Tabla 1) estipuladas en la NMX-F-036-NORMEX-2006 Alimentos Miel Especificaciones y Métodos de Prueba; y en el ámbito internacional el CODEX STAN 12-1981 Norma para la miel.

Como se puede observar, son pocas las especificaciones en las que difieren ambas normas. Únicamente en la NMX se evalúa el porcentaje de cenizas, el contenido de azúcares reductores y de glucosa; por otro lado, solamente el Codex Alimentarius contempla el análisis de la conductividad eléctrica, así como del contenido de la suma de glucosa y fructosa. Respecto a los límites establecidos en ambas normas para los parámetros en común, son iguales o cercanos. A continuación se detallan únicamente los parámetros de calidad más solicitados por los productores y compradores potenciales de miel.

Tabla 1. Especificaciones de calidad indicadas en Norma para el producto miel.

Parámetro	NMX		CODEX	
	Mín.	Máx.	Mín.	Max.
% Contenido de sacarosa (g/100g)	-	5.0	-	5.0
% Humedad (g/100g)	-	20.0	-	20.0
% Sólidos insolubles en agua (g/100g)	-	0.3	-	0.5
Acidez (miliequivalentes de ácido/kg)	-	40.0	-	50.0
*HMF (mg/kg _{miel})	-	40.0	-	40.0
**HMF (mg/kg _{miel})	-	80.0	-	80.0
Índice de diastasa (UD)	8.0	-	8.0	-
% Cenizas (g/100g)	-	0.6		
% Contenido azúcar reductor (g/100g) expresado como azúcar invertido	63.8	-		
% Contenido glucosa (g/100g)	-	38.0		
Conductividad eléctrica (µS)			-	800
Contenido glucosa y fructosa (g/100g)			60.0	-

NMX: Norma mexicana. CODEX: Codex Alimentarius. Mín.: Límite Mínimo. Máx.: Límite máximo. HMF: Hidroximetilfurfural. UD: Unidades de diastasa (EC 3.2.1.1.) en la escala de Gothe, en mililitros de solución de almidón al 1% hidrolizados por la enzima contenida en un gramo de miel por hora a 40°C. *Miel con menos de 6 meses de almacenamiento. **Miel de más de 6 meses de almacenamiento.

2.2.1 Físicoquímicos

2.2.1.1 Porcentaje de Humedad

Primeramente, las abejas recolectan néctares o melazas con humedades cercanas al 60 %, posteriormente son sometidos a un proceso de secado y transformación hasta la obtención de miel con un contenido de humedad entre 15 y 21 %, dependiendo del nivel de madurez alcanzado en la colmena, el origen botánico de la miel y sus condiciones de almacenamiento (Pajuelo, 2009). El % de humedad influye en algunas propiedades de la miel como la viscosidad, el color, sabor, gravedad específica, solubilidad y la cristalización (da Silva, Gauche, Gonzaga, Costa y Fett, 2016; Conforti y Lupano, 2006). Este último proceso es de interés en la calidad de la miel debido a los cambios que se generan en su apariencia y textura afectan su aceptación (Conforti y Lupano, 2006).

La cristalización es un proceso natural que esta influenciado por factores como el contenido de agua, la composición de azúcares, la presencia de núcleos de cristalización (microcristales de glucosa, cera y polen), el grado de sobresaturación, la viscosidad y la temperatura de almacenamiento (Dettori, Tappi, Piana, Rosa y

Rocculi, 2018; Costa, Kaspchak, Queiroz, de Almeida, Quast y Quast, 2015; Venir, Spaziani y Maltini, 2010). Manikis y Thrasivoulou (2001) determinaron que el parámetro que influye mayormente en la cristalización de la miel es la relación glucosa/agua; la glucosa cristaliza primero debido a su menor solubilidad con respecto a la fructosa. Normalmente todos los grupos hidroxilo de la molécula de azúcar interactúan con moléculas de agua. Durante la cristalización, la glucosa esta monohidratada lo que quiere decir que únicamente se encuentra enlazada con una molécula de agua; como consecuencia el contenido de agua libre es mayor incrementándose la actividad del agua (Laos, Kirs, Pall y Martverk, 2011; Venir et al., 2010; Zamora, Chirife y Roldán, 2006).

2.2.1.2 Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica (CE) se define como la capacidad de conducir electricidad una disolución de miel al 20 % (Moniruzzaman, Sulaiman, Khalil y Gan, 2013). Normalmente existe una correlación positiva entre la CE, el contenido de minerales, el color y el sabor (da Silva et al., 2016); el potasio (K) es el elemento de mayor presencia en la miel (200-900 ppm) (Yücel y Sultanoglu, 2013). Por otro lado, el color es más claro en aquellas mieles que tienen un bajo contenido de minerales y las oscuras presentan una CE alta; por ejemplo, las de origen floral tienen conductividades bajas y colores más claros que las mieles de mieladas (Pajuelo, 2009). Por último, los minerales influyen en el sabor de la miel, siendo más fuerte a mayor CE.

2.2.1.3 pH

A la fecha los Comités Reguladores del producto miel no han establecido límites para su pH, no obstante, se han reportado valores entre 3.2-4.5, a los cuales se tiene inhibición de crecimiento microbiano. Por otro lado, el pH puede ser un parámetro para la verificación de adulteraciones en este producto; por ejemplo, la adición de jarabe de maíz de alta fructosa en miel brasileña dio como resultado un aumento significativo en el pH en comparación con aquella sin adición de dicho jarabe (da Silva et al., 2016). Como ya se mencionó, el pH está relacionado directamente con la formación de HMF (Fallico, Arena y Zappala, 2008).

2.2.1.4 Color

El color de la miel es un parámetro primordial para la aceptación y preferencia por parte de los consumidores, por lo que es muy importante para su comercialización (da Silva et al., 2016). Depende de su composición la cual está relacionada con su origen botánico. Por ejemplo, una miel de romero o de azahar tendrá un color claro; para una miel de brezos o de mielada su color es bastante oscuro casi negro (Pajuelo, 2009). Por otro lado, un color oscuro puede desarrollarse por el tiempo y la temperatura de su almacenamiento debido a cambios en su composición; así como por el tratamiento térmico aplicado a la miel para impedir el desarrollo y crecimiento de microorganismos para prevenir la contaminación del producto fresco. También durante el envasado o su extracción porque la miel debe tener una fluidez adecuada (da Silva et al., 2016); o con la finalidad de inhibir o retardar el proceso de cristalización debido a que también influye en el color de la miel como consecuencia de que los cristales de glucosa reflejan la luz, promoviendo un aumento en la luminosidad y una disminución en su coloración amarilla característica (Dettori et al., 2018).

2.2.2 Frescura de la miel

La miel es considerada un alimento saludable y natural, su frescura es un atributo de importancia para los apicultores debido a la aceptación de los consumidores por el producto (Fallico et al., 2008). Los parámetros más importantes son la concentración de hidroximetilfurfural (HMF) y el índice de diastasa (ID) (Laos et al., 2011). El HMF generalmente no está presente en la miel fresca o se encuentra en bajas concentraciones, aumentando su contenido por su calentamiento o por largos periodos de almacenamiento (Rajchl et al., 2013; Khalil, Sulaiman y Gan, 2010; Zappalà, Fallico, Arena y Verzera, 2005). Por su parte, el ID bajo estas mismas condiciones tiende a disminuir, dando como resultado la pérdida de frescura (Serrano, Espejo, Villarejo y Jodral, 2007).

2.2.2.1 Hidroximetilfurfural

El HMF es un aldehído cíclico producido por la deshidratación de azúcares en condiciones ácidas, promovida ya sea por tratamiento térmico ó por periodos prolongados de almacenamiento de la miel (da Silva et al., 2016). Se considera un producto indeseable debido a los efectos negativos que puede generar en la salud humana como: mutagenicidad indirecta, transformación neoplásica, toxicidad hepática y renal e irritación de la mucosa, piel, ojos y tracto respiratorio superior, entre otros (Shapla, Solayman, Alam, Khalil y Gan, 2018).

En la Figura 1 se esquematizan las rutas principales para la producción del HMF a partir de la D-fructosa y la D-glucosa; en la primera se forma el catión fructofuranosil (A), el cual sufre una serie de deshidrataciones hasta la formación del HMF. Por otra parte, se llevan a cabo las reacciones de Maillard a partir de la D-glucosa la cual reacciona con una amina formándose una base de Schiff (B) dando origen al 1,2-eneamidotol (glucosamina) (C), a partir de la cual se genera la 3-deoxiosona que sufre una ciclización, formándose un hemiacetal que se deshidrata para dar origen al HMF. Cabe resaltar que dicho compuesto también se puede generar a partir de la D-fructosa mediante reacciones de Maillard por la deshidratación del 1,2-enediol (E).

2.2.2.2 Enzima diastasa (EC 3.2.1.1.)

Las diastasas (α - y β -amilasas) son producidas en la glándula hipofaringea de la abeja, depositadas en el néctar en el momento de su recolección y durante la maduración de la miel. Son termosensibles y su reducción puede ser un indicativo del sobrecalentamiento de la miel ($>60^{\circ}\text{C}$) y conlleva a la pérdida de su frescura, la cual es reportada como el índice de diastasa donde una unidad de diastasa (UD) se define en la escala de Gothe, como el volumen (mL) de solución de almidón al 1% hidrolizado por la enzima/gramo de miel/hora a 40°C (NMX-F-036-NORMEX-2006).

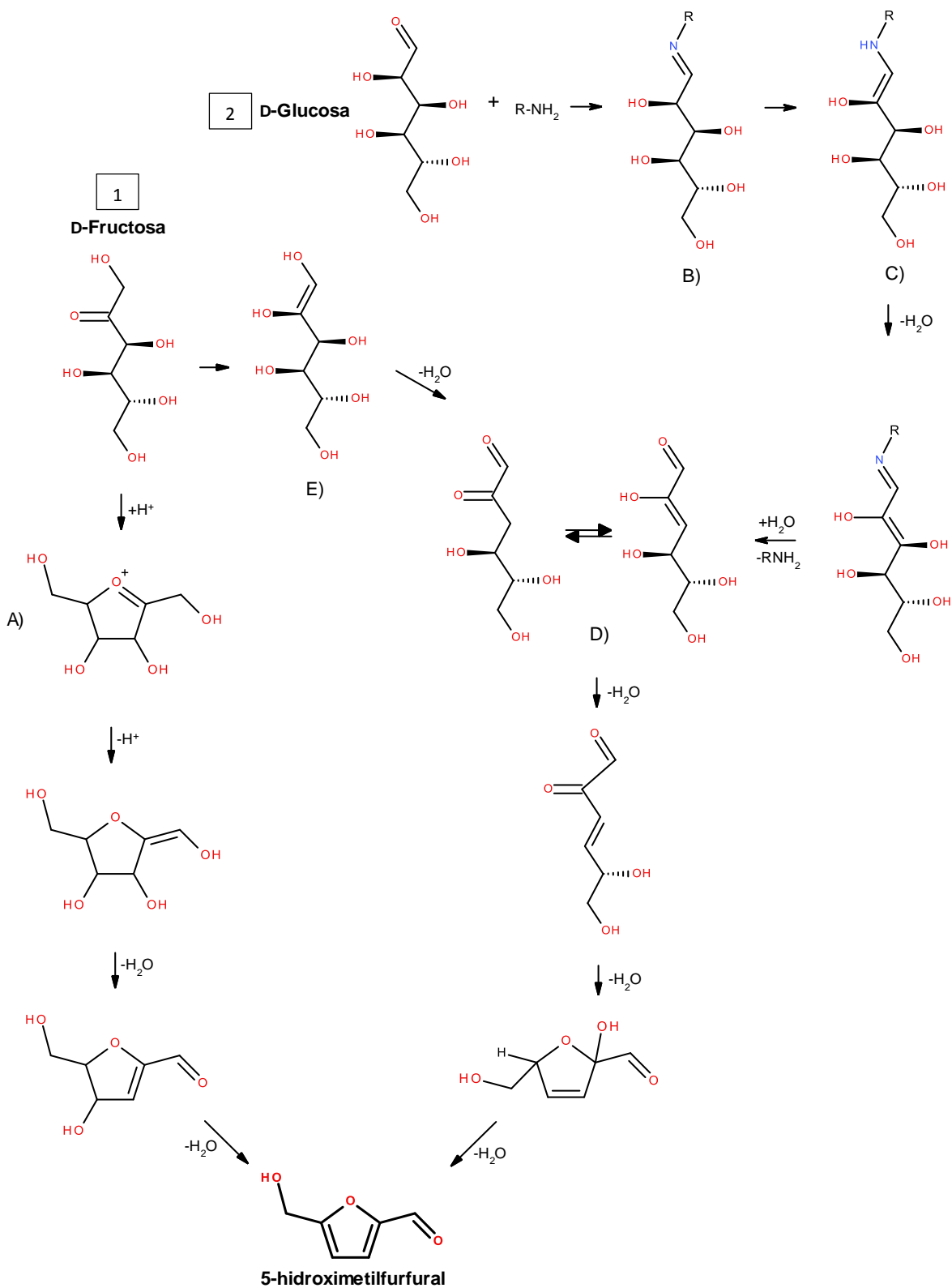


Figura 1. Rutas para la formación del 5-hidroxitilfural (da Silva et al., 2016).

El contenido de diastasa depende de la edad de las abejas pecoreadora (la cual sale de la colmena a recolectar el néctar), fuerza numérica de la colonia, condición fisiológica, raza, así como del período de recolección de néctar y su cantidad, además de su contenido de azúcares debido a que existe una relación inversamente proporcional con respecto a la concentración de diastasa. Las mieles con menor actividad de diastasa se producen a partir de los néctares colectados a principios de la primavera (da Silva et al., 2016).

2.3 La miel como alimento funcional

Un *alimento funcional* se define como aquel que además de nutrir le confiere al consumidor un determinado beneficio a su salud. Debe presentar las características de un alimento propiamente dicho; pueden ser naturales o procesados a los que se les ha añadido, incrementado o eliminado uno o varios componentes que son los responsables de su actividad biológica (Aranceta y Gil, 2010). Un aspecto importante en la miel son las actividades biológicas que se le han conferido, tales como la antioxidante, antimicrobiana y antiviral, asociadas al contenido de compuestos polifenólicos.

2.3.1 Polifenoles

Los polifenoles son compuestos químicos que poseen como estructura base un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo, incluyendo también derivados como ésteres, metil ésteres, glicósidos, entre otros (Balasundram, Sundram y Samman, 2006). En las plantas tienen origen en su metabolismo secundario como mecanismos de defensa ante situaciones de diferentes tipos de estrés (Quiñones, Miguel y Aleixandre, 2012); principalmente por las rutas del ácido shiquímico (Figura 2) y de los poliacetatos (Figura 3). En la primera se sintetizan los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano); mientras que en la ruta de los poliacetatos se generan las quinonas y xantonas (Quiñones et al., 2012).

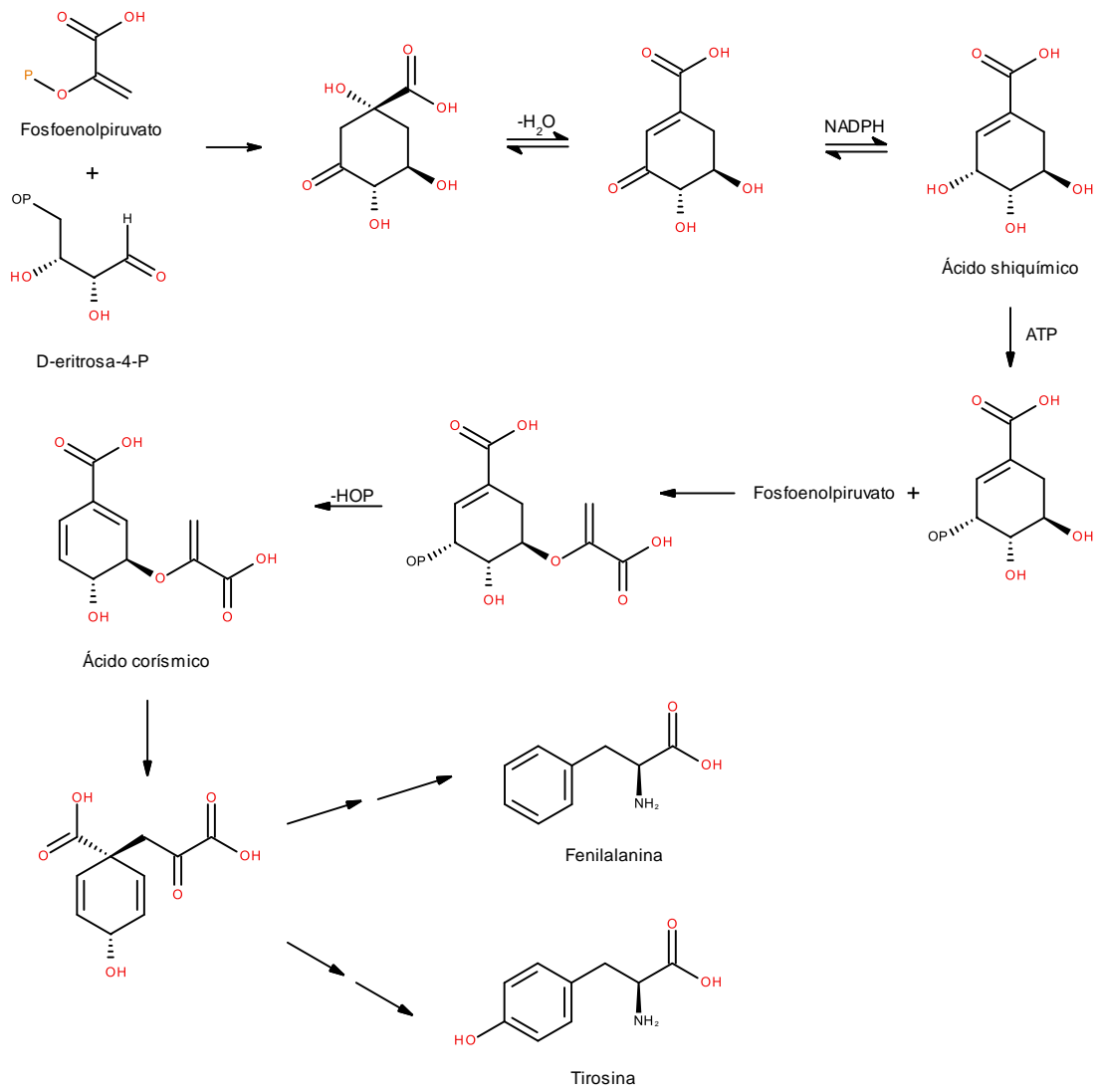


Figura 2. Ruta metabólica del ácido shiquímico (Dewick, 2002).

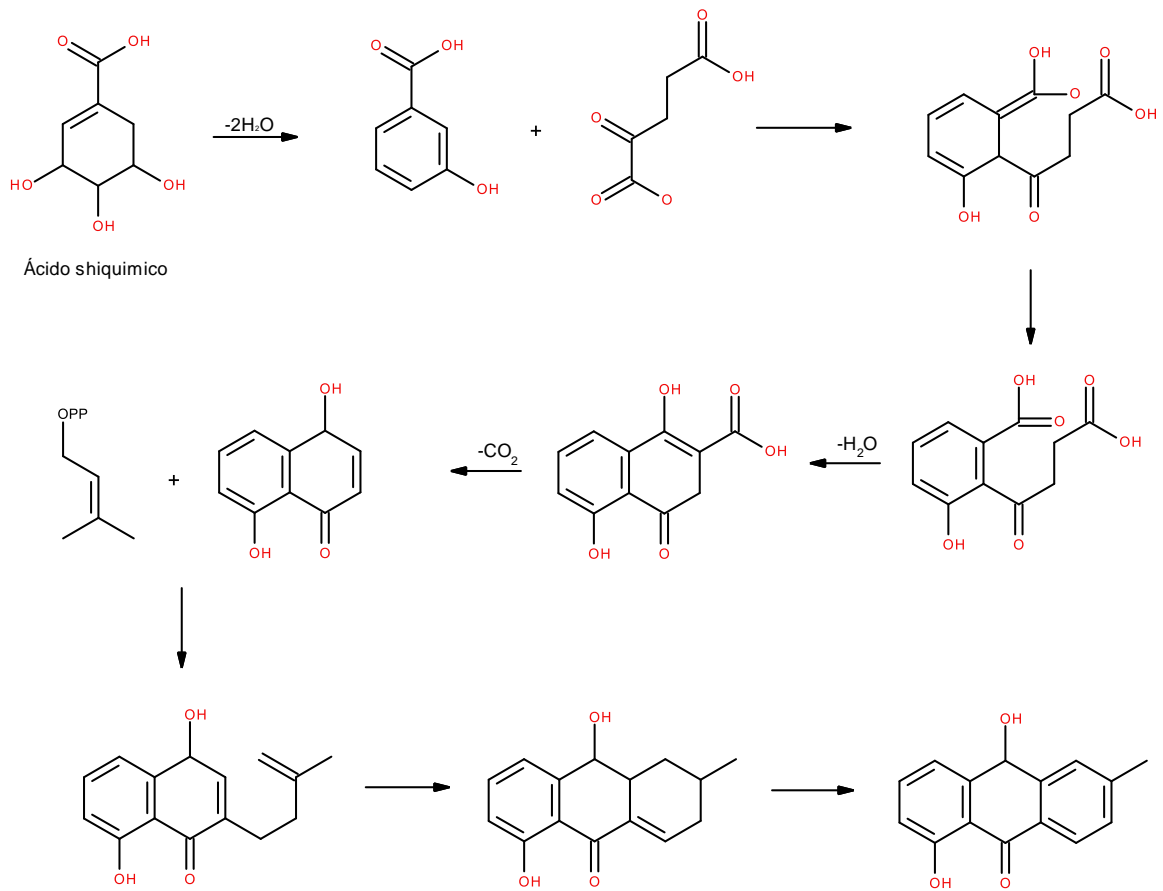


Figura 3. Ruta de síntesis de los poliacetatos (Quiñones et al., 2012).

2.3.2 Clasificación

Los polifenoles se clasifican en clases y subclases (Figura 4) en función del número de anillos fenólicos y de los elementos estructurales que estos poseen; siendo los principales grupos: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Quiñones et al., 2012).

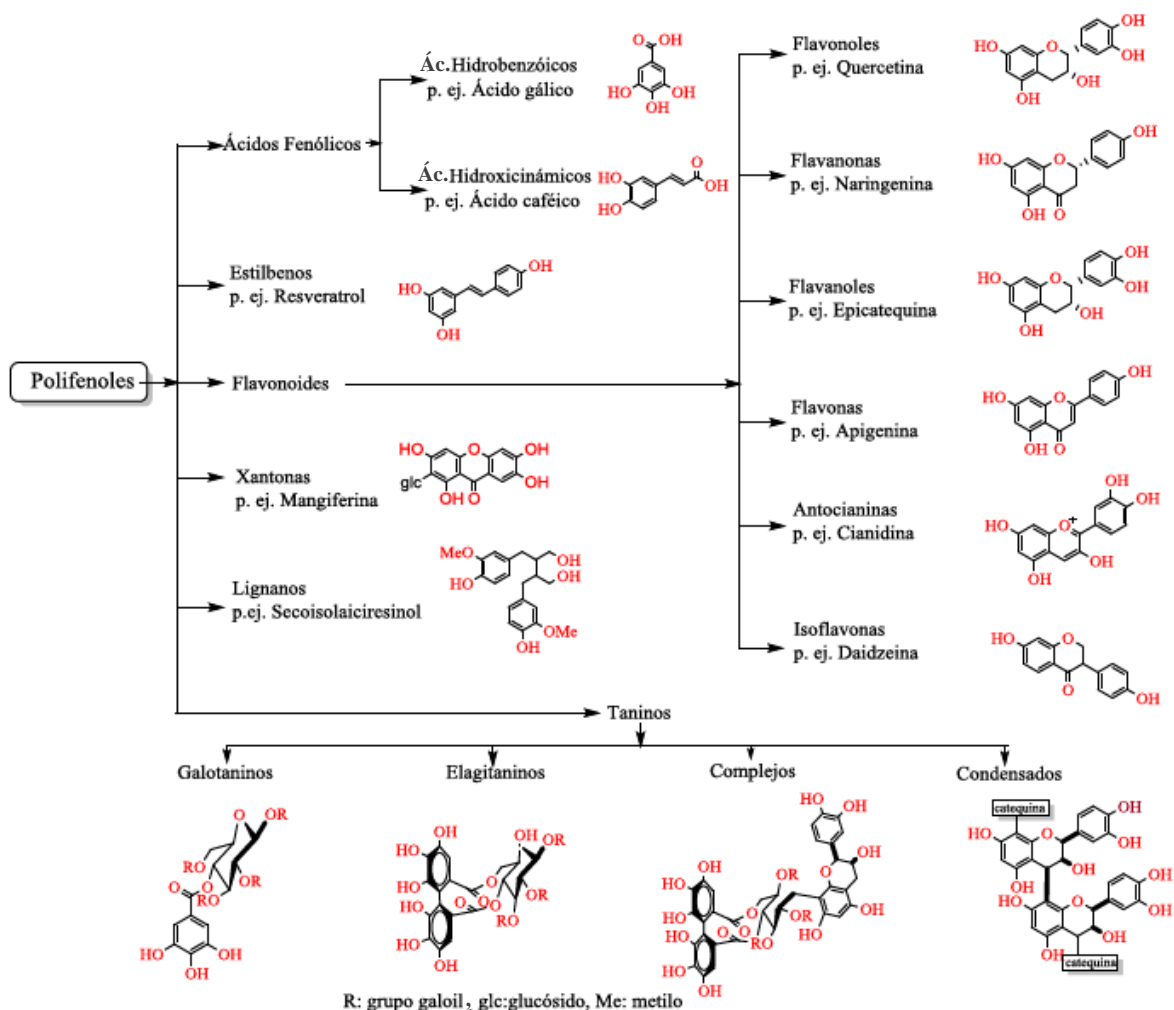


Figura 4. Clasificación de los compuestos polifenólicos (López-Hernández, 2017).

2.3.3 Polifenoles en miel

Se han identificado 150 compuestos polifenólicos en miel (ANEXO I), siendo los más característicos: ácido caféico, ácido ferúlico, ácido gálico, quercetina, apigenina y kaempferol. La identificación y cuantificación de estos compuestos se ha realizado empleando estándares y HPLC con detectores UV o de arreglo de diodos: catequina (0.61-36.77 mg/kg), ácido gálico (0.43-0.81 mg/kg), ácido caféico (0.05-2.49 mg/kg), ácido benzóico (0.64-1.33 mg/kg), ácido *p*-cumárico (1.03 mg/kg), ácido *trans*-cinámico (0.50 mg/kg), kaempferol (0.08-0.81 mg/kg) y apigenina (0.18 mg/kg) (Moniruzzaman et al., 2014; Khalil, Alam, Moniruzzaman, Sulaiman y Gan, 2011). Truchado, Vit, Heard, Tomàs-Barberà y Ferreres (2015) empleando un HPLC-

DAD-MS con ionización ESI identificaron 18 polifenoles glicosilados (ANEXO 1) en mieles de Australia. Por otro lado, Kečkeš et al. (2013) utilizaron UHPLC-MS y bases de datos para la identificación de 43 compuestos polifenólicos (ANEXO 1).

La identificación de polifenoles se ha realizado principalmente con HPLC y diferentes sistemas de detección, sin embargo el desarrollo de UHPLC, ha mejorado los métodos para el análisis de matrices complejas, permitiendo una mejor separación y caracterización de los compuestos que la conforman.

2.3.4 Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas

El sistema UHPLC-QToF consta de un cromatógrafo de líquidos de ultra desempeño acoplado a un espectrómetro de masas con analizador cuadrupolo tiempo de vuelo. Algunas características de la parte de la cromatografía son: tamaño de partícula reducido de la fase estacionaria (columna), operación con una bomba capaz de incrementar la presión hasta 15,000 psi y un consumo bajo de disolventes (orgánicos o acuosos), en el orden de los microlitros. A pesar de que la eficiencia en la separación de los compuestos es proporcional a la longitud de la columna e inversamente proporcional al radio de las partículas, en el UHPLC se reduce el tamaño de partícula de la fase estacionaria y por consiguiente la longitud de la columna, sin afectar la resolución de la respuesta (Chawla y Ranjan, 2016).

Para el análisis de los analitos en el espectrómetro de masas primeramente se debe eliminar el disolvente y enseguida ser ionizados. Para tal fin, existen diferentes métodos de ionización siendo el de electroespray uno de ellos (ESI, por sus siglas en inglés: *ElectroSpray Ionization*), en el cual frecuentemente se producen iones multi-cargados que hacen que la medición de masas grandes sea más precisa, permitiendo de éste modo el análisis de compuestos polares de hasta 10,000 Da. En la Figura 5 se esquematiza la formación y la trayectoria que siguen los iones: (1) El flujo proveniente de cromatógrafo pasa a través de un capilar al que se le aplica un potencial eléctrico (positivo o negativo) de 3-5 kV. (2) La solución es atomizada por efecto del campo eléctrico y con ayuda de un gas (N_2) a alta temperatura (400°C), el disolvente se evapora. De éste modo se evita la condensación de las gotas, las cuales se hacen más pequeñas y, al estar cargadas eléctricamente en su

superficie, la densidad de carga aumenta hasta que la repulsión natural entre cargas similares provoca la liberación de iones. (3) Los iones que poseen la carga que fue especificada en las condiciones de trabajo del equipo, siguen su trayectoria hacia el analizador, mientras que el resto de los iones son eliminados con el gas de desolvatación (Herber y Johnstone, 2003).

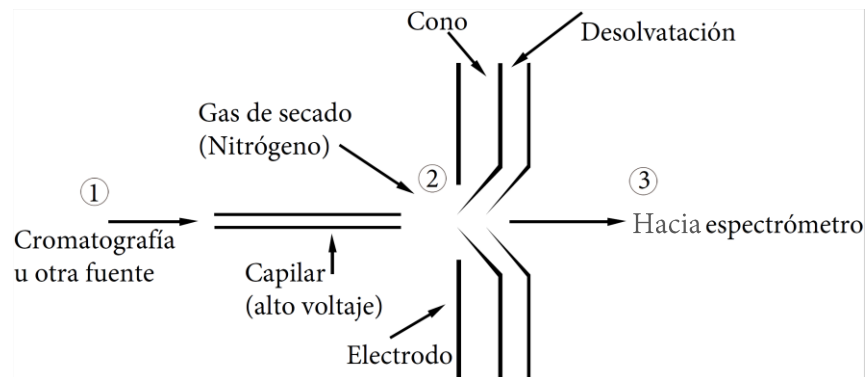


Figura 5. Esquema de la formación de iones y su trayectoria hacia el espectrómetro de masas (Herbert y Johnstone, 2003).

El cuadrupolo y el tiempo de vuelo (ToF, por sus siglas en inglés: *Time of Flight*), son analizadores de masas. Estos dispositivos pueden separar iones, átomos, moléculas o grupos de moléculas, de acuerdo a su relación masa/carga (m/z).

Un analizador cuadrupolar combina los potenciales de corriente directa (CD) y radiofrecuencia (RF) en un arreglo de cuatro barras orientadas de forma paralela y simétrica (Figura 6).

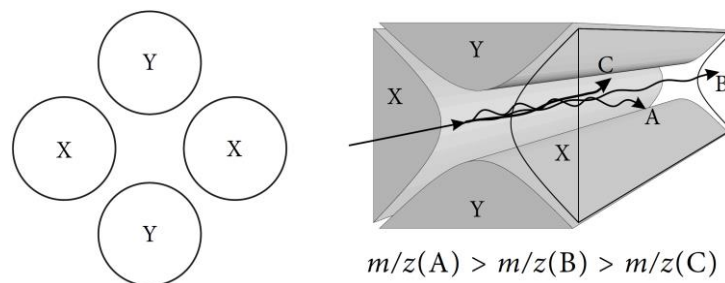


Figura 6. Esquema y principio de operación de un analizador cuadrupolar. X y Y: sección transversal de las barras paralelas combinando potenciales de CD y RF. A, C: trayectoria de los iones con valores inestables de m/z ; B: trayectoria de iones estables que atraviesan el cuadrupolo para su subsecuente detección (Westman-Brinkmalm y Brinkmalm, 2009).

