



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Agropecuarias

Maestría en Ciencia de los Alimentos

**“Efecto de la temperatura en los compuestos bioactivos en
diferentes mieles del estado de Hidalgo”**

T E S I S

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencia de los Alimentos

P r e s e n t a

Ing. Adabella Suárez Vargas

Director de tesis: Dr. Rafael G. Campos Montiel

Asesoras: Dra. Aurora Quintero Lira

Dra. Diana Pimentel González

Dra. Ana Cristina Figueira

Tulancingo, Hgo. Octubre 2013



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Agropecuarias

COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO DEL ICAP

Actas de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos
Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: "**Efecto de la temperatura en los compuestos bioactivos en diferentes mieles del estado de Hidalgo**", que desarrolla la estudiante Ing. en Alimentos Adabella Suárez Vargas.

Asistentes:

Dr. Rafael German Campos Montiel

Dra. Diana Jaqueline Pimentel González

Dra. Aurora Quintero Lira

A. Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por la estudiante, comunicando a la Ing. Alimentos Adabella Suárez Vargas, oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. La estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que la estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE

"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 16 de Octubre del 2013.

Dr. Rafael German Campos Montiel

Dra. Diana Jaqueline Pimentel González

Dra. Aurora Quintero Lira





AGRADECIMIENTO

Al apoyo recibido por CONACYT con la beca de la Maestría en Ciencia de los Alimentos de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo incluida en el Padrón Nacional de Posgrado de CONACYT.

Este proyecto fue financiado parcialmente por el PIFI 2012 de la Maestría en Ciencia de los Alimentos y por el Cuerpo Académico de Aprovechamiento Agroalimentario Integral.

Agradecimientos

Gracias a mi mamá (Viki) y papá (Martiniano) porque siempre serán mi gran admiración en mi vida y sé que este logro se los debo a ustedes por estar siempre conmigo y nunca dejarme sola. Gracias a Dios por haberme dado esta bendición de crecer y tener la familia que formaron mis padres.

A mis hermanos por compartir todos los momentos de felicidad de unión, por todo su apoyo incondicional gracias Alma, Jazmín, Yocelin, Elizabeth, Rodrigo, Martín y Martincito por ser una dicha en nuestra familia.

Al Dr. Rafael G. Campos por permitirme una vez más ser parte de su grupo de trabajo y por todo el apoyo, confianza y amistad que siempre me ha brindado gracias Dr.

A mis asesoras de Tesis a la Dra. Ana Figueira , Diana Pimentel y Aurora Quintero por todo su apoyo y observaciones en la realización de esta tesis para que quedara la mejor posible.

A la Dra. Diana muchas gracias por todo el tiempo y dedicación invertida en la realización de esta tesis.

A la Dra Aurora mil gracias por todo su apoyo, conocimiento y el tiempo dedicado en la realización de esta tesis y sobre todo por su amistad que me ha brindado.

Dra Ana Figueira por su atención, enseñanza y amabilidad que me brindo en la estancia en Faro Portugal gracias Dra.

A mis amigos de esta etapa de mi vida, gracias por brindarme su amistad y por todos los divertidos e inolvidables momentos que compartimos gracias Heidi, Enaim, Ulin, Emmanuel y Rene. Porque su amistad siempre se va a quedar en mí corazón.

A mis amigos y compañeros que siempre han estado conmigo y me han brindado su amistad en los momentos que hemos compartido gracias amiga Diane, Lorena, Yaquelin, Jorge y Luis.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Estado de Hidalgo.....	3
2.1.1 Orizatlán.....	4
2.1.2 Acaxochitlán.....	4
2.1.3 El Arenal.....	4
2.1.4 Tasquillo.....	4
2.1.5 Huehuetla.....	5
2.2 Las Abejas.....	5
2.3 Miel.....	7
2.3.1 Definición de miel.....	7
2.3.2 Fuentes de origen de la miel.....	8
2.3.2.1 Néctar.....	8
2.3.2.2 Mielato.....	8
2.3.3 Elaboración de la miel por las abejas.....	9
2.3.4 Clasificación de miel.....	10
2.3.4.1 Origen botánico.....	10
2.3.4.2 Elaboración.....	10
2.3.4.3 Presentación.....	11
2.3.5 Composición química de la miel.....	11
2.3.6 Características organolépticas de la miel.....	12

2.3.6.1 Color.....	13
2.3.7 Polen en la miel.....	13
2.3.7.1 Análisis polínico cualitativo	14
2.3.7.2 Análisis polínico cuantitativo.....	14
2.3.8 Alteraciones de la miel	15
2.3.8.1 Modificaciones naturales	15
2.3.8.2 Fraudes inducidas por el humano.....	16
2.3.9 Otros productos comerciales de la miel	17
2.3.10 Procedimiento industrial para la obtención de la miel	18
2.4 Alimentos funcionales	19
2.4.1 Compuestos bioactivos de los alimentos	19
2.4.2 Compuestos fenólicos	21
2.4.2.1 Clasificación de los compuestos fenólicos	21
2.4.2.2 Ácidos fenólicos.....	22
2.4.2.3 Flavonoides	23
2.5 Antioxidantes	25
2.6 Radicales libres.....	26
3. ANTECEDENTES.....	28
4. OBJETIVO.....	34
4.1 Objetivo general.....	34
4.2 Objetivos específicos	34
5. HIPÓTESIS.....	35
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
6.1 Lugar de estudio	36
6.2 Materiales	36
6.3 Análisis polínico cualitativo y cuantitativo	37
6.4 Procesamiento térmico	38

6.5	Determinación de color	38
6.6	Determinación de fenoles totales	39
6.7	Contenido de flavonoides totales	40
6.8	Determinación de Hidroximetilfurfural (HMF)	40
6.9	Medición de la actividad antioxidante	41
6.9.1	Determinación de la actividad antioxidante por DPPH	41
6.9.2	Actividad antioxidante del radical ABTS	42
6.10	Análisis estadístico	43
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
7.1	Análisis polínico cualitativo y cuantitativo	44
7.1.1	Análisis polínico de la miel de Orizatlán	44
7.1.2	Análisis polínico de la miel de Acaxochitlán	45
7.1.3	Análisis polínico de la miel de El arenal	48
7.1.4	Análisis polínico de la miel de Tasquillo	49
7.1.5	Análisis polínico de la miel de Huehuetla	50
7.1.6	Análisis polínico de miel Comercial	51
7.2	Determinación de compuestos bioactivos	54
7.2.1	Fenoles totales	54
7.2.2	Flavonoides totales	55
7.3	Determinación de Hidroximetilfurfural (HMF)	56
7.4	Actividad antioxidante	58
7.4.1	Actividad antioxidante del radical DPPH	58
7.4.2	Actividad antioxidante del radical ABTS	59
7.5	Determinación de Color	61
7.6	Correlaciones de los parámetros determinados con las 6 muestras mieles	64
8.	CONCLUSIONES	67
9.	BIBLIOGRAFÍA	68
10.	ANEXOS	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Diferentes zonas climáticas del estado de Hidalgo.....	3
Figura 2.	Abeja obrera, reina y zángano.....	5
Figura 3.	Colmena.....	6
Figura 4.	Miel de abeja.....	7
Figura 5.	Esquema de elaboración de la miel.....	9
Figura 6.	Esquema general del proceso industrial de la miel.....	18
Figura 7.	Clasificación de compuestos bioactivos según su naturaleza química.....	20
Figura 8.	Clasificación de los compuestos fenólicos.....	22
Figura 9.	Estructura básica de los ácidos fenólicos.....	23
Figura 10.	Estructura básica de los flavonoides.....	23
Figura 11.	Neutralización de un radical libre.....	25
Figura 12.	Muestras de mieles de 5 municipios del estado de Hidalgo.....	36
Figura 13.	Diagrama de cromaticidad.....	38
Figura 14.	Reacción de la reducción del radical DPPH.....	41
Figura 15.	Diferentes tipos de polen en la miel de Orizatlán.....	44
Figura 16.	Frecuencia de granos de polen en la miel de Orizatlán.....	45
Figura 17.	Diferentes tipos de polen en la miel de Acaxochitlán.....	46
Figura 18.	Frecuencia de granos de polen en la miel de Acaxochitlán.....	47
Figura 19.	Diferentes tipos de polen en la miel de El arenal.....	48
Figura 20.	Frecuencia de granos de polen en la miel de El arenal.....	49
Figura 21.	Diferentes tipos de polen en la miel de Tasquillo.....	49

Figura 22.	Frecuencia de granos de polen en la miel de Tasquillo.....	50
Figura 23.	Diferentes tipos de polen en la miel de Huehuetla.....	50
Figura 24.	Frecuencia de granos de polen en la miel de Huehuetla.....	51
Figura 25.	Diferentes tipos de polen en la miel de Comercial.....	52
Figura 26.	Frecuencia de granos de polen en la miel Comercial.....	52
Figura 27.	Cantidad de granos de polen en las muestras de miel.....	53
Figura 28.	Concentración de fenoles totales a diferentes temperaturas.....	54
Figura 29.	Concentración de flavonoides totales a diferentes temperaturas.....	56
Figura 30.	Actividad antioxidante del radical DPPH de mieles a diferentes temperaturas.....	58
Figura 31.	Actividad antioxidante del radical ABTS de mieles a diferentes temperaturas.....	60
Figura 32.	Decoloración de los radicales (a) ABTS y (b) DPPH que presentaron los 6 tipos de miel (1) Orizatlán, (2) Acaxochitlán, (3) El arenal, (4) Tasquillo, (5) Huehuetla y (6) Comercial.....	61
Figura 33.	Diferentes tipos de color de las muestras de miel (1) Orizatlán, (2) Acaxochitlán, (3) El arenal, (4) Tasquillo, (5) Huehuetla y (6) Comercial.....	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Composición química de la miel.....	12
Tabla 2.	Clases de miel según su riqueza polínica.....	14
Tabla 3.	Clasificación de antioxidantes.....	25
Tabla 4.	Principales radicales.....	26
Tabla 5.	Las letras minúsculas a, b, c y d indican las diferencias que hubo en la concentración de HMF para cada tipo de miel a diferentes temperaturas y las letras mayúsculas indican las diferencias que hay en la concentración de HFM en las seis muestras de miel en cada temperatura.....	57
Tabla 6.	Determinación de color de las 6 diferentes muestras de miel del estado de Hidalgo; las letras mayúsculas A, B, C, D, E, F indican las diferencias de tono de todas la mieles a las diferentes temperaturas que fueron expuestas y las letras minúsculas a, b, c indican las diferencias en el cambio de tono de color para cada tipo de miel de 20 a 80 °C.....	62
Tabla 7.	Determinación de los parámetros de color de las 6 diferentes muestras de miel del estado de Hidalgo; las letras indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras en Luminosidad, a^+ y b^+	63
Tabla 8.	Coeficiente de correlacione de cada miel con las variables determinadas (Fenoles, Flavonoides, DPPH, ABTS e HMF).....	64
Tabla 9.	Coeficiente de correlación de color de la miel con las variables de estudio.....	66

Abreviaturas y simbología

mL	Mililitro
mn	Nanómetro
mg	Miligramo
EQA	Equivalentes de Ácido Gálico
EQ	Equivalentes de Quercetina
DPPH	2,2 Diphenl-1-picrylhydrazyl
ABTS	3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
HMF	Hidroximetilfurfural
g	Gramos
L	Luminosidad
h	Angulo Hue
FOSHU	Foods For Specified Health Uses
RL	Radicales libres

RS	Especies reactivas
FRAP	Potencia Antioxidante Reductora Férrica
ORAC	Capacidad de Absorción de Radicales Libres de Oxígeno
°C	Grados centígrados
μM	Micro-mol
%	Porcentaje
pH	Potencial de hidrógeno

RESUMEN

La miel es considerada como un alimento funcional ya que contiene compuestos antioxidantes entre los que destacan fenoles y flavonoides, los cuales se encuentran en mayor o menor cantidad dependiendo del origen floral del que provenga la miel. La finalidad de este trabajo fue determinar el efecto de la temperatura sobre los compuestos bioactivos en 5 mieles, de diferentes zonas geográficas y botánicas del estado de Hidalgo y una miel escogida al azar de un centro comercial. Se llevó a cabo la recolección de la miel en diferentes municipios como: Orizatlán, Acaxochitlán, El arenal, Tasquillo y Huehuetla. La identificación del origen floral de las mieles se realizó por medio del análisis polínico. Se encontró que la miel de Orizatlán es monofloral (*Citrus*), la miel de Tasquillo es mielada y la miel de Acaxochitlán, El arenal, Huehuetla y Comercial fueron multiflorales. Todas las mieles se sometieron a diferentes temperaturas (20, 40, 50, 60, 70, y 80°C) durante 10 min determinando fenoles totales (mg EAG/100g miel), flavonoides totales (mg EQ/100g miel), hidroximetilfurfural (mgHMF/kg), color y actividad antioxidante (DPPH y ABTS). Las muestras de miel presentaron diferente comportamiento con respecto a la temperatura. En fenoles la miel de Tasquillo y la Comercial obtuvieron una curva de respuesta cuadrática, alcanzando una mayor concentración a los 70 °C, mientras que las demás mieles su curva de respuesta fue lineal incrementando los fenoles con la temperatura. En flavonoides totales la miel de Orizatlán, El arenal y Tasquillo presentaron un comportamiento lineal ascendente, pero la miel de Acaxochitlán y Huehuetla su curva de respuesta fue cuadrática, mientras la comercial no presentó efecto por la temperatura. En la actividad antioxidante del radical DPPH se encontró que la miel de Acaxochitlán y Comercial su comportamiento fue lineal ascendente y para Orizatlán, El arenal y Tasquillo su curva de respuesta fue cuadrática pero en la miel de Huehuetla no hubo ningún efecto de la temperatura en esta miel. La capacidad antioxidante radical ABTS en las 5 mieles recolectadas presentaron una curva de respuesta cuadrática encontrando su máxima actividad a los 70°C, mientras en la miel Comercial su curva de respuesta fue lineal ascendente. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en cada tipo de miel en el contenido de hidroximetilfurfural. En color se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) que abarcan de rojo (a^+) a amarillo (b^+). Se determinaron diferentes correlaciones entre los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante encontrando una buena correlación entre fenoles y la actividad antioxidante DPPH en la miel de Acaxochitlán. La miel de Orizatlán, El arenal y Huehuetla mostraron una buena correlación entre flavonoides y la

capacidad antioxidante de ABTS y de fenoles con la capacidad antioxidante del radical ABTS fue excelente la correlación en la miel de Orizatlán, Tasquillo y Huehuetla. Las 6 mieles mostraron un buen coeficiente de correlación entre el hidroximetilfurfural y la actividad antioxidante. Observando que el comportamiento de fenoles, flavonoides, hidroximetilfurfural, color y actividad antioxidante (DPPH y ABTS) con la temperatura en sus curvas de respuesta y sus correlaciones dependen del origen floral.

ABSTRACT

Honey is considered as a functional food because it contains antioxidant compounds among which phenols and flavonoids, which are found to greater or lesser amount depending on the source of which comes floral honey. The purpose of this study was to determine the effect of temperature on bioactive compounds in five sorts of honey from different geographical and botanical areas in Hidalgo State and a sort of honey chosen at random from a mall. Collecting honey was carried out in different municipalities as Orizatlán, Acaxochitlán, El Arenal, Tasquillo and Huehuetla. The identification of the botanical origin of honey was performed using pollen analysis. It was found that honey from Orizatlán is monofloral (Citrus) honey from Tasquillo is honeydew and honey from Acaxochitlán, El Arenal, Commercial and Huehuetla was multiflowered. Every kind of honey was subjected to different temperatures (20, 40, 50, 60, 70, and 80°C) for 10 min determining total phenols (mgEAG/100g honey), total flavonoids (mgEQ/100ghoney), hydroxymethylfurfural (mgHMF/kg), color and antioxidant activity (DPPH and ABTS). Honey samples showed different behavior with respect to temperature. Honey phenols and Commercial Tasquillo obtained a quadratic response curve, reaching a higher concentration at 70°C, while the remaining honey response curve was linear with increasing temperature phenols. In total flavonoids Orizatlán honey, El Arenal and Tasquillo presented a linear behavior up, but about honey from Huehuetla and Acaxochitlán, its response was quadratic curve, while commercial showed no effect by temperature. In the antioxidant activity of DPPH radical was found that honey Commercial and Acaxochitlán was linear behavior up and Orizatlán, Tasquillo, El arenal their response curve was quadratic, but Huehuetla honey there was no effect of temperature on this honey. The ABTS radical antioxidant capacity in the five honeys collected showed a quadratic response curve found maximum activity at 70°C, while in commercial honey response curve was linear up. Significant differences were found ($p < 0.05$) in each type of honey in the hydroxymethylfurfural content. Color differences were significant ($p < 0.05$) ranging from red (a+) to yellow (b+). Different correlations were determined between bioactive compounds and antioxidant capacity, so it was found a good correlation between phenolics and antioxidant activity DPPH in honey from Acaxochitlán. The honey from Orizatlán, Huehuetla and El arenal showed a good correlation between flavonoids and antioxidant capacity of ABTS and phenolics with ABTS radical antioxidant capacity was excellent correlation in Orizatlán, Taquillo and Huehuetla honey. The six kind of honey showed good correlation coefficient between the hydroxymethylfurfural and antioxidant activity. It was observed that behavior of phenols, flavonoids, hydroxymethylfurfural, color and antioxidant activity (DPPH and ABTS) with the temperature in their response curves and correlations depend on botanical origin.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la alimentación humana ha cobrado gran importancia, generando un interés cada vez mayor, no sólo para cubrir los requerimientos nutricionales y energéticos para la supervivencia, sino como forma de mejorar el estado de salud y disminuir el riesgo de sufrir enfermedades, que muchas de ellas resultan por el estrés oxidativo que se acumula en el organismo, a lo largo de la vida (Arvanitoyannis, 2005) es por ello, la importancia del consumo de alimentos funcionales, que son aquellos que aportan algún tipo de beneficio para la salud (Mazza, 2000). La funcionalidad de estos alimentos, está determinada por una serie de compuestos bioactivos, como los compuestos fenólicos (Hooper, 2006) que presentan propiedades de ser antioxidantes, capaces de atrapar radicales libres que dañan el organismo (Niva, 2007). Dentro de los alimentos, la miel es considerada como un alimento funcional la cual se define como: una sustancia elaborada por las abejas melíferas, a partir del néctar de las flores ó de las secreciones procedentes de partes vivas de las plantas, que la transforman combinando con sustancias específicas propias, almacenan y dejan madurar en los panales de la colmena (Gil, 2010). Diversos autores han demostrado que la miel es una fuente natural de antioxidantes que son eficaces en la reducción de sufrir riesgos de corazón, cáncer, cataratas, disminución del sistema inmunológico, diferentes procesos inflamatorios etc, (The National Honey Board, 2003).