Las barras X y Y están interconectadas eléctricamente y en cualquier momento tienen potenciales de igual magnitud pero de signo contrario. Los iones acelerados que provienen de la fuente de ionización entrarán al analizador pero únicamente aquellos con la relación m/z estable (que se encuentren dentro del intervalo de valores que fueron inicialmente indicados en el equipo), viajarán paralelamente través de las barras del cuadrupolo y llegarán al detector.

Por otro lado, el analizador ToF separa los iones con base a su diferencia de tiempo entre una señal inicial y el pulso generado cuando chocan con el detector. Idealmente todos los iones tienen la misma energía cinética pero diferentes velocidades dependiendo de la relación m/z .

En la Figura 7 se muestra la trayectoria que siguen los iones en un instrumento híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo. El proceso inicia cuando: (1) Los iones generados en la fuente de ionización se dirigen mediante un campo eléctrico hacia el cuadrupolo; (2) La corriente de iones que poseen valores en el intervalo de m/z definido, pasan a través del cuadrupolo; (3) Cuando llegan al electrodo deflector se les aplica un potencial eléctrico en forma de pulsos para que se aceleren dentro del tubo analizador ToF dirigiéndose hacia el reflectrón; (4) Se incrementan los intervalos de tiempo en los que los valores sucesivos de m/z serán detectados al llegar al detector (Herber y Johnstone, 2003).

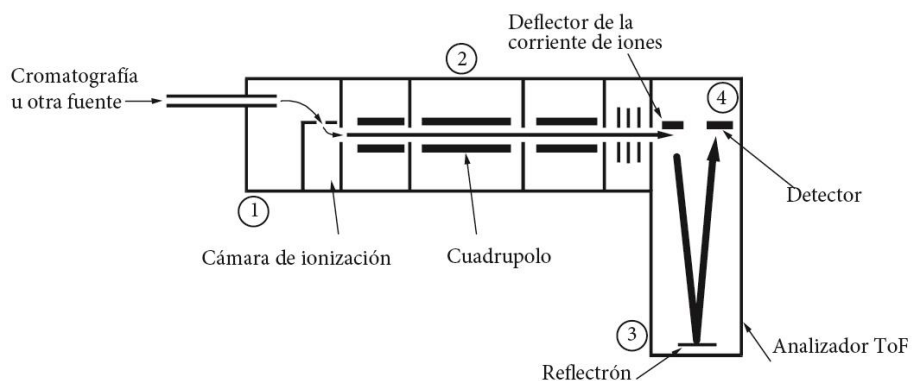


Figura 7. Esquema de un espectrómetro de masas con analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo (QToF) (Gómez-Castillo, 2018).

Las principales ventajas de los instrumentos que poseen QToF son la rápida adquisición de datos (30 espectros de masa/segundo) y una alta sensibilidad, lo que hace que esta tecnología sea utilizada para el análisis de muestras complejas. El equipo utilizado en el presente trabajo de tesis tiene ambos analizadores (QToF). Es importante mencionar que para incrementar la sensibilidad y la intensidad de las señales hasta en dos órdenes de magnitud en este tipo de tecnología se puede lograr manipulando la configuración electrónica del MS o haciendo uso de sustancias estabilizadoras con las cuales se mejora la eficiencia de la ionización (Watson, Atsriku y Oliveira, 2003). Por ejemplo, en la caracterización de polifenoles se han usado el ácido acético para incrementar la sensibilidad en la detección de trimetoxiflavona (Huck y Bonn, 2001); también para el análisis de flavonoides se ha reportado el uso de una solución amortiguadora de acetato de amonio (pH 4.0) ó ácido fórmico 0.4 % a pH 2.3 (Rauha, Vuorela y Kostainen, 2001). Adicionalmente, se han desarrollado nuevas estrategias de ionización para la detección de flavonoides empleando complejos metálicos con ligandos neutros (Satterfield y Brodbelt, 2000).

2.3.5 Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante es una de las principales propiedades biológicas conferida a los polifenoles, su importancia radica en que revierten situaciones de estrés oxidativo que es el desbalance entre las defensas antioxidantes del organismo y las especies reactivas de oxígeno (ROS, de sus siglas en inglés Reactive Oxygen Species). Estos iones se producen como respuesta a estímulos exógenos (fumar, irradiación UV, contaminación ambiental, etc.) y endógenos (respiración, catecolaminas u óxidos de nitrógeno). La célula disminuye el efecto dañino de estos oxidantes por medio de mecanismos enzimáticos (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa) y no enzimáticos (Zhi-Zhong, Yang y Jin-Song, 2016). La importancia de contrarrestar el estrés oxidativo es porque juega un papel fundamental en procesos como el envejecimiento prematuro así como en numerosas enfermedades como cáncer, cardiovasculares y neurodegenerativas (Bayliak, Burdyliuk y Lushchak, 2017).

2.4 Estabilidad de la miel

Los alimentos son perecederos por naturaleza y tienden a disminuir su calidad demandada por el consumidor, pudiendo llegar a ser perjudicial dependiendo de sus propiedades físicas, químicas, microbiológicas y sensoriales, asociadas a las condiciones y tiempo de almacenamiento. Se dice que en este punto ha llegado al final de su vida útil (Kilcast y Subramaniam, 2000).

El Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (IFST, de su sigla en inglés Institute of Food Science and Technology), define a la vida útil como el "Período durante el cual el producto alimenticio permanecerá seguro; garantizando que conserva las características sensoriales, químicas, físicas, microbiológicas y funcionales deseadas; y cumpliendo con cualquier declaración de la etiqueta de los datos nutricionales cuando se almacena en las condiciones recomendadas" (Robertson, 2009).

2.4.1 Factor crítico de calidad

La identificación del factor crítico de calidad (aquel que disminuye la calidad del alimento) es el primer paso para la evaluación de la estabilidad de los alimentos, se realiza tomando en cuenta las siguientes pautas (Phimolsiripol y Suppakul, 2016):

- 1) Normas nacionales e internacionales: es la principal pauta para la seguridad e inocuidad del alimento, siguiendo las leyes gubernamentales.
- 2) Consumidores: proporcionan el mejor criterio de la calidad crítica de un alimento.
- 3) Estándar del cliente: como intermediario conoce las características con las que debe de cumplir el producto.
- 4) Competidores: la calidad puede estar relacionada con las características de un producto de un competidor.

2.4.1.1 Tipos de pruebas

Las pruebas se pueden dividir en tres tipos (Phimolsiripol y Suppakul, 2016):

Estática. El producto es almacenado bajo condiciones ambientales. Esta prueba requiere mucho tiempo para observar los cambios y es costosa.

Acelerada. El producto es almacenado bajo un intervalo seleccionado de condiciones generalmente temperatura, humedad relativa o presión parcial de oxígeno (Giraldo, 1999) que no deben alterar la trayectoria normal de estabilidad del alimento y bajo la premisa de que el proceso deteriorante acelerado será el mismo bajo las condiciones reales a las cuales serán almacenados (Kilcast y Subramaniam, 2000). Se tienen resultados en un período de tiempo relativamente corto y también proporciona datos cinéticos, por tal razón, en la prácticas se recurre a este tipo de pruebas con la finalidad de acortar considerablemente el tiempo para la obtención de los resultados (Kilcast y Subramaniam, 2000).

De uso/abuso. El producto es almacenado bajo un ciclo de variables ambientales; se utiliza para evaluar el producto y el empaque como uno solo. Mediante ciclos de variables que son iguales o superiores a lo esperado en condiciones reales. Se utiliza a menudo para determinar los efectos del transporte.

En el presente trabajo, se realizaron pruebas del tipo estática y acelerada, para determinar el factor crítico de estabilidad de las mieles analizadas.

2.4.1.2 Condiciones de almacenamiento

Las condiciones de almacenamiento del producto deben de ser seleccionadas dependiendo del tipo de prueba a realizar, siendo las de mayor importancia la temperatura y humedad relativa. Para las pruebas aceleradas las temperaturas de almacenamiento deben presentar diferencias de 5 a 10°C y deben evitarse temperaturas extremadamente elevadas que afecten considerablemente al alimento (Phimolsiripol y Suppakul, 2016). Además, se debe considerar que la humedad relativa en climas templados varía entre 50-70 % HR (Torrieri, 2016). En las pruebas a condiciones ambientales, el producto debe estar a las condiciones lo más reales de almacenamiento.

Una vez que se definen las condiciones de almacenamiento, la calidad a lo largo del tiempo debe ser monitoreada para lo cual se deben incluir de seis a ocho puntos de muestreo, y los cambios de calidad de los productos deben ser del 30-50 % del original para representar una tendencia de deterioro durante todo el almacenamiento (Phimolsiripol y Suppakul, 2016).

2.4.1.3 Cinética de reacción

Dentro de la evaluación de la estabilidad o vida útil de un alimento es importante primeramente determinar el orden de la reacción que caracteriza el comportamiento de los datos experimentales de los parámetros analizados.

Reacción de orden cero

En la ecuación 1 (general de una cinética de reacción), cuando $n=0$ se obtiene la reacción de orden cero. Esto implica que la velocidad de pérdida de A es constante con el tiempo e independiente de la concentración de A.

$$\frac{dA}{dt} = -kA^n \quad \text{Ec. 1}$$

$$A_e = A_0 - kt \quad \text{Ec. 2}$$

Donde: A_0 y A_e son el valor inicial y final del parámetro A, respectivamente, t es la vida media (en días, meses o años) y k es la constante de velocidad de la reacción.

La cinética de orden cero se ha aplicado en alimentos como: el zumo de limón, mayonesa, jugos y pulpas de frutas; además de alimentos con una alta concentración de azúcares como: caramelos, dulces de leche y leche condensada (Manayay, Ibarz, Castillo y Palacios, 2013; Valencia, Cortés y Román, 2012; Ibarz, Pagán, Garza e Ibarz, 2010; Manayay e Ibarz, 2010; García y Molina, 2008; Rozycki, 2003; Buera, Hough, Martinez y Resnik, 1990).

Reacción de primer orden

Considerando los principios fundamentales de la cinética química y que $n=1$ se tiene que:

$$A = A_0 e^{-(\sum k_i t_i)} \quad \text{Ec. 3}$$

Donde: A es la cantidad de algún factor de calidad remanente al final de un tiempo t_i .

La ecuación de este orden suele caracterizar el deterioro de alimentos como: la carambola (*Averrhoa carambola* L.), tomate, lechuga y otros vegetales (González et al., 2016; Lana, Tijskens y Kooten, 2005; Pirovani et al., 2005).

Reacción de segundo orden

Cuando $n=2$ se obtiene la ecuación 4, siendo un ejemplo de su uso la evaluación de los cambios de color en manzanas (Cortés y Chiralt, 2008).

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{A_0} + kt \quad \text{Ec. 4}$$

Cabe señalar, que la aplicación de dicha ecuación no se utiliza frecuentemente para describir el deterioro de los alimentos (Taoukis, Labuza y Saguy, 2000).

Modelo de Arrhenius

La ecuación de Arrhenius se basa en aspectos termodinámicos y describe la dependencia de las reacciones químicas con la temperatura, relacionadas con la estabilidad y vida útil de los alimentos incluyendo la pérdida de la calidad sensorial (Labuza y Fu, 1993).

$$k = k_0 \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad \text{Ec. 5}$$

Donde: k_0 es el factor de frecuencia o factor pre-exponencial; E_a es la energía de activación, R es la constante universal de los gases y T es la temperatura (K).

Cuando se grafica el $\ln k$ vs $1/T$ se utiliza la ecuación de la recta para ajustar los datos experimentales, cuya pendiente es E_a/R ; para su aplicación se deben tener datos de por lo menos tres diferentes temperaturas.

Las pruebas de vida acelerada se basan en el cumplimiento de la ley de Arrhenius; la ecuación para calcular su efecto sobre la vida media es (Giraldo, 1999):

$$t_s = t_0 \exp\left[-\frac{E_a}{R} \left[\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T_s}\right]\right] \quad \text{Ec. 6}$$

Donde: T_0 y T_s son la temperatura al tiempo t_0 y t_s , respectivamente; R es la constante de los gases, y E_a es la energía de activación para la reacción de deterioro.

Q₁₀

Q_{10} es otro parámetro que se utiliza con frecuencia para describir la relación entre la temperatura y la velocidad de reacción (Man, 2002), y se define como la disminución de la vida útil por un aumento de 10 °C. Se ha utilizado para predecir la pérdida de calidad o de nutrientes en muchos alimentos. Belmares, Guerra y Mata (2009) indican que el cálculo de este coeficiente se realiza para conocer la velocidad de reacción del deterioro en relación con el incremento de la temperatura. Q_{10} es definido como (Man, 2002):

$$Q_{10} = \frac{\text{Razón a la temperatura a } (T+10)^{\circ}\text{C}}{\text{Razón a la temperatura } T^{\circ}\text{C}} \quad \text{Ec. 7}$$

$$Q_{10} = \frac{\text{Vida de anaquel a } T^{\circ}\text{C}}{\text{Vida de anaquel a } (T+10)^{\circ}\text{C}} \quad \text{Ec. 8}$$

3. ESTADO DEL ARTE

A la fecha son pocos los reportes de estabilidad para la miel, siendo un dato importante para garantizar el consumo de un producto de calidad. Bogdanov (2008) realizó el análisis del almacenamiento de miel, no refirió el origen de la muestra ni la humedad relativa; las temperaturas analizadas fueron de 10 a 70°C, con incrementos de 10°C. Los resultados mostraron que el tiempo de formación de 40 mg HMF/kg_{miel} fue de 0.5-1 año (30°C), 1-2 meses (40°C) y 5-10 días (50°C). La vida media (disminución del 50 % de la actividad de la enzima) para el índice de diastasa fue 200 días (30°C), 31 días (40°C) y 5.4 días (50°C).

Belmares et al. (2009) realizaron una prueba de vida acelerada para miel, no mencionaron su procedencia, emplearon una estufa de calentamiento sin especificar la humedad relativa utilizada. Cabe señalar que en el presente trabajo se empleó una cámara climática con control de temperatura y humedad. Estos autores calcularon el valor de Q_{10} con los parámetros de viscosidad y un análisis sensorial. Para este último tuvieron como resultado una vida útil de 21 días (35°C), 14 días (45°C) y 7 días (55°C). Con base a la viscosidad 28 días (35°C), 21 días (45°C) y 14 días (55°C).

Fallico, Arena y Zappala (2009), reportaron la estimación de la vida de anaquel empleando un programa de simulación de diseño propio. Utilizaron 14 mieles italianas comerciales de las cuales 2 fueron de acacia (*Robinia pseudoacacia* L.), 4 de cítricos (*Citrus aurantium* L.), 2 de eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis* L.), 2 de castaña (*Castanea sativa* L.), y 4 multiflorales. Las mieles se almacenaron por duplicado, a temperatura ambiente (25±2°C) y a 55-60 % HR. Cada mes durante 18 meses, evaluaron la concentración de HMF (por HPLC con un detector de arreglo de diodos), ID (por un método espectrofotométrico usando un kit enzimático), % humedad, CE, ácidos libres, pH, lactonas y acidez total. La vida de anaquel se estimó empleando los parámetros de HMF y diastasa. Los resultados mostraron que durante los primeros 4 meses de almacenamiento no se observaron variaciones en la concentración de HMF: mieles cítricas (5.6 y 28.7 mg HMF/kg_{miel}), mieles de castaña, así como de eucalipto (0.1 mg HMF/kg_{miel}), y miel multifloral (10.4 a 17.4

mg HMF/kg_{miel}). Por otro lado, la actividad de diastasa no mostró variación durante los primeros 8 meses de almacenamiento, y después de 18 meses ninguna de las muestras tuvo actividad enzimática menor a 11 UD. Los autores empleando una cinética de primer orden establecieron que la vida útil más probable de la miel de acacia osciló entre 16-23 meses; para la de cítricos entre 13-17 meses; la de eucalipto fue de 15-16 meses y la multifloral con un intervalo entre 14.7-26 meses.

Parvanov y Dinkov (2012) en una comunicación corta mencionaron los requerimientos para el procesamiento, almacenamiento y vida de anaquel de miel orgánica, con base a lo reportado en literatura y experiencia propia. Concluyeron que la miel debe almacenarse en recipientes herméticos a las condiciones de temperatura <20°C y una humedad relativa <65 %; además que cuando la miel es calentada a <37°C el tiempo de consumo preferente es de 1 año y sin calentamiento de 2 años.

Por su parte, Qamer, Ahamed, Ali y Shakoori (2013) estudiaron el efecto del almacenamiento para la miel de *Apis dorsata* de Nepal, pero no reportaron su estabilidad. Las muestras fueron obtenidas de 4 bosques y fueron almacenadas a temperatura ambiente (25-29°C), con toma de muestra a los 0, 8 y 16 meses. Los autores mencionaron que no utilizaron conservadores ni calentamiento durante el almacenamiento y que las muestras no presentaron granulación. Los análisis fisicoquímicos fueron de acuerdo a los métodos establecidos por la Comisión Europea de la Miel (CEM). El método de Winkler se utilizó para la determinación del contenido de HMF que es otro método espectrofotométrico diferente al empleado en este trabajo de tesis (método de Carrez). La actividad de diastasa e invertasa se determinaron por los métodos de Schade y Siegenthaler, respectivamente. Los resultados mostraron que no hubo diferencia significativa en el pH (3.42-6.1) de la miel y que los valores estuvieron dentro de lo estipulado por la CEM. En cuanto a la acidez libre, desde el tiempo cero las mieles mostraron valores cercanos al límite superior permisible (>60 meq/kg), mencionando que pudo deberse al origen multifloral de los néctares. Asimismo, observaron un aumento de la CE (0.8 mS/cm) de la miel dentro del límite máximo de la CEM. La actividad de diastasa disminuyó el

58.03% (11.62 UD) y el 92.59% (0.86 UD), a los 8 y 16 meses, respectivamente; resaltando que este último valor ya no se encuentra dentro de lo establecido en norma. El HMF a los 8 meses aumentó el 60.04% (53.42 mg/kg_{miel}) y 1063% (621.28 mg/kg_{miel}) al final del almacenamiento, para este último valor no cumpliendo con lo establecido en la norma. Finalmente, mencionaron la necesidad de establecer los límites máximos de los parámetros de calidad para la miel de *Apis dorsata* considerando su origen floral y la composición así como la especie de abejas.

Con respecto al análisis de la miel como *alimento funcional*; Wang, Gheldof y Engeseth (2004) evaluaron el contenido de polifenoles totales, perfil polifenólico y actividad antioxidante de mieles con y sin calentamiento previo a su almacenamiento en diferentes condiciones de temperatura, luz y material del envase, únicamente al tiempo inicial y a los 6 meses de almacenamiento. En el caso de la miel sin calentamiento almacenada a temperatura ambiente en envase de vidrio transparente y en presencia de luz (similares a unas de las condiciones que se emplearon en este trabajo) reportaron la disminución de aproximadamente el 50 % de la actividad antioxidante (método ORAC), por otra para el CPT se mantuvo sin cambio durante el almacenamiento. Respecto al perfil polifenólico, se identificaron 14 compuestos (ANEXO 1), mismo que no varió después de 6 meses de almacenamiento presentando las diferencias solamente en las concentraciones de los compuestos.

Como se puede observar, a la fecha no existen reportes de la estabilidad para las mieles producidas en el estado de Oaxaca, no hay evidencia del uso de UHPLC-QToF para la cuantificación del HMF siendo este uno de los parámetros frecuentemente evaluados en la estabilidad de la miel durante su almacenamiento. Además, el contenido de polifenoles totales, perfil polifenólico y la actividad antioxidante, se han reportado únicamente al inicio y al final del tiempo de almacenamiento. Tampoco hay reportes del uso de UHPLC-QToF para el monitoreo del perfil polifenólico de miel almacenada a condiciones aceleradas.

4. JUSTIFICACIÓN

La miel es un producto que se comercializa a nivel mundial; en el 2017 los ingresos por su venta en México fueron de \$104,717 miles de USD y los países de mayor exportación de la miel mexicana fueron: Alemania, Estados Unidos de América, Reino Unido, Arabia Saudita, Suiza y Bélgica (TRADE MAP, 2017). Oaxaca fue el quinto estado con mayor producción a nivel nacional con 4,077.74 Ton (SAGARPA, 2017); su precio está en función de su calidad y origen. Sin embargo, son pocos los trabajos que han evaluado su estabilidad reportando tiempos que van desde los 20 meses (Fallico et al., 2009) hasta los 4 años (Parvanov y Dinkov, 2012), no existiendo estudios para la miel producida en Oaxaca. Además, la miel es considerada un *alimento funcional* por los beneficios a la salud que su ingesta conlleva asociados a la presencia de compuestos como los polifenoles, los cuales poseen actividades biológicas como la antioxidante (Ajibola et al., 2012). Con base en lo anterior, es recomendable realizar el estudio de cada una de las mieles considerando la influencia que tiene el tipo de abeja que la produce, las características del néctar, el origen floral, los valores iniciales de los parámetros fisicoquímicos (Parvanov y Dinkov, 2012), así como el contenido de polifenoles.

En el presente trabajo se consideró de importancia el estudio de la estabilidad de la miel producida en el estado de Oaxaca, en específico de los municipios de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, las cuales actualmente ya se comercializan a nivel nacional e internacional. Se evaluaron varios parámetros de calidad establecidos en normas nacionales e internacionales; dentro de los cuales se resalta la cuantificación de hidroximetilfurfural durante el almacenamiento de la miel empleando por primera vez una tecnología de vanguardia como es UHPLC-QToF.

A pesar de que existen reportes del CPT y AA para la miel, únicamente se han realizado al inicio de su caracterización y después de un año de almacenamiento (Šarić et al., 2012); o antes y después de 6 meses de su envasado en diferentes tipos de empaque (Wang et al., 2004). En este trabajo de tesis los valores del CPT y AA son el resultado del monitoreo durante su almacenamiento en condiciones

aceleradas y ambiente, los cuales fueron relacionados a la par con el perfil polifenólico determinado por UHPLC-QToF lo cual no ha sido reportado a la fecha.

Con base a todo lo antes expuesto se reporta por primera vez el tiempo de la estabilidad de la miel considerándose como un *alimento funcional* además del cumpliendo con los parámetros establecidos en normas nacionales e internacionales. Finalmente, los resultados generados favorecerán directamente a los productores de las mieles evaluadas como primera instancia, lo que para ellos puede representar una ventaja competitiva en el mercado; y para los consumidores al tener la información del alimento que adquieren.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Estimar el tiempo de estabilidad de miel producida en los municipios de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca, México; mediante pruebas de vida acelerada, y la evaluación durante su almacenamiento del perfil polifenólico utilizando UHPLC-QToF, así como, de la actividad antioxidante por un ensayo *in vitro*, generando conocimiento científico de la calidad de la miel.

5.2 Objetivos específicos

1. Determinar los parámetros físicoquímicos de calidad establecidos en normas nacionales e internacionales: porcentaje de humedad, conductividad eléctrica, índice de diastasa y concentración de hidroximetilfurfural, en mieles de los municipios de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero almacenadas a condiciones aceleradas y del medio ambiente.
2. Determinar parámetros físicoquímicos de calidad no establecidos en las normas de referencia: pH y color, en las mieles de ambos orígenes almacenadas a condiciones aceleradas y del medio ambiente.
3. Definir las condiciones para la cuantificación del HMF por UHPLC-QToF en la miel de los municipios de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero almacenadas a condiciones aceleradas.
4. Determinar los parámetros de la miel como *alimento funcional*: contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante, en mieles de ambos orígenes almacenadas a condiciones aceleradas y del medio ambiente.

5. Determinar el parámetro crítico de calidad para el cálculo del tiempo de estabilidad de las mieles tanto de Huajuapán de León como Putla Villa de Guerrero.
6. Comparar el perfil de polifenoles en las mieles de ambos orígenes en las condiciones de almacenamiento de mayor variación en el contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante, obtenidos mediante las condiciones establecidas para el método de UHPLC-QToF y el software Progenesis QI[®].
7. Analizar la significancia estadística de los factores: lugar de origen, temperatura y tiempo; y de las correlaciones múltiples de Pearson entre los parámetros evaluados a condiciones aceleradas.

6. METAS

6.1 Identificar el parámetro crítico de calidad de las mieles producidas en los municipios de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero con base a parámetros fisicoquímicos (objetivos 1 y 2) y como *alimento funcional* (objetivo 4).

6.2 Tener definido el tiempo de estabilidad de la miel producida en ambos municipios.

6.3 Tener las condiciones cromatográficas y de espectrometría de masas para la cuantificación de HMF por UHPLC-QToF.

6.4 Tener las condiciones cromatográficas y de espectrometría de masas para la identificación de compuestos polifenólicos en miel y definir las diferencias entre los perfiles de polifenoles de las mieles estudiadas.

6.5 Demostrar la variación de los parámetros y comparación de significancia entre los factores evaluados en las mieles objeto de estudio.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

En este apartado se describen los materiales y métodos que se utilizaron para la evaluación comparativa del efecto de la temperatura y tiempo de almacenamiento de miel de dos orígenes con respecto a: 1) parámetros de calidad con base a lo establecido para este alimento en las normas oficiales: nacional e internacional; adicionalmente se implementó un método empleando un UPLC-QToF para cuantificar el hidroximetilfurfural. 2) Perfil de compuestos polifenólicos por UHPLC-QToF. 3) Contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante usando un método *in vitro*.

7.1 Origen de la miel

Las mieles fueron proporcionadas por la Sociedad Cooperativa de Apicultores de Huajuapán S.C. de C.V. de R.L., ubicada en la ciudad de Huajuapán de León, Oaxaca. Las cuales provienen de los siguientes orígenes.

ORIGEN 1. Heróica Ciudad de Huajuapán de León, es el municipio 039 y pertenece a la región mixteca (INEGI, 2018). Coordenadas 97°16' longitud oeste, 17°48' latitud norte y a una altura de 1,600 m sobre el nivel del mar. El clima es templado y cálido, subhúmedo con lluvias en verano, el rango de temperaturas registrado fluctúa entre los 16-24°C y la precipitación pluvial va de 700 a 1,000 mm (INAFED, 2018).

ORIGEN 2. Putla Villa de Guerrero, es el municipio 073 y pertenece a la región sierra sur (INEGI, 2018). Coordenada 97°55' longitud oeste, 17°01' latitud norte y a una altura de 750 m sobre el nivel del mar. El clima es templado y cálido, con oscilación térmica entre 15-35°C, presenta lluvias en verano y principios de otoño con una precipitación promedio de 1,319mm (INAFED, 2018).

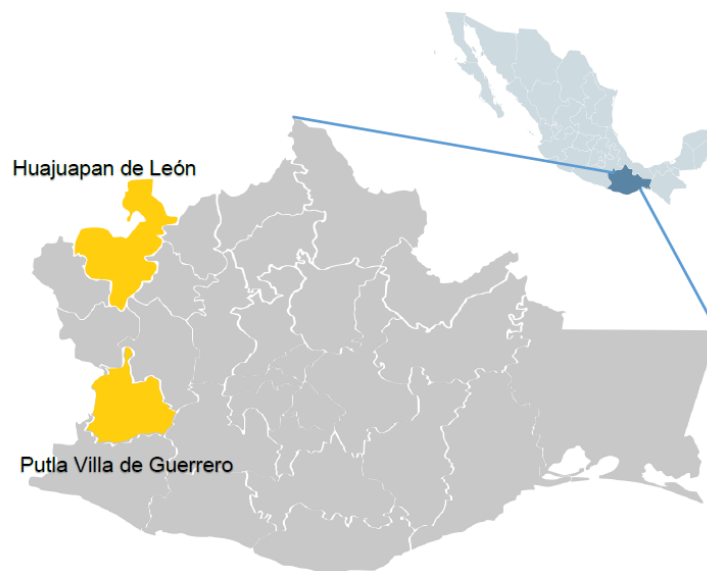


Figura 8. Localización de los Municipios: Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca, México.

7.2 Reactivos

Hidroximetilfurfural, solución de Carrez I ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$) y II ($Zn(CH_3CO_2)_2 \cdot 2H_2O$), ácido gálico, reactivo de Folin-Ciocalteu y DPPH^{*} (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos). NaCl, NaHSO₃, KI, HCl, CH₂Cl₂, yodo y acetato de sodio (Meyer). Na₂CO₃ (Reasol). H₂O y MeOH (LC/MS, Fisher). Acetonitrilo (LC-MS, J.T. Baker). Isopropanol (HPLC, J.T. Baker). Leucina/encefalina y ácido fórmico (Waters). MeOH grado reactivo, ácido acético glacial y soluciones amortiguadoras estandarizadas para pH 7.0 y 4.0 (J.T. Baker). Acetonitrilo (Tedia). Solución de almidón al 0.5 % (Hycl).

7.3 Materiales

Columna para cromatografía de líquidos Acquity UPLC HSS T3 C18 2.1 x 100 mm, tamaño de partícula de 1.8 μm y vial de vidrio con tapa ranurada de 2.0 mL (Waters). Columna Supelclean™ LC-18 SPE-3 mL de base silica enlazada a octadecilo (C18) de 45 μm y 6 nm de tamaño de partícula y poro respectivamente (Supelco[®]). Filtros de nylon 0.2 y 0.45 μm (Whatman™). Tubos para centrifuga de 50 mL (Falcon™) y papel Parafilm M.

7.4 Equipos

UPLC-QToF Waters Acquity UPLC[®] Clase I con detector Xevo G2 XS QToF equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI) y software Masslynx versión 4.1. (Waters Corp., Milford MA, USA). Cámara climática artificial (Marca Luzeren, mod. RTOP-260D). Vórtex (Marca IKA, mod. VORTEX3). Espectrofotómetro UV-vis (Marca Hinotek, mod. UV765). Espectrofotómetro (Marca HunterLab, mod. UltraScan VIS). Baño ultrasónico (Marca BRANSON, mod. 8800). Centrífuga refrigerada (Marca Eppendorf, mod. 5810 R). Rotavapor (Marca BUCHI, mod. R-100). Rotavapor (Marca IKA, mod. RV 10 basic). Refractómetro portátil (Marca HANNA, mod. HI 96801). Conductímetro (Marca HANNA, mod. HI98311). Potenciómetro (Marca HANNA, mod. HI2210) e higrómetro (Marca ColeParmer, mod. 3310-20).

7.5 Evaluación de la estabilidad de la miel

7.5.1 Diseño experimental

El diseño experimental para las pruebas a condiciones aceleradas fue de tres factores multiniveles, lo cual dio como resultado 30 combinaciones de tratamientos (ANEXO II). El almacenamiento a condiciones ambiente, se conformó por dos factores multiniveles, presentando 16 tratamientos analizados cada cuatro semanas (ANEXO II).

Variables controladas:

- Origen de la muestra: Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca, México.
- Condiciones aceleradas: temperatura 30, 40, 50°C con 70 % HR durante 5 semanas.
- Condiciones ambientales: temperatura $22.12 \pm 1.75^\circ\text{C}$ con 63.00 ± 7.61 % HR, durante 32 semanas.

Variables dependientes:

De calidad

- Porcentaje de humedad
- Conductividad eléctrica

- pH
- Color
- Índice de diastasa
- Hidroximetilfurfural

Como *alimento funcional*

- Contenido de polifenoles totales
- Actividad antioxidante

7.6 Obtención de la miel

Ambas muestras se obtuvieron en el período de cosecha correspondiente a la primera quincena del mes de mayo del 2017. La miel procedente de Putla Villa de Guerrero fue transportada el 2 de mayo a la ciudad de Huajuapán de León. Dichas muestras fueron entregadas el 4 de mayo en el laboratorio de Biotecnología del edificio de Productos Naturales y Alimentos, de la Universidad Tecnológica de la Mixteca.

7.7 Extracción de la miel del panal

Los bastidores fueron colocados en una mesa de extracción, primero se efectuó el corte del opérculo continuando con el corte del panal completo (Figura 9).



Figura 9. Corte del opérculo del panal en mesa de extracción.

La miel se obtuvo por efecto de la gravedad, se filtró y se recibió en cubetas de material plástico de 19 L, las cuales fueron selladas y almacenadas a temperatura ambiente durante 48 h. Después de este tiempo, se eliminó de la superficie la capa constituida por restos de polen, abejas y cera. La miel fue entonces envasada en frascos (46 piezas) transparentes de vidrio con tapa hermética y capacidad de 120 mL, previamente esterilizados.

La muestra del tiempo cero fue miel de cada origen que se colectó inmediatamente después al corte del opérculo. La toma se realizó en tubos falcon de 50 mL, los cuales fueron; sellados, cubiertos con papel aluminio para su protección contra la luz y almacenados a -20°C, para su análisis posterior.

7.8 Almacenamiento

Para el almacenamiento en condiciones aceleradas se utilizó una cámara climática artificial, en la cual se controlaron la humedad relativa y las temperaturas antes mencionadas. En lo referente al almacenamiento a condiciones ambiente, las muestras fueron colocadas en un anaquel metálico con puertas de vidrio; la temperatura y humedad fueron monitoreadas con un termómetro de mercurio y un higrómetro, respectivamente.

7.9 Acondicionamiento de la miel para su análisis

La miel del tiempo cero fue colocada a baño maría a 40°C durante 50 min, con agitación manual intermitente, hasta su homogeneidad y se dejó atemperar para su uso. Es importante señalar que la miel no se calentó cuando fue utilizada para la cuantificación del hidroximetilfurfural, únicamente se mezcló hasta que se observó una apariencia homogénea.

7.10 Determinación de parámetros fisicoquímicos de calidad

7.10.1 NMX-F-036-NORMEX-2006

7.10.1.1 Porcentaje de humedad

Determinación. Se colocó una gota de miel en la celda de medición del refractómetro a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Previamente se hizo la calibración con agua desionizada. Los resultados se reportaron como porcentaje de humedad, aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = (100 - \text{°Brix}) \quad \text{Ec. 9}$$

7.10.1.2 Conductividad eléctrica (CE)

Preparación de la muestra. Se preparó una solución de miel al 20 % (p/v), disolviendo 10 g de miel en 50 mL de agua desionizada (AD) a 20°C.

Determinación. La CE se midió utilizando un conductímetro de acuerdo a lo reportado por Moniruzzaman et al. (2013). Los resultados se reportaron en microsiemens por centímetro ($\mu\text{S}/\text{cm}$).

7.10.1.3 Índice de diastasa

Se utilizó el método espectrofotométrico de Schade de acuerdo a la NMX-F-036-NORME-2006.

Preparación de soluciones. Solución primaria de yodo: se disolvieron 0.088 g de yodo y 0.22 g de KI en AD y se aforó hasta 10 mL. Solución de yodo 0.0007 N: se pesaron 4.0 g de KI y se disolvieron con 40 mL de AD, después se añadió 1.0 mL de la solución primaria de yodo y se aforó a 100 mL. Solución de cloruro de sodio 0.5 M: se pesaron 14.5 g de NaCl y se disolvieron en 500 mL de AD. Solución amortiguadora de acetato pH 5.3: se pesaron 52.4 g de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$ y se disolvieron en 400 mL de AD, después se añadieron 10.5 mL de ácido acético glacial, se aforó a 500 mL y finalmente se ajustó el pH a 5.3 con acetato de sodio anhidro y ácido acético concentrado. Solución de almidón al 0.5 %.

Preparación de la muestra. Se pesaron 10 g de miel y disolvieron en 5.0 mL de solución amortiguadora de acetato y 20 mL de AD, aforando a 50 mL en un matraz que previamente contenía 3.0 mL de NaCl 0.5 M.

Determinación de la actividad de diastasa. Diez mililitros de la solución de miel y 5.0 mL de la solución de almidón al 0.5 % se colocaron por separado en un baño de agua a $40 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 15 min y transcurrido ese tiempo se mezclaron a homogeneidad. Sin suspender el calentamiento de la mezcla anterior, se tomaron 1.4 mL y se homogeneizaron con 10 mL de la solución de yodo 0.0007 N. Se leyó la absorbancia a 600 nm. A intervalos de 5 min se continuaron tomando volúmenes de

1.4 mL de la mezcla y 10 mL de la solución de yodo, hasta llegar a una absorbancia menor a 0.235.

Cálculo del índice de diastasa. Los datos de absorbancia se graficaron en función del tiempo (min) y se ajustaron con la ecuación de la recta, a partir de la cual se calculó el tiempo para obtener la absorbancia de 0.235. Posteriormente, se dividió 300 (constante de cálculo) entre el tiempo calculado. La unidad de diastasa (UD) se define en la escala de Gothe como el volumen (mL) de solución de almidón al 1 % hidrolizada por la enzima/gramo de miel/hora a 40°C.

7.10.2 Cuantificación de hidroximetilfurfural (HMF) por un método espectrofotométrico

Para cuantificar la concentración de HMF (NMX-036-1997) cada una de las muestras de miel fue tratada empleando el método de Carrez como se indica en la norma.

Preparación de soluciones. Soluciones Carrez I y II: para la primera 15 g de $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ se disolvieron en 100 mL de AD, mientras que para la segunda 30 g de $Zn(CH_3CO_2)_2 \cdot 2H_2O$, se solubilizaron con 100 mL de AD. Solución de referencia de bisulfito de sodio al 0.2 %: se disolvieron 0.2 g de $NaHSO_3$ en 100 mL de AD.

Preparación de la muestra. Cinco gramos de miel se disolvieron con 25 mL de AD. A esta solución se añadieron 0.5 mL de cada una de las soluciones de Carrez I y II, se aforó a 50 mL y se filtró empleando papel filtro. Cinco mililitros del filtrado se mezclaron con 5.0 mL de AD (muestra); como control se mezclaron 5.0 mL del filtrado con 5.0 mL de la solución de $NaHSO_3$ al 0.2 %.

Cuantificación. Se midió la absorbancia a 284 y 336 nm en un espectrofotómetro UV-vis. Cuando el valor de la absorbancia fue mayor a 0.600, la muestra se diluyó con AD y se corrigió el valor de la absorbancia con el factor de dilución (ecuación 10).

$$\frac{mg\ HMF}{100g\ miel} = \frac{(A_{284} - A_{336}) \times 14.97 \times 5}{g_{muestra}}$$

Ec. 10

Donde:

A_{284} : Absorbancia de la muestra a 284 nm

A_{336} : Absorbancia de la muestra a 336 nm

14.97 = es el factor $(126/16.830) (1000/10) (100/5)$, siendo:

126 = peso molecular del HMF

16.830 = absortividad molar del HMF a 284 nm

1000 en mg/g

10 en centilitros por litro

100 = gramos de miel reportados

5 = peso nominal de la muestra en gramos

7.10.3 Cuantificación de hidroximetilfurfural por UHPLC-QToF

Las condiciones que se establecieron en el presente trabajo de tesis para la identificación del HMF en la miel, se detallan a continuación.

Preparación de la muestra. Las muestras se prepararon utilizando dos técnicas diferentes de extracción del HMF.

Extracción 1. Se disolvieron 0.2 g de miel en 2.0 mL de H₂O grado masas, la mezcla se homogenizó en un vortex durante 5 min, transcurrido este tiempo se colocó en un baño ultrasónico a $22\pm 2^\circ\text{C}$ por 5 min y se filtró con una membrana de 0.20 μm de tamaño de poro.

Extracción 2. Se realizó de acuerdo a la metodología reportada por Teixidó, Moyano, Santos y Galceran (2008) con ligeras modificaciones. Se disolvieron 0.5 g de miel en 9.0 mL de H₂O desionizada acidificada con HCl (pH 1.0), la muestra se homogenizó con un vórtex durante 1 min, evitando la formación de espuma. Después, se adicionó 1.0 mL de las soluciones de Carrez I y II, y se homogenizó manualmente. La mezcla se centrifugó a 20°C , 4,000 rpm durante 10 min; el sobrenadante se filtró con una membrana de 0.45 μm de tamaño de poro. La muestra filtrada se limpió utilizando una columna Supelclean LC-18, misma que se acondicionó con 5.0 mL de MeOH grado reactivo y 1.0 mL de solución acuosa de ácido acético al 0.1 % (v/v). Se aplicó a la fase estacionaria de la columna 1.0 mL de la muestra filtrada, seguido de 1.0 mL de agua con la finalidad de lavar la columna y eliminar algunas impurezas. El eluido para la cuantificación del HMF fue obtenido

con 1.0 mL de MeOH y se llevó a sequedad total en un rotavapor a 40°C. Finalmente, el extracto se resuspendió en H₂O grado masas hasta una concentración de 100 µg/mL y se filtró con una membrana de 0.20 µm de tamaño de poro.

Preparación del estándar. Para la construcción de la curva de calibración se preparó una solución patrón de 1.0 mg/mL de HMF, a partir de la cual se obtuvieron diluciones con 0.4 unidades de diferencia logarítmica (0.128, 0.32, 0.8, 2.0, 5.0, 12.5 y 31.25 µg/mL).

Instrumentación y condiciones de trabajo UHPLC-QToF

La cuantificación del HMF, se realizó en un equipo UPLC-QToF

Condiciones cromatográficas. Se empleó una columna UPLC HSS T3 C18, utilizando con las fases móviles A: agua al 0.1 % ácido acético, y B: acetonitrilo:isopropanol (8:2, v/v). El volumen de inyección fue de 2.0 µL con una velocidad de flujo de 0.3 mL/min. Todas las muestras fueron eluidas con un gradiente lineal de 0 a 4:00 min (97-60 % A), 4:01-4:50 min (60-97 % A) y 4:51 a 6:00 min (97 % A). La temperatura de la columna fue de 25°C y del automuestreador 20°C.

Condiciones QToF: El sistema MS fue operado en modo de ionización positiva (ESI+), modo de sensibilidad, temperatura de la fuente de ionización 100°C y temperatura de desolvatación de 500°C. Activado el gas de colisión (Ar) y nitrógeno como gas del cono, con un flujo del gas de desolvatación de 800 L/h. Se recopilaron los datos de espectrometría de masas desde 60-600 *m/z* en formato continuo 0.5 s. Se utilizó como estándar de referencia de masas leucina/encefalina ([M-H]⁺ = 556.2771). Los iones monitoreados para el HMF fueron: [M+H]⁺ (*m/z*= 127) y [M+H-H₂O]⁺ (*m/z*=109). La cuantificación se basó en la respuesta del ión *m/z* 109.

7.10.4 Otros parámetros

7.10.4.1 pH

Preparación de la muestra. Se preparó una solución de miel al 10 % (p/v), pesando 5.0 g de la muestra y disolviendo en 50 mL de AD. *Determinación.* Se utilizó un potenciómetro calibrado previamente (Islam et al., 2012).

7.10.4.2 Color

Determinación. Se utilizó el método establecido por Özcan y Ölmez (2014) con modificaciones. La medición del color se realizó con el sistema CIE L^* , a^* y b^* . Se utilizó una caja petri con aprox. 50 g de miel de apariencia homogénea y sellada con papel parafilm. La medición se realizó empleando un espectrofotómetro en modo de transmitancia óptica, con el programa ESY MATCH, utilizando el iluminante D65, un ángulo de 10° y un diámetro de observación de 1.25 cm. Los parámetros obtenidos fueron L^* [luminosidad, de 0 (negro) a 100 (blanco)], a^* [de rojo (+a) hasta verde (-a)], y b^* [de amarillo (+b) hasta el azul (-b)]. Además, se calcularon los parámetros de cromaticidad (C^*), del tono o matiz (h) y el cambio de color total (ΔE) con las siguientes ecuaciones:

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad \text{Ec. 11}$$

$$h = \arctan \frac{b^*}{a^*} \quad \text{Ec. 12}$$

$$\Delta E = [L^{*2} + a^{*2} + b^{*2}]^{1/2} \quad \text{Ec. 13}$$

7.11 Caracterización de la miel como *alimento funcional*

7.11.1 Obtención del extracto metanólico

A 0.1 g de miel se le adicionó 1.0 mL de MeOH grado reactivo para la extracción sólido-líquido, empleando un vórtex durante 1 min a temperatura ambiente. Luego se colocó en un baño ultrasónico a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 10 min, para después eliminar con centrifugación la cera y algunos sólidos presentes en la muestra a 12000 rpm, a 4°C durante 10 min. Después se pasó por una columna Supelclean LC-18, con el objetivo de concentrar la muestra como pretratamiento antes de su análisis, misma que se acondicionó previamente con 2.0 mL de MeOH y 2.0 mL de H_2O de acuerdo

a lo recomendado por el proveedor, luego se equilibró con 2.0 mL de H₂O. Posteriormente, se aplicó 1.0 mL del extracto a la fase estacionaria de la columna, el eluido se obtuvo con 2.0 mL de MeOH y se llevó a sequedad total en un rotavapor a 50°C. Finalmente, el extracto fue resuspendido en 1.0 mL de MeOH grado masas. A este extracto le fue determinada la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles totales, así como el perfil polifenólico.

7.11.2 Contenido de polifenoles totales (CPT) por el método de Folin-Ciocalteu

Curva de calibración de ácido gálico. Se prepararon soluciones de ácido gálico de 10, 30, 50, 70 y 90 µg/mL a partir de una solución patrón de 2.0 mg/mL. Se siguió la metodología reportada por López-Hernández (2017), para lo cual se tomaron 50 µL de cada dilución y se añadieron 3.0 mL de H₂O. Posteriormente, se adicionaron 250 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu 1.0 N y se homogenizó. La disolución se dejó reposar durante 5 min. Al término de dicho periodo, se agregaron 750 µL de Na₂CO₃ al 20 % y 950 µL de H₂O, la mezcla se homogenizó en un vórtex y se dejó en reposo durante 40 min. Se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-vis a 765 nm.

Cuantificación. Para la cuantificación de polifenoles totales de los extractos metanólicos se adicionaron 50 µL del extracto en lugar de la solución de ácido gálico y se siguió el procedimiento antes descrito.

7.11.3 Análisis del perfil polifenólico por UHPLC-QToF

Las condiciones que se establecieron en el presente trabajo de tesis para la identificación de los compuestos polifenólicos en la miel, se detallan a continuación.

Preparación de la muestra. El extracto metanólico obtenido en la sección 7.11.1 a una concentración de 3.0 mg/mL, se filtró por una membrana de nylon de tamaño de poro 0.20 µm y fue recuperado en un vial de vidrio de 2.0 mL. A 1.0 mL del filtrado se adicionó 1.0 µL de ácido fórmico, como estabilizador de iones, para tener una concentración final del 0.1 %. Además, se preparó una mezcla de todos los extractos analizados. Finalmente, las muestras se desgasificaron y homogeneizaron en un baño sonicador. Las corridas se realizaron por triplicado.

Instrumentación y condiciones de trabajo UHPLC-QToF.

Condiciones cromatográficas. Se empleó una columna UPLC HSS T3 C18, utilizando como fases móviles A: agua:ácido acético (99.9:0.1, v/v) y B: acetonitrilo (100 %), el volumen de inyección fue de 5.0 μ L con una velocidad de flujo de 0.2 mL/min. La elución se realizó con el gradiente lineal: de 0 a 30 min (97-3 % A), 30 a 35 min (3-97 % A), de 35 a 40 min (97 % A). La temperatura de la columna fue de 40°C y la del automuestreador 7.0°C.

Condiciones QToF: El sistema MS fue operado en modo de ionización negativa (ESI-) y modo de sensibilidad, temperatura de la fuente 100°C, y temperatura de desolvatación de 250°C. Activado el gas de colisión (Ar) y nitrógeno como gas del cono con un flujo del gas de desolvatación de 800 L/h. Los datos de espectrometría de masas se recopilaron desde 100-1200 m/z en formato continuo 0.5 s. Se utilizó como estándar de referencia de masas leucina/encefalina ($[M-H]^- = 554.2615$).

Identificación de compuestos polifenólicos. La identificación se realizó mediante el software Progenesis QI^R, específico para el análisis de datos de LC-MS, el cual permite la caracterización con precisión de los compuestos presentes en los extractos.

Se importaron al Progenesis QI^R cada uno de los cromatogramas para su alineamiento con la mezcla de extractos y se seleccionaron los aductos: $[M-H]$, $[M-2H]$ y $[M-H_2O-H]$ para la identificación. Los triplicados de las corridas fueron agrupados en bloques y mediante un ANOVA de una vía y se realizó una selección de las relaciones m/z identificadas con base en el tiempo de retención (t_R) a los cuales se presentaron los picos cromatográficos de los extractos analizados y se efectuó el análisis estadístico correspondiente. Con dichos resultados se realizó una selección de la m/z dependiendo de su abundancia normalizada y se generó un resumen de su asignación y monitoreo durante las 5 semanas de almacenamiento con el paquete estadístico EZinfo. Con dicha información se realizó la identificación de los compuestos en la base de datos METLIN para metabolómica, se efectuó la búsqueda en modo negativo y con un error de hasta 5 ppm. Una vez realizada la identificación de los posibles compuestos presentes en las dos muestras de miel,

los cuales fueron clasificados de acuerdo al tipo de polifenol y su fuente de origen, con las bases de datos: PubChem, ChemSpider ChEBI, 3DMET, Kegg Compounds, KNApSAcK y HMDB. Finalmente, con asesoría de la Sociedad Cooperativa de Apicultores de Huajuapán se realizó una selección de los compuestos presentes en cada muestra de miel dependiendo de su fuente floral.

7.11.4 Actividad antioxidante mediante método de DPPH'

Preparación de solución. Solución 0.1 mM de DPPH': se pesó 0.004 g de DPPH' y disolvió en MeOH grado reactivo aforando a 100 mL.

Determinación. Se adicionaron 50 μ L del extracto metanólico a 2.0 mL de la solución de DPPH' 0.1 mM, se homogenizó durante 1 min empleando un vórtex y se registró la absorbancia a 517 nm después de 30 min de reacción. Los resultados se reportaron como porcentaje de inhibición de la actividad antioxidante (López-Hernández, 2017).

$$\%Inhibición = \frac{(A_0 - A_A)}{A_0} * 100 \quad \text{Ec. 14}$$

Donde:

A_0 = La absorbancia después de 30 min en ausencia del antioxidante.

A_A = La absorbancia después de 30 min en presencia del antioxidante.

7.12 Estabilidad de la miel

Primero, se determinó el parámetro crítico de calidad de la miel de ambos orígenes. Utilizándolo en la evaluación de los modelos de cinética de reacción de orden cero, primer y segundo orden. A partir de la ecuación con el mejor ajuste (R^2) se determinaron las constantes de velocidad de reacción (k). Luego, de los parámetros de ajuste de la gráfica de Arrhenius se calculó la energía de activación (E_a). Además, se calculó el factor Q_{10} . Finalmente, con la ecuación ec. 15 se realizó el cálculo de θ a temperatura ambiente.

$$\ln C = \ln C_0 + k\theta \quad \text{Ec. 15}$$

Donde:

C= Concentración final

C₀= Concentración inicial

k= Constante de velocidad de reacción

θ= Tiempo de estabilidad

7.13 Análisis estadístico

Para los cálculos estadísticos se empleó el software STATISTICA, versión 10. Se realizó el análisis ANOVA factorial para determinar la diferencia estadísticamente significativa entre las distintas condiciones evaluadas. Además, se llevó a cabo la prueba de Duncan con un nivel de significancia del 95 % ($p < 0.05$) para los análisis múltiples de comparación de medias.

8. RESULTADOS Y DISCUSIONES

El presente apartado contiene los resultados y discusiones de la miel de Huajuapán de León (MH) y Putla Villa de Guerrero (MP), Oaxaca; almacenada a condiciones aceleradas y ambiente, precisados en las siguientes secciones: *i*) Caracterización de la miel, *ii*) Estabilidad respecto a parámetros de calidad, *ii*) Actividad antioxidante *in vitro* y *iii*) Perfil de polifenoles empleando UHPLC-QToF.

8.1 Caracterización de la miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero

Se presentan los valores obtenidos de cada uno de los parámetros evaluados (Tabla 2) para la miel recién extraída del panal (tiempo cero).

Tabla 2. Parámetros evaluados en la miel de dos municipios del estado de Oaxaca al tiempo cero.

Parámetro	Hujuapán de León	Putla Villa de Guerrero
% humedad (mg/100 mg _{miel})	18.93 ± 0.06 ^b	19.17 ± 0.06 ^a
Conductividad eléctrica (μS)	340.00 ± 0.00 ^a	193.00 ± 0.00 ^b
HMF (mg/kg _{miel})	7.87 ± 0.19 ^a	4.36 ± 0.44 ^b
Índice de diastasa (UD)	75.93 ± 1.35 ^b	112.71 ± 0.88 ^a
pH	3.87 ± 0.01 ^a	3.74 ± 0.03 ^b
Cambio de color total (ΔE)	107.99 ± 0.69 ^a	4.65 ± 0.01 ^b
CPT (mg EAG/100 g _{miel})	33.49 ± 3.19 ^a	35.48 ± 2.57 ^a
AA (% Inhibición)	11.83 ± 1.17 ^a	9.89 ± 0.76 ^b

Valores medios ± desviación estándar. HMF: hidroximetilfurfural; UD: unidades de diastasa; CPT: Contenido de Polifenoles Totales. EAG: Equivalentes de Ácido Gálico. AA: Actividad Antioxidante. Medias en la misma fila con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$; prueba de Duncan).

Como se puede observar, los parámetros de calidad: % de humedad, conductividad eléctrica, HMF e índice de diastasa, cumplen con lo especificado en la NMX-F-036-NORMEX-2006 y el CODEX STAT 12-198 (Tabla 1). El resto de los parámetros

evaluados se encuentran dentro de los valores reportados por otros autores (Habib et al., 2014a; Rios et al., 2014; Kamboj et al., 2013; Bertonec, Golob, Kropf y Korosec, 2011). Por otro lado, a excepción del CPT, todos los parámetros mostraron diferencia significativa ($p < 0.05$), debido tal vez a su origen relacionado con la floración, el clima, etc. (Habib et al., 2014b; Özcan y Ölmez, 2014; Perna, Simonetti, Intaglietta, Sofo y Gambacorta, 2012; Šarić et al., 2012).

Para la MP respecto a la MH, el % humedad e índice de diastasa fueron mayores 1.0 y 1.5 veces, respectivamente; la conductividad eléctrica así como la concentración de HMF (determinada mediante el método espectrofotométrico) fueron menores 1.7 y 1.8 veces, respectivamente. El cambio de color total para la MH (107.99 ± 0.69) fue aprox. 23 veces mayor en comparación con el de la MP (4.65 ± 0.01), observándose una coloración más clara en dicha miel (Figura 12). Lo anterior pudo ser consecuencia de la cristalización que presentó la miel de Putla por su almacenamiento a -20°C hasta su análisis, como ya fue señalado en la sección de metodología, lo que no se observó en la MH. Se ha reportado que la formación de cristales de glucosa (color blanco) le confiere a la miel una coloración más clara (Khalil, 2010). Finalmente, la MH registró mayor actividad antioxidante con respecto a la MP lo cual puede deberse al tipo y/o concentración de compuestos polifenólicos presentes en dicha miel.

8.2 Estabilidad de la miel

8.2.1 Pruebas aceleradas

8.2.1.1 Parámetros fisicoquímicos

En las Figuras 7 y 8 se muestran los gráficos correspondientes para cada parámetro fisicoquímico evaluado como parte del estudio de la estabilidad durante el almacenamiento de las mieles de Huajuapán y de Putla a 30, 40 y 50°C (70 % HR) durante 5 semanas. Los resultados del análisis estadístico entre temperaturas para ambos orígenes de la miel, así como por semana evaluada, se presentan en las Tablas A3-A10 (ANEXO IV).

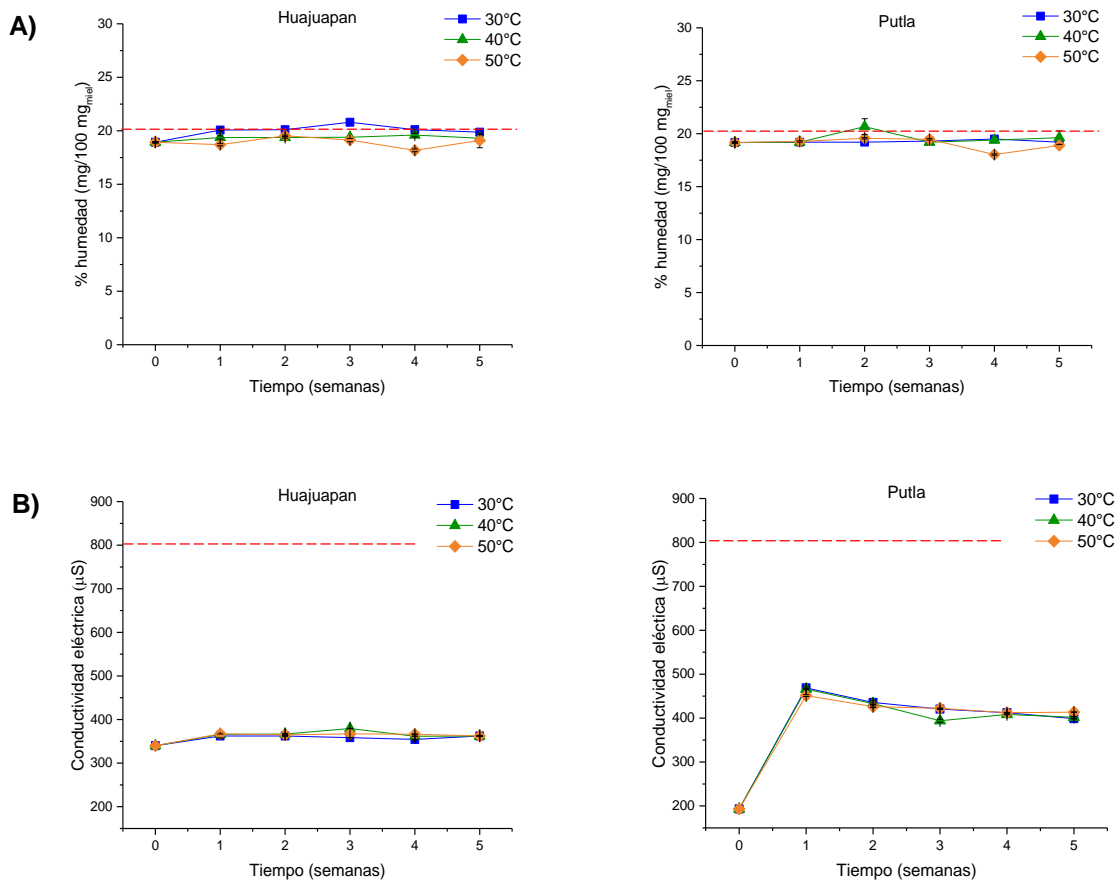


Figura 10. Parámetros de calidad evaluados en miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca. **A:** % humedad (mg/100 mg_{miel}) y **B:** Conductividad eléctrica (µS). La miel fue almacenada durante 5 semanas a 70 % HR y 30, 40 y 50°C. --- Límite máximo del valor establecido en NMX-F-036-1997. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

La MH a 30°C alcanzó valores de humedad por encima del 20 % y para la MP únicamente se observó en la semana 2 a 40°C (Figura 10). Primeramente, la diferencia en el comportamiento del % humedad que se observó entre las dos mieles a 30, 40 y 50°C, pudo deberse a su diferente origen botánico y las condiciones climáticas (Conti, Stripeikis, Campanella, Cucina y Tudino, 2007; Conti, 2000). Por otro lado, los valores de humedad de la MH a 30°C pueden estar relacionados con la cristalización que se presentó a ésta temperatura, debido a que se ha reportado que se puede originar por la mayor concentración de glucosa con respecto a la fructosa y también a su menor solubilidad que tiene dicho carbohidrato, lo que provoca la separación de agua y promueve la formación de pequeños

cristales que funcionan como núcleos iniciadores de una reacción en cadena (Escuredo, Dobre, Fernández-González y Seijo, 2014; Tornuk et al., 2013). Es importante mencionar que la cristalización de la miel no se observó a 40 y 50°C debido tal vez a la solubilización de los cristales a estas temperaturas (Khalil, 2010).

Respecto a la conductividad eléctrica, la MP tuvo variación muy marcada entre el tiempo cero y la semana 1 a las tres temperaturas evaluadas. Para la miel de ambos orígenes durante su almacenamiento, los valores registrados concuerdan con lo reportado por Qamer et al. (2013) para una miel de Nepal almacenada por 8 y 16 meses (240-640 μS y 290-710 μS , respectivamente). La CE de la miel está relacionada principalmente con el contenido de minerales como el potasio, el cual representa una tercera parte del contenido total (Yücel y Sultanoglu, 2013), así como del magnesio, calcio, hierro, fósforo, sodio, manganeso, yodo, zinc, cobalto, níquel y cadmio (Alqarni et al., 2012).

En la Figura 11, se muestran los resultados de pH y el cambio de color total. Los valores del pH fueron similares entre lugares de origen y temperaturas evaluadas; además, se encuentran dentro del intervalo de valores reportados (3.3-5.3) por varios autores para miel (Rio et al., 2014; Kamboj et al., 2013; Moniruzzaman et al., 2013). El pH de la miel se relaciona con su contenido de iones y ácidos orgánicos (Yücel y Sultanoglu, 2013), los cuales pudieron haber influido en la variación de la conductividad eléctrica registrada para las mieles de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero.

Para ambos orígenes, el cambio de color total (ΔE) se mantuvo constante a 40 y 50°C presentando una coloración ámbar ($\Delta E > 100$). Como ya se ha mencionado, el grado de oscurecimiento de la miel tienen una relación directamente proporcional con la temperatura, con largos períodos de almacenamiento, la proporción entre glucosa y fructosa así como a las reacciones de Maillard (Damodaran et al., 2010). En el caso de la MH a 30°C, ΔE disminuyó con respecto al tiempo de almacenamiento. Lo que concuerda con lo reportado por Costa et al. (2015) y Assil, Sterling y Sporns (1991), quienes observaron que por debajo de 40°C se promueve más la cristalización. La MP a la semana 1 registró un aumento en el ΔE (4.65 ± 0.01 -

69.32±2.70) debido tal vez a que adquirió un color más claro por su almacenamiento al que fue sometido previo a su análisis. Los tonos claros estuvieron asociados con la cristalización que presentó la miel.

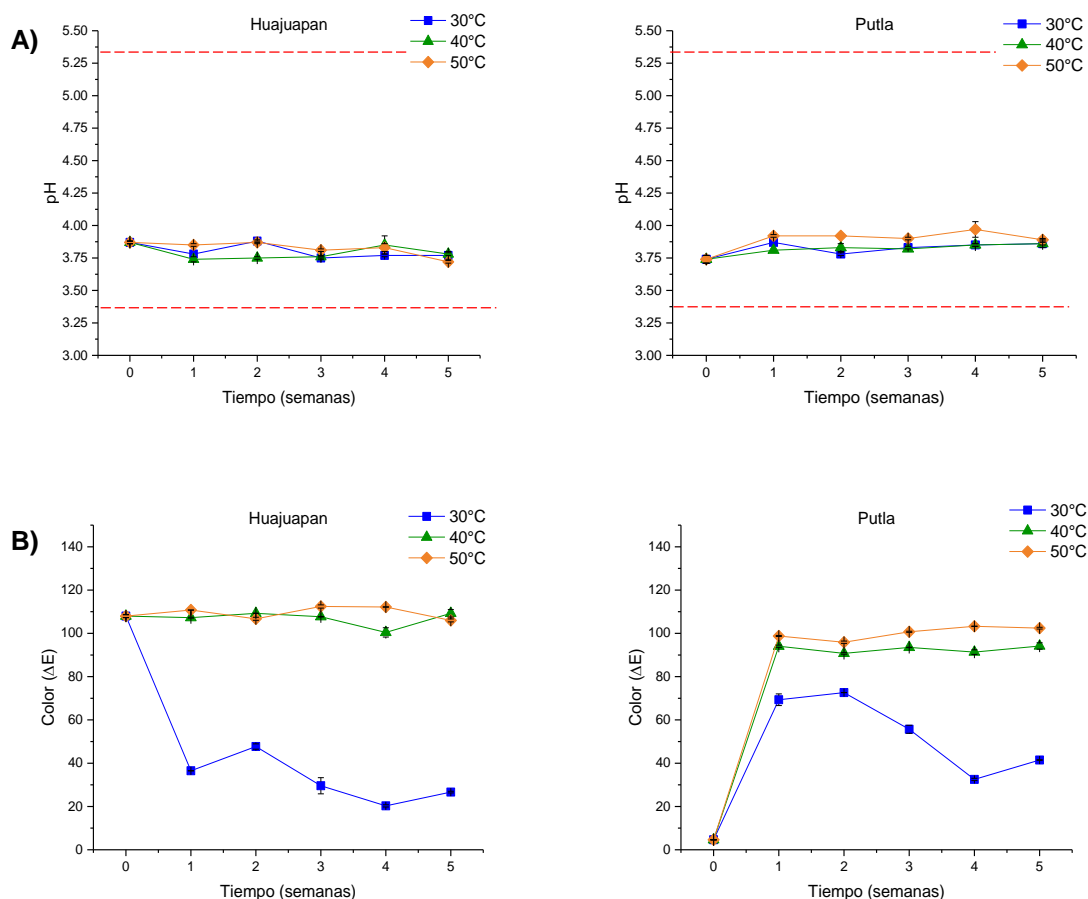


Figura 11. Parámetros de calidad no estipulados en NMX-F-036-NORMEX-2006, evaluados en miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca. **A:** pH y **B:** Cambios de color total (ΔE). La miel fue almacenada durante 5 semanas a 70 % HR y 30, 40 y 50°C. --- Límites máximo y mínimo. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

En la Figura 12 se muestra una escala propuesta en el presente trabajo de tesis, para el cambio de color total con base a los valores registrados para las mieles analizadas. El valor más bajo lo presentó la MP al t_0 . Por otro lado, valores de $\Delta E > 100$ y de aproximadamente 100, fueron para tonos más oscuros y ámbar, respectivamente.