La composición de la miel es muy compleja, siendo básicamente una solución sobresaturada de azúcares, encontrando en mayor proporción fructosa (38%) glucosa (31%), maltosa (7.3%), sacarosa (1.3%) y en menor proporción están, los compuestos fenólicos, minerales, proteínas, aminoácidos libres, enzimas, ácidos libres y vitaminas (Alvarez *et al.* 2010). Los compuestos fenólicos presentes (flavonoides, ácidos fenólicos, ácido ascórbico, carotenoides) enzimas (catalasa, peroxidasa) y compuestos resultantes de la reacción de Maillard son los responsables de la capacidad antioxidante de la miel (Kowalski, 2013, Escriche *et al.*, 2013., Lachman *et al.*, 2010., Alvarez *et al.*, 2009., Vit *et al.*, 2008., Meda *et al.*, 2005., Turkmen *et al.*, 2006) y estos van a depender de la fuente floral o néctar que frecuentan las abejas (Baltrusaityte, 2007). El estado de Hidalgo cuenta con 5 diferentes climas, encontrando una biodiversidad de fuentes florales en cada zona geográfica y climática, es por ello que, en esta investigación se llevó acabo la recolección de 5 mieles de diferentes apiarios de cada zona climática, encontrando cierta vegetación característica de

cada lugar, los municipios fueron; Orizatlán, Acaxochitlán, El arenal, Tasquillo y Huehuetla, utilizando también una miel de un centro comercial. A todas las muestras, se les realizó análisis polínico, con la finalidad de identificar el origen floral de cada miel, las muestras fueron sometidas a un procesamiento térmico, durante 10 min a diferentes temperaturas (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C) determinando en cada temperatura el color de cada tipo de miel, la concentración de fenoles totales y flavonoides totales, igualmente su capacidad antioxidante por los métodos de DPPH y ABTS. Se utilizó la metodología propuesta por la AOAC para cuantificación de Hidroximetilfurfural ya que es un parámetro que se utiliza para determinar la calidad y frescura de la miel.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Estado de Hidalgo

El estado de Hidalgo se ubica en la región centro-oriental, conformando uno de los 31 estados y un distrito federal de las 32 entidades federativas de México, colinda al norte con los estados de San Luis Potosí y Veracruz, al este con el estado de Puebla, al sur con los estados de Tlaxcala y México y al oeste con el estado de Querétaro.

Una de las características que presenta el estado de Hidalgo es por tener una diversidad de climas, como se observa en la Figura 1, entre los cuales podemos destacar: clima seco-semiseco, templado subhúmedo, cálido húmedo, templado húmedo y cálido subhúmedo (Gutiérrez *et al.*, 1995).

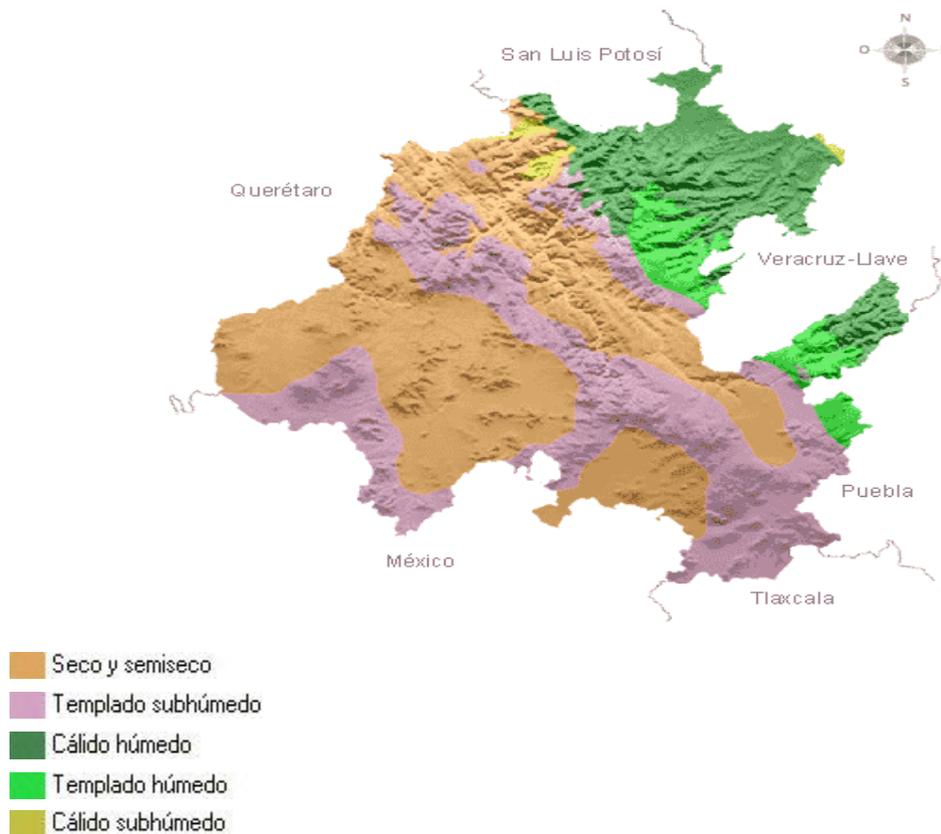


Figura 1. Diferentes zonas climáticas del Estado de Hidalgo

También cuenta con una gran biodiversidad de vegetación. De acuerdo SAGARPA (2010) el estado de Hidalgo genera, alrededor de 850 toneladas de miel anualmente, ubicándose las

principales zonas apícolas productoras de miel en el norte del estado lo que corresponde a la huasteca, que abarca los municipios de Orizatlán y Huejutla y de menor producción apícola se encuentra los municipios de Meztlán, Zimapán, Tezontepec, Acaxochitlán, Huehuetla y Tulancingo. Cada uno de estos municipios presentan características particulares, en cuanto a las fuentes florales y geográficas. A continuación se describe de acuerdo a la monografía del estado de Hidalgo (Rivas, 1992) y Gutiérrez *et al.*, (1998) las principales fuentes florales que predomina en estos municipios apícolas.

2.1.1 Orizatlán

Es un municipio de clima cálido húmedo y su vegetación se compone de selva media, encontrando una gran zona de árboles cítricos, principalmente de naranja. En esta zona por lo general todo el año los árboles presentan hojas y una gran diversidad de flores, también se encuentran árboles chicozapote, mango, encino, copal o zauchiate, diversidad de plantas herbáceas, algunas gramíneas principalmente maíz, maderas finas como ébano, caoba, cedro blanco. Orizatlán es uno de los principales productores de miel en el estado de Hidalgo (Gutiérrez *et al.*, 1998., Rivas, 1992).

2.1.2 Acaxochitlán

Este municipio presenta un clima templado húmedo, encontrando principalmente una vegetación de maíz, grandes variedades de árboles frutales (manzana, durazno, capulín, pera, ciruelos) así como también eucalipto, pino, encino, ocote, oyamel y cedro rojo. Además de especies no maderables como hongos, palma, camedor y musgo (Gutiérrez *et al.*, 1998., Rivas, 1992).

2.1.3 El Arenal

Su vegetación principalmente es de matorral espinoso, pirul, casuarina, nopales, maguey mezquite, huizache, aceitilla, navo, maíz al igual una gran variedad de flores, plantas herbáceas y algunos árboles como manzana, zapote, su clima se caracteriza por ser templado subhúmedo (Gutiérrez *et al.*, 1998., Rivas, 1992).

2.1.4 Tasquillo

El Municipio se caracteriza por contar con poca variedad de vegetación debido a que está ubicado en una zona semidesértica lo cual corresponde a un clima seco y semiseco, encontrando extensiones de nopaleras, arbustos bajos, maguey, cactus, cardones, biznagas,

garambullos, huizaches, mezquites, pirul y árboles de nogal (Gutiérrez *et al.*, 1998., Rivas , 1992).

2.1.5 Huehuetla

En este municipio podemos encontrar un clima cálido subhúmedo, presentando una temperatura media anual de 21°C, esta zona se caracteriza por ser cafetalera. Encontrando también una gran cantidad de plantas herbáceas y árboles de eucalipto, pino, encino, manzanilla, oyamel, cedro rojo, cítricos, además de especies no maderables como hongos, palma, camedor etc (Gutiérrez *et al.*, 1998.y Rivas E., 1992).

2.2 Las Abejas

Las abejas (*Apis mellifera*) son “insectos sociales” es decir, viven formando colonias que pueden estar constituidas alrededor de 40,000 individuos y se reparten de forma muy ordenada el trabajo que deben realizar. En cada colmena hay tres tipos de individuos como se observa en la Figura 2, las abejas obreras, una reina y los zánganos (Herrero, 2004).

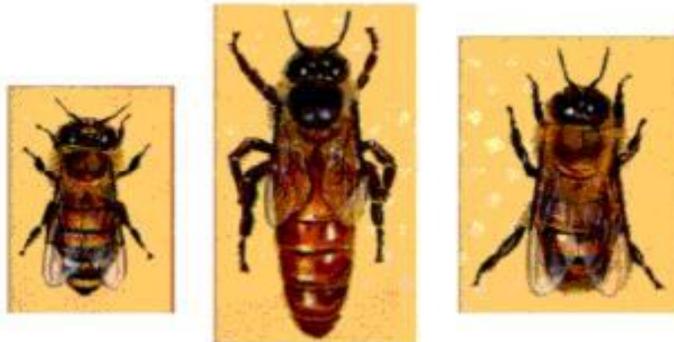


Figura 2. Abeja obrera, reina y zángano

- ⌘ **La reina:** Es el insecto central de la colonia, la única hembra perfecta y fecunda. Se distingue del resto por su longitud, que es de 16 mm aproximadamente, y por las alas, que son muy cortas en relación al cuerpo. Su misión es poner huevecillos diariamente y su alimentación es a base de jalea real y llega a vivir 5 años aproximadamente (Pierre, 2006).