Figura 12. Escala de ΔE para la miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca. ΔE : Cambio de color total.

En la Tabla 3, se enlistan valores de ΔE reportados para mieles de diferentes orígenes. Como puede observarse, el intervalo es muy amplio y varía dependiendo de la flora de la cual provienen los néctares y el polen para la producción de la miel.

Tabla 3. Valores de ΔE para miel de diferentes orígenes.

Origen de la miel	ΔE	Referencia
Eslovenia	33.34-85.44	Bertoncelj et al. (2011)
España	54.79 y 56.79	Kadar et al. (2011)
India	51.69 y 58.29	Kamboj et al. (2013)
Emiratos Árabes	7.76-52.96	Habib et al. (2014b)

Los valores de ΔE observados en la MH y MP, pueden atribuirse a los cambios en los compuestos con dobles enlaces conjugados como los polifenoles, flavonoides, terpenos y carotenoides (Brudzynski y Kim, 2011b). Deng, Yang, Capanoglu, Cao y Xiao (2018), refirieron que la glicosilación de compuestos polifenólicos, las reacciones de oscurecimiento enzimático y la copigmentación por puentes de hidrógeno entre grupos fenólicos y flavonoides, provocan cambios en el color de la miel. También pueden deberse a los productos de las reacciones de Maillard (Brudzynski y Kim, 2011a).

8.2.1.2 Parámetros de frescura

8.2.1.2.1 Índice de diastasa

En la Figura 13, se muestran los resultados del ID durante el almacenamiento por 5 semanas a 70 % HR, 30, 40 y 50°C. La Tabla A6 contiene los resultados del análisis estadístico de los valores de este parámetro (ANEXO IV).

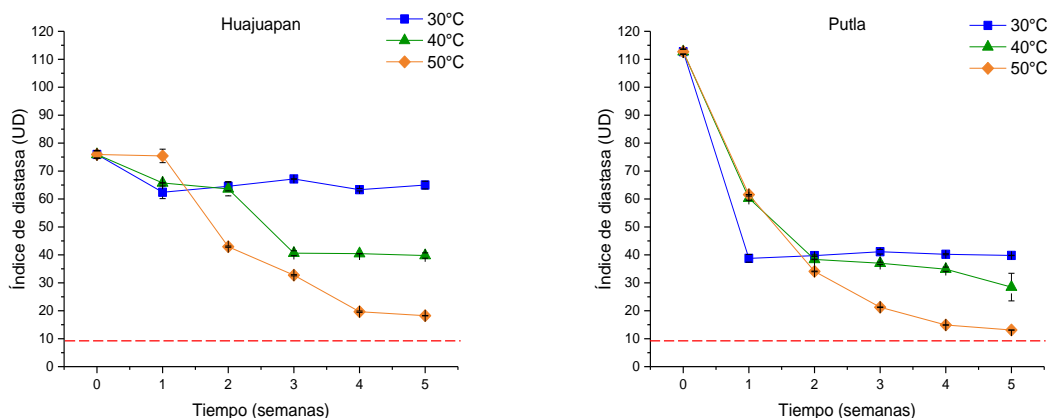


Figura 13. Índice de diastasa en miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca. UD: Unidad de diastasa, en la escala de Gothe se define como los mililitros de solución de almidón al 1.0% hidrolizados por gramo de miel por hora, a 40°C. --- Límite mínimo del valor establecido en la NMX-F-036-NORMEX-2006 y CODEX STAN 12-198. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Para ambos orígenes se observó una relación inversamente proporcional entre el ID y la temperatura, registrándose el valor menor a los 50°C, encontrándose cerca en los límites de calidad para este parámetro establecido en la NMX-F-036-NORMEX-2006 y CODEX STAN 12-198. La MP mostró el mayor decremento en el ID con respecto a la MH a la semana 1 a las tres temperaturas evaluadas.

Como ya se ha mencionado previamente, el ID puede variar con la edad de las abejas, los períodos tanto de recolección del néctar como del estado fisiológico de la colmena, el contenido de azúcares, el origen del néctar así como del polen (da Silva, 2016); también se ve afectada por la temperatura y el tiempo de almacenamiento. Se reportaron para mieles de Argentina valores de índice de

diastasa de 8.0-27.0 UD (Rios et al., 2014), mientras que aquellas provenientes de la India estuvieron entre 10.47 y 14.97 UD (Kamboj et al., 2013). da Silva et al. (2016) reportaron los siguientes valores de ID para mieles de diferentes procedencias: 10.55-12.40 UD (Brasil), 8.70-45.80 UD (España) y 6.05-19.10 UD (África). Lo anterior expone que las mieles en su mayoría cumplen con el límite mínimo establecido en norma (8.0 UD), al igual que las mieles analizadas en el presente trabajo.

8.2.1.2.2 Hidroximetilfurfural

1) Método de NMX-F-036-1997

En la Figura 14, se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación del HMF mediante el método de White referido en la NMX.

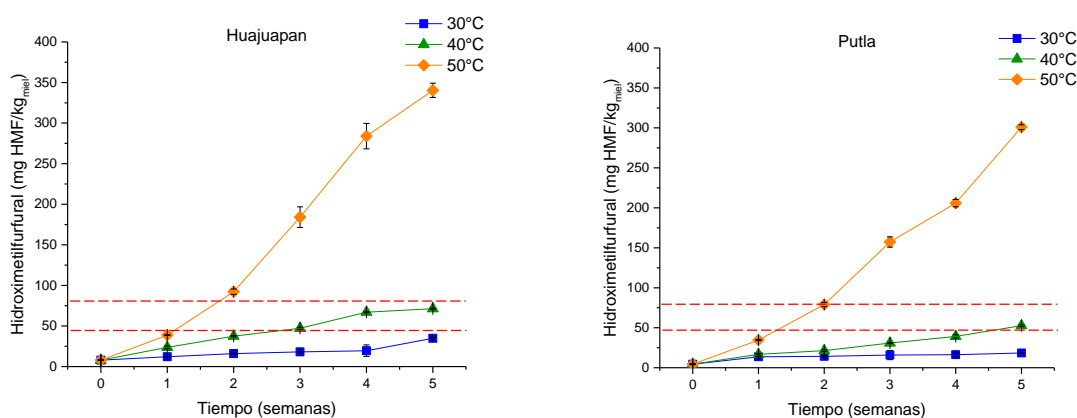


Figura 14. Hidroximetilfurfural en miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca. Valores medios \pm desviación estándar. Duncan, $p < 0.05$. --- Líneas de los límites máximos NMX-F-036-NORMEX-2006.

La concentración de HMF mostró un comportamiento similar en las muestras analizadas; a 30°C las concentraciones de HMF en las mieles de ambos orígenes permanecieron dentro de los límites establecidos en la norma, un incremento de 10°C propició en la MH que a partir de la semana 3 se registraran valores superiores a los 40 mg HMF/kg_{miel} (límite máximo para miel con menos de 6 meses de almacenamiento), mientras que para la MP únicamente el valor de la quinta semana excedió dicho límite. Por otro lado, la miel de ambos orígenes a partir de la semana

2 a 50°C excedieron el límite establecido para miel con más de 6 meses de almacenamiento (80 mg HMF/kg_{miel}), correspondiendo a la mayor concentración de HMF. Estos resultados concuerdan con lo reportado para productos como: jugos de frutas, mermeladas, puré de tomate, comida para bebés, cereales de desayuno, leche, café, etc. (Shapla et al., 2018; Kowalski, Lukasiwicz, Duda-Chodak y Zięc, 2013). La concentración HMF fue directamente proporcional al incremento de la temperatura y al tiempo de almacenamiento, debido a que el HMF es un producto de la reacción de Maillard la cual es catalizada por altas temperaturas. Sin embargo, se ha demostrado que otros factores como el perfil de azúcares, el contenido de ácidos orgánicos, el % humedad y la fuente floral pueden influir en el aumento de la concentración de HMF en la miel (Gianelli et al., 2010).

2) UHPLC-QToF

En la Figura 15 se muestran los cromatogramas correspondientes a diferentes concentraciones del estándar del HMF: 0.128, 0.32, 0.8, 2.0, 5.0, 12.5, y 31.25 µg/mL, observándose un incremento en la señal directamente proporcional a su concentración, con un t_R de 2.13-2.14 min. Las concentraciones del HMF en las muestras se calcularon empleando la ecuación de ajuste polinomial: $y = -6.96168x^2 + 427.631x + 46.0275$, $R^2 = 0.990041$ (ANEXO VI).

En el espectro de masas que se generó a partir del pico cromatográfico analizado (Figura 16), se observaron dos señales de mayor porcentaje de intensidad con una m/z de 127.0414 y 109.0304, que corresponden a los aductos $[M+H]^+$ y $[M+H-H_2O]^+$, de la molécula de HMF ($C_6H_6O_3$) con masa molar 126.0273 g/mol. El ión 109 fue el que mostró mayor estabilidad, este hecho ya fue reportado para dicho compuesto empleando una fuente de ionización APCI (Teixidó et al., 2008; Gökmen y Senyuva, 2006). Por lo tanto, se puede considerar la selectividad y estabilidad de éste ión porque no se ve afectado por el uso de diferentes fuentes de ionización. Con base a lo anterior, en los picos cromatográficos correspondientes al HMF tanto en el estándar como en la muestra de miel, se identificó la $m/z=109$ para su cuantificación (Figura 16). Es importante resaltar que es la primera vez que se reporta el análisis del HMF durante el almacenamiento de la miel por UHPLC-QToF.

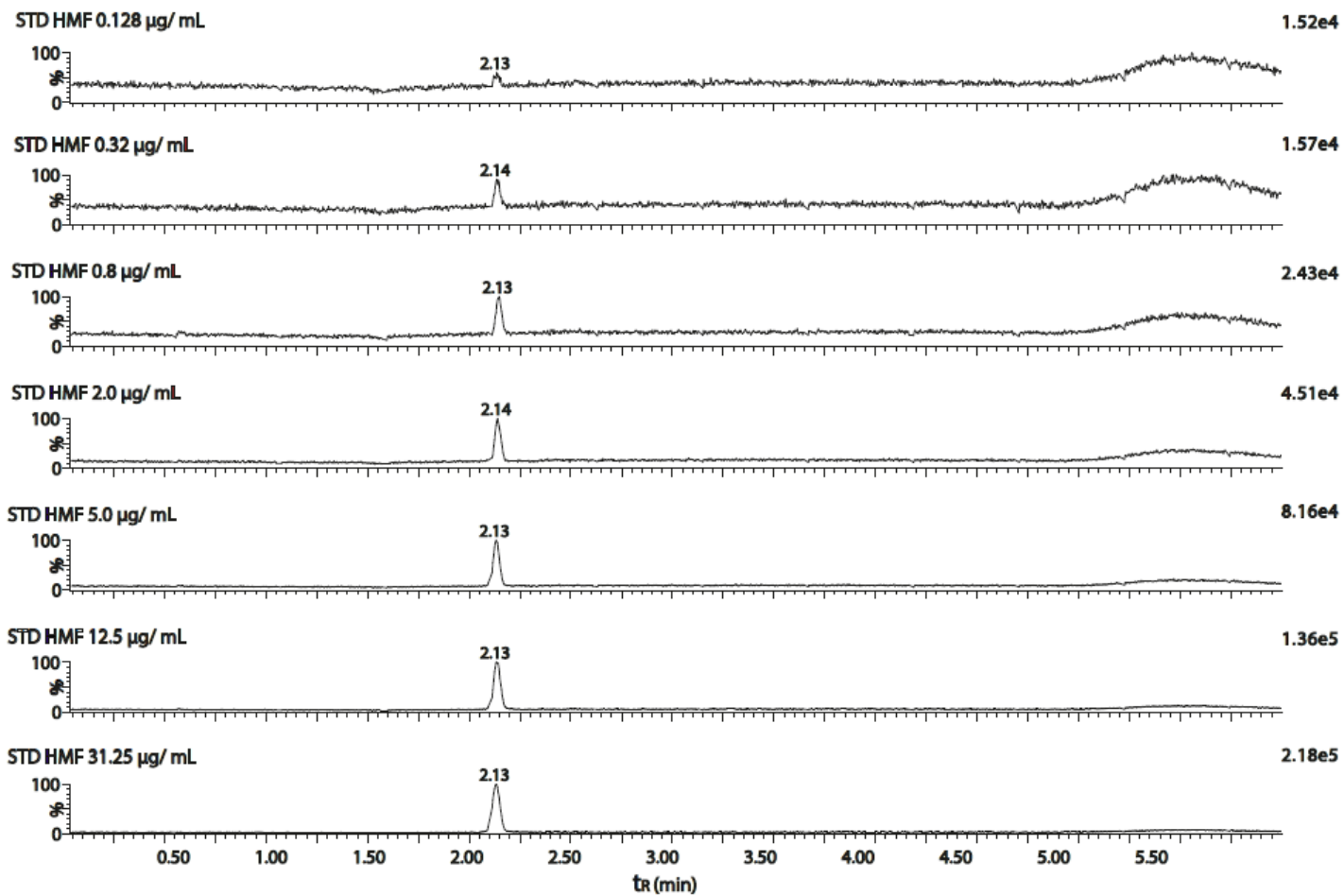


Figura 15. Cromatogramas del estándar de hidroximetilfurfural (HMF), empleando un UPLC-QToF, columna Acquity UPLC HSS T3 C18 a 25°C, ionización ESI (+), flujo de 0.3 mL/min, fase móvil: A: agua:ácido acético (99.9:0.1, v/v) y B: acetonitrilo:isopropanol (8:2, v/v). Se utilizó N₂ como gas acarreador y activado el gas de colisión (Ar).

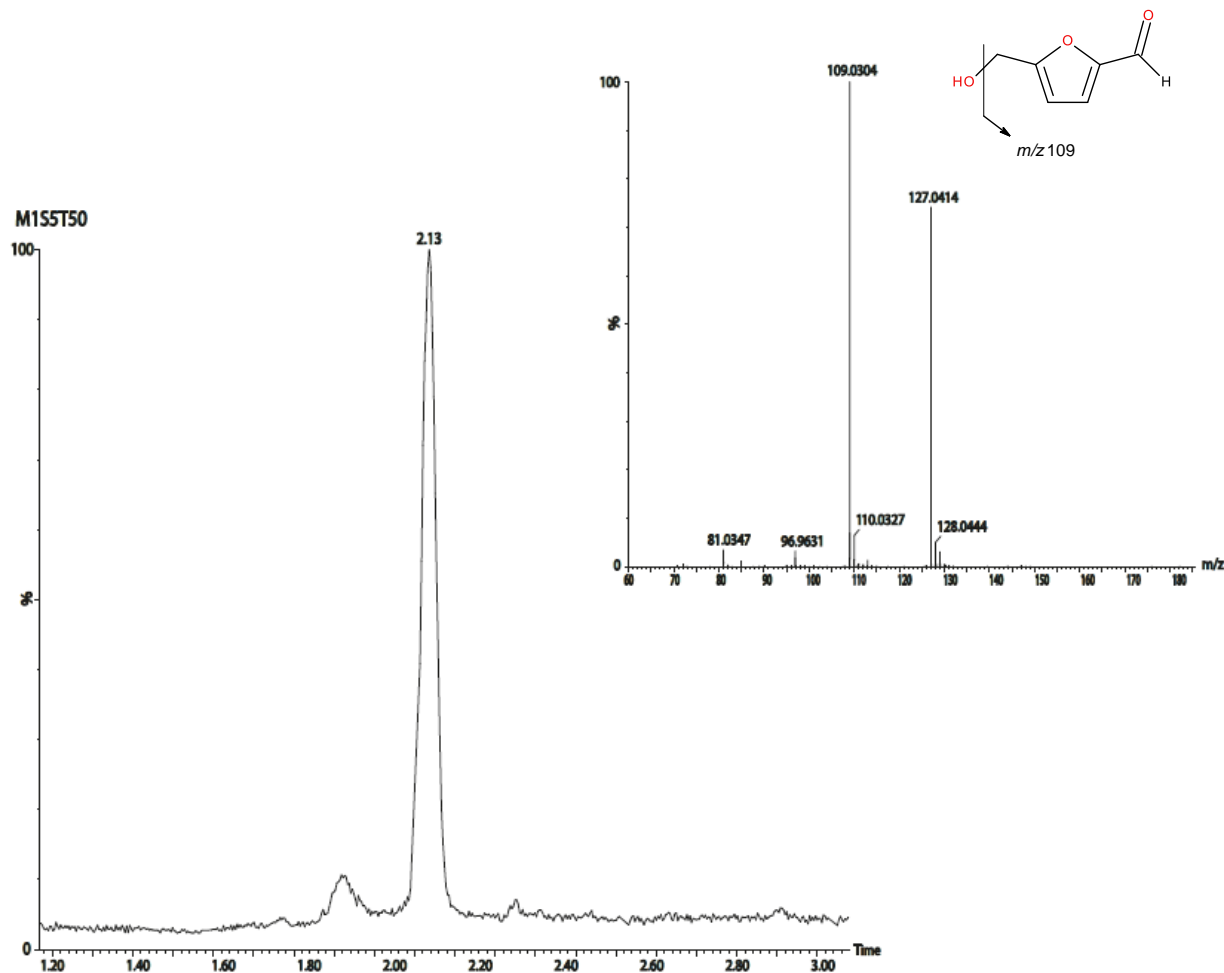


Figura 16. Cromatograma para la identificación de la m/z del hidroximetilfurfural (HMF) en miel de Huajuapán de León, Oaxaca, almacenada a 50°C y 70 % HR. En el inserto se muestra el espectro de masas donde se observa la m/z 109.0304 característico del HMF. Se utilizó un UHPLC-QToF, ionización ESI (+), flujo de 0.3 mL/min, fases móviles A: agua:ácido acético (99.9:0.1, v/v) y B: acetonitrilo:isopropanol (8:2, v/v). Columna Acquity UPLC HSS T3 C18, a 25°C. Se utilizó N₂ como gas acarreador y activado el gas de colisión (Ar).

A partir del análisis realizado para la MH se observó que el porcentaje de intensidad del ión m/z 109 se incrementó proporcionalmente con respecto al tiempo de almacenamiento y temperatura, sin embargo, este comportamiento no fue registrado para la MP la cual no mostró una tendencia definida. Diversos autores mencionan que el HMF es el principal producto de degradación de la fructosa y glucosa (da Silva et al., 2016; Fauzi y Farid, 20015; Khalil et al., 2010). Con base en lo anterior, la diferencia observada puede deberse al origen de la miel estudiada, respecto a la composición y concentración de dichos azúcares (Habib et al., 2014b).

Los resultados de la cuantificación de HMF en la miel de Huajuapán de León por éste método (Tabla 4) mostró un comportamiento similar con aquellos determinados con el método de la NMX.

Tabla 4. Concentración de hidroximetilfurfural ($\text{mg}/\text{kg}_{\text{miel}}$) para la miel de Huajuapán de León cuantificada por UHPLC-QToF.

Semana	30 °C	40°C	50°C
0	$2.67 \pm 0.12^{\text{aF}}$	$2.67 \pm 0.12^{\text{aE}}$	$2.67 \pm 0.12^{\text{aF}}$
1	$4.40 \pm 0.00^{\text{cE}}$	$6.40 \pm 0.20^{\text{bD}}$	$8.67 \pm 0.23^{\text{aE}}$
2	$5.80 \pm 0.00^{\text{cD}}$	$8.00 \pm 0.20^{\text{bC}}$	$17.71 \pm 0.23^{\text{aD}}$
3	$6.79 \pm 0.20^{\text{cB}}$	$9.53 \pm 0.12^{\text{bB}}$	$28.06 \pm 0.64^{\text{aC}}$
4	$6.19 \pm 0.00^{\text{cC}}$	$13.06 \pm 0.12^{\text{bA}}$	$31.32 \pm 0.42^{\text{aB}}$
5	$8.92 \pm 0.16^{\text{cA}}$	$13.05 \pm 0.12^{\text{bA}}$	$39.51 \pm 0.31^{\text{aA}}$

Valores medios \pm desviación estándar

^{a-c} Medias en la misma fila con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$; prueba de Duncan).

^{A,F} Medias en la misma columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$; prueba de Duncan).

Todas las concentraciones se encontraron por debajo del límite máximo establecido en la NMX ($40 \text{ mg}/\text{kg}_{\text{miel}}$) para mieles con menos de 6 meses de almacenamiento. Zappalà et al. (2005), no lograron cuantificar por HPLC al HMF en miel de eucalipto, probablemente porque la afinidad de su columna es menor o debido a que este método es menos sensible que la UHPLC-MS.

La comparación de los dos métodos utilizados para la cuantificación de HMF en el presente trabajo, mostró que las concentraciones fueron diez veces menores por UHPLC-QToF con respecto a los del método espectrofotométrico. Lo anterior puede atribuirse a los componentes fundamentales de cada equipo utilizado; en el

caso del espectrómetro de masas son la fuente de ionización, el analizador y el detector; en el espectrofotómetro UV-vis son: fuente de luz, colimador, monocromador, selector de longitud de onda y detector fotoeléctrico. En conclusión, el método UHPLC-MS representa una alternativa para cuantificar con mayor selectividad y precisión (Gökmen y Senyuva, 2006) al HMF en miel como parámetro de calidad durante su almacenamiento, requiriéndose menor cantidad de muestra y tiempo de análisis.

8.2.2 Pruebas a condiciones ambiente

8.2.2.1 Parámetros fisicoquímicos

En la Figura 17 se muestran los gráficos comparativos de MH y MP almacenadas a condiciones ambiente ($22.12 \pm 1.75^\circ\text{C}$ y $63.00 \pm 7.61\%$ HR), de la ciudad de Huajuapán de León, Oaxaca. El resultado del análisis estadístico de los datos obtenidos se presentan en la Tabla A11 del ANEXO V.

Las mieles presentaron un comportamiento similar en todos los parámetros fisicoquímicos evaluados a excepción del ΔE , registrando valores menores para la MH, lo cual puede estar relacionado con un mayor grado de cristalización por su composición, como ya fue mencionado. A la semana 32 de almacenamiento se registraron valores de 19.6 ± 10 y 20.00 ± 0.06 para el % humedad para la MH y la MP, respectivamente; cumpliendo lo establecido en NMX para dicho parámetro. Rios et al. (2014) reportaron para mieles argentinas una variación de humedad de 15.4-19.8 %, mientras que para mieles de Eslovenia fue 13.5-18.5 % (Bertoncelj et al., 2011). Dichos valores se encuentran por debajo de los resultados obtenidos en el presente trabajo. Sin embargo, no es el caso para los valores de mieles de Grecia (20.49 %), Brasil (20.50 %) e India (21.60 %) (da Silva et al., 2016). A partir de la semana 4, la CE de la miel de ambos orígenes mostró valores de 400 μS aprox., por debajo del límite máximo señalado. Además, el pH se mantuvo dentro del intervalo reportado para mieles.

Comparando los resultados de estos parámetros fisicoquímicos con respecto a los obtenidos a 30°C del almacenamiento en condiciones aceleradas de la miel, el color fue el parámetro que presentó mayor cambio; el ΔE fue 3.2 y 7.5 veces menor para

MH y MP, respectivamente. Brudzynski y Kim (2011), observaron cambios significativos de color ($p < 0.0025$) después de dos años de almacenamiento de muestras de miel a temperatura ambiente y en ausencia de luz, dichos cambios los relacionan con la presencia de melanoidinas como las causantes del oscurecimiento no enzimático durante el almacenamiento o calentamiento.

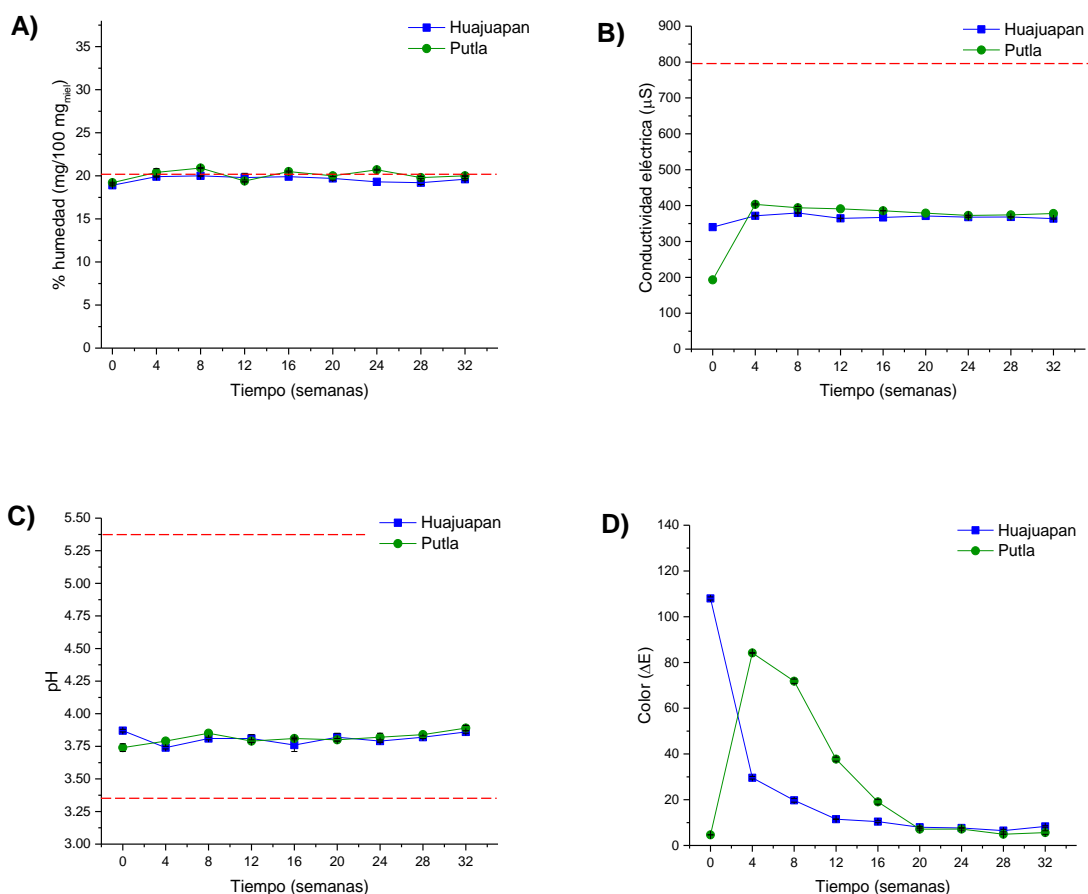


Figura 17. Parámetros fisicoquímicos de calidad indicados en la NMX. Se realizaron para la miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca. **A:** % humedad (mg/100 mg_{miel}), **B:** Conductividad eléctrica (μS), **C:** pH, **D:** Cambio de color total (ΔE). La miel fue almacenada durante 32 semanas a condiciones ambiente (63.00±7.61 % HR y 22.12±1.75°C). Todos los análisis se realizaron por triplicado. --- Líneas de los límites máximo y mínimo.

8.2.2.2 Parámetros fisicoquímicos de frescura

En la Figura 18, se muestran los gráficos correspondientes a la evaluación de la concentración del HMF e índice de diastasa para la miel de ambos orígenes almacenada a $22.12 \pm 1.75^\circ\text{C}$ y $63.00 \pm 7.61\%$ HR.

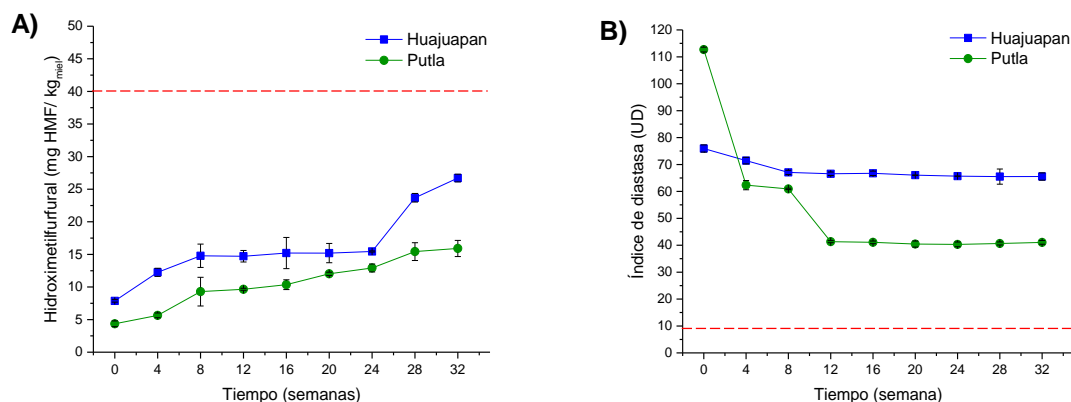


Figura 18. Parámetros de frescura de miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca. **A:** Hidroximetilfurfural (mg HMF/kg_{miel}). **B:** Índice de diastasa (UD). La miel fue almacenada durante 32 semanas a condiciones ambiente ($63.00 \pm 7.61\%$ HR y $22.12 \pm 1.75^\circ\text{C}$). --- Límite mínimo del valor establecido en la NMX-F-036-1997. Todos los análisis se realizaron por triplicado. UD: Unidad de diastasa, en la escala de Gothe se define como los mililitros de solución de almidón al 1.0% hidrolizados por gramo de miel por hora, a 40°C .

Al final de la semana 32 de almacenamiento los dos parámetros de frescura para la miel de ambos orígenes estuvieron dentro de los límites establecidos en norma. La concentración de HMF presentó una tendencia de aumento en las dos mieles, la MH registró mayor concentración con respecto a la MP. En cuanto al ID se observó un comportamiento constante a partir de la semana 12, siendo la MP la que presentó mayor disminución.

Khalil et al. (2010) reportaron para mieles de Malasia almacenadas por seis meses concentraciones de HMF entre 2.80-24.87 mg/kg_{miel}. Sin embargo, Qamer et al. (2013) observaron (con un método espectrofotométrico) un aumento de HMF de 0.6 veces (53.42 mg/kg_{miel}) durante los primeros 8 meses de su almacenamiento y de 10.6 veces (621.28 mg/kg_{miel}) a los 16 meses. Para MH y MP hubo un aumento de 3.4 y 3.7 veces respectivamente, a las 32 semanas (8 meses), lo que indica una

mayor velocidad de formación del HMF en las mieles del presente estudio. Por último, MH y MP tuvieron una concentración de HMF de 41.14 ± 0.50 y 26.21 ± 0.49 mg HMF/kg_{miel}, respectivamente, a la semana 56 (14 meses), encontrándose dentro del límite (80 mg HMF/kg_{miel}) para mieles de más de 6 meses de almacenamiento.

8.2.3 Estimación del tiempo de estabilidad

La estabilidad de la miel de ambos orígenes se estimó con los resultados obtenidos para la concentración del HMF por el método espectrofotométrico, debido a que fue el parámetro crítico a las condiciones aceleradas.

Tabla 5. Cinética de formación de hidroximetilfurfural (HMF) en mieles de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca.

	<i>k</i> (mg/kg·semana)	Ecuación lineal	R ²
Huajuapán			
30°C	2.9	HMF= 0.0029x+0.0088	0.9534
40°C	13.1	HMF= 0.0131x+0.0097	0.9838
50°C	71.1	HMF= 0.0711x-0.02	0.9746
Putla			
30°C	2.9	HMF=0.0029x+0.0051	0.9512
40°C	9.1	HMF=0.0091x+0.0047	0.9853
50°C	59.3	HMF=0.0593x-0.0179	0.9731

HMF: Hidroximetilfurfural. *k*: constante de velocidad de reacción. Valores de *k* calculados utilizando los valores obtenidos de 0-5 semanas a 30, 40 y 50 °C a 70 % HR. Las ecuaciones y R² se calcularon mediante el programa OriginPro 2016.

El mejor ajuste en una ecuación de orden cero se tuvo a 40°C siendo la R² de 0.9838 (MH) y 0.9853 (MP). Por otro lado, la *k* de reacción para la formación del HMF en la miel de ambos orígenes mostró un incremento con respecto a la temperatura, presentándose el mayor valor a 50°C tanto para la MH (71.1 mg/kg·semana) como para la MP (59.3 mg/kg·semana). Fueron mayores 24.5 (MH) y 20.4 (MP) veces, respectivamente, en comparación a los obtenidos a 30°C. Este incremento en *k* también fue reportado por Fallico et al. (2009) quienes determinaron para una miel multifloral de Italia almacenada a 50°C una *k* de 36.54 mg/kg·semana y de 0.438 mg/kg·semana para miel almacenada a temperatura ambiente. Dichos valores se encuentran por debajo de lo reportado para la MH y MP a 50°C.

La E_a y Q_{10} para la miel de ambos orígenes se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 6. Energía de activación (E_a) y factor Q_{10} para mieles de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca.

	E_a (kcal/mol)	Q_{10} 30-40°C	Q_{10} 40-50°C
Huajuapán	31.11	4.52	5.43
Putla	29.29	3.14	6.52

Se observó que el valor menor de E_a fue para la MP, lo que implica que la producción del HMF es mayor en comparación con la MH. Comparando con la miel multifloral Italiana que presentó una E_a de 11.3 kcal/mol (Fallico et al., 2009) fue menor que las reportadas en el presente trabajo, lo que indica que la reacción del HMF se efectúa con mayor facilidad en dicha miel.

El Q_{10} para la miel de ambos orígenes incrementó con el aumento en las temperaturas evaluadas. La MP presentó el valor mayor de Q_{10} lo que implica un incremento de 6.52 veces la concentración del HMF al incrementar de 40 a 50°C la temperatura de almacenamiento.

El cálculo del tiempo de estabilidad de las muestras de miel mostró que la MH es 2.02 veces más estable con respecto a la MP (Tabla 7). Estos resultados se encuentran por arriba de lo reportado por Fallico et al. (2009) quienes estimaron un máximo de 17, 16.2 y 26 meses de estabilidad para miel de cítricos, eucalipto y multifloral, respectivamente.

Tabla 7. Evaluación del tiempo de estabilidad para mieles de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca.

Origen	Años
Huajuapán	6.4
Putla	12.9

8.3 Estabilidad de la miel como *alimento funcional*

8.3.1 Pruebas aceleradas

Los resultados del contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante durante el almacenamiento de las muestras de miel, se muestran en la Figura 19.

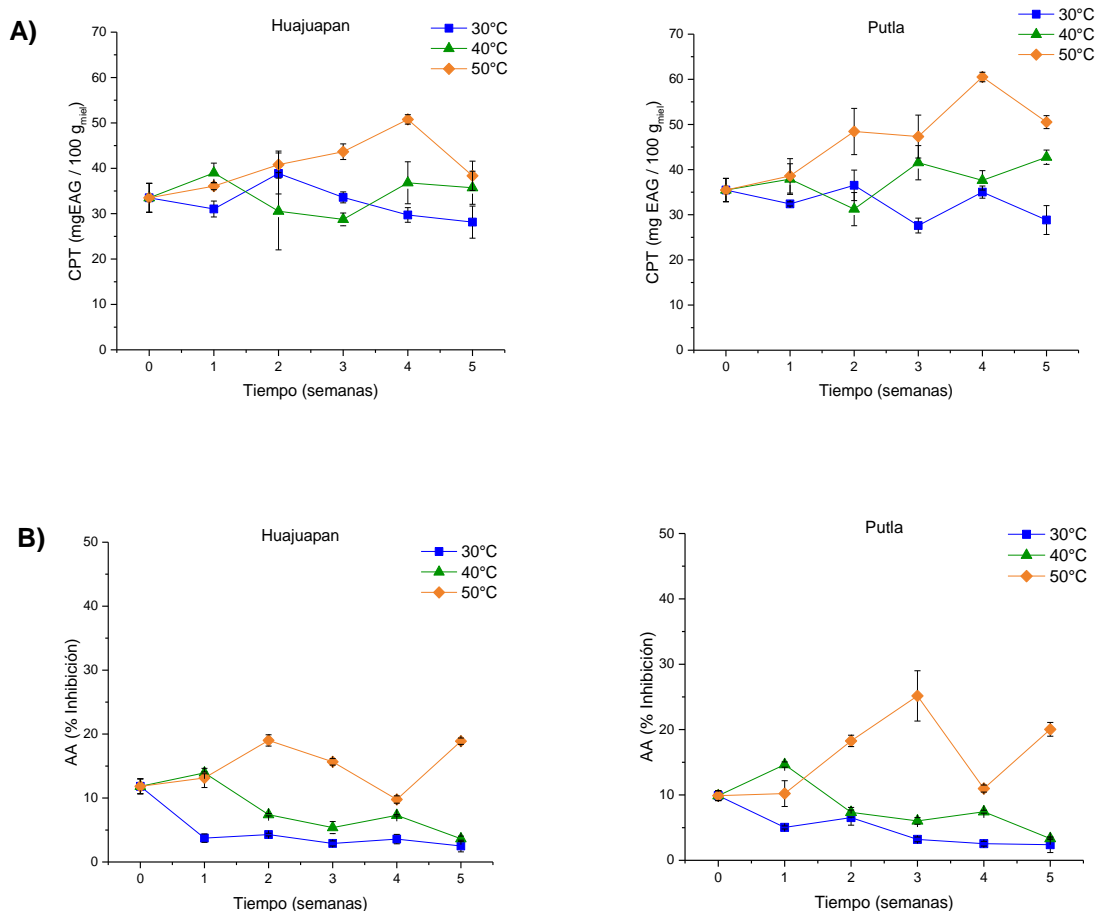


Figura 19. Contenido de Polifenoles Totales y Actividad Antioxidante. Se realizaron en miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca. **A:** CPT (mg EAG/100 g_{miel}). **B:** AA (% inhibición). La miel fue almacenada durante 5 semanas a 70 % HR y 30, 40 y 50°C. Todos los análisis se realizaron por triplicado. CPT: Contenido de Polifenoles totales. AA: Actividad Antioxidante.

El CPT para los dos orígenes se mantuvo por arriba de los 25 mg EAG/100 g_{miel} hasta las 5 semanas de almacenamiento, registrándose en ambas muestras la mayor variación a los 50°C. Con base a esta observación, se realizó un análisis de

su perfil polifenólico mediante UHPLC-MS, cuyos resultados se presentan en el apartado 8.4.

A la fecha no se han establecido límites para el CPT en miel y existen diferencias entre los valores reportados. Por ejemplo, Flanjak, Kenjeric, Bubalo y Primorac (2016) obtuvieron valores de 2.82 a 58.8 mg EAG/100 g_{miel} para miel de Croacia; dentro de este intervalo se encuentra el CPT de mieles italianas 38.9 y 12.06 mg EAG/100 g_{miel} reportados por Petretto, Cossu y Alamanni (2014) y por Perna et al. (2012), respectivamente. El CPT para mieles de China tiene valores entre 79.4 y 232.7 mg EAG/100g_{miel} (Tahir, Xiaobo, Zhihua y Yaodi, 2015). El CPT en la MH fue entre 28.14 y 50.77 mg EAG/100g_{miel}, y para la MP fue de 27.61-60.52 mg EAG/100g_{miel}; ambas muestras mantuvieron valores por encima de lo reportado para mieles de Italia al final de su almacenamiento.

Con respecto a la AA (Figura 19B), las mieles almacenadas a 30 y 40°C mostraron una disminución con respecto al tiempo de almacenamiento. A los 50°C se observó un comportamiento irregular pero se registraron los valores mayores para AA a la semana 5, siendo aproximadamente el doble con respecto al t_0 . Perna et al. (2012) reportaron valores de AA de 54.29-78.73 % inhibición para mieles de Italia, mayores a las obtenidas en el presente trabajo, debido tal vez a la composición por su origen. Se ha reportado que el porcentaje de inhibición se puede afectar por la inestabilización de los propios antioxidantes a temperaturas altas debida a la reactividad de los iones metálicos, así como de las velocidades de reacción redox (Kamal y Appelvist, 1996).

La actividad antioxidante puede verse incrementada por la formación de melanoidinas que son productos de la etapa final de la reacción de Maillard (Brudzynski y Miotto, 2011a), y tienen la propiedad de captar radicales libres así como de quelar metales, lo que les confiere un poder antioxidante (Wang et al., 2011). Lo anterior puede ser una posible explicación a los resultados obtenidos de AA para la miel de ambos orígenes a 50°C. Es importante resaltar que es la primera vez que se reporta el CPT así como la AA como parte de la evaluación de la estabilidad de la miel a diferentes temperaturas de almacenamiento.

Por otra parte, los factores que más influyen en la estabilidad de los polifenoles son: pH, temperatura, presencia de iones metálicos y enzimas. Además, la variación en su concentración de polifenoles y actividad biológica durante el almacenamiento, puede estar relacionada con los cambios de estabilidad de dichos compuestos mediante diferentes mecanismos como la epimerización y reacciones de autooxidación (Deng et al., 2018).

8.3.2 Pruebas a condiciones ambiente

En la Figura 20, se observan los gráficos correspondientes a la evaluación de los parámetros de concentración de polifenoles totales y actividad antioxidante para la miel de ambos orígenes almacenada a $22.12 \pm 1.75^\circ\text{C}$ y $63.00 \pm 7.61\%$ HR.

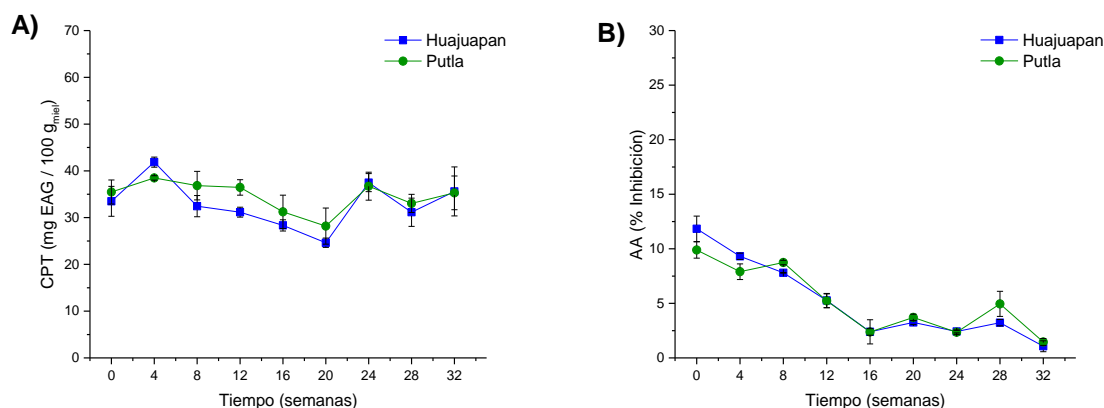


Figura 20. Contenido de Polifenoles Totales y Actividad Antioxidante de miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca. **A:** Contenido de Polifenoles Totales (mg EAG/100 g_{miel}). **B:** Actividad Antioxidante (% inhibición). CPT: Contenido de polifenoles totales. AA: Actividad Antioxidante. La miel fue almacenada durante 32 semanas a $63.00 \pm 7.61\%$ HR y $22.12 \pm 1.75^\circ\text{C}$. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Ambas muestras de miel mostraron tendencias similares para los parámetros evaluados con respecto al tiempo. En la semana 4, el CPT fue mayor para MH con respecto a la MP (41.87 ± 1.08 y 38.49 ± 0.47 mg EAG/100 g_{miel}, respectivamente) y menor hasta la semana 20. Durante todo el tiempo de almacenamiento el CPT de la MH y la MP permaneció en el intervalo de 24.63 ± 1.00 y 41.87 ± 1.08 mg EAG/100 g_{miel}, coincidiendo con lo observado para las mieles almacenadas a 30 y 40°C .

Bohn (2014) reportó que el consumo *per cápita* de polifenoles en algunos países es: 0.4-1.2 g/día (Finlandia), 1.0-1.1 g/día (Estados Unidos) y 0.8-1.6 g/día (Polonia). Basando únicamente la ingesta de polifenoles a la miel, se debería consumir aproximadamente 600 g/día tomando en cuenta el contenido de polifenoles calculado en el presente trabajo.

La AA presentó una disminución de 11 y 7 veces aproximadamente para MH y MP respectivamente, durante las 32 semanas de almacenamiento con respecto al tiempo cero, llegando a un % de inhibición de 1.07 ± 0.50 (MH) y 1.46 ± 0.31 (MP). Este comportamiento también se observó para las mieles almacenadas a 30 y 40°C.

Šarić et al. (2012), observaron una disminución tanto en el CPT como en la AA de miel almacenada a condiciones ambiente (no especificadas) por 6 y 12 meses. La disminución en el CPT fue de 8.8 veces a los 12 meses (22.89 ± 4.50 mg EAG/kg_{miel}), menor a lo reportado en el presente trabajo; la AA también disminuyó 1.4 veces a los 12 meses.

8.4 Perfil polifenólico durante el almacenamiento a 50°C

En la Figura 21, se presenta el comparativo de los cromatogramas de los extractos metanólico de la miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, almacenadas a 50°C de las condiciones aceleradas.

Se observaron picos cromatográficos a diferentes t_R (1.21, 7.85, 9.19, 9.97, 27.90 y 29.44 min), encontrándose similitud para la mayoría de las señales entre las dos mieles analizadas pero de diferente intensidad, lo que puede sugerir que tienen una composición similar pero difieren en cuanto a su concentración.

A partir del perfil de abundancia estandarizada (Figura 22) se determinó la presencia o ausencia de compuestos polifenólicos en las mieles de Huajuapán y Putla, en cada una de las cinco semanas de almacenamiento evaluadas a 50°C y 70 % HR. Por ejemplo, en la MP la apigenina-7-ramnósido-4'-rutinósido únicamente se identificó al tiempo cero (Figura 22). En el ANEXO VII se enlistan los compuestos identificados en la MP y MH almacenadas a 50°C y 70 % HR durante cinco semanas.

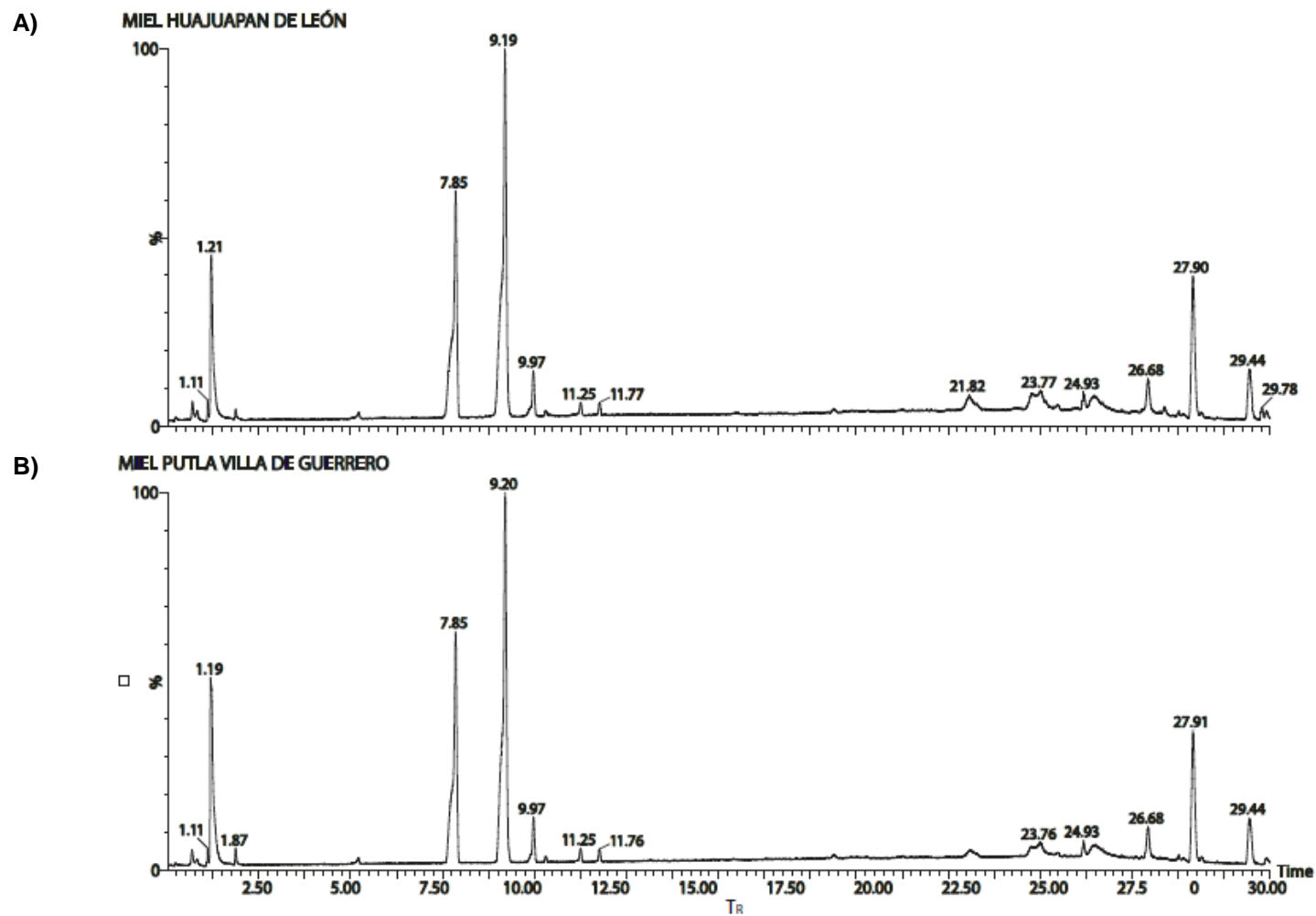


Figura 21. Cromatogramas de los extractos metanólicos de miel de A) Huajuapán de León y B) Putla Villa de Guerrero, Oaxaca. Adquiridos por UHPLC-QToF, ionización ESI (-), flujo de 0.2 mL/min, fase móvil A: agua:ácido acético (99.9:0.1, v/v) y B: acetonitrilo (100 %)

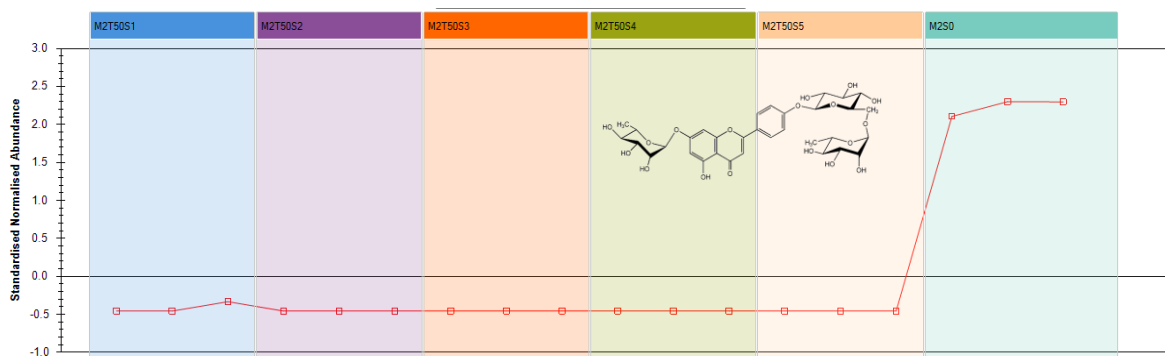


Figura 22. Perfil de abundancia estandarizada de la apigenina-7-ramnósido-4'rutinósido. Identificado en el extracto metanólico de miel de Putla Villa de Guerrero, Oaxaca, almacenada a 50°C y 70 % HR. Obtenido mediante el software Progenesis QIR.

En el presente trabajo, se identificarán 72 polifenoles: 20 en ambas muestras, 22 y 30 únicamente en MH y MP, respectivamente; los cuales no han sido reportados para miel. La mayoría de estos compuestos se encuentran en forma de glicósidos, lo que concuerda con lo reportado por Truchado et al. (2015) quienes emplearon HPLC/DAD/ESI-MS e identificaron 19 glicósidos de quercetina, kaempferol e isorhamnetina, sin embargo únicamente realizaron la identificación como caracterización de la miel analizada y no se efectuó un monitoreo durante el almacenamiento como en el presente trabajo. El análisis de este tipo de compuestos por HPLC se ha visto limitado por el requerimiento de estándares de referencia por lo que posiblemente no se había reportado la presencia de polifenoles glicosilados (Moniruzzaman, Sulaiman, Khalil y Gan, 2016; Zhao et al., 2016; Wabaidur et al., 2015; Badjah Hadj Ahmed, Obbed, Wabaidur, Al Othman y Al-Shaalan, 2014; Petretto et al., 2014).

Por otro lado, los resultados del análisis de los extractos de miel por UHPLC-QToF mostraron que hubo variación en el contenido de compuestos polifenólicos en MH y MP con respecto al tiempo de almacenamiento (Figura 23). Para la MH fueron identificados 24 compuestos al t_0 , y 14, 19, 16, 16 y 14 en las semanas 1-5, respectivamente. En la MP se identificaron 30, 31, 20, 14, 22 y 21 compuestos

polifenólicos en las semanas 0-5, respectivamente. En ningún caso se observó una tendencia (Figura 23).

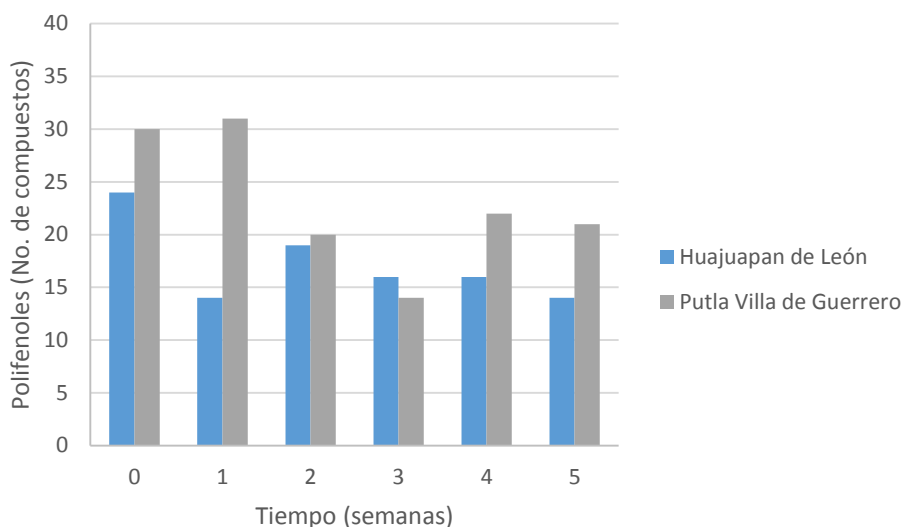


Figura 23. Número de compuestos polifenólicos identificados en miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca. La miel fue almacenada durante 5 semanas a 50°C y 70 % HR. Cada muestra fue analizada por triplicado, por UHPLC-QToF, ionización ESI(-), flujo de 0.2 mL/min, fases móviles A: agua:ácido acético (99.9:0.1, v/v) y B: acetonitrilo (100%). Se utilizó la base de datos METLIN Metabolomic para la identificación de los compuestos polifenólicos.

El número de polifenoles identificados fue mayor en MP con respecto a la MH, lo cual concuerda de manera general con lo registrado para ambas muestras durante su almacenamiento en el CPT (Figura 19A). Sin embargo, en la semana 4 los extractos de miel de ambos orígenes a pesar de que presentaron la máxima concentración de polifenoles totales no tuvieron el mayor número de polifenoles identificados, lo cual pudo deberse probablemente a la abundancia de los compuestos presentes. Por ejemplo, en la MH se identificó la pelargonidina 3-[6-(3-glucosilcafeil)glucósido] de las semanas 2-5; dicho compuesto presentó un porcentaje de abundancia mayor en la semana 4 (14.97 %) con respecto a las semanas 3 (13.08 %) y 5 (12.60 %). En la MP la epidistenina registró un porcentaje de intensidad de 3.38, 4.15 y 3.84, en las semanas 3, 4 y 5, respectivamente.

Respecto a la AA (Figura 19B), se observaron los % de inhibición mayores en las semanas 2 y 5 en la MH y 3 para la MP, lo que puede estar relacionado con el tipo de compuestos polifenólicos presentes, su abundancia o el efecto sinérgico entre ellos. Rice-Evans, Miller y Paganga (1997) hicieron un análisis comparativo entre las actividades antioxidantes de los compuestos puros de quercetina, catequina, apigenina, naringenina y kaempferol observando actividades antioxidantes de 4.7, 2.4, 1.5, 1.5 y 1.3 (mM equivalente de Trolox), respectivamente, sugiriendo que existen diferencias entre las actividades dependiendo del tipo de compuesto polifenólico presente.

La variación en el CPT y la AA de las mieles puede deberse a la fuente floral principalmente, debido a que los polifenoles son metabolitos secundarios producidos por las plantas como mecanismo de defensa, y les pueden conferir el color, aromas y/o sabor a las mismas. Dichos compuestos son característicos de la especie vegetal y pueden variar por los factores climáticos, entre otros. (Al-Mamary, Al-Meerri y Al-Habori, 2002; Aljadi y Kamaruddin, 2002).

8.5 Evaluación de la significancia estadística de los factores: lugar de origen, temperatura y tiempo

Se realizó una comparación de significancia para los parámetros evaluados en condiciones aceleradas, analizando los factores de: lugar de origen, tiempo y temperatura, así como sus interacciones (Tabla 8).

La mayoría de los factores y sus interacciones mostraron diferencia estadísticamente significativa para cada uno de los parámetros de la miel a un nivel de significancia de $p < 0.001$, salvo el % humedad (factor O) y el CPT (interacción O x t x T) los cuales tuvieron un nivel de significancia de $p < 0.01$.

Tabla 8. Significancia de los factores evaluados y sus interacciones, de las mieles de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca.

Parámetro	Interacción						
	O	t	T	O x t	O x T	T x t	O x t x T
% Humedad	**	***	***	***	***	***	***
Conductividad Eléctrica	***	***	***	***	***	***	***
Hidroximetilfurfural	***	***	***	***	***	***	***
Índice de diastasa	***	***	***	***	***	***	***
pH	***	***	***	***	***	***	***
Color	***	***	***	***	***	***	***
AA	NS	***	***	***	NS	***	***
CPT	***	***	***	NS	***	***	**

O: lugar de origen. t: tiempo. T: temperatura. O x t: origen x tiempo. O x T: origen x temperatura. T x t: temperatura x tiempo. O x t x T= origen x tiempo x temperatura. AA: Actividad Antioxidante. CPT: Contenido de polifenoles totales.

NS: No significativo; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$

Por otro lado, no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) para la AA por el factor origen y la interacción O x T, así también en el CPT por la interacción O x t. Lo anterior concuerda con el comportamiento observado en el CPT con respecto al tiempo de almacenamiento y el origen, porque ambas mieles presentaron la misma tendencia a las temperaturas evaluadas (Figura 19A). Por otra parte, la AA (Figura 19B) exhibió el mismo efecto por temperatura en la miel de ambos orígenes, presentando tendencias de disminución con respecto al tiempo en el % de inhibición a 30 y 40°C; y un aumento con variación a 50°C. Con base al análisis anterior y los niveles de significancia observados en la mayoría de los parámetros, se consideró conveniente determinar las correlaciones de Pearson entre los parámetros evaluados con respecto a cada una de las temperaturas.

8.6 Correlaciones de Pearson entre parámetros a las tres temperaturas evaluadas

Se obtuvo el coeficiente de correlación múltiple de Pearson para los parámetros evaluados a condiciones aceleradas (30, 40 y 50°C y 70 % HR), durante cinco semanas para la MH y MP (Tablas A14-A19 en el ANEXO VIII). Y únicamente se analizaron las correlaciones **muy alta** ($r > 0.8$).

Se observó que a las tres temperaturas la MP siempre tuvo el mayor número de correlaciones de Pearson muy altas, con respecto a la MH; las correlaciones comunes entre ambas mieles fueron: AA-ID y CE- ΔE (30°C) e ID-HMF (40 y 50°C). La correlación CE- ΔE fue inversamente proporcional para la MH y tuvo el comportamiento contrario para la MP, en la cual se observó un incremento en la correlación por efecto de la temperatura, lo que concuerda con los colores más oscuros en la miel a 50°C (Figura 11B), y coincide con lo reportado por Habib et al. (2014a) quienes observaron que las mieles más oscuras presentan altos niveles de minerales y por consiguiente mayor CE.

Para la MP a 30°C también se registraron correlaciones directamente proporcionales muy altas entre el HMF con la CE y pH, para la segunda se ha reportado que la reacción de producción del HMF es promovida a pHs ácidos (Mahfuza et al., 2018; Khalil et al., 2010), correlación que igualmente se presentó a 40°C y en MH a 50°C. Por su parte la MH presentó una correlación entre el % humedad- ΔE (-0.8207) a 30°C, lo que concuerda con lo reportado por Escuredo et al. (2014) quienes observaron que el cambio en el % de humedad es un resultado de la cristalización de la miel, la cual tiene como efecto una disminución en el color por la presencia de los cristales (Figura 11B). La correlación ID-AA se presentó en ambas muestras de miel y fue disminuyendo con respecto al aumento en la temperatura (Figura 13 y 19B), dicha correlación no ha sido reportada hasta el momento.

Respecto a los parámetros de frescura (ID-HMF), los valores registrados con respecto a la temperatura fueron: -0.4256 y -0.9357 (30°C), -0.9324 y -0.8304 (40°C) así como -0.9415 y -0.8260 (50°C) para la MH y la MP, respectivamente. Se observó

que existe una correlación inversamente proporcional entre ID-HMF (Figuras 13 y 14), ya que conforme pierde su frescura se incrementa la concentración de HMF y disminuye la actividad de la diastasa. Sin embargo, para la MH fue más evidente el aumento en el valor de la correlación y por lo tanto el efecto de la temperatura en el incremento del HMF y disminución del ID; lo que pudo verse reflejado en la menor estabilidad de dicha miel durante su almacenamiento (Tabla 7), siendo el hidroximetilfurfural el parámetro crítico de calidad.

9. CONCLUSIONES

Los estudios realizados en el presente trabajo de tesis generaron las siguientes conclusiones:

- 1) Se observó diferencia significativa entre los parámetros fisicoquímicos y como *alimento funcional*, evaluados en la caracterización al tiempo cero de las mieles de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, a excepción del contenido de polifenoles totales.
- 2) El efecto por el tiempo y temperatura de almacenamiento fue mas evidente el los parámetros de: color, índice de diastasa y concentración de hidroximetilfurfural para la miel de ambos orígenes.
- 3) Los valores de concentración del HMF por UHPLC-QToF para la miel de Huajuapán de León mostraron la misma tendencia con respecto al método espectrofotométrico, pero de un orden de magnitud menor debido tal vez a que la espectrometría de masas permitió cuantificar con mayor precisión al HMF por ser una tecnología más selectiva.
- 4) En todas las condiciones de almacenamiento ensayadas, el CPT se mantuvo en un intervalo de 24.63-60.52 mg EAG/100g_{miel}; dichos valores se encuentran en los intervalos reportados para miel.
- 5) La actividad antioxidante no mostró una correlación con el CPT, y se observó una disminución menor al 4 % de inhibición al tiempo final de su almacenamiento a 30, 40°C y temperatura ambiente. Sin embargo, a los 50°C se registró un incremento con respecto al tiempo de almacenamiento, debido posiblemente a la síntesis de melanoidinas asociada a reacciones de Maillard que se llevan a cabo a altas temperaturas.