- ⌘ **Las abejas obreras:** Forman la población más numerosa, 70 000 en primavera y unas 20 000 en invierno. Cumplen muchas funciones dependiendo de su edad pero la más

importante, es la fabricación de miel a través de la recolección del néctar. Éstas suelen moverse en un radio de acción de 3 kilómetros, siendo su velocidad media de 30-40 km/h, llevando a cabo unos 40 vuelos diarios y visitando unas 400 flores de la misma especie. Al regresar reconocen su colmena por el color, su forma y posición. Entre ellas se distinguen por el olor, pues cada colonia tiene el suyo característico (Lastra, 2001).

- ⌘ **Los zánganos:** En cada colmena suele haber de 500 a 1500 cumpliendo una doble función: fecundar a la reina y proporcionar calor al nido de cría (Herrero, 2004).

Estos tres personajes constituyen lo que es una colmena, lugar donde se almacena y madura la miel. Está compuesta por panales, como se observa en la Figura 3, formados por miles de celdas donde depositan la miel, cada celda tiene seis lados de igual tamaño y ligeramente inclinados para evitar que la miel se derrame. Aunque las paredes son muy delgadas, son capaces de soportar bastante miel, una colmena suele tener unos diez panales en su interior (Pierre, 2006).



Figura 3. Colmena

2.3 Miel

El aprovechamiento de la miel se remota a tiempos prehispánicos, nuestros antepasados se nutrían de miel, recolectándola directamente de las colmenas silvestres. Hoy en día se ha desarrollado esta actividad, que se le ha llamado “apicultura” por lo que se entiende como la actividad de criar y sacar provecho de las abejas y de los productos que son capaces de elaborar y recolectar (Herrero, 2004).

2.3.1 Definición de miel

Existen diversas definiciones de miel encontradas en la literatura, algunas de ellas se describen a continuación;

La miel es la sustancia natural dulce, producida por la abeja *Apis mellifera*, a partir del néctar de las flores, secreciones de la planta y/o excreciones de los insectos succionadores, presentes en las partes vivas de las plantas (miel de mielada), que las abejas recolectan, transforman combinándolas con sustancias propias, la cual depositan y almacenan en colmenas para que madure (Gil, 2010).

Según la organización mundial para la agricultura y la alimentación (FAO, 1999) define a la miel, como una sustancia dulce natural producida por abejas obreras, a partir del néctar de las plantas o de secreciones de partes vivas de las plantas y de excreciones de insectos succionadores, que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias que depositan, deshidratan, almacenan y dejan en el panal para que madure y añeje. Como se puede apreciar en la Figura 4, la miel es un producto natural muy complejo, que varía su composición según la fuente floral, zona geográfica, condiciones climatológicas, estación de año y método de conservación. Su color va de casi incoloro a pardo oscuro; su consistencia puede ser fluida, viscosa o parcialmente cristalizada y su aroma es variable (Frankel, 1998).



Figura 4. Miel de abeja

2.3.2 Fuentes de origen de la miel

Las principales fuentes que utiliza la abeja, para formar la miel son dos tipos de secreciones azucaradas: el **néctar** y el **mielato** (mielada). Ambos tienen el origen en la savia elaborada que distribuye los nutrientes en las plantas vasculares (Gil 2010, Pierre, 2007).

2.3.2.1 Néctar

Néctar es un líquido azucarado, elaborado por las glándulas de las plantas llamado nectarios, que se encuentran en cualquier área de los vegetales. Su composición consta de diferentes tipos de azúcares, como sacarosa, glucosa, fructuosa, melecitosa, etc y agua, pueden presentar un pH ácido (2.7 - 6) aunque algunos son alcalinos (8.0) debido a la concentración de sales minerales, se ha detectado trazas de proteínas, enzimas, ácidos orgánicos, fosfatos y aminoácidos.

Se pueden distinguir tres tipos de néctar según su espectro de azúcar:

- ⌘ Néctares que predomina la sacarosa
- ⌘ Néctares que contiene un equilibrio de sacarosa, glucosa y fructuosa.
- ⌘ Néctares que contienen cantidades parecidas de glucosa y fructuosa

Se ha encontrado diversas vitaminas en el néctar como: tiamina, riboflavina, piridoxina, niacina, ácido pantotéico, ácido fólico, biotina y ácido ascórbico, la cantidad está relacionado con la variedad de nectarios. (Gil, 2010).

2.3.2.2 Mielato

Los mielatos o mieladas son líquidos azucarados, procedentes de exudados de plantas o elaborados por la secreción de algunos hemípteros que las abejas recolectan, en las hojas de diversos arboles como coníferas, forestales y frutales. Los mielatos son producidos por insectos que pertenecen al orden *Rhynchoa*, que se caracterizan por la estructura de su aparato bucal, que está adaptado, para perforar las partes internas del vegetal, hasta llegar a los vasos conductores y succionar las materias nitrogenadas contenidas en el floema.

El insecto expulsa en forma de pequeñas gotitas los azúcares que no puede digerir, cayendo sobre las hojas o vegetal, esto constituye el mielato que la abeja recogerá y transformara en miel de mielato. (Lastra, 2001).

Los principales hidratos de carbono presentes en el mielato son glucosa, sacarosa, fructuosa, maltosa, trehalosa (disacárido característico del metabolismo del insecto)

melecitosa y eritrosa. Además existen aminoácidos como alanina, valina, histidina, tirosina, lisina, prolina, algunas sales minerales (fosfatos, cloratos, sulfatos) y ácidos orgánicos (cítrico, málico, succínico). El pH de la mielada oscila entre 3.2 y 4.5, al igual que en el néctar su proporción es muy variable dependiendo de su origen (Gil, 2010).

2.3.3 Elaboración de la miel por las abejas

Una vez de que las abejas ingieren, a través de sus piezas bucales el néctar o mielato lo transporta en su estómago e incorpora secreciones salivares, rica en enzimas (diastasa, invertasas y glucosa oxidasa) durante el transporte, inicia la transformación del néctar o mielada en miel, por la acción enzimática, principalmente de la invertasa o sacarasa. Su función del estómago es transportar el líquido hasta llegar a la colmena y además lleva inmiscuido granos de polen (Pierre, 2007).

La elaboración comienza cuando la abeja del exterior entra a la colmena y remite a una abeja interior una gotita de la materia prima recolectada. Esta gotita se intercambia de una abeja a otra, el número de intercambios es aproximadamente de 3 hasta 10 veces, lo cual en cada succión y recepción, la gotita de néctar se enriquece con nuevas secreciones enzimáticas totales al néctar original, además existe una disminución de agua hasta un 13-20 %. La abeja deposita la gotita de néctar en la cara interna superior de la celdilla y la sella con una fina capa de cera (Ortiz, 1992). En la siguiente Figura 5, se resumen en 4 etapas generales la elaboración de la miel por la abeja:

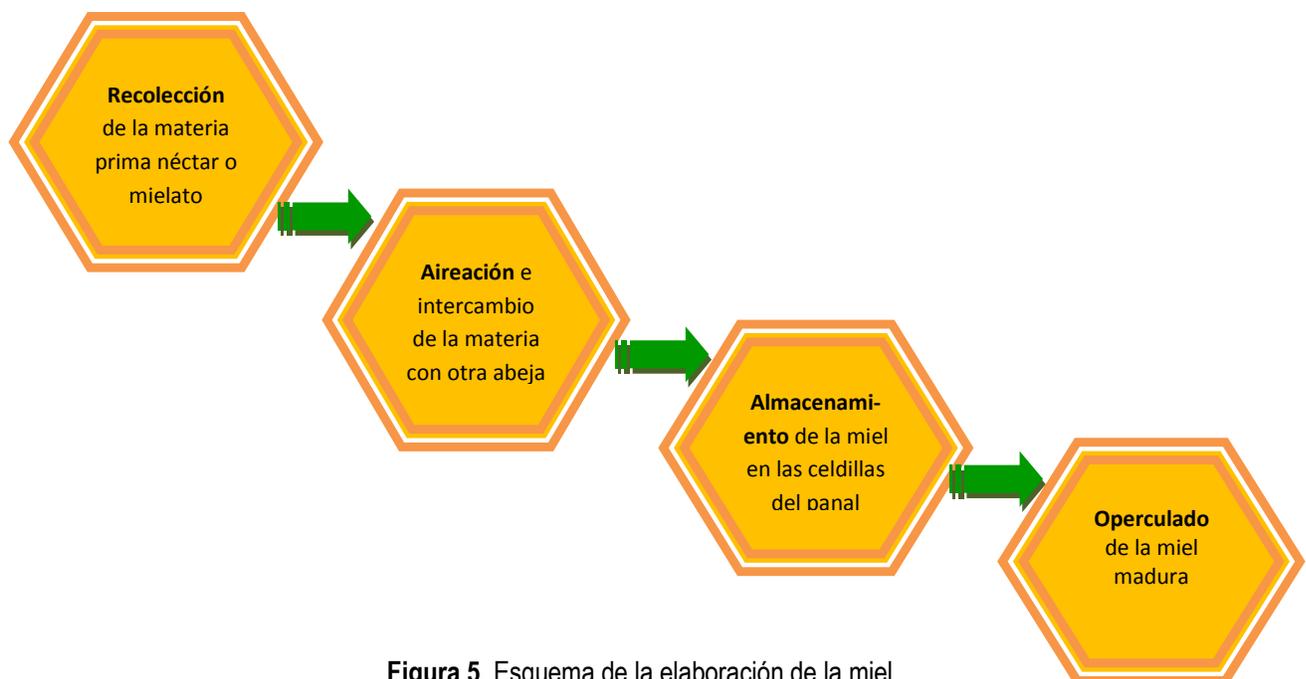


Figura 5. Esquema de la elaboración de la miel

2.3.4 Clasificación de miel

La miel según Gil (2010) se puede clasificar en base a su origen **botánico, elaboración y presentación**:

2.3.4.1 Origen botánico:

Miel de néctar o floral: El néctar que recogen las abejas de las diferentes flores, presentan cualidades específicas (sabor, aroma, pigmentos, concentración de azúcar y presencia de polen) que van a determinar las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y organolépticas del producto final. A continuación se presenta la clasificación de la miel con respecto a su origen botánico.