- 6) En ambas mieles objeto de estudio, se identificó al HMF como el parámetro crítico de calidad debido a que rebasó el límite máximo establecido en las normas nacional e internacional.
- 7) El tiempo de estabilidad estimado para la miel producida en Putla Villa de Guerrero (12.9 años) fue mayor con respecto a la de Huajuapán de León (6.4 años).
- 8) Se identificaron 72 compuestos polifenólicos que no se han reportado con anterioridad: 20 en ambas muestras; 22 y 30 únicamente en la miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, respectivamente. En su mayoría fueron compuestos glicosilados, identificación que fue posible con la implementación de un detector MS.
- 9) La mayoría de los factores y sus interacciones mostraron diferencia estadísticamente significativa para cada uno de los parámetros de la miel a un nivel de significancia de $p < 0.001$, salvo el % humedad (factor lugar de origen) y el CPT (interacción lugar de origen x tiempo x temperatura) los cuales tuvieron un nivel de significancia de $p < 0.01$.
- 10) El análisis de la correlación múltiple de Pearson de los parámetros evaluados, permitió evidenciar que para la miel de Huajuapán de León existió un aumento en la correlación entre los parámetros de frescura (HMF-ID) con respecto a la temperatura; lo que se reflejó en su mayor inestabilidad.

10. PERSPECTIVAS

- 1) En el presente trabajo no se analizaron todos los parámetros establecidos en las normas referidas por lo que se recomienda en futuras determinaciones considerar: cenizas, acidez, sólidos insolubles en agua, contenido de azúcares reductores, sacarosa, glucosa y glucosa más fructosa.
- 2) Con base a los resultados obtenidos se considera conveniente realizar el monitoreo bajo las condiciones aceleradas empleadas en este trabajo durante ocho semanas en la miel de ambos orígenes, para los parámetros de frescura (HMF e ID). Lo anterior con el objetivo de mejorar el ajuste del modelo matemático para el cálculo del tiempo de estabilidad.
- 3) Debido al cambio de color observado asociado a la cristalización de la miel, se considera conveniente realizar la determinación de la correlación que existe entre el contenido de glucosa y actividad de agua; con base a lo reportado por Manikis y Thrasivoulou (2001).
- 4) La tendencia de la concentración de HMF empleando UHPLC-QToF en la miel de Huajuapán de León, concordó con la observada empleando el método espectrofotométrico, lo que no sucedió con la miel de Putla Villa de Guerrero. Por lo cual, se proponen modificaciones en el método de preparación de dicha muestra, pudiendo ser, el incremento en el volumen utilizado de las soluciones de Carrez.
- 5) En el presente trabajo se realizó únicamente el análisis del perfil polifenólico de la miel de ambos orígenes almacenadas a 50°C, observándose variaciones durante el monitoreo. Se recomienda realizar dicho análisis para las mieles almacenadas a 30 y 40°C; además de realizar un experimento MS/MS para corroborar la presencia de los compuestos identificados.

- 6) Es recomendable analizar el contenido de melanoidinas debido a que a 50°C se observó un incremento en la actividad antioxidante, sin embargo, el CPT no presentó la misma tendencia en las mieles estudiadas.

11. REFERENCIAS

- Ajibola, A., Chamunorwa, J. P., y Erlwanger, K. H. (2012). Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth. *Nutrition & Metabolism*, 9(1), 1-12.
- Aljadi, A. M., y Kamaruddin, M. Y. (2004). Evaluation of the phenolic and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry*, 85, 513-518.
- Al-Mamary, M., Al-Meerri, A., y Al-Habori, M. (2002). Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*, 22, 1041-1047.
- Alqarni, A. S., Owayss, A. A., y Mahmoud, A. A. (2012). Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. *Journal of Saudi Chemical Society*, 5, 618-625.
- Alvarez-Suarez, J. M., Giampieri, F., González-Paramás, A. M., Damiani, E., Astolfi, P., Martínez-Sánchez, G., Bompadre, S., Quiles, J. L., Santos-Buelga, C., y Battino, M. (2012). Phenolic from monofloral honey protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 1508-1516.
- Aranceta, J. y Gil, A. (2010). *Alimentos funcionales y salud en las etapas infantil y juvenil*. Madrid. España: Médica Panamericana.
- Assil, H. I., Sterling, R., y Sporns, P. (1991). Crystal Control in Processed Liquid Honey. *Journal of Food Science*, 56(4), 1034-1041.
- Bachmann, H. E. L. (2007). *Estudios Preliminares de Caracterización de Miel de Abeja: Determinación de Carbohidratos por GC/MS y análisis enzimático* (tesis de Licenciatura). Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Badjah Hadj Ahmed, A. Y., Obbed, M. S., Wabaidur, S. M., Al Othman, Z. A., y Al-Shaalan, N. H. (2014). High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Phenolic Acid, Flavonoid, and Phenol Contents in Various Natural Yemeni Honeys Using Multi-walled Carbon Nanotubes as a Solid-Phase Extraction Adsorbent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 5443-5450.
- Balasundram, N., Sundram, K., y Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses; Analytical, nutritional and clinical methods. *Food Chemistry*, 99, 191-203.
- Bayliak, M., Burdyliuk, N., y Lushchak, V. (2017). Growth on Alpha-Ketoglutarate Increases Oxidative Stress Resistance in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Microbiology*, 2017, 1-9.
- Belmares, J. L., Guerra, A., y Mata, C. A. E. (2009). Determinación de la vida de anaquel de alimentos con alto contenido de carbohidratos. *XI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Monterrey, Nuevo León.
- Bertoncelj, J., Golob, T., Kropf, U., y Korosec, M. (2011). Characterization of Slovenian honey on the basis of sensory and physicochemical analysis with a chemometric approach. *Food Science and Technology*, 46, 1661-1671.
- Biesaga, M., y Pyrzyńska, K. (2009). Liquid chromatography/tandem mass spectrometry studies of the phenolic compounds in honey. *Journal Chromatography A*, 1216, 6620-6626.
- Bohn, T. (2004). Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Review*, 72(7), 429-452.

- Brudzynski, K., y Kim, L. (2011). Storage-induced chemical changes in active components of honey de-regulate its antibacterial activity. *Food Chemistry*, 126, 1155-1163.
- Brudzynski, K., y Miotto, D. (2011a). The relationship between the content of Millard reaction-like products and bioactivity of Canadian honeys. *Food Chemistry*, 124, 869-874.
- Brudzynski, K., y Miotto, D. (2011b). The recognition of high molecular weight melanoidins as the main components responsible for radical-scavenging capacity of unheated and heat-treated Canadian honeys. *Food Chemistry*, 125, 570-575.
- Buera, M. P., Hough, G., Martinez, E., y Resnik, S. L. (1990). Colorimetric, Spectrophotometric and Sensory Color Measurements of a Dairy Product: Dulce de Leche. *Anuales de la Asociación Química Argentina*, 78(5), 291-299.
- Campillo, N., Viñas, P., Férrez-Melgarejo, G., y Hernández-Córdoba, M. (2015). Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of flavonoid aglycone compounds in honey using liquid chromatography with diode array detection and time-of-flight mass spectrometry. *Talanta*, 131, 185-191.
- Campone, L., Piccinelli, A. L., Pagano, I., Carabetta, S., Di Sanzo, R., Russo, M., y Rastrelli, L. (2014). Determination of phenolic compounds in honey using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal Chromatography*, 1334, 9-15.
- Chawla, G., y Ranjan, C. (2006) Principle, instrumentation, and applications of UPLC: a novel technique of liquid chromatography. *Open Chemistry Journal*, 3(1), 1-16.
- Claridades Agropecuarias. (2011). Monografía de la Miel (ASERCA). Enero. Núm. 11.
- CODEX STAND. 12-1981. Norma para la Miel. Codex Alimentarius Commission. 1-9.
- Conforti, P. A., y Lupano, C. E. (2006). Crystallization of Honey at -20°C. *International Journal of Food Properties*, 9, 99-107.
- Conti, M. E. (2000). Lazio region (central Italy) honey: determination of mineral content and typical quality parameters. *Food Control*, 11, 459-463.
- Conti, M. E., Stripeikis, J., Campanella, L., Cucina, D., y Tudino, M. B. (2007). Characterization of Italian honeys (Marche Region) on the basis of their mineral content and some typical quality parameters. *Chemistry Central Journal*, 1(1), 1-10.
- Cortés, R., y Chiralt, A. (2008). Cinética de los cambios de color en manzana deshidrata por aire fortificada con vitamina E. *VITAE*, 15(1), 8-16.
- Costa, L. C. V., Kaspchak, E., Queiroz, M. B., de Almeida, M. M., Quast, E., y Quast, L. B. (2015). Influence of temperature and homogenization on honey crystallization. *Brazilian Journal of Food Technology*, 18(2), 155-161.
- Damodaran, S., Parkin, K. L., y Fennema, O. R. (2010). *Fennema Química de los alimentos*. Zaragoza España: Acribia.
- Das, A., Datta, S., Mukherjee, S., Bose, S., Ghosh, S., y Dhar, P. (2015). Evaluation of antioxidative, antibacterial and probiotic growth stimulatory activities of *Sesamum indicum* honey containing phenolic compounds and lignans. *LWT-Food Science and Technology*, 61, 244-250.

- da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., y Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196, 309-323.
- Deng, J., Yang, H., Capanoglu, E., Cao, H., Xiao, J. (2018). Technological aspects and stability of polyphenols. En: *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. Galanakis Laboratories, Chania, Greece: Woodhead Publishing.
- Dettoni, A., Tappi, S., Piana, L., Rosa, M. D., y Rocculi, P. (2018). Kinetic of induced honey crystallization and reated evolution of structural and physical properties. *LWT-Food Science and Technology*, 95, 333-338.
- Dewick, M. P. (2002). *Medicinal Natural Products*. Pharmaceutical Sciences. 124-126
- Dimitrova, B., Gevrenova, R., y Anklam, E. (2007). Analysis of Phenolic Acids in Honeys of Different Floral Origin by Solid-phase Extraction and High-performance Liquid Chromatography. *Phytochemical Analysis*, 18, 24-32.
- Escuredo, O., Dobre, I., Fernández-González, M., y Seijo, M. C. (2014). Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chemistry*, 149, 84-90.
- Fallico, B., Arena, E., y Zappala, M. (2008). Degradation of 5-Hydroxymethylfurfural in Honey. *JFS Food Chemistry*, 73(9), 625-631.
- Fallico, B., Arena, E., y Zappala, M. (2009). Prediction of honey shelf life. *Journal of Food Quality*, 32, 352-368.
- Fauzi, N. A., y Farid M. M. (2015). High-pressure processing of Manuka honey: brown pigment formation, improvement of antibacterial activity and hydroxymethylfurfural content. *International Journal of Food Science & Technology*, 50, 178-185.
- Flanjak, I., Kenjeric, D., Bubalo, D., y Primorac, L. (2016). Characterisation of selected Croatian honey types base on the combination of antioxidant capacity, quality parameters, and chemometrics. *European Food Research and Technology*, 242, 467-475.
- García C., y Molina M. E. (2008). Estimación de la vida útil de una mayonesa mediante pruebas aceleradas. *Ingeniería*, 18(1,2), 57-64.
- Gianelli Barra, M. P., Ponce-Díaz, M. C., y Venegas-Gallegos, C. (2010). Volatile compounds in honey produced in the Central Valley of Ñuble Province, Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70, 75-84.
- Giraldo, G. I. (1999). *Métodos de estudio de vida de anaquel de los alimentos* (Trabajo para optar a la categoría de profesor asociado). Universidad Nacional de Colombia. Colombia.
- Gökmen, V., y Senyuva, H. Z. (2006). Improved Method for the Determination of Hydroxymethylfurfural in Baby Foods Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2845-2849.
- Gómez-Castillo, J. F. (2018). *Análisis Comparativo del Perfil Polifenólico en Cáscara de Punica granatum Cultivada en Guanajuato y Oaxaca* (tesis de maestría). Universidad Tecnológica de la Mixteca, Oaxaca, México.
- González, G., Pirovani, M. E., Piagentini, A. M., Ulín, F., Miranda, E., Osorio, R., Maldonado, E. J., y Salinas, R. M. (2016). Kinetics of sensory changes and shelf-life of minimally processed star fruit. *Fitotecnia Mexicana*, 39(4), 393-402.

- Gozálvez, F. (1990). *Agroindustria de la miel*. Aspectos técnicos. En: Instituto Internacional de Cooperación para la Agricultura. Seminario técnico de agroindustria y comercialización de miel y polen. Santiago, Chile. 5-11.
- Habib, H. M., Al Meqbali, F. T., Kamal, H., Souka, U. D., y Ibrahim, W. H. (2014a). Bioactive components, antioxidant and DNA damage inhibitory activities of honeys from arid regions. *Food Chemistry*, *153*, 28-34.
- Habib, H. M., Al Meqbali, F. T., Kamal, H., Souka, U. D., y Ibrahim, W. H. (2014b). Physicochemical and biochemical properties of honeys from arid regions. *Food Chemistry*, *153*, 35-43.
- Herbert, C., y Johnstone, R. (2003). *Mass spectrometry basics*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Huck, C. W., y Bonn, G. K. (2001). Evaluation of detection methods for the reversed-phase HPLC determination of 3', 4', 5'-trimethoxyflavone in different phytopharmaceutical products and in human serum. *Phytochemical analysis*, *12*(2), 104-109.
- Ibarz R., Pagán J., Garza S., y Ibarz A. (2010). Browning of clarified lemon juices treated at high temperatures. *Scientia Agropecuaria*, *1*(2010), 07-20.
- Islam, M. A., Islam, M. N., Moniruzzaman, M., Mottalib, M. A., Sulaiman, S. A., Gan, S. H., y Khalil, M. I. (2012). Physicochemical and antioxidant properties of Bangladeshi honeys stored for more than one year. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *12*(177), 1-10.
- Jaganathan, S. K., y Mandal, M. (2009). Antiproliferative Effects of Honey and of Its Polyphenols: A Review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2009*, 1-13.
- Jerković, I., Kuš, P. M., Tuberoso, C. I. G., y Šarolić, M. (2014). Phytochemical and physical-chemical analysis of Polish willow (*Salix* spp.) honey: Identification of the marker compounds. *Food Chemistry*, *145*, 8-14.
- Jerković, I., Tuberoso, C. I. G., Baranović, G., Marijanović, Z., Kranjac, M., Svečnjak, L., y Kuš, P. M. (2015). Characterization of Summer Savory (*Satureja hortensis* L.) Honey by Physico-Chemical Parameters and Chromatographic/Spectroscopic Techniques (GC-FID/MS, HPLC-DAD, UV/VIS and FTIR-ATR). *Croatica Chemica Acta*, *88*, 15-22.
- Jerković, I., Tuberoso, C. I. G., Kuš, P. M., Marijanović, Z., y Kranjac, M. (2014). Screening of *Coffea* spp. honey by different methodologies: Theobromine and caffeine as chemical markers. *RSC Advances*, *4*, 60557-60562.
- Kadar, M., Juan-Borrás, M., Carot, J. M., Domenech, E., y Escriche, I. (2011). Volatile fraction composition and physicochemical parameters as tools for the differentiation of lemon blossom honey and orange blossom honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *91*(15), 2768-2776.
- Kamal, E. A., y Appelqvist, L. A. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, *31*, 671-701
- Kamboj, R., Bera, M. B., y Nanda, V. (2013). Evaluation of physico-chemical properties, trace metal content and antioxidant activity of Indian honeys. *Food Science & Technology*, *48*, 578-587.
- Kečkeš, S., Gašić, U., Veličković, T. Č., Milojković-Opsenica, D., Natić, M., y Tešić, Ž. (2013). The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honey using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry. *Food Chemistry*, *138*, 32-40.
- Khalil, H. (2010) Crystallization of Honey. *Bee World*, *87*(4), 71-74.

- Khalil, M. I., Moniruzzaman, M., Alam, N., Sulaiman, S. A., y Gan, S. H. (2011). Phenolic Acid Composition and Antioxidant Properties of Malaysian Honeys. *Journal of Food Biochemistry*, 76(6), 1-8.
- Khalil, M. I., Salaiman, S. A., y Gan, S. H. (2010). High 5-hydroxymethylfurfural concentrations are found in Malaysian honey samples stored for more than one year. *Food and Chemical Toxicology*. 48, 2388-2392.
- Kilcast, D., y Subramaniam, P. (2000). *The stability and shelf-life of food*. New York. Woodhead Publishing Limited.
- Kowalski, S., Lukasiewicz, M., Duda-Chodak, A., y Zięć, G. (2013) 5-Hydroxymethyl-2-Furfural (HMF) Heat-Induced Formation, Occurrence in Food and Biotransformation a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 63(4), 207-225.
- Kumazawa, S., Okuyama, Y., Murase, M., Ahn, M-R., Nakamura, J., y Tatefuji, T. (2012). Antioxidant Activity in Honeys of Various Floral Origins: Isolation and Identification of Antioxidants in Peppermint Honey. *Food Science Technology Reserch*, 18, 679-685.
- Kuś, P. M., Congiu, F., Teper, D., Sroka, Z., Jerković, I., y Tuberoso, C. I. G. (2014). Antioxidant activity, color characteristics, total phenol content and general HPLC fingerprints of six Polish unifloral honey types. *LWT-Food Science and Technology*, 55, 124-130.
- Kuś, P. M., Jerković, I., Tuberoso, C. I. G., Marijanović, Z., y Congiu, F. (2014). Cornflower (*Centaurea cyanus* L.) honey quality parameters: Chromatographic fingerprints, chemical biomarkers, antioxidant capacity and others. *Food Chemistry*, 142, 12-18.
- Kuś, P. M. y van Ruth, S. (2015). Discrimination of Polish unifloral honeys using overall PTR-MS and HPLC fingerprints combined with chemometrics. *LWT-Food Science Technology*, 62, 69-75.
- Labuza, P., y Fu, B. (1993). Growth kinetics for shelf-life prediction: theory and practice. *Journal of Industrial Microbiology*, 12(1993), 309-323.
- Lana, M. M., Tijsskens, L. M. M., y Kooten, O. (2005). Effects of storage temperature and fruit ripening on firmness of fresh cut tomatoes. *Biology Technology*, 35, 87-95.
- Laos, K., Kirs, E., Pall, R., y Martverk, K. (2011). The Crystallization Behaviour of Estonian Honeys. *Agronomy Research*, 9, 427-432.
- Liang, Y., Cao, W., Chen, W.-Y., Xiao, X.-H., y Zheng, J.-B. (2009). Simultaneous determination of four phenolic components in citrus honey by high performance liquid chromatography using electrochemical detection. *Food Chemistry*, 114, 1537-1541.
- López-Hernández, A. (2017). *Desarrollo de una bebida funcional híbrida adicionada con extracto polifenólico obtenido a partir de cáscara de granada (Punica granatum), y la evaluación de sus propiedades antioxidantes y antiviral* (tesis de maestría). Universidad Tecnológica de la Mixteca, Oaxaca, México.
- Man, D. (2002). *Food Industry Briefing Series: Shelf Life*. Oxford: Blackwell Science.
- Manayay, D., Ibarz A., Castillo, W., y Palacios, L. (2013). Cinética de la diferencia de color croma en el proceso térmico de pulpa de mango (*Mangifera idica* L.) variedad Haden. *Scientia Agropecuaria*, 4(3), 181-190.
- Manayay, D., y Ibarz A. (2010). Modeling the kinetics nonenzymatic browning reactions and rheological behavior in the thermal process of fruit juices and pulps. *Scientia Agropecuaria*, 1(2), 155-168.

- Manikis, I., y Thrasivoulou, A. (2001) The relation of physicochemical characteristics of honey and the crystallization sensitive parameters. *Apiacta*, 36, 106-112.
- Mannina, L., Sobolev, A. P., Di Lorenzo, A., Vista, S., Tenore, G.C., y Daglia, M. (2015). Chemical Composition of Different Botanical Origin Honeys Produced by Sicilian Black Honeybees (*Apis mellifera ssp. sicula*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 5864-5874.
- Moniruzzaman, M., Sulaiman, S. A., Khalil, M. I., y Gan, S. H. (2013). Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of sourwood and other Malaysian honeys: a comparison with manuka honey. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 1-12.
- Moniruzzaman, M., Yung, A. C., Visweswara, R. P., Nurul, I. H. M., Amirah, S. (2014). Identification of Phenolic Acids and Flavonoids in Monofloral Honey from Bangladesh by High Performance Liquid Chromatography: Determination of Antioxidant Capacity. *BioMed Research International*, 73, 74-90.
- Moniruzzaman, M., Sulaiman, S. A., Khalil, M. I., y Gan, S. H. (2016). Phenolic Acid and Flavonoid Composition of Malaysian Honey. *Journal of Food Biochemistry*. 2016, 1-8.
- Nicoli, M.C. (2012). An introduction to food shelf life: Definitions, basic concepts, and regulatory aspects. In: Shelf Life Assessment of Food. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor and Francis Group.
- NMX-F-036-1997. Miel Especificaciones y métodos de prueba. *Norma Mexicana, Direccion General de Normas*.
- NMX-F-036-NORMEX-2006. Miel Especificaciones y métodos de prueba. *Norma Mexicana, Direccion General de Normas*.
- Oelschlaegel, S., Gruner, M., Wang, P.-N., Boettcher, A., Koelling-Speer, I., y Speer, K. (2012). Classification and Characterization of Manuka Honeys Based on Phenolic Compounds and Methylglyoxal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7229-7237.
- Özcan, M. M., y Ölmez, Ç. (2014). Some qualitative properties of different monofloral honeys. *Food Chemistry*, 163, 212-218.
- Parvanov, P., y Dinkov, D. (2012). More insight into organic bee honey processing, storage and shelf life. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 15(3), 206-210.
- Pasini, F., Gardini, S., Marcazzan, G. L., y Caboni, M. F. (2013). Buckwheat honey: Screening of composition and properties. *Food Chemistry*, 141, 2802-2811.
- Peng, Y.S., y Marston, J.M. (1986). Filtering mechanism of the honey bee proventriculus. *Physiological Entomology*, 11, 433-439.
- Perna, A., Intaglietta, I., Simonetti, A., y Gambacorta, E. (2013). A comparative study on phenolic profile, vitamin C content and antioxidant activity of Italian honeys of different botanical origin. *International Journal Food Science and Technology*, 48, 1899-1908.
- Perna, A., Simonetti, A., Intaglietta, I., Sofo, A., y Gambacorta, E. (2012) Metal content of southern Italy honey of different botanical origins and its correlation with polyphenol content and antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 47, 19909-1917.
- Petretto, G. L., Cossu, M., y Alamanni, M. C. (2014). Phenolic content, antioxidant and physico-chemical properties of Sardinian monofloral honeys. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(2), 482-491.

- Petrus, K., Schwartz, H., y Sontag, G. (2011). Analysis of flavonoids in honey by HPLC coupled with coulometric electrode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400, 2555-2563.
- Phimolsiripol, Y., y Suppakul, P. (2016). Techniques in Shelf Life Evaluation of Food Products. *Food Science*, 2016, 1-8.
- Pichichero, E., Canuti, L., y Canini, A. (2009). Characterisation of the phenolic and flavonoid fractions and antioxidant power of Italian honeys of different botanical origin. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 89, 609-616.
- Pirovani, M. E., Piagentini, A. M., Güemes, D. R., Méndez, J. C., Jiménez, S. M. y Salsi, M. S. (2005). Predicción de la vida útil de lechuga iceberg fresca cortada. *Actas del X Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (AATA)*, Mar del Plata, Argentina.
- Qamer, S., Ahamed, F., Ali, S. S., y Shakoori, A. R. (2013). Effect of storage on various honey quality parameters of *Apis dorsata* honey from Nepal. *Pakistan Journal of Zoology*, 45(3), 741-747.
- Quiñones, M., Miguel, M., y Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria: Organo Oficial de La Sociedad Española de Nutrición Parenteral Y Enteral*, 27(1), 76-89.
- Rajchl, A., Drgová, L., Grégrová, A., Čížková, H., Ševčík, R., y Voldřich, M. (2013). Rapid determination of 5-hydroxymethylfurfural by DART ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 4737-4745.
- Rauha, J. P., Vourela, H., y Kostianen, R. (2001). Effect of eluente on the ionization efficiency of flavonoids by ion spray, atmospheric pressure chemical ionization, and atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 36(12), 1269-1280.
- Reza Hadjmohammadi, M., Saman, S., y Nazari, S. J. (2010). Separation optimization of quercetin, hesperetin and chrysin in honey by micellar liquid chromatography and experimental design. *Journal of Separation Science*, 33, 3144-3151.
- Rice-Evans, A. C., Miller, N. J., y Paganga, G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152-159.
- Rios, F., Sanchez, A. C., Lobo, M., Lupo, L., Coelho, I., Castanheira, I., y Samman, N. (2014). A chemometric approach: characterization of quality and authenticity of artisanal honeys from Argentina. *Journal of Chemometrics*, 2014(28), 834-843.
- Rozycki, S. D. (2003). Cinética de pardeamiento en sistemas lácteos concentrados: análisis comparativo de modelos. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 4(2), 95-102.
- Robertson, G. L. (2009). *Food Packaging and Shelf Life A Practical Guide*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Šarić, G., Marković, K., Major, N., Krpan, M., Uršulin-Trstenjak, N., Hruškar, M., y Vahčić, N. (2012). Changes of Antioxidant Activity and Phenolic Content in Acacia and Multifloral Honey During Storage. *Food Technology and Biotechnology*, 50(4), 434-441.
- Sarmiento Silva, T. M., Pereira dos Santos, F., Evangelista-Rodrigues, A., Sarmiento da Silva, E. M., Sarmiento da Silva, G., Santos de Novais, J., Ribeiro dos Santos, F. A., y Amorim Camara, C. (2013). Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. *Journal Food Composition and Analysis*, 29, 10-18.

- Satarupa, R. y Subha, G. (2014). Physical, Chemical and Antioxidant Properties of Honey: A Review . *Asian Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2(1), 96-99.
- Satterfield, M., y Brodbelt, J. S. (2000). Enhanced detection of flavonoids by metal complexation and electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 72(691), 5898-5906.
- Serrano, S., Espejo, R., Villarejo, M., y Jodral, L. M. (2007). Diastase and invertase activities in Andalusian honey. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 76-79.
- Shapla, M. U., Solayman, Md., Alam, N., Khalil, Md. I., y Gan, S. H. (2018). 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and others food products: effects on bees and human health. *Chemistry Central Journal*, 2018, 12-35.
- Silici, S., Sarioglu, K., y Karaman, K. (2014) Determination of polyphenols of some turkish honeydew and nectar honeys using HPLC-DAD. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 36(16), 2330-2341.
- Silva, L. R., Videira, R., Monteiro, A. P., Valentão, P., y Andrade, P. B. (2009). Honey from Luso região (Portugal): Physicochemical characteristics and mineral contents. *Microchemical Journal*, 93, 73-77.
- Solayman, M., Islam, M., Paul, S., Ali, Y., Khalil, M., Alam, N., Gan, S.H. (2016) Physicochemical properties, minerals, trace elements, and heavy metals in honey of different origins: a comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 219-233.
- Stephens, J. M., Schlothauer, R. C., Morris, B. D., Yang, D., Fearnley, L., Greenwood, D. R., y Loomes, K. M. (2010). Phenolic compounds and methylglyoxal in some New Zealand manuka and kanuka honeys. *Food Chemistry*, 120, 78-86.
- Tabachnick, F., y Fidell, L. (2013). *Multivariate statistics*. NY: Pearson.
- Tahir, H. E., Xiaobo, Z., Zhihua, L., y Yaodi, Z. (2013). Comprehensive evaluation of antioxidant properties and volatile compounds of sudanese honey. *Journal of Food Biochemistry*, 39, 349-359.
- Taoukis, S. P., Labuza, P. T., y Saguy, S. I. (2000). *Kinetics of food deterioration and shelf-life prediction*. The handbook of food engineering practice. Boca Ratón. FL.: CRC Press.
- Teixidó, E., Moyano, E., Santos, F. J., y Galceran, M. T. (2008). Liquid chromatography multi-stage mass spectrometry for the analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods. *Journal of Chromatography*, 1185, 102-108.
- Tornuk, F., Karaman, S., Ozturk, I., Toker, O. S., Tastemur, B., Sagdic, O., Dogan, M., y Kayacier, A. (2013). Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. *Industrial Crops and Products*, 46, 124-131.
- Torrieri, E. (2016). Storage Stability: Shelf Life Testing. *Encyclopedia of Food and Health*, 2016, 188-192.
- Trautvetter, S., Koelling-Speer, I., y Speer, K. (2009) Confirmation of phenolic acids and flavonoids in honeys by UPLC-MS. *Apidologie*, 40, 140-150.
- Truchado, P., Ferreres, F., y Tomas-Barberan, F. A. (2009). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry reveals the widespread occurrence of flavonoid glycosides in honey, and their potential as floral origin markers. *Journal of Chromatography A*, 1216, 7241-7248.

- Truchado, P., Vit, P., Heard, T. A., Tomàs-Barberà, F. A., y Ferreres, F. (2015). Determination of interglycosidic linkages in O-glycosyl flavones by high-performance liquid chromatography/photodiode-array detection coupled to electrospray ionization ion trap mass spectrometry. Its application to *Tetragonula carbonaria* honey from Australia. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 29, 948-954.
- Tuberoso, C. I. G., Bifulco, E., Caboni, P., Sarais, G., Cottiglia, F., y Floris, I. (2011). Lumichrome and Phenyllactic Acid as Chemical Markers of Thistle (*Galactites tomentosa* Moench) Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 364-369.
- Tuberoso, C. I. G., Bifulco, E., Caboni, P., Cottiglia, F., Cabras, P., y Floris, I. (2010). Floral Markers of Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.) Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 384-389.
- Tuberoso, C. I. G., Bifulco, E., Jerkovic, I., Caboni, P., Cabras, P., y Floris, I. (2009). Methyl Syringate: A Chemical Marker of Asphodel (*Asphodelus microcarpus* Salzm. et Viv.) Monofloral Honey. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 57, 3895-3900.
- Valencia, F. E., Cortés, M., y Román, M. O. (2012). Cinética del color durante el almacenamiento de caramelos blandos de uchuva adicionados de calcio y sin sacarosa. *Lasallista*, 9(2), 11-25.
- Venir, E., Spaziani, M., Maltini, E. (2010). Crystallization in "Tarassaco" Italian honey studied by DSC. *Food Chemistry*, 122, 410-415.
- Wabaidur, S. M., Ahmed, Y. B. H., Alothman, Z. A., Obbed, M. S., Al-Harbi, N. M., y Al-Turki, T. M. (2015). Ultra high performance liquid-chromatography with mass spectrometry method for the simultaneous determination of phenolic constituents in honey from various floral sources using multiwalled carbon nanotubes as extraction sorbents. *Journal of Separation Science*, 38, 2597-2606.
- Wang, C. H., Gheldof, N., y Engeseth, N. J. (2004). Effect of processing and storage on antioxidant capacity of honey. *Food Chemistry and Toxicology*, 69(2), 96-101.
- Wang, H.-Y., Qian, H. y Yao, W.-R. (2011). Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. *Food Chemistry*, 128, 573-584.
- Watson, D. G., Atsriku, C., y Oliveira, E. J. (2003). Review role of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of oxidation products and antioxidants in biological systems. *Analytica Chimica Acta*, 492(1,2), 17-47.
- Westman-Brinkmalm, A., y Brinkmalm, G. (2009). *Mass Spectrometry Instrumentation, Interpretation, and Application*. Hoboken, New Jersey. John Wiley and Sons, Inc.
- Yücel, Y., y Sultanoglu, P. (2013). Characterization of honeys from Hatay region by their physicochemical properties combined with chemometrics. *Food Bioscience*, 1, 16-25.
- Zamora, M. C., Chirife, J., y Roldán, D. (2006). On the nature of the relationship between water activity and % moisture in honey. *Food Control*, 17, 642-647.
- Zappalà, M., Fallico, B., Arena, E., y Verzera, A. (2005). Methods for the determination of HMF in honey: a comparison. *Food Control*, 16, 273-277.
- Zhang, X.-H., Wu, H.-L., Wang, J.-Y., Tu, D.-Z., Kang, C., Zhao, J., Chen, Y., Miu, X.-X., y Yu, R.-Q. (2013). Fast HPLC-DAD quantification of nine polyphenols in honey by using second-order calibration method based on trilinear decomposition algorithm. *Food Chemistry*, 138, 62-69.
- Zhao, J., Du, X., Cheng, N., Chen, L., Xue, L., Zhao, J., Wuc, L., y Cao, W. (2016). Identification of monofloral honeys using HPLC-ECD and chemometrics. *Food Chemistry*, 194, 167-174.

Zhi-Zhong, X., Yang, L., y Jin-Song, B. (2016). Hydrogen sulfide and cellular redox homeostasis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1-12.