- ⌘ Miel unifloral o monofloral: se designan cuando el tipo de polen que la caracteriza, está presente en su sedimento en cantidades superiores al 45% del total. Aunque en ciertas plantas de baja capacidad productora de polen como *Laminaceae* y *Citrus*, si estos tipos de polen están en el sedimento de la miel en una concentración del 10 al 20% de presencia es suficiente para considerarse monoflorales (Sáenz y Gómez, 2000)
- ⌘ Miel multifloral o polifloral: son mieles en las que, aunque proceden del néctar de las flores, no predomina ninguna forma polínica sobre las demás existiendo una gran variedad de polen.
- ⌘ Miel mielada: para su elaboración de esta miel la abeja toma directamente de las secreciones de las plantas o los exudados de ciertos insectos depositados sobre el vegetal. En este tipo de mieles abundan polen de plantas anemófilas (Coníferas, nogales, olmos, etc.) al igual se encuentran restos de hongos, esporas en el sedimento.

2.3.4.2 Elaboración:

Esta clasificación, se basa en el procesamiento que lleva a cabo, el apicultor para poder extraer la miel de los panales.

- ⌘ Miel escurrida: Miel que se obtiene mediante el escurrido de los panales previamente desoperculados, sin larvas.
- ⌘ Miel centrifugada: Se lleva a cabo mediante la centrifugación de los panales sin larvas.
- ⌘ Miel prensada: Se obtenida mediante la comprensión de los panales.

- ⌘ Miel filtrada: Se lleva a cabo mediante un prensado seguido de la filtración con la finalidad de eliminar toda materia extraña.

2.3.4.3 Presentación:

Se refiere a la forma, de cómo es expuesta o presentada la miel para su venta hacia el consumidor entre las que encontramos las siguientes.

- ⌘ Miel en panal: Se refiere a la miel almacenada en las celdillas de cera del panal que construyen las abejas.
- ⌘ Miel a granel: Es colocada en envases de gran capacidad y en el momento de exponer para su venta se coloca en envases más pequeños.
- ⌘ Miel envasada: Principalmente la llevan a cabo empresas autorizadas, en envases adecuados y etiquetados para su mayor conservación y la cual es sometida a calentamientos suaves (Gil, 2010).

2.3.5 Composición química de la miel

Es difícil hablar de la composición química de miel, ya que depende de muchos factores (Alvarez *et al.*, 2009) como:

- ⌘ Zonas geográficas
- ⌘ Estación del año de cosecha
- ⌘ Fuente floral
- ⌘ Raza apícola
- ⌘ Factores edafológicos y climáticos
- ⌘ Estado fisiológico de la colonia

Se puede decir que la miel es esencialmente una solución concentrada de azúcar que contiene aproximadamente un 80% de hidratos de carbono encontrando en mayor proporción a la fructosa y glucosa, el 17% corresponde al contenido de agua y un 3% de diversas sustancias como ácidos orgánicos, aminoácidos libres, enzimas, sustancias minerales, vitaminas, compuestos aromáticos etc, sin embargo se han llegado a detectar más de 180 sustancias diferentes además de residuos sólidos como granos polen y cera (Alvarez *et al.*, 2010)

Como se puede observar en la siguiente Tabla 1, se muestra la composición promedio en de la miel (Gil, 2010., Lastra, 2001).

Componente	Cantidad promedio en 100g miel
Agua	17 g
Carbohidratos totales	82.4 g
Fructuosa	38.5 g
Glucosa	31.2 g
Maltosa	7.2 g
Sacarosa	1.5 g
Oligosacáridos	1.3 g
Vitaminas	0.3-0.5 mg
Ácido ascórbico	2.4 mg
Nitrógeno	0.4 mg
Minerales	0.17 mg
Ácidos libres	0.6-47 mg
Compuestos fenólicos	50-400 mg
Ácidos totales	29.1m Eq
pH	3.4-6.1

Tabla 1. Composición química de la miel

Las características fisicoquímicas de las mieles, siempre tendrán una variación en cuanto a su conformación, por lo que en cada zona donde se extraiga la miel, será diferente a otra zona (Lastra, 2001).

2.3.6 Características organolépticas de la miel

Las principales propiedades organolépticas que se detectan en la miel son: sabor, olor, brillo, viscosidad, cristalización y color, todas estas características en conjunto constituyen la apariencia que distinguen los diversos tipos de mieles. El aroma y el sabor ambos están muy relacionados, por la procedencia del néctar. Dentro de estas características y afines para esta investigación solo describiremos la propiedad de color en la miel.

2.3.6.1 Color

El color de la miel puede variar desde casi incoloro hasta rojo oscuro, pasando por las tonalidades amarillas, ámbar y marrones (White, 1978). El color de la miel está relacionada con el origen botánico y la composición del néctar (aminoácidos, carotenoides, flavonoides, polifenoles) (Bogdanov *et al.*, 2004., Terrab *et al.*, 2004). Las variaciones finales de color están relacionadas con los procesos de envejecimiento natural y calentamiento, que tienden a ser tonalidades más oscuras y son debidas a las reacciones de los polifenoles, azúcares reductores y aminoácidos con el hierro (Miliun, 1939).

2.3.7 Polen en la miel

La Melisopolinología es la ciencia que estudia y analiza el polen y otros elementos presentes en la miel. Sus principales objetivos son:

- ⌘ Conocer el origen floral de la miel
- ⌘ Determinar el origen geográfico
- ⌘ Determinar la riqueza polínica
- ⌘ Detectar la presencia de impurezas

El polen son granos de estructuras complejas, formadas dentro de los sacos polínicos, al germinar generan los gametos masculinos que fecundaran. La importancia del polen representa la alimentación para la abeja por su alto contenido proteico, al libar la abeja, el néctar de la planta queda impregnada de polen la cual pasará a la miel quedando suspendida en ella (Herrero, 2004).

La composición química del polen corresponde a un 7-15 % agua, 18 a 28 % de proteínas en la cuales, se encuentran: globulinas, albuminas, prolaminas y glutelinas, así como vitaminas A, C y del grupo B, hidratos de carbono (25-48%) (Glucosa, fructuosa, ramnosa, sacarosa y rafinosa), almidón, celulosa, pectinas, lípidos de 1 a 14 %, algunos ácidos (fórmico, acético, valerico, oleico) finalmente ciertos minerales (1-15%) como potasio, fosforo calcio entre otros (Benedetti y Pieralli, 1990).

El estudio del polen como ya se mencionó, es de gran importancia, principalmente para identificar el origen floral de la miel, se lleva a cabo por medio del análisis polínico, a través del estudio microscópico de los componentes del sedimento obtenido de una miel, ya que nos permite identificar los tipos polínicos presentes, de manera cualitativa y cuantitativamente. De este modo es posible determinar cuáles han sido las especies

vegetales, de las que se ha obtenido la materia prima necesaria para la elaboración de la miel (Lastra, 2001).

2.3.7.1 Análisis polínico cualitativo

Consiste en identificar cada una de las especies que se encuentran en el sedimento de la miel. Los resultados del recuento polínico se expresan, en el llamado espectro polínico, por lo que cada tipo de polen indica el número de granos contados, el porcentaje que estos expresan en la muestra y su representatividad o dominancia se clasifican en 5 categorías, según la escala propuesta por Sawyer (1988), las cuales se mencionan a continuación:

- ⌘ Polen dominante ó **D**, cuando representa más de 45%
- ⌘ Polen acompañante ó **A**, cuando representa entre 16 y 45%
- ⌘ Polen importante ó **I** cuando representa del 3 al 15%
- ⌘ Polen aliado o raro ó **R**, representa cantidades de 3 al 1%
- ⌘ Polen esporádico, representa menos de 1%

En base a lo anterior como ya se había mencionado, cuando se encuentre un solo tipo de polen mayor al 45% se le considera un polen dominante y la miel se le denomina monofloral y cuando no hay predominancia de ningún tipo de polen, la miel será multifloral o miliflores (Sawyer, 1988., Louveaux *et al.*, 1978).

2.3.7.2 Análisis polínico cuantitativo

Se basa en el recuento total de los granos de polen que están presentes en determinada cantidad de miel. Según su origen floral las mieles pueden tener cierta riqueza polínica, Maurizio (1939) clasifica en 5 diferentes clases a la miel como se muestra en la siguiente Tabla 2.

Clase	Granos de polen por peso de miel
I	< 2,000
II	De 2,000 a 10,000
III	De 10,001 a 50,000
IV	De 50,001 a 100,000
V	>100,000

Tabla 2. Clases de miel según su riqueza polínica

Invariablemente, el polen siempre está presente en las mieles, en mayor o menor cantidad, se consideran 4 razones principales por las cuales, puede variar la presencia de polen en la miel:

- ⌘ El tipo de flor que visita la abeja ya que hay muchas plantas que son pobres en polen (*citrus*)
- ⌘ Manejo de las prácticas apícolas
- ⌘ La distancia de la fuente del néctar hacia la colmena
- ⌘ Tipo de procesamiento que se le ha dado a la miel, principalmente cuando han sido filtradas, hay la presencia de muy poca cantidad de polen (Gil, 2010., Sawyer, 1988).

2.3.8 Alteraciones de la miel

La miel puede sufrir algunas alteraciones como todo producto biológico que pueden modificar, sus características organolépticas y valor nutritivo. Se pueden presentar tales alteraciones de dos formas principalmente; **modificaciones naturales** y **fraudes por el humano**.