Páginas electrónicas consultadas:

Bogdanov, S. (2008). Storage, Crystallisation and Liquefaction of Honey. Consultado en: www.bee.hexagon.net

INAFED, 2018. Consultado en: <https://www.gob.mx/inafed>

INEGI, 2018. Consultado en: <https://www.inegi.org.mx/>

Pajuelo, G. A. (2009). Control de calidad en mieles. Castellón, Europa. Consultado en: <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/3825/articulos-otros-temas-archivo/control-de-calidad-en-mieles.html>

SAGARPA, 2017. Miel orgánica oaxaqueña se consolida en Europa. Recuperado de <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2015B299.aspx>

SIAP, 2017. Consultado en: http://infosiap.siap.gob.mx/anpecuario_siapx_gobmx/indexnal.jsp

TRADE MAP, 2017. Estadística del comercio para el desarrollo internacional de las empresas. Consultado en: https://www.trademap.org/Country_SelProductCountry.aspx?nvpm=3|484|||0409||4|1|1|2|1|2|1|

ANEXO I

Tabla A1. Compuestos polifenólicos reportados en diferentes muestras de miel empleando HPLC-acoplado a diferentes detectores y UPLC-acoplado a masas.

No.	Compuesto	Número reportes	Referencias
1	Acacetina	3	T, AN, AJ
2	Acetato de pinobanksina	1	H
3	Ácido abscísico	4	H, AG, AM, AQ
4	Ácido <i>trans-trans</i> -abscísico	6	T, O, U, W, AB, AH
5	Ácido <i>cis-trans</i> -abscísico	8	E, M, Q, T, U, W, AB, AH
6	Ácido acetilsalicílico	1	AM
7	Ácido <i>p</i> -anísico	1	AM
8	Ácido benzoico	11	A, K, L, O, S, U, V, AB, AC, AM, AP
9	Ácido <i>p</i> -benzoico	1	AQ
10	Ácido caféico	21	A, E, G, I, M, K, T, S, V, U, X, Y, Z, AB, AC, AK, AP, AL, AM, AI, AJ
11	Ácido caféico isoprenil éster	1	H
12	Ácido 3-O-cafeoilquinico	1	T
13	Ácido cinámico	6	G, T, K, L, N, AQ
14	Ácido <i>tr</i> -cinámico	6	A, B, I, S, AC, AM, AP
15	Ácido clorogénico	15	A, B, D, G, E, S, K, L, T, I, V, Y, X, AI, AM
16	Ácido coniférico	2	A, S
17	Ácido <i>m</i> -cumárico	1	AP
18	Ácido <i>o</i> -cumárico	1	AP
19	Ácido <i>p</i> -cumárico	22	E, G, I, K, N, M, T, O, U, V, W, X, Y, Z, AA, AC, AK, AL, AM, AI, AP, AQ
20	Ácido dicafeoilquinico	1	T

21	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	1	W
22	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético	1	AM
23	Ácido 4-hidroxifenilacético	3	I, K, AM
24	Ácido 4-hidroxifenilpropiónico	1	AM
25	Ácido elágico	2	G, AM
26	Ácido fenilacético	4	AB, AG, AM, AP
27	Ácido feniláctico	3	R, AB, AE
28	Ácido β -feniláctico	1	AM
29	Ácido ι - β -feniláctico	1	AP
30	Ácido DI- p -hidroxi-feniláctico	1	AP
31	Ácido ferúlico	17	B, D, E, G, I, I, N, M, K, U, V, Y,X,Z, AK, AP, AI
32	Ácido <i>trans</i> -ferúlico	1	AO
33	Ácido gálico	21	A, E, G, I, K, N, O, Q, S, T, V, W, X, Y, AB, AC, AG, AI, AL, AM, AP
34	Ácido hidroxinámico	1	AM
35	Ácido 3-hidroxibenzóico	1	AP
36	Ácido 4-hidroxibenzóico	6	K, L, O, AB, AM, AP
37	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	7	E, G, H, U, Q, Y, AI
38	Ácido <i>p</i> -hidroxicinámico	2	B, I
39	Ácido <i>p</i> -hidroxifenilacético	2	U, AI
40	Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico	1	N
41	Ácido homogentísico	1	AM
42	Ácido Isoferúlico	1	U
43	Ácido kójico	2	O, AB
44	Ácido maléico	2	I,K
45	Ácido mandélico	1	AM
46	Ácido 2-metoxibenzóico	2	AB, AG
47	Ácido 4-metoxibenzóico	1	AG
48	Ácido 4-metoxicinámico	1	AM

49	Ácido 4-metoxifeniláctico	3	H, AB, AG
50	Ácido trimetoxibenzóico	1	AG
51	Ácido protocatecuico	7	E, G, T, U, Y, AM, AP
52	Ácido gentísico	2	E, AM
53	Ácido rosmarínico	2	E, G
54	Ácido salicílico	2	AM, AP
55	Ácido shiquímico	1	AM
56	Ácido sinapico	3	G, I, AI
57	Ácido tr-sinapico	1	AM
58	Ácido siríngico	17	B, G, I, K, L, M, N, U, Z, Y, AC, AB, AG, AI, AM, AP, AQ
59	Ácido vanílico	12	G, K, L, M, O, W, Z, AC, AM, AP, AI, AQ
60	Alpinetina	1	T
61	Apigenina	15	A, B, D, S, T, K, M, L, U, AC, AI, AJ, AL, AM
62	Apigenina+isoramentina	1	AN
63	Baicaleína	1	C
64	Butirato de pinobanksina	1	H
65	Carvacrol	1	I
66	Catequina	9	A, B, E, N, I, S, V, X, AC
67	Crisina	13	C, E, K, L, M, U, T, AF, AJ, AM, AN, AQ
68	Dihidroxi flavona	1	T
69	Epicatequina	4	E, N, V, X
70	Epigallocatequina	1	E
71	Eriodictiol	1	T
72	Éster feniletílico del ácido caféico	2	T, AJ
73	Fisetina	1	C
74	Floroglucinol	2	Z, AM
75	Galangina	13	B, E, I, K, L, M, T, U, AD, AJ, AL, AN, AQ
76	Galato de epigallocatequina	1	E

77	Galato de galocatequina	1	E
78	Galocatequina	2	E, V
79	Genisteina	1	AL
80	Hesperetina	10	A,C,E, M,S, V, AK, AC,AD, AF, AN
81	Isoramnetina	5	T, U, W, Z, AD
82	Isoramnetina-3-O-hexosil(1-6)hexósido	1	AN
83	Isoramnetina-3-O-rutinosido-7-O-glucósido	1	AN
84	Isoramnetina-3(2,6-diramnosa) hexosa	1	J
85	Isoramnetina-3(2 hexosa) hexosa	1	J
86	Isoramnetina-3(2 ramnosa) hexosa	1	J
87	Isoramnetina-3(X hexosa) hexosa	1	J
88	Isoramnetina-3 (2 hexosa,6 ramnosa) hexosa	1	J
89	Isoramnetina-3(2 hexosa,3 ramnosa) hexosa	1	J
90	Isoramnetina-3-O-hexosi(1-2)hexósido	1	AN
91	Isoramnetina-3-O-neohesperidósido	1	AN
92	Isosakuranetina	1	AN
93	Kaempferido	1	T
94	Kaempferol	21	A, B, C, E, I, K, L, M, S, T, Z, AA, AC, AD, AL, AI, AJ, AN, AM, AQ
95	Kaempferol-3(2 hexosa) hexosa	1	J
96	Kaempferol-3(2 hexosa,3 ramnosa) hexosa	1	J
97	Kaempferol-3 (2 hexosa,6 ramnosa) hexosa	1	J
98	Kaempferol-3-4-di-O-hexosido	1	AN
99	Kaempferol-3(2 ramnosa) hexosa	1	J
100	Kaempferol-3(2 pentosa)hexosa	1	J
101	Kaempferol-3(X pentosa)hexosa	1	J
102	Kaempferol-3-O-hexosi(1-2)hexósido	1	AN
103	Kaempferol-3-O-neohesperidósido	1	AN
104	Kaempferol-3-O-rutinósido	2	H, AN

105	Kaempferol-7-O-ramnósido	1	AN
106	Kaempferol-3-O-rutinósido-7-O-ramnósido	1	AN
107	Luteolina	10	K, I, L, M, T, AC, AB, AD, AI, AN
108	Metilbenzaldehído	1	O
109	4-metilpirocatecol	1	AM
110	Metilquercetina	1	AN
111	Metilsiríngico Metil	8	F, H, O, Q, R, AB, AG, AO
112	Metoxi-crisina	1	T
113	8- metoxikaempferol -3-O- hexosi (1-2) hexósido	1	AN
114	8- metoxikaempferol-3-O-neohesperidósido	1	AN
115	8-metoxikaempferol	1	Z
116	Miricetina	13	A, C, D, K, L S, T, M, V, AI, AL, AM , AN
117	Naringenina	9	A, C, K, L, S, W, AC, AD, AI
118	Naringina	6	A, S, K, L, AC, AI
119	Pinobanksina	10	B, E, H, I, M, T, U, AJ, AN, AQ
120	Pinocembrina	11	B, E, H, I, M, T, U, X, AJ, AN, AQ
121	Pinobanksina-3-O-acetato	1	T
122	Pinobanksina-3-O-butirato	1	T
123	Pinobanksina-3-O-hexanoato	1	T
124	Pinobanksina-5-metiléter	2	H, T
125	Pinobanksina-5-metiléter-3-O-acetato	1	T
126	Pinobanksina-3-O-pentenoato	1	T
127	Pinobanksina-3-O-propionato	1	T
128	Pinostrobina	2	E, T
129	Prenil cafeato	1	T
130	Quercetina	22	B, C, D, E, I, K, L, M, T, U, V, W, X, Z, AD, AF, AI, AN, AM, AL, AJ, AQ
131	Quercetina-trihexosa	1	J
132	Quercetina-3-O-hexosi(1-2)hexósido	1	AN

133	Quercetina hexosil rutinósido	1	H
134	Quercetina bis-metilada	1	T
135	Quercetina ramnosil-hexosil-ramnósido	1	H
136	Quercetina-O-ramnósido	1	Z
137	Quercetina-3(2 ramnosa) hexosa	1	J
138	Quercetina-3 (2,6-diramnosa) hexosa	1	J
139	Quercetina-3-O-rutinósido-7-O-ramnosido	1	AN
140	Quercetina-3(2 hexosa) hexosa	1	J
141	Quercetina-3(6 ramnosa) hexosa	1	J
142	Quercetina-3(2 pentosa) hexosa	1	J
143	Quercetina -3-O-rutinósido	3	H, T, AN
144	Ramnetina	1	T
145	Resveratrol	1	E
146	Rutina	7	B, D, I, N, V, Y, AI
147	Sakuranetina	1	T
148	Tectocrisina	2	T, AN
149	Timol	1	I
150	Tricetina	1	AN

[A] Moniruzzaman et al., 2016; [B] Zhao et al., 2016; [C] Campillo et al., 2015; [D] Das et al., 2015; [E] Gašić et al., 2015; [F] Jerković et al., 2015; [G] Kus et al., 2015; [H] Mannina et al., 2015; [I] Petretto et al., 2015; [J] Truchado et al., 2015; [K] Wabaidur et al., 2015; [L] Badjah Hadj et al., 2014; [M] Campone et al., 2014; [N] Habib et al., 2014; [O] Jerković et al., 2014; [P] Jerković et al., 2014; [Q] Kuš et al., 2014; [R] Kuš et al., 2014; [S] Moniruzzaman et al., 2014; [T] Kečkeš et al., 2013; [U] Pasini et al., 2013; [V] Perna et al., 2013; [W] Sarmiento et al., 2013; [X] Silici et al., 2014; [Y] Zhang et al., 2013; [Z] Alvarez-Suárez et al., 2012; [AA] Kumazawa et al., 2012; [AB] Oelschlaegel et al., 2012; [AC] Khalil et al., 2011; [AD] Petrus et al., 2011; [AE] Tuberoso et al., 2011; [AF] Reza et al., 2010; [AG] Stephens et al., 2010; [AH] Tuberoso et al., 2010; [AI] Biesaga et al., 2009; [AJ] Jaganathan et al., 2009; [AK] Liang et al., 2009; [AL] Pichichero et al., 2009; [AM] Trautvetter et al., 2009; [AN] Truchado et al., 2009; [AO] Tuberoso et al., 2009; [AP] Dimitrova et al., 2007; [AQ] Wang et al., 2004.

ANEXO II

Factores	Niveles
A. Origen	a ₁ Huajuapán de León a ₂ Putla Villa de Guerrero
B. Temperatura (°C)	b ₁ 30 b ₂ 40 b ₃ 50
C. Tiempo (semanas)	c ₁ Primera c ₂ Segunda c ₃ Tercera c ₄ Cuarta c ₅ Quinta

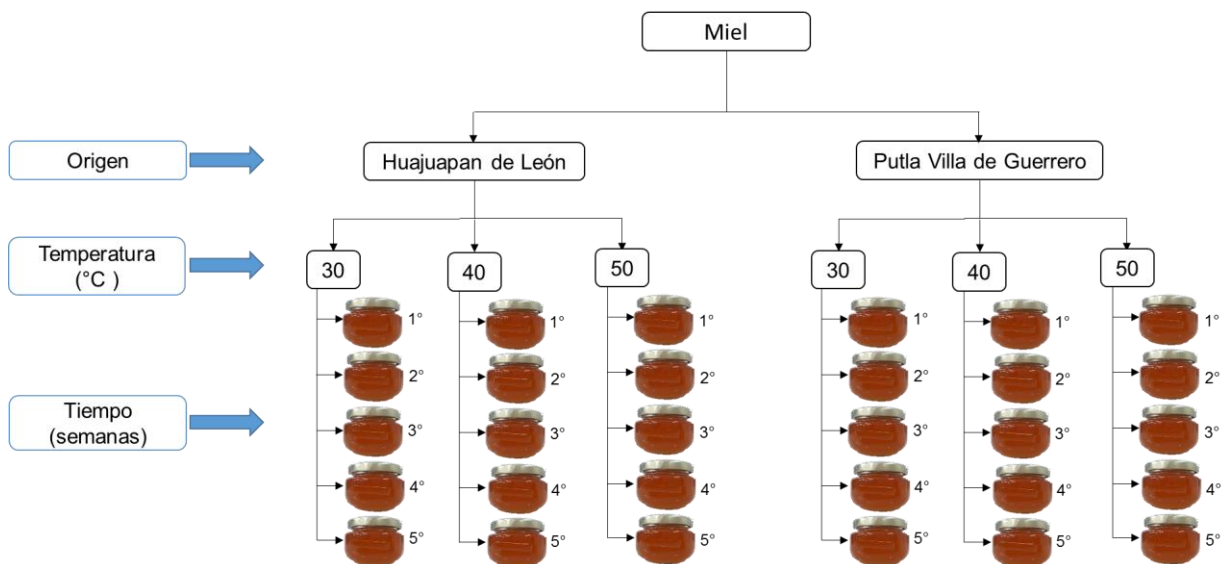


Figura A1. Diseño experimental para las condiciones de vida acelerada.

ANEXO II continuación

Factores	Niveles
A. Origen	a ₁ Huajuapán de León a ₂ Putla Villa de Guerrero
B. Tiempo (semanas)	b ₁ Cuatro b ₂ Ocho b ₃ Doce b ₄ Dieciséis b ₅ Veinte b ₆ Veinticuatro b ₇ Veintiocho b ₈ Treinta y dos

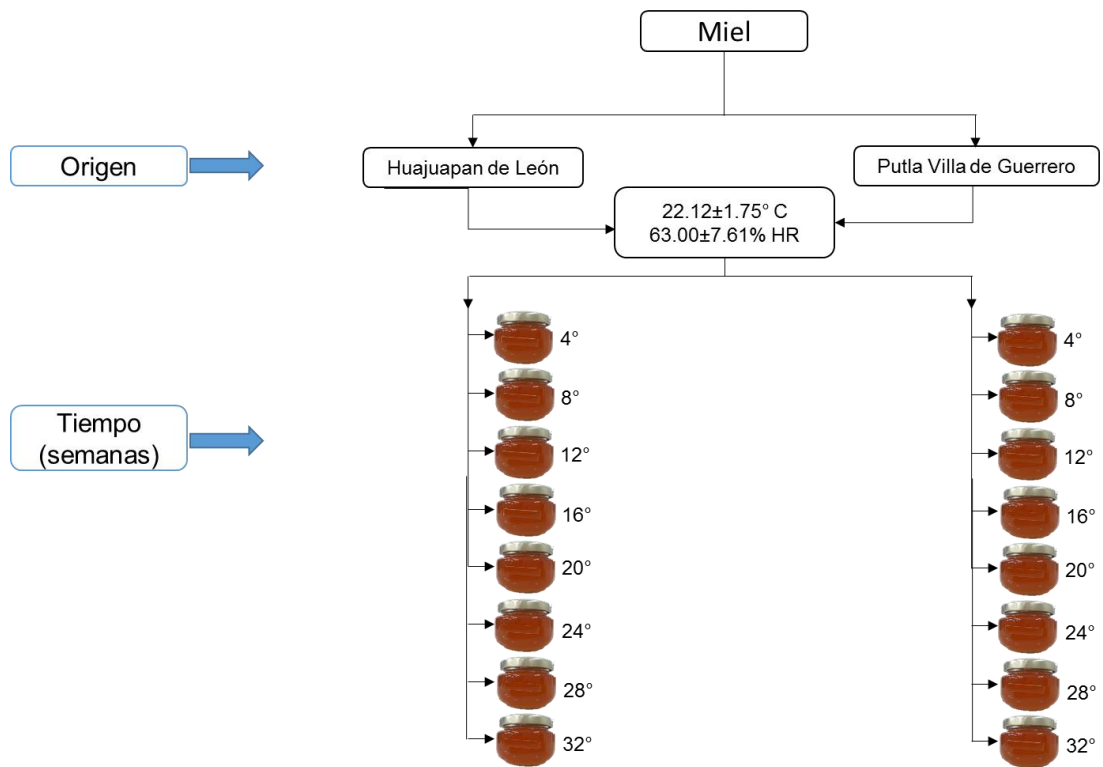


Figura A2. Diseño experimental para almacenamiento a condiciones ambiente.

ANEXO III

Tabla A2. Estimación del tiempo de estabilidad para la miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero a diferentes condiciones (ambiente y prueba acelerada).

Parámetros	Tiempo (semanas)	Municipio							
		Huajuapán de León				Putla Villa de Guerrero			
		Temperatura (°C)				Temperatura (°C)			
		22.12 ± 1.75	30	40	50	22.12 ± 1.75	30	40	50
	0	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
• Porcentaje de humedad	1		✓	✓	✓		✓	✓	✓
• pH	2		✓	✓	✓		✓	✓	✓
• Color	3		✓	✓	✓		✓	✓	✓
• Conductividad eléctrica	4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
• Índice de diastasa	5		✓	✓	✓		✓	✓	✓
• Concentración de HMF	8	✓				✓			
• Contenido de Polifenoles	12	✓				✓			
• Actividad antioxidante	16	✓				✓			
	20	✓				✓			
	24	✓				✓			
	28	✓				✓			
	32	✓				✓			

ANEXO IV

Tabla A3. Porcentaje de humedad (g/100g_{miel}) para la miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca a 70 % HR.

Semana	Huajuapán			Putla		
	T 30 °C	T 40°C	T 50°C	T 30 °C	T 40°C	T 50°C
0	18.93 ± 0.06 ^{bD}	18.93 ± 0.06 ^{bC}	18.93 ± 0.06 ^{bB}	19.17 ± 0.06 ^{aC}	19.17 ± 0.06 ^{aB}	19.17 ± 0.06 ^{aD}
1	20.07 ± 0.06 ^{aB}	19.37 ± 0.15 ^{bB}	18.70 ± 0.10 ^{dB}	19.20 ± 0.00 ^{cC}	19.20 ± 0.00 ^{cB}	19.27 ± 0.06 ^{bcC}
2	20.10 ± 0.00 ^{bB}	19.37 ± 0.06 ^{cB}	19.53 ± 0.06 ^{bcA}	19.20 ± 0.00 ^{cC}	20.67 ± 0.75 ^{aA}	19.57 ± 0.06 ^{bcA}
3	20.80 ± 0.00 ^{aA}	19.40 ± 0.00 ^{bcB}	19.13 ± 0.15 ^{eAB}	19.30 ± 0.00 ^{cdB}	19.20 ± 0.00 ^{deB}	19.47 ± 0.06 ^{bB}
4	20.10 ± 0.00 ^{aB}	19.60 ± 0.17 ^{bA}	18.17 ± 0.12 ^{dC}	19.50 ± 0.00 ^{bcA}	19.40 ± 0.00 ^{cB}	18.03 ± 0.06 ^{dF}
5	19.87 ± 0.23 ^{aC}	19.30 ± 0.00 ^{abB}	19.10 ± 0.69 ^{abAB}	19.20 ± 0.00 ^{abC}	19.63 ± 0.64 ^{abB}	18.90 ± 0.00 ^{bE}

T: temperatura. n=3. Desviación estándar ±.

^{a-e}Medias en la misma fila con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$; prueba de Duncan).

^{A-E}Medias en la misma columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$; prueba de Duncan).

Tabla A4. Conductividad eléctrica (μS) de miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca a 70 % HR.

Semana	Huajuapán			Putla		
	T 30 °C	T 40°C	T 50°C	T 30 °C	T 40°C	T 50°C
0	340.00 ± 0.00 ^{aD}	340.00 ± 0.00 ^{aD}	340.00 ± 0.00 ^{aE}	193.00 ± 0.00 ^{bF}	193.00 ± 0.00 ^{bF}	193.00 ± 0.00 ^{bE}
1	362.33 ± 4.62 ^{dA}	366.00 ± 0.00 ^{cdB}	367.00 ± 0.00 ^{cB}	468.67 ± 2.31 ^{aA}	466.00 ± 1.00 ^{aA}	451.33 ± 2.08 ^{bA}
2	362.33 ± 1.15 ^{dA}	366.67 ± 1.53 ^{cB}	365.00 ± 1.00 ^{cdC}	435.67 ± 4.04 ^{aB}	433.00 ± 1.73 ^{aB}	426.00 ± 1.73 ^{bB}
3	358.33 ± 0.58 ^{fB}	379.33 ± 0.58 ^{dA}	367.00 ± 0.00 ^{eA}	420.67 ± 1.15 ^{bC}	394.00 ± 3.46 ^{cE}	422.33 ± 0.58 ^{aC}
4	354.33 ± 0.58 ^{eC}	361.67 ± 0.58 ^{dC}	366.33 ± 0.58 ^{cB}	412.33 ± 0.58 ^{aD}	408.33 ± 0.58 ^{bC}	412.33 ± 0.58 ^{aD}
5	362.33 ± 1.15 ^{dA}	361.67 ± 0.58 ^{dC}	362.33 ± 0.58 ^{dD}	398.67 ± 0.58 ^{cE}	402.00 ± 1.73 ^{bD}	413.67 ± 0.58 ^{aD}

T: temperatura. n=3. Desviación estándar ±.

^{a-f}Medias en la misma fila con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$; prueba de Duncan).

^{A-F}Medias en la misma columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$; prueba de Duncan).

Tabla A5. Concentración de hidroximetilfurfural (mg/kg_{miel}) para la miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca a 70 % HR.

Semana	Huajuapán			Putla		
	T 30 °C	T 40°C	T 50°C	T 30 °C	T 40°C	T 50°C
0	7.87 ± 0.19 ^{aD}	7.87 ± 0.19 ^{aF}	7.87 ± 0.19 ^{aF}	4.36 ± 0.44 ^{bB}	4.36 ± 0.44 ^{bF}	4.36 ± 0.44 ^{bF}
1	12.08 ± 0.70 ^{fCD}	23.63 ± 1.66 ^{cE}	38.81 ± 0.52 ^{aE}	13.72 ± 0.08 ^{eA}	16.73 ± 0.83 ^{dE}	34.59 ± 0.80 ^{bE}
2	15.95 ± 0.71 ^{eBC}	37.50 ± 0.77 ^{cD}	92.27 ± 3.31 ^{aD}	14.24 ± 0.98 ^{eA}	21.34 ± 1.00 ^{dD}	79.00 ± 2.60 ^{bD}
3	18.08 ± 0.33 ^{eB}	47.22 ± 1.27 ^{cC}	184.16 ± 12.67 ^{aC}	15.83 ± 5.78 ^{eA}	30.87 ± 0.59 ^{dC}	157.29 ± 6.37 ^{bC}
4	19.49 ± 7.18 ^{eB}	67.01 ± 0.55 ^{cB}	283.93 ± 15.73 ^{aB}	16.30 ± 2.19 ^{eA}	39.19 ± 1.99 ^{dB}	205.91 ± 4.60 ^{bB}
5	34.91 ± 0.73 ^{eA}	71.31 ± 0.62 ^{cA}	340.39 ± 8.81 ^{aA}	18.50 ± 0.10 ^{fA}	52.58 ± 1.06 ^{dA}	300.94 ± 3.02 ^{bA}

T: temperatura. n=3. Desviación estándar ±.

^{a-f} Medias en la misma fila con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$; prueba de Duncan).

^{A,F} Medias en la misma columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$; prueba de Duncan).

Tabla A6. Índice de diastasa (UD) para la miel Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca a 70 % HR.

Semana	Huajuapán			Putla		
	T 30 °C	T 40°C	T 50°C	T 30 °C	T 40°C	T 50°C
0	75.93 ± 1.35 ^{bA}	75.93 ± 1.35 ^{bA}	75.93 ± 1.35 ^{bA}	112.71 ± 0.88 ^{aA}	112.71 ± 0.88 ^{aA}	112.71 ± 0.88 ^{aA}
1	62.40 ± 2.25 ^{cC}	65.75 ± 0.01 ^{bB}	75.41 ± 2.41 ^{aA}	38.75 ± 1.38 ^{dC}	60.30 ± 0.75 ^{cB}	61.56 ± 0.05 ^{cB}
2	64.55 ± 1.65 ^{aC}	63.59 ± 2.46 ^{aB}	42.93 ± 0.23 ^{bB}	39.72 ± 0.25 ^{cBC}	38.37 ± 0.08 ^{cC}	34.08 ± 0.13 ^{dC}
3	67.16 ± 0.05 ^{aB}	40.59 ± 0.87 ^{bC}	32.73 ± 0.22 ^{dC}	41.12 ± 0.84 ^{bB}	37.01 ± 0.39 ^{cC}	21.26 ± 0.12 ^{eD}
4	63.32 ± 0.43 ^{aC}	40.43 ± 0.02 ^{bC}	19.67 ± 0.24 ^{dD}	40.23 ± 0.18 ^{bB}	34.86 ± 0.76 ^{cC}	14.91 ± 0.08 ^{eE}
5	64.98 ± 1.38 ^{aBC}	39.78 ± 0.95 ^{bC}	18.23 ± 0.08 ^{dD}	39.80 ± 0.07 ^{bBC}	28.46 ± 4.94 ^{cD}	13.09 ± 0.01 ^{eF}

En la escala de Gothe la unidad de diastasa (UD) se define como: mililitros de solución de almidón al 1% hidrolizada/gramo de miel/h a 40°C.

T= temperatura. n=3. Desviación estándar ±.

^{a-e} Medias en la misma fila con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$; prueba de Duncan).

^{A,F} Medias en la misma columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$; prueba de Duncan).

Tabla A7. pH de miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca a 70 % HR.

Semana	Huajuapán			Putla		
	T 30 °C	T 40°C	T 50°C	T 30 °C	T 40°C	T 50°C
0	3.87 ± 0.01 ^{aB}	3.87 ± 0.01 ^{aA}	3.87 ± 0.01 ^{aA}	3.74 ± 0.03 ^{bD}	3.74 ± 0.03 ^{bC}	3.74 ± 0.03 ^{bC}
1	3.78 ± 0.00 ^{eC}	3.74 ± 0.02 ^{fB}	3.85 ± 0.01 ^{cAB}	3.87 ± 0.00 ^{bA}	3.81 ± 0.00 ^{dB}	3.92 ± 0.01 ^{aB}
2	3.88 ± 0.01 ^{bA}	3.75 ± 0.01 ^{dB}	3.83 ± 0.01 ^{cBC}	3.78 ± 0.01 ^{dC}	3.83 ± 0.03 ^{cAB}	3.92 ± 0.00 ^{aB}
3	3.75 ± 0.01 ^{dC}	3.76 ± 0.01 ^{dB}	3.81 ± 0.01 ^{cC}	3.83 ± 0.01 ^{bB}	3.82 ± 0.00 ^{bcAB}	3.90 ± 0.01 ^{aB}
4	3.77 ± 0.01 ^{cBC}	3.85 ± 0.07 ^{bA}	3.83 ± 0.03 ^{bcBC}	3.85 ± 0.01 ^{bAB}	3.85 ± 0.01 ^{bAB}	3.97 ± 0.06 ^{aA}
5	3.77 ± 0.03 ^{cBC}	3.78 ± 0.01 ^{cB}	3.72 ± 0.01 ^{dD}	3.86 ± 0.01 ^{bAB}	3.86 ± 0.03 ^{bA}	3.89 ± 0.01 ^{aB}

T= temperatura. n=3. Desviación estándar ±.

^{a-f} Medias en la misma fila con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$; prueba de Duncan).

^{A,D} Medias en la misma columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$; prueba de Duncan).

Tabla A8. Cambios de color total (ΔE) para la miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca a 70 % HR.

Semana	Huajuapán			Putla		
	T 30 °C	T 40°C	T 50°C	T 30 °C	T 40°C	T 50°C
0	107.99 ± 0.69 ^{aA}	107.99 ± 0.69 ^{aA}	107.99 ± 0.69 ^{aC}	4.65 ± 0.01 ^{bF}	4.65 ± 0.01 ^{bC}	4.65 ± 0.01 ^{bF}
1	36.50 ± 0.05 ^{fC}	107.24 ± 0.21 ^{bA}	110.76 ± 0.36 ^{aB}	69.32 ± 2.70 ^{eB}	94.07 ± 0.52 ^{dA}	98.79 ± 0.23 ^{cD}
2	47.70 ± 1.24 ^{fB}	109.27 ± 0.07 ^{aA}	106.72 ± 0.69 ^{bD}	72.63 ± 0.02 ^{eA}	90.73 ± 0.38 ^{dB}	95.90 ± 0.53 ^{cE}
3	29.59 ± 3.72 ^{fD}	107.68 ± 0.12 ^{bA}	112.42 ± 0.75 ^{aA}	55.68 ± 1.85 ^{eC}	93.50 ± 0.10 ^{dA}	100.72 ± 0.26 ^{cC}
4	20.28 ± 0.49 ^{fE}	100.44 ± 2.13 ^{cB}	112.18 ± 0.12 ^{aA}	32.53 ± 0.48 ^{eE}	91.33 ± 1.06 ^{dB}	103.27 ± 0.08 ^{bA}
5	26.66 ± 0.39 ^{fD}	109.26 ± 1.72 ^{aA}	105.99 ± 0.68 ^{bD}	41.47 ± 0.16 ^{eD}	94.16 ± 1.45 ^{dA}	102.40 ± 0.39 ^{cB}

T= temperatura. n=3. Desviación estándar ±.

^{a-f} Medias en la misma fila con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$; prueba de Duncan).

^{A,F} Medias en la misma columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$; prueba de Duncan).

Tabla A9. Contenido de Polifenoles Totales (mg EAG/100g_{miel}) presente en miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca a 70 % HR.

Semana	Huajuapán			Putla		
	T 30 °C	T 40°C	T 50°C	T 30 °C	T 40°C	T 50°C
0	33.49 ± 3.19 ^{aAB}	33.49 ± 3.19 ^{aAB}	33.49 ± 3.19 ^{aE}	35.48 ± 2.57 ^{aA}	35.48 ± 2.58 ^{aBC}	35.48 ± 2.58 ^{aC}
1	31.03 ± 1.75 ^{cB}	38.99 ± 2.15 ^{aA}	36.06 ± 0.77 ^{abDE}	32.41 ± 0.46 ^{bcAB}	37.90 ± 3.40 ^{aAB}	38.61 ± 3.81 ^{aC}
2	38.86 ± 4.51 ^{bcA}	30.54 ± 8.50 ^{cAB}	40.80 ± 2.98 ^{abBC}	36.52 ± 3.37 ^{bcA}	31.25 ± 3.68 ^{bcC}	48.44 ± 5.12 ^{aB}
3	33.61 ± 1.21 ^{cAB}	28.74 ± 1.40 ^{cdB}	43.65 ± 1.72 ^{abB}	27.61 ± 1.65 ^{dC}	41.53 ± 3.79 ^{ba}	47.32 ± 4.76 ^{aB}
4	29.72 ± 1.62 ^{dB}	36.81 ± 4.61 ^{cAB}	50.77 ± 1.04 ^{ba}	35.02 ± 1.34 ^{ca}	37.62 ± 2.15 ^{cAB}	60.52 ± 1.05 ^{aA}
5	28.14 ± 3.54 ^{dB}	35.71 ± 3.64 ^{cAB}	38.33 ± 3.23 ^{bcCD}	28.83 ± 3.19 ^{dBC}	42.74 ± 1.58 ^{ba}	50.52 ± 1.44 ^{aB}

T= temperatura. n=3. Desviación estándar ±.

^{a-d} Medias en la misma fila con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$; prueba de Duncan).

^{A,E} Medias en la misma columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$; prueba de Duncan).

Tabla A10. Actividad Antioxidante presente en miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca a 70 % HR.

Semana	Huajuapán			Putla		
	T 30 °C	T 40°C	T 50°C	T 30 °C	T 40°C	T 50°C
0	11.83 ± 1.17 ^{aA}	11.83 ± 0.17 ^{aB}	11.83 ± 1.17 ^{aC}	9.89 ± 0.76 ^{ba}	9.89 ± 0.76 ^{bb}	9.89 ± 0.76 ^{bc}
1	3.73 ± 0.67 ^{cBC}	13.94 ± 0.14 ^{aA}	13.16 ± 1.50 ^{aC}	5.03 ± 0.24 ^{cC}	14.89 ± 0.03 ^{aA}	10.21 ± 1.97 ^{bc}
2	4.29 ± 0.21 ^{cB}	7.40 ± 0.19 ^{bc}	19.01 ± 0.88 ^{aA}	6.54 ± 1.15 ^{bb}	7.35 ± 0.74 ^{bc}	18.27 ± 0.87 ^{aB}
3	2.90 ± 0.39 ^{cBC}	5.38 ± 0.94 ^{cd}	15.66 ± 0.50 ^{bb}	3.20 ± 0.36 ^{cd}	6.03 ± 0.51 ^{cd}	25.16 ± 3.84 ^{aA}
4	3.58 ± 0.73 ^{dB}	7.29 ± 0.12 ^{cC}	9.77 ± 0.57 ^{bd}	2.54 ± 0.37 ^{ed}	7.43 ± 0.22 ^{cC}	10.98 ± 0.54 ^{aC}
5	2.50 ± 0.91 ^{bc}	3.64 ± 0.42 ^{be}	18.89 ± 0.49 ^{aA}	2.49 ± 1.20 ^{bd}	3.32 ± 0.11 ^{be}	20.04 ± 1.04 ^{aB}

T= temperatura. n=3. Desviación estándar ±.

^{a-e} Medias en la misma fila con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$; prueba de Duncan).

^{A,E} Medias en la misma columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$; prueba de Duncan).

ANEXO V

Tabla A11. Parámetros fisicoquímicos de miel cosechada en Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca a 22.12±1.75°C y 63.00±7.6 1 % HR.

	Origen	Tiempo (Semanas)								
		0	4	8	12	16	20	24	28	32
Hidroximetilfurfural (mg/kg _{miel})	Huajuapán	7.87±0.19 ^{eA}	12.25±0.62 ^{dA}	14.79±1.79 ^{cA}	14.72±0.89 ^{cA}	15.21±2.39 ^{cA}	15.20±1.48 ^{cA}	15.45±0.09 ^{cA}	23.69±0.66 ^{bA}	26.71±0.59 ^{aA}
	Putla	4.36±0.44 ^{eB}	5.65±0.36 ^{eB}	9.29±2.20 ^{dB}	9.65±0.16 ^{dB}	10.36±0.75 ^{cdB}	12.02±0.25 ^{bcB}	13.74±1.70 ^{abA}	15.43±1.37 ^{aB}	15.91±1.24 ^{aB}
Índice de Diastasa (UD)	Huajuapán	75.93±1.35 ^{aB}	71.45±1.23 ^{bA}	67.05±0.79 ^{cA}	66.56±0.64 ^{cA}	66.72±0.83 ^{cA}	66.03±0.09 ^{cA}	65.66±0.03 ^{cA}	65.50±2.81 ^{cA}	65.55±1.36 ^{cA}
	Putla	112.71±0.88 ^{aA}	62.32±1.73 ^{bB}	63.93±5.21 ^{bA}	41.34±0.37 ^{cB}	41.07±0.48 ^{cB}	40.43±1.12 ^{cB}	40.31±0.87 ^{cB}	40.66±0.57 ^{cB}	41.06±0.70 ^{cB}
pH	Huajuapán	3.87±0.01 ^{aA}	3.74±0.01 ^{eB}	3.81±0.01 ^{cB}	3.81±0.03 ^{cA}	3.76±0.05 ^{deA}	3.82±0.03 ^{cA}	3.79±0.01 ^{cdA}	3.82±0.01 ^{bcB}	3.86±0.01 ^{abA}
	Putla	3.74±0.03 ^{fB}	3.79±0.00 ^{eA}	3.85±0.00 ^{bA}	3.79±0.01 ^{eA}	3.81±0.01 ^{cdeA}	3.80±0.01 ^{deA}	3.82±0.03 ^{cdA}	3.84±0.00 ^{bcA}	3.89±0.02 ^{aA}
Conductividad Eléctrica (μS)	Huajuapán	340.00±0.00 ^{eA}	371.67±1.15 ^{bB}	379.33±0.58 ^{aB}	364.33±0.58 ^{dB}	367.00±0.00 ^{cB}	371.00±0.00 ^{bB}	367.67±0.58 ^{cB}	368.33±0.58 ^{cB}	363.67±1.53 ^{dB}
	Putla	193±0.00 ^{gB}	403.33±1.53 ^{aA}	394.00±3.46 ^{bA}	391.00±0.00 ^{cA}	385.67±0.58 ^{dA}	379.00±0.00 ^{eA}	372.67±0.58 ^{fA}	374.00±0.00 ^{fA}	378.00±0.00 ^{eA}
% Humedad	Huajuapán	18.9±0.06 ^{eB}	19.9±0.06 ^{abA}	20.0±0.06 ^{aB}	19.8±0.49 ^{abA}	19.9±0.00 ^{abB}	19.7±0.21 ^{abA}	19.3±0.00 ^{cdB}	19.2±0.20 ^{deB}	19.6±0.10 ^{bcB}
	Putla	19.2±0.06 ^{dA}	20.4±0.44 ^{bA}	20.9±0.06 ^{aA}	19.4±0.12 ^{dA}	20.5±0.06 ^{bA}	20.0±0.00 ^{cA}	20.7±0.06 ^{abA}	19.8±0.12 ^{cA}	20.0±0.06 ^{cA}
Color (ΔE)	Huajuapán	107.99±0.69 ^{aA}	29.59±0.54 ^{bB}	19.71±0.79 ^{cB}	11.49±0.11 ^{dB}	10.40±0.42 ^{eB}	7.98±0.35 ^{fA}	7.66±0.09 ^{fA}	6.50±0.56 ^{gA}	8.33±0.31 ^{fA}
	Putla	4.65±0.01 ^{fB}	84.18±0.19 ^{aA}	71.81±0.94 ^{bA}	37.74±0.84 ^{cA}	19.05±0.98 ^{dA}	7.15±0.43 ^{eA}	7.16±0.47 ^{eA}	4.92±0.02 ^{fB}	5.64±0.77 ^{fB}

En la escala de Gothe la unidad de diastasa (UD) se define como: mililitros de solución de almidón al 1% hidrolizada/gramo de miel/h a 40°C. μS=micro siemens. ΔE=cambio de color total. n=3.

^{a-g}Medias en la misma fila con diferentes letras son significativamente diferentes ($p<0.05$; prueba de Duncan).

^{A,B}Medias en la misma columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($p<0.05$; prueba de Duncan) para cada variable.

Tabla A12. Contenido de Polifenoles Totales y Actividad Antioxidante determinadas para miel cosechada en Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca a 22.12±1.75°C y 63.00±7.61 % HR.

		Tiempo (Semanas)								
Origen		0	4	8	12	16	20	24	28	32
CPT (mgEAG/100g _{miel})	Huajuapán	33.49±3.19 ^{bcA}	41.87±1.08 ^{aA}	32.44±2.27 ^{cdA}	31.16±1.07 ^{cdB}	28.35±1.20 ^{deA}	24.63±1.00 ^{eA}	37.48±1.93 ^{abA}	31.15±3.02 ^{cdA}	35.61±5.25 ^{bcA}
	Putla	35.48±2.58 ^{abA}	38.49±0.47 ^{aB}	36.84±3.05 ^{aA}	36.46±1.66 ^{abA}	31.24±3.56 ^{bcA}	28.22±3.91 ^{cA}	36.72±2.99 ^{aA}	33.04±1.96 ^{abcA}	35.30±3.61 ^{abA}
AA (% Inhibición)	Huajuapán	11.83±1.17 ^{aA}	9.31±0.30 ^{bA}	7.80±0.03 ^{cB}	5.26±0.66 ^{dA}	2.39±1.11 ^{efB}	3.25±0.18 ^{eA}	2.42±0.13 ^{efA}	3.23±0.29 ^{eA}	1.07±0.50 ^{gA}
	Putla	9.89±0.76 ^{aA}	7.90±0.72 ^{bB}	8.74±0.21 ^{bA}	5.23±0.64 ^{cA}	2.38±0.30 ^{eA}	3.71±0.30 ^{dA}	2.35±0.19 ^{eA}	4.95±1.15 ^{cA}	1.46±0.31 ^{eA}

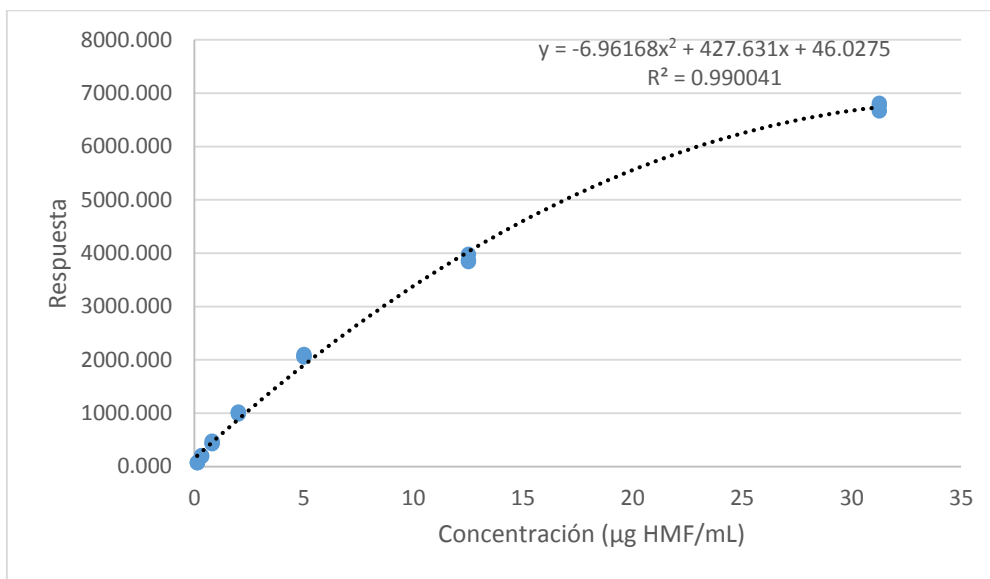
CPT: Contenido de polifenoles totales. AA: Actividad Antioxidante. n=3.

^{a-h}Medias en la misma fila con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$; prueba de Duncan).

^{A,B}Medias en la misma columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$; prueba de Duncan) para cada variable.

ANEXO VI

Curva de calibración para la cuantificación de hidroximetilfurfural por UHPLC-QToF.



ANEXO VII

Tabla A13. Polifenoles identificados en muestras de miel de Huajuapán de León almacenadas a 50°C y 70 % HR.

Compuesto	Masa	Aducto	m/z	t _R (min)	Error (ppm)	Semana						
						0	1	2	3	4	5	
Isovitexina 7-O-glucósido-2''-O-ramnósido	740.2076	[M-H ₂ O-H] ⁻	721.1979	1.20	0			x		x		
Apigenina 7-rutinósido-4'-glucósido	740.2076	[M-H ₂ O-H] ⁻	721.1979	1.20	0			x		x		
Apigenina 7-O-(2G-ramnosil)gentiobiosido	740.2076	[M-H ₂ O-H] ⁻	721.1979	1.20	0			x		x		
Kaempferol 3-ramnínósido	740.2076	[M-H ₂ O-H] ⁻	721.1979	1.20	0			x		x		
Mauritianin	740.2076	[M-H ₂ O-H] ⁻	721.1979	1.20	0			x		x		
Robinin	740.2076	[M-H ₂ O-H] ⁻	721.1979	1.20	0			x		x		
Isoramnetina 3-ramnosil-(1->6)-[ramnosil-(1->2)-(3''-(E)-p-cumaroilgalactósido)-7-ramnósido	1062.306	[M-H] ⁻	1061.3117	1.20	2				x		x	
6-Hidroxiluteolina 5,6,3',4'-tetrametil éter 7-celobiósido	682.2057	[M-H] ⁻	681.2066	1.22	4					x	x	x
Quercetina 5,7,3',4'-tetrametil éter 3-rutinósido	666.2112	[M-H] ⁻	665.2119	1.23	4					x	x	x
Cassiaoccidentalín A	560.1470	[M-H] ⁻	559.1464	1.24	1	x	x					
Apimaisina	560.1470	[M-H] ⁻	559.1464	1.24	1	x	x					
Puerarina 4'-O-glucósido	578.1581	[M-H ₂ O-H] ⁻	559.1464	1.24	2	x	x					
Isovitexina 2''-O-ramnósido	578.1581	[M-H ₂ O-H] ⁻	559.1464	1.24	2	x	x					
Violantina	578.1581	[M-H ₂ O-H] ⁻	559.1464	1.24	2	x	x					
Isovitexina 7-O- ramnósido	578.1581	[M-H ₂ O-H] ⁻	559.1464	1.24	2	x	x					
Apigenina 7- rutinósido	578.1581	[M-H ₂ O-H] ⁻	559.1464	1.24	2	x	x					
Isocitisósido 3''-O-beta-D-xilopiranosido	578.1581	[M-H ₂ O-H] ⁻	559.1464	1.24	2	x	x					
Acacetina 7-glucosil-(1->4)-xilósido	578.1581	[M-H ₂ O-H] ⁻	559.1464	1.24	2	x	x					
Kaempferide 3- ramnósido-7-xilósido	578.1581	[M-H ₂ O-H] ⁻	559.1464	1.24	2	x	x					
Kaempferitrina	578.1581	[M-H ₂ O-H] ⁻	559.1464	1.24	2	x	x					
Patuletina 7-[6''-(2-metilbutiril)-glucósido]	578.1581	[M-H ₂ O-H] ⁻	559.1464	1.24	2	x	x					
Acacetina 7-(2''-acetilglucósido)	488.1277	[M-H ₂ O-H] ⁻	469.1149	1.27	3	x	x			x		
Dicloriparísida C	622.1845	[M-H ₂ O-H] ⁻	603.1733	1.31	3	x			x			x
Embinoidina	622.1845	[M-H ₂ O-H] ⁻	603.1733	1.31	3	x			x			x
Pectolinarigenina 7- rutinósido	622.1845	[M-H ₂ O-H] ⁻	603.1733	1.31	3	x			x			x

Kaempferol 7,4'-dimetil éter 3-neohesperidósida	622.1845	[M-H ₂ O-H] ⁻	603.1733	1.31	3	x	x			x
Pelargonidina 3-[6-(3-glucosilcafeil) glucósido]	756.1830	[M-2H] ²⁻	377.0865	1.85	3		x	x	x	x
Perillanina	756.1830	[M-2H] ²⁻	377.0865	1.85	3		x	x	x	x
Isovitexina 7-O-(6'''-cafeoil)-beta-D-glucopiranosido	756.1830	[M-2H] ²⁻	377.0865	1.85	3		x	x	x	x
Orientina 2''-O-xilósido-6''- ácido ferúlico	756.1830	[M-2H] ²⁻	377.0865	1.85	3		x	x	x	x
Quercetina 3-(2G-(E)-p-cumaroilrutinosido)	756.1830	[M-2H] ²⁻	377.0865	1.85	3		x	x	x	x
Kaempferol 3-(6''-p-cumarilglucósido)-7-glucósido	756.1830	[M-2H] ²⁻	377.0865	1.85	3		x	x	x	x
Pinocembrina 7-apiosilo-(1->5)-apiosilo-(1->2)-glucósido	682.2050	[M-H] ⁻	681.2059	1.86	3		x	x		x
Pelargonidina 3-[6'''-(3-glucosilcafeil)soporósido]-5-glucósido	1080.283	[M-H] ²⁻	539.1378	1.86	5		x		x	x
2'-Deoxypiscerythron	368.1230	[M-H] ⁻	367.1201	26.67	3	x		x		
Barpisoflavona B	368.1230	[M-H] ⁻	367.1201	26.67	3	x		x		
Isosoforonol	368.1230	[M-H] ⁻	367.1201	26.67	3	x		x		
Glicicumarina	368.1230	[M-H] ⁻	367.1201	26.67	3	x		x		
Licoarilcumarina	386.1341	[M-H ₂ O-H] ⁻	367.1201	26.67	3	x		x		
Kenusanona D	386.1366	[M-H ₂ O-H] ⁻	367.1201	26.67	5	x		x		
Laxiflorin	414.1630	[M-H ₂ O-H] ⁻	395.1494	29.46	0	x				
Quercetina 3-(2'',3'',4''-triacetilgalactósido)	590.1219	[M-H ₂ O-H] ⁻	571.1104	29.77	2		x			

Tabla A14. Polifenoles identificados en muestras de miel de Putla Villa de Guerrero almacenadas a 50°C y 70 % HR.

Nombre del compuesto	Masa	Aducto	m/z	t _R (min)	Error (ppm)	Semana					
						0	1	2	3	4	5
Pelargonidina 3-[6-(3-glucosilcafeil) glucósido]	756.1852	[M-2H] ²⁻	377.0876	1.20	0		x		x	x	x
Perillanina	756.1852	[M-2H] ²⁻	377.0876	1.20	0		x		x	x	x
Quercetina 3-(2G-(E)-p-cumaroilrutinosido)	756.1852	[M-2H] ²⁻	377.0876	1.20	0		x		x	x	x
Kaempferol 3-(6"-p-cumarilglucósido)-7-glucósido	756.1852	[M-2H] ²⁻	377.0876	1.20	0		x		x	x	x
Kaempferol 3- glucósido-7-p-cumarilglucósido	756.1852	[M-2H] ²⁻	377.0876	1.20	0		x		x	x	x
Apigenina 7-ramnosil-(1->6)-(4"-E-p-metoxicinamoilglucósido)	738.2095	[M-H ₂ O-H] ⁻	719.1997	1.20	2		x			x	x
Pelargonidina 3- rutinósido-5-glucósido	740.2068	[M-H ₂ O-H] ⁻	721.1971	1.20	1		x			x	x
Apigenina 7- rutinósido-4'-glucósido	740.2068	[M-H ₂ O-H] ⁻	721.1971	1.20	1		x			x	x
Apigenina 7-O-(2G-ramnosil)gentiobiósido	740.2068	[M-H ₂ O-H] ⁻	721.1971	1.20	1		x			x	x
Kaempferol 3-ramninosido	740.2068	[M-H ₂ O-H] ⁻	721.1971	1.20	1		x			x	x
Mauritianin	740.2068	[M-H ₂ O-H] ⁻	721.1971	1.20	1		x			x	x
Robinin	740.2068	[M-H ₂ O-H] ⁻	721.1971	1.20	1		x			x	x
Isoramnetina 3-ramnosil-(1->6)-[ramnosil-(1->2)-(3'''-(E)-p-cumaroilgalactósido)-7-ramnósido	1062.304	[M-H] ⁻	1061.3098	1.20	4	x	x				
Pinocembrina 7-apiosilo-(1->5)-apiosilo-(1->2)-glucósido	682.2055	[M-H] ⁻	681.2064	1.22	4					x	x
Kaempferol 4'-metil éter 3-(2Glc-glucosil rutinósido)	770.2161	[M-H ₂ O-H] ⁻	751.2067	1.25	2	x					
Isoramnetina 3-robinobiósido-7- ramnósido	770.2161	[M-H ₂ O-H] ⁻	751.2067	1.25	2	x					
Typhaneoside	770.2161	[M-H ₂ O-H] ⁻	751.2067	1.25	2	x					
Apigenina 7- ramnósido-4'-rutinosido	724.2132	[M-H ₂ O-H] ⁻	705.2033	1.26	0	x		x	x		
Ramnazina 3-ramninosido	784.2340	[M-H ₂ O-H] ⁻	765.2248	1.26	0	x					
Scutellareina 6,7-dimetiléter 4'-rutinosido	622.1845	[M-H ₂ O-H] ⁻	603.1733	1.28	3	x					
Pectolarigenina 7-rutinosido	622.1845	[M-H ₂ O-H] ⁻	603.1733	1.28	3	x					
Bisdemalonilsalvianina	756.1828	[M-2H] ²⁻	377.0864	1.85	3				x	x	x
Cianidina 3-(4'''-cafeilrutinosido)	756.1828	[M-2H] ²⁻	377.0864	1.85	3				x	x	x

Perillanina	756.1828	[M-2H] ²⁻	377.0864	1.85	3				x	x	x
Quercetina 3-(2G-(E)- <i>p</i> -cumaroilrutinosido)	756.1828	[M-2H] ²⁻	377.0864	1.85	3				x	x	x
Kaempferol 3-glucósido-7- <i>p</i> -cumarilglucósido	756.1828	[M-2H] ²⁻	377.0864	1.85	3				x	x	x
Cassiaoccidentalín A	560.1465	[M-H ₂ O-H] ⁻	541.1346	1.86	1		x				
Apimaisina	560.1465	[M-H ₂ O-H] ⁻	541.1346	1.86	1		x				
Pelargonidina 3-[6'''-(3-glucosilcafeil)soporósido]-5-glucósido	1080.284	[M-2H] ²⁻	539.1377	1.86	5		x				
Naringina 6''- ramnósido	726.2290	[M-H] ⁻	725.2304	1.87	0			x	x		x
Epidistenina	258.0868	[M-2H] ²⁻	128.0369	1.88	3					x	x
Demetilvestitol	258.0868	[M-2H] ²⁻	128.0369	1.88	3					x	x
Davidigenina	258.0868	[M-2H] ²⁻	128.0369	1.88	3					x	x
Scutellareina 6,4'-dimetil éter 7-(3'''-acetilrutinosido)	664.1947	[M-H ₂ O-H] ⁻	645.1841	1.89	3		x				
Garcinone A	380.1597	[M-H] ⁻	379.1570	23.62	5		x				
2'-Deoxypiscerythron	368.1225	[M-H] ⁻	367.1196	26.70	2		x	x	x		
Gancaonina B	368.1225	[M-H] ⁻	367.1196	26.70	2		x	x	x		
Isoaurmillon	368.1225	[M-H] ⁻	367.1196	26.70	2		x	x	x		
Aurmillone	368.1225	[M-H] ⁻	367.1196	26.70	2		x	x	x		
Isosoforonol	368.1225	[M-H] ⁻	367.1196	26.70	2		x	x	x		
Leiocinol	368.1225	[M-H] ⁻	367.1196	26.70	2		x	x	x		
Integrina	368.1225	[M-H] ⁻	367.1196	26.70	2		x	x	x		
Ciclointegrina	368.1225	[M-H] ⁻	367.1196	26.70	2		x	x	x		
Sofoflavescenol	368.1225	[M-H] ⁻	367.1196	26.70	2		x	x	x		
Isoanhidroicaritina	368.1225	[M-H] ⁻	367.1196	26.70	2		x	x	x		
Topazolin	368.1225	[M-H] ⁻	367.1196	26.70	2		x	x	x		
Licoarilcumarina	368.1225	[M-H] ⁻	367.1196	26.70	2		x	x	x		
Artocarpetina A	368.1225	[M-H] ⁻	367.1196	26.70	2		x	x	x		
Glicirrhizaisoflavona C	368.1225	[M-H] ⁻	367.1196	26.70	2		x	x	x		
Glicoricona	368.1225	[M-H] ⁻	367.1196	26.70	2		x	x	x		
Hidrato de topazolina	386.1336	[M-H ₂ O-H] ⁻	367.1196	26.70	2		x	x	x		
Kenusanona D	386.1336	[M-H ₂ O-H] ⁻	367.1196	26.70	2		x	x	x		
Quercetina 3-(2'',3'',4''-triacetilgalactósido)	590.1220	[M-H ₂ O-H] ⁻	571.1105	29.78	3					x	

ANEXO VIII

En las Tablas de la A15-A20 se muestran las correlaciones entre los parámetros evaluados a 30, 40 y 50°C para la miel de Huajuapán de León y Putla Villa de Guerrero, Oaxaca, a través de los coeficientes de correlación de Pearson.

Los coeficientes de correlación toman valores entre -1 y +1, y miden la fuerza de la relación lineal entre las variables. Tabachnick y Fidell (2013) proponen la siguiente escala para la clasificación de las correlaciones.

$r=1$	Perfecta
$0.8 < r < 1$	Muy alta
$0.6 < r < 0.8$	Alta
$0.4 < r < 0.6$	Moderada
$0.2 < r < 0.4$	Baja
$0 < r < 0.2$	Muy baja
$r=0$	Nula

Tabla A15. Matriz de correlación entre los parámetros evaluados en miel de Huajuapán de León, Oaxaca almacenados a 30°C y 70 % HR.

	<i>% humedad</i>	<i>CE</i>	<i>pH</i>	ΔE	<i>CPT</i>	<i>AA</i>	<i>ID</i>	<i>HMF</i>
<i>% humedad</i>	1							
<i>CE</i>	0.7253	1						
<i>pH</i>	-0.6275	-0.4087	1					
ΔE	-0.8207	-0.8164	0.7515	1				
<i>CPT</i>	0.0556	-0.0317	0.7188	0.3660	1			
<i>AA</i>	-0.8508	-0.9117	0.6817	0.9757	0.2515	1		
<i>ID</i>	-0.6815	-0.8859	0.4988	0.8997	0.2049	0.8991	1	
<i>HMF</i>	0.2943	0.5331	-0.5012	-0.6276	-0.5255	-0.6453	-0.4256	1

Coeficientes de correlación de Pearson. CE: Conductividad Eléctrica. ΔE : cambio de color total. CPT: Contenido de Polifenoles Totales. AA: Actividad Antioxidante. ID: Índice de Diasta. HMF: Hidroximetilfurfural.

Tabla A16. Matriz de correlación entre los parámetros evaluados en miel de Huajuapán de León, Oaxaca almacenados a 40°C y 70 % HR.

	<i>% humedad</i>	<i>CE</i>	<i>pH</i>	ΔE	<i>CPT</i>	<i>AA</i>	<i>ID</i>	<i>HMF</i>
% humedad	1							
CE	0.7292	1						
pH	-0.3507	-0.7669	1					
ΔE	-0.5735	0.0213	-0.5062	1				
CPT	0.1411	-0.3083	0.1472	-0.3923	1			
AA	-0.3625	-0.4435	0.1036	-0.0478	0.4485	1		
ID	-0.6881	-0.6106	0.1163	0.3564	0.0717	0.8144	1	
HMF	0.7007	0.4735	-0.0865	-0.3506	0.0710	-0.8246	-0.9324	1

Coefficientes de correlación de Pearson. CE: Conductividad Eléctrica. ΔE : cambio de color total. CPT: Contenido de Polifenoles Totales. AA: Actividad Antioxidante. ID: Índice de Diasta. HMF: Hidroximetilfurfural.

Tabla A17. Matriz de correlación entre los parámetros evaluados en miel de Huajuapán de León, Oaxaca almacenados a 50°C y 70 % HR.

	<i>% humedad</i>	<i>CE</i>	<i>pH</i>	ΔE	<i>CPT</i>	<i>AA</i>	<i>ID</i>	<i>HMF</i>
% humedad	1							
CE	-0.0657	1						
pH	-0.0262	-0.2740	1					
ΔE	-0.6205	0.3740	0.2216	1				
CPT	-0.4477	0.5924	-0.1045	0.5609	1			
AA	0.8695	0.2658	-0.4225	-0.6508	-0.2433	1		
ID	0.0667	-0.5219	0.6701	-0.0365	-0.7412	-0.2905	1	
HMF	-0.2304	0.4555	-0.8302	0.0181	0.6136	0.1954	-0.9415	1

Coefficientes de correlación de Pearson. CE: Conductividad Eléctrica. ΔE : cambio de color total. CPT: Contenido de Polifenoles Totales. AA: Actividad Antioxidante. ID: Índice de Diasta. HMF: Hidroximetilfurfural.

Tabla A18. Matriz de correlación entre los parámetros evaluados en miel de Putla Villa de Guerrero, Oaxaca almacenados a 30°C y 70 % HR.

	<i>% humedad</i>	<i>CE</i>	<i>pH</i>	ΔE	<i>CPT</i>	<i>AA</i>	<i>ID</i>	<i>HMF</i>
% humedad	1							
CE	0.2655	1						
pH	0.3687	0.7619	1					
ΔE	-0.1160	0.8866	0.4473	1				
CPT	0.0535	-0.2927	-0.5542	-0.1754	1			
AA	-0.5715	-0.7141	-0.8689	-0.3580	0.6119	1		
ID	-0.3480	-0.9737	-0.7864	-0.8007	0.3649	0.8276	1	
HMF	0.3979	0.8357	0.8055	0.5792	-0.5168	-0.9406	-0.9357	1

Coefficientes de correlación de Pearson. CE: Conductividad Eléctrica. ΔE : cambio de color total. CPT: Contenido de Polifenoles Totales. AA: Actividad Antioxidante. ID: Índice de Diasta. HMF: Hidroximetilfurfural.

Tabla A19. Matriz de correlación entre los parámetros evaluados en miel de Putla Villa de Guerrero, Oaxaca almacenados a 40°C y 70 % HR.

	<i>% humedad</i>	<i>CE</i>	<i>pH</i>	ΔE	<i>CPT</i>	<i>AA</i>	<i>ID</i>	<i>HMF</i>
% humedad	1							
CE	0.3331	1						
pH	0.3549	0.7964	1					
ΔE	0.2918	0.9622	0.8970	1				
CPT	-0.6126	0.1253	0.3504	0.2985	1			
AA	-0.3025	0.0187	-0.5207	-0.2222	-0.3716	1		
ID	-0.3855	-0.8226	-0.9681	-0.9360	-0.3337	0.5383	1	
HMF	0.0957	0.4844	0.8909	0.6681	0.6378	-0.7337	-0.8304	1

Coefficientes de correlación de Pearson. CE: Conductividad Eléctrica. ΔE : cambio de color total. CPT: Contenido de Polifenoles Totales. AA: Actividad Antioxidante. ID: Índice de Diasta. HMF: Hidroximetilfurfural.

Tabla A20. Matriz de correlación entre los parámetros evaluados en miel de Putla Villa de Guerrero, Oaxaca almacenados a 50°C y 70 % HR.

	<i>% humedad</i>	<i>CE</i>	<i>pH</i>	ΔE	<i>CPT</i>	<i>AA</i>	<i>ID</i>	<i>HMF</i>
% humedad	1							
CE	-0.0141	1						
pH	-0.3328	0.9197	1					
ΔE	-0.1415	0.9812	0.9392	1				
CPT	-0.6638	0.5129	0.7417	0.6506	1			
AA	0.4256	0.3964	0.2011	0.4494	0.2510	1		
ID	0.2944	-0.8093	-0.8345	-0.9040	-0.8482	-0.5989	1	
HMF	-0.4895	0.4399	0.4714	0.5920	0.7577	0.4948	-0.8260	1

Coefficientes de correlación de Pearson. CE: Conductividad Eléctrica. ΔE : cambio de color total. CPT: Contenido de Polifenoles Totales. AA: Actividad Antioxidante. ID: Índice de Diasta. HMF: Hidroximetilfurfural.