2.3.8.1 Modificaciones naturales

Las principales modificación naturales, que sufre la miel son: cristalización, fermentación, envejecimiento y acumulación de hidroximetilfurfural (HMF) (Gil, 2010).

⌘ **Cristalización**

Es un fenómeno natural que se produce en la mayor parte de mieles, esto se debe a la precipitación de la glucosa, azúcar menos soluble que la fructuosa. La velocidad es directamente proporcional al contenido de glucosa y a la presencia de partículas de polen, cera o burbujas de aire, que favorecen la formación de núcleos de cristalización. Las mieles con una relación de glucosa/agua > 2.1 tienden a cristalizar rápidamente: la temperatura mayor a 25 °C retrasa este fenómeno.

La cristalización produce una serie de fenómenos, como la separación de dos fases (masa blanquecina en el fondo del envase) o la cristalización incompleta. La pasteurización retrasa la cristalización y el crecimiento de levaduras (Gil, 2010).

⌘ **Fermentación**

La fermentación es la alteración más grave que puede sufrir la miel. Es un proceso irreversible que implica la transformación y pérdida de las características del producto

original. La cantidad de agua es un factor que ayuda a la fermentación y si el contenido supera el 18%, la miel puede fermentar fácilmente debido, a que la concentración de azúcares no es suficiente como para impedir la multiplicación natural de las levaduras que estas provocan la formación de alcoholes y ácidos orgánicos, a partir de los azúcares presentes. En este proceso se genera etanol, una de las características es el olor a “vino” y la presencia de numerosa burbujas de CO₂ (Gil, 2010).

⌘ Envejecimiento

Esta principalmente se encuentran influenciadas del medio atmosférico y sus principales defectos son:

- ⌘ Aumento en la acidez y la formación de hidroximetilfurfural
- ⌘ Coloración más intensa
- ⌘ Disminución de la actividad enzimática
- ⌘ Descenso de los niveles de azúcares reductores

⌘ Acumulación de HMF

El hidroximetilfurfural es un aldehído y un furano que se forma natural y espontáneamente en la miel, a partir de los azúcares presentes, principalmente por la deshidratación de la fructuosa. A medida que transcurre la vida útil de una miel el hidroximetilfurfural va aumentando, al igual si es sometido algún procesamiento térmico (White, 1980 y Ventura 1990). El contenido de dicho aldehído es considerado uno de los parámetros de calidad, de las condiciones en que la miel fue almacenada o si recibió tratamiento recibido y la edad (White, 1980). El máximo permitido en la normativa Mexicana actual es de 40 mg de H.M.F./Kg de miel, valores superiores indican mieles viejas de baja calidad y/o excesivamente calentadas o adulteradas (Subovsky *et al.*,2000).

2.3.8.2 Fraudes inducidas por el humano

La miel puede llegar a sufrir alteraciones causadas por los apicultores que van a afectar su calidad y propiedades de la miel

⌘ Mezclado

Consiste en la mezcla de dos tipos diferentes de mieles (oscuras y claras) con el fin de obtener miles cuyas características se ajusten a las exigencias del mercado.

⌘ Adición de polen

Se hace con la finalidad de adicionar polen a la miel y falsificar su origen floral y dar una denominación que no corresponde.

⌘ Alimentación de abejas con jarabes o sustancias azucaradas

Se realiza con el fin de aumentar la producción de miel en una colmena en base a la alimentación de las abejas con jarabes o sustancias ricas en azúcar. Lo cual se obtiene una miel con alto contenido de sacarosa mayor de 10%.

⌘ Adición de agua

Es un fraude muy común y fácil de detectar ya que una miel líquida es sinónimo de que se haya alterado y va a influir en la fermentación de esta (Gil, 2010, Lastra, 2001).

2.3.9 Otros productos comerciales de la miel

⌘ Jalea real

Consiste en una secreción amarillenta ligeramente gelatinosa, que es producida por las glándulas hipofaríngeas y mandibulares de las abejas obreras jóvenes que sirve de alimento a todas las larvas de la colmena y a la reina a lo largo de toda su vida. El principal componente es agua 66%, azúcares representa el 15%, y el resto lo conforman aminoácidos como: prolina, lisina, arginina y ácidos glutámicos. Según Baltrusaitė (2007) considera que las propiedades nutricionales del polen y la jalea real se deben principalmente al contenido en proteína.

⌘ Propoleo

Es una sustancia viscosa elaborada por las abejas a partir de las secreciones de las resinas y savia de distintos árboles, específicamente como coníferas, las abejas lo emplean como material de construcción y antiséptico. Contiene un 50% de resinas (flavonoides, ácidos orgánicos, esteroides, aldehídos etc) (Gil, 2010).

⌘ Cera

La cera es el material líquido que segregan las abejas melíferas a través de sus glándulas cereras, al contacto con el aire la cera se endurece y forma pequeñas escamillas. Las abejas la utilizan para construir los alveolos hexagonales de sus panales, en donde almacenan la miel, la reina deposita en ellas sus huevos y las nuevas abejas que se crían en su interior. Aproximadamente un millón de estas escamillas significa un kilo de cera; Las propiedades fisicoquímicas de la cera dependerán de las especies de abejas que la produzcan (Herrero, 2004).

2.3.10 Procedimiento industrial para la obtención de la miel

En la siguiente Figura 6, se describen las principales etapas que se llevan a cabo en el procesamiento de la miel a nivel industrial (Gil, 2010., Herrero, 2004).

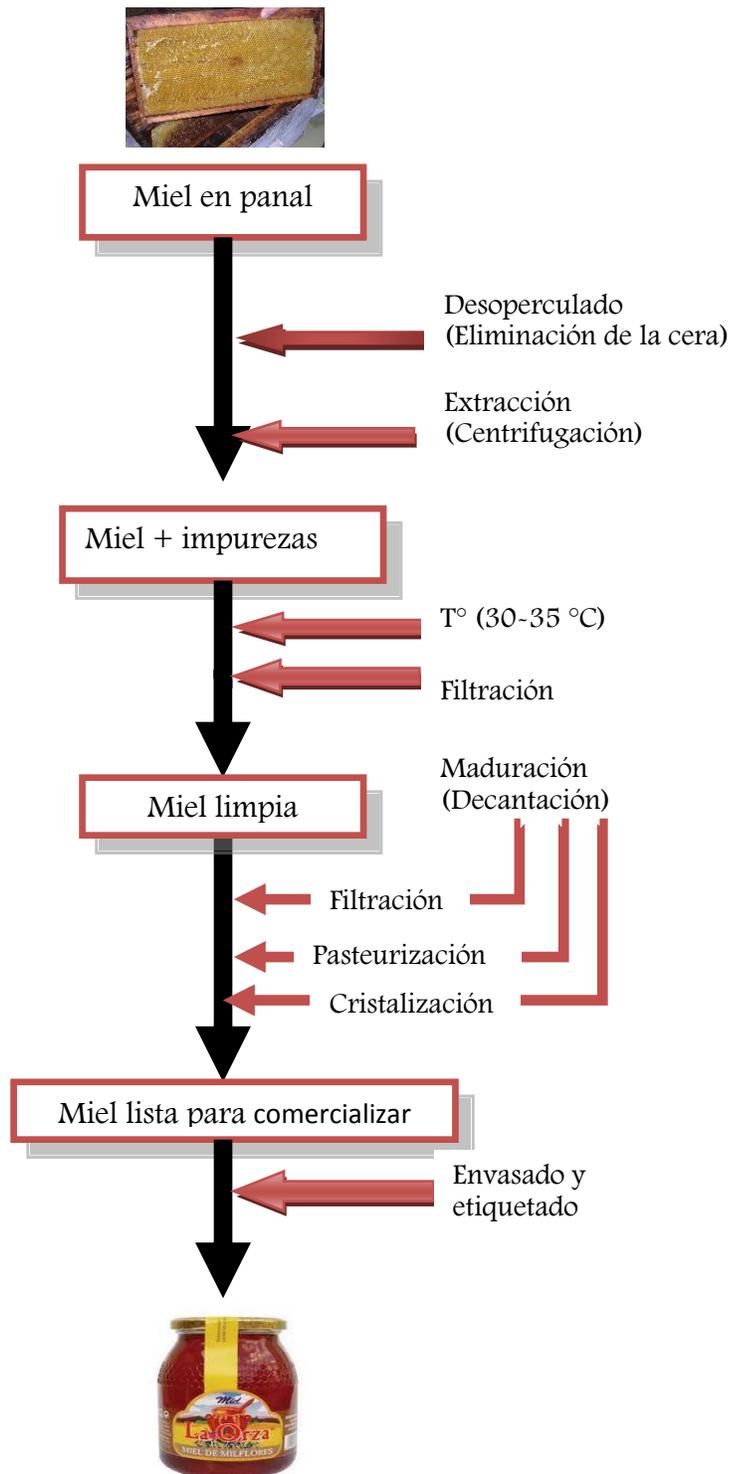


Figura 6. Esquema general del proceso industrial de la miel

2.4 Alimentos funcionales

Los conceptos de alimentos funcionales surgió en Japón a principios de los 80's, pero hasta en 1991, el ministro de salud y bienestar de este país fue pionero en publicar una reglamentación permitiendo legalmente la comercialización de algunos alimentos funcionales (Foods for Specified Health Uses ó FOSHU) refiriéndose aquellos alimentos con componentes, que desempeñan una función favorable y específica en las funciones fisiológicas del organismo humano, más allá de su aporte nutricional. Para su aprobación como FOSHU, un alimento debe cumplir fundamentalmente 3 requisitos:

- ⌘ Que exista evidencia científica de su eficacia
- ⌘ Que su consumo sea seguro, con estudios adicionales en humanos
- ⌘ Que se haya determinado analíticamente sus compuestos bioactivos

La funcionalidad de estos alimentos viene determinada por una serie de compuestos bioactivos, que confieren al alimento ciertas características específicas que lo convierten en funcional, ayudando a la prevención de enfermedades y mejorar el estado de bienestar del individuo. En los últimos años ha sido muy significativo el aumento de consumo de alimentos funcionales ya que muchos de ellos presentan características de contener compuestos bioactivos encontrando un grupo especial a los antioxidantes (Ohama y Ikeda 2006, Shimizu, 2003).

2.4.1 Compuestos bioactivos de los alimentos

Los nutrientes que proporcionan los alimentos son de dos tipos: macronutrientes y micronutrientes. Ambos son fundamentales para el organismo ya que intervenir en funciones vitales (Marti del Moral, 2005). La funcionalidad de un alimento esta generalmente relacionado con los compuestos bioactivos, también llamados fitoquímicos (cuando es de origen vegetal) que son metabolitos secundarios de las plantas; sin embargo, se pueden encontrar en alimentos de origen animal, al igual que en bacterias y hongos (Gil, 2010). La presencia y concentración de éstos, va a estar en función de diversos factores: climatológicos, agronómicos, tecnológico ó culinarios. Estos compuestos presentan una cierta actividad biológica dentro del organismo, la más conocida y estudiada es su capacidad antioxidante que se traduce en bienestar para el individuo y menor riesgo de desarrollar diversas enfermedades (Serrano, 2005). En las últimas décadas se ha observado el gran interés por la identificación de los compuestos, que hacen que un alimento sea funcional y

determinar los beneficios que proporcionan a nuestro organismo. De acuerdo a la descripción que hace Marti del Moral (2005) clasifica a los compuestos bioactivos según su naturaleza química como se observa en la siguiente Figura 7, donde se muestran algunos ejemplos de compuestos bioactivos.

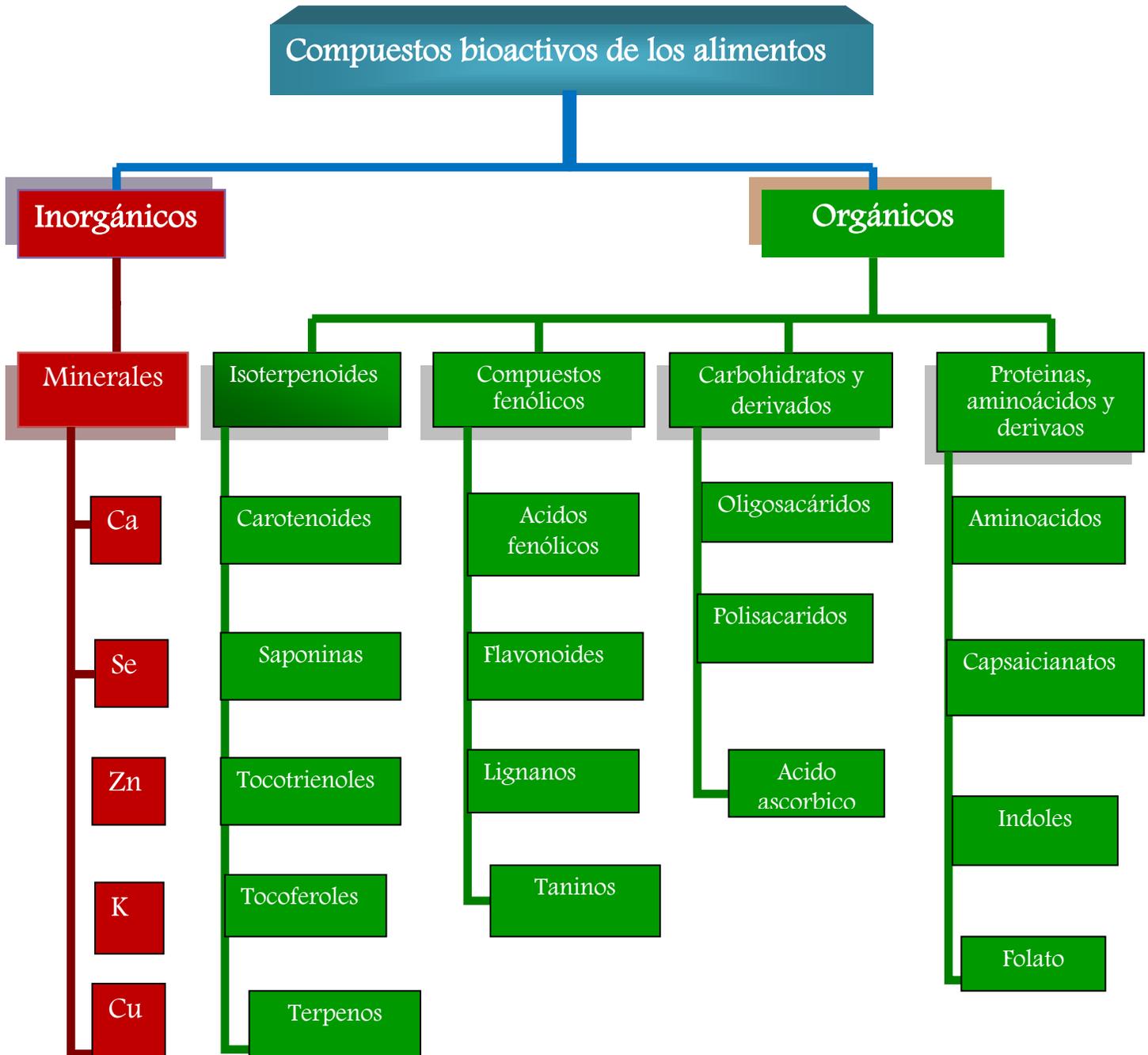


Figura 7. Clasificación de compuestos bioactivos según su naturaleza química

2.4.2 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios sintetizados por los vegetales, su estructura consiste en un núcleo aromático con al menos un grupo hidroxilo libre (-OH) (Dimitros, 2006). Se consideran a los compuestos fenólicos como los compuestos bioactivos más importantes en la dieta humana y se encuentran principalmente en las frutas, verduras, legumbres, vino, café, zumos de frutas etc, estos son en gran parte responsables del color, aroma, y sabor de los alimentos que los contiene. A lo largo de los años se ha identificado más de 8000 compuestos fenólicos (Saura y Goñi, 2007).

El interés por el consumo de compuestos fenólicos se ha asociado con efectos favorables en enfermedades cardiovasculares (Renaud y Lorgeril, 1992) o neurodegenerativas (Sun *et al*, 2002) en la prevención y tratamiento de distintos tipos de cáncer (Lambert *et al*, 2005) en general, en todas aquellas enfermedades donde el estrés oxidativo tiene un papel importante. Los efectos beneficiosos se explican fundamentalmente, por las propiedades antioxidantes (Martínez, 2002)

2.4.2.1 Clasificación de los compuestos fenólicos

Esta familia de compuestos fenólicos forma parte de un grupo muy heterogéneo; comprende desde simples moléculas como el ácido fenólico hasta compuestos altamente polimerizados como los taninos. En la Figura 8, se indican las principales familias de compuestos fenólicos, basándose en su estructura química básica, teniendo en cuenta el número de átomos de carbono que lo constituyen (Antolovich *et al.*, 2000; Bravo, 1998)

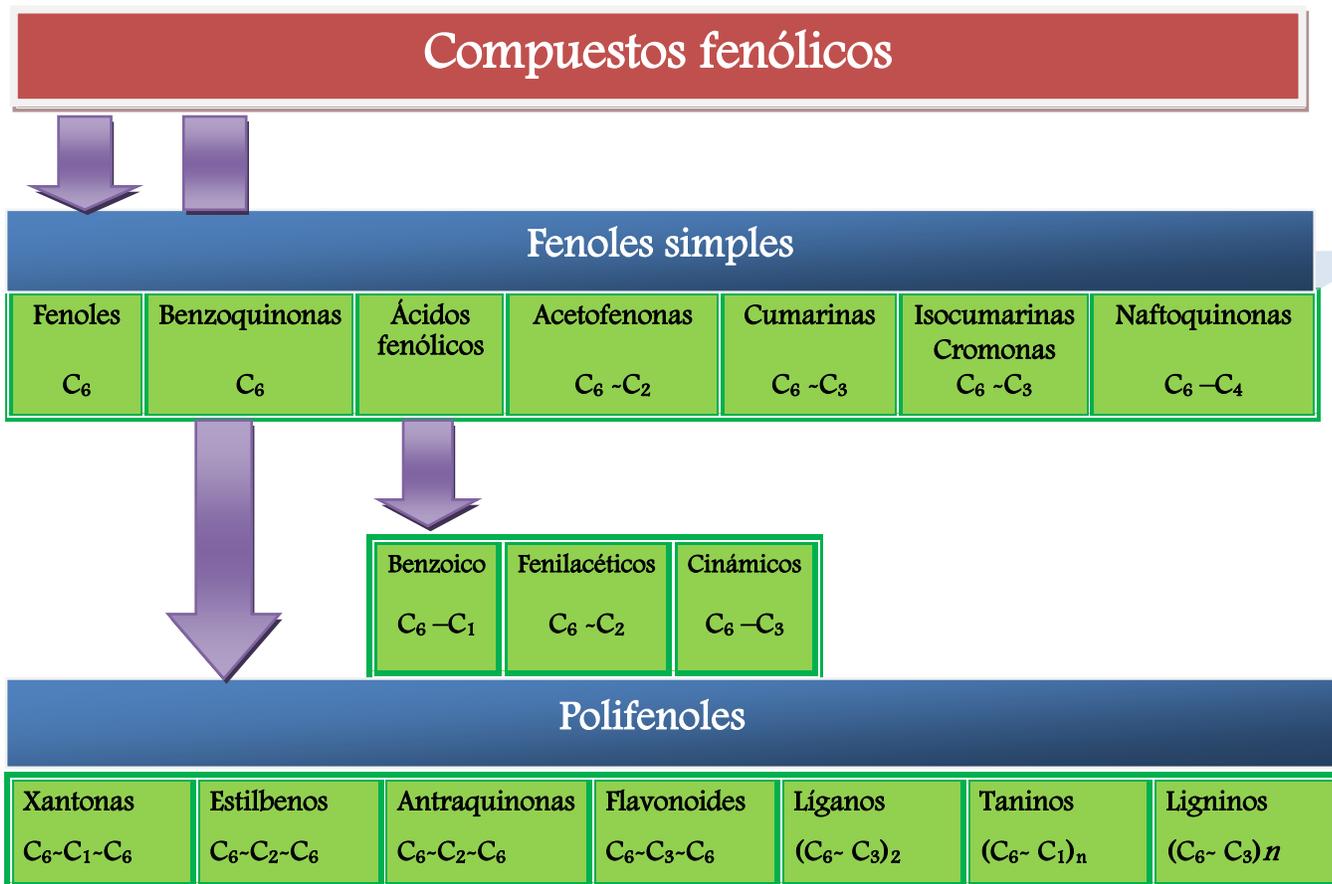


Figura 8. Clasificación de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos presentes en los alimentos suelen presentarse conjugados con mono-polisacáridos, ácidos glucurónico y galacturónico, al igual se pueden unir a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, animas y lípidos (Duthie *et al.*, 2003). Los grupos de compuestos de mayor importancia desde la perspectiva de salud humana son los ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos, debido a evidencias encontradas acerca de su capacidad antioxidante, directamente sobre las especies reactivas de oxígeno. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se atribuye a la facilidad para ceder átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre y a la posibilidad de deslocalización de cargas en el sistema de dobles enlaces del anillo aromático (Duthie *et al.*, 2003).

2.4.2.2 Ácidos fenólicos

La estructura química de este grupo de compuestos fenólicos como se observa en la Figura 9, consta de un anillo aromático, un grupo hidroxílico comunes a todos los compuestos

fenólicos y un grupo carboxílico. Los principales compuestos con interés terapéutico, son los derivados del ácido benzoico (C_6-C_1) y del ácido cinámico (C_6-C_3).

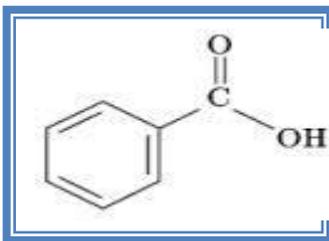


Figura 9. Estructura básica de los ácidos fenólicos

Los derivados del ácido cinámico son abundantes en la naturaleza en forma libre (ácido cumárico, ácido caféico etc) al igual los derivados del ácido benzoico abundan en la naturaleza (ácido vanílico, ácido gálico) (Nichenametla y Taruscio, 2006).

Los grupos fenólicos son capaces de aceptar un electrón para formar radicales fenoxilo relativamente estables, deteniendo las reacciones oxidativas en cadena que se producen en las células de ahí se deriva las propiedades de ser antioxidantes (Scalbert, 2005). Los compuestos fenólicos poseen además una estructura química ideal para captar iones metálicos (principalmente hierro y cobre) y por tanto para inhibir la formación de radicales libres a través de reacciones tipo Fenton (Rice- Evans *et al.*, 1997).

2.4.2.3 Flavonoides

Los flavonoides son el grupo más extenso dentro de los compuestos fenólicos y se encuentran distribuidos en una gran variedad de alimentos de origen vegetal. La estructura común de los flavonoides consiste en dos anillos aromáticos (A y B) unidos por 3 átomos de carbono que normalmente forman un heterociclo oxigenado (C) como se observa en la Figura 10, por lo general se encuentran unidos a azúcares, por lo que tienden hacer hidrosolubles, aunque en ocasiones también se pueden encontrar como agliconas.

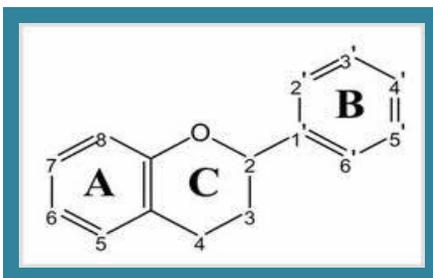


Figura 10. Estructura básica de los flavonoides

Debido a sus propiedades organolépticas, los flavonoides son los responsables del color natural de los alimentos. La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química (Bors, 1990). Las variaciones estructurales en los anillos permiten subdividir a los flavonoides en 6 subclases: flavononas, flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanoles y antocianidinas (Kroon *et al.*, 2004). Los efectos beneficiosos sobre la salud ejercida por los flavonoides se encuentran el efecto antioxidante en numerosos sistemas biológicos, la quelación de metales (Martínez-Flores, 2002)

El mecanismo por el que los flavonoides ejercen su actividad antioxidante se basa en la transferencia de electrones, que conlleva a la aparición de una molécula radical activa y la capacidad de estos compuestos para quelar metales (Kroon *et al.*, 2004).

Los compuestos fenólicos o polifenoles, han sido reconocidos por su amplio espectro de compuestos bioactivos de la dieta humana, encontrando presencia de ellos en la miel. Se ha establecido que la mayoría de los compuestos bioactivos encontrados en miel son compuestos fenólicos de acuerdo con varias investigaciones previas, es posible afirmar su capacidad antioxidante, sin embargo, la concentración de éstos puede variar sustancialmente de acuerdo al origen del tipo de flor de la que proviene el néctar, estación del año, factores ambientales (Meda *et al.*, 2005)

2.5 Antioxidantes

Halliwel y Gutteridge (1998) definieron como antioxidante a aquella sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres, cediéndole electrones y (Figura 11) transformándolo en radical débil con escasos o nulos efectos tóxicos.

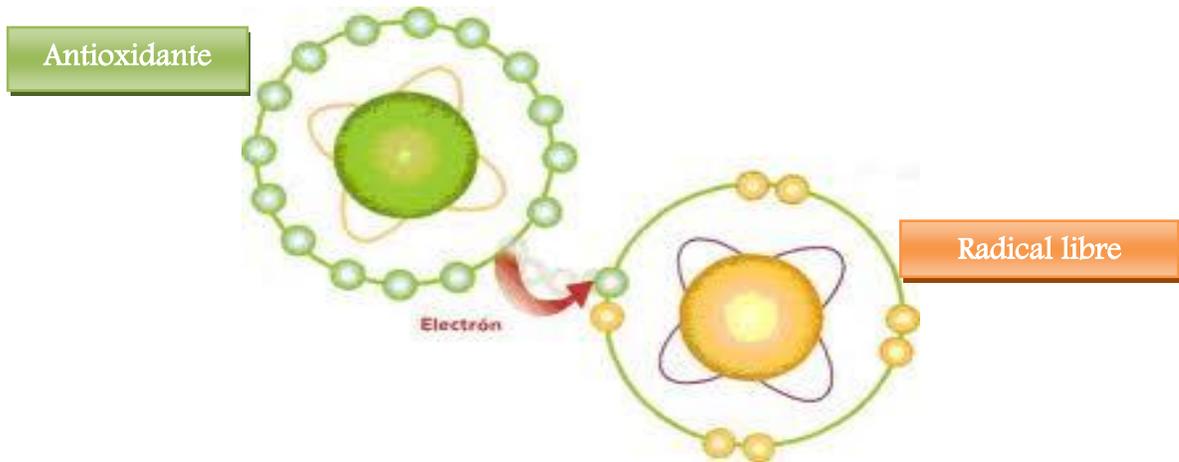


Figura 11. Neutralización de un radical libre

La actividad antioxidante, es la capacidad de neutralizar los radicales libres, realizada por un grupo de moléculas llamadas antioxidantes. Entre las sustancias antioxidantes están los compuestos fenólicos que se encuentran en una gran variedad de alimentos entre ellos la miel (Rao y Balachandran, 2006).

Los antioxidantes se clasifican en endógenos, fabricados por la propia célula, y exógenos, como se observa de la Tabla 3 que ingresan en el organismo a través de la dieta o de suplementos con formulaciones antioxidantes.

Exógenos	Endógenos	Cofactores
Vitamina E	Glutación	Cobre
Vitamina C	Coenzima Q	Zinc
Betacaroteno	Catalasa	Manganeso
Compuestos fenólicos	Glutación peroxidasa	Hierro
Licopeno	Dismutasa	Selenio

Tabla 3. Clasificación de antioxidantes

2.6 Radicales libres

Se consideran radicales libres (RL) aquellas moléculas, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo (Dimitrios, 2006). Esta configuración espacial les hace muy inestables y extraordinariamente reactivos, con una enorme capacidad para combinarse, con la mayoría de las biomoléculas celulares (carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos) provocando un gran daño en ellas y en las membranas celulares. (Finkel, 2000). Dentro de los radicales libres o especies reactivas del oxígeno (ROS del inglés reactive oxygen species), el oxígeno es el principal radical libre, ya que tiene dos electrones desapareados. En la siguiente Tabla 4 se muestran los principales radicales y especies reactivas del oxígeno.

Especie	Nombre común
-OH	Radical hidroxilo
O ₂ ⁻	Anión superóxido
HO ₂	Radical hidroperoxilo
RO ⁻	Radical alcoxilo
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
RNS, RIS, RCS	Especies reactivas(nitrógeno, hierro, cobre)
ROO ⁻	Radical peroxilo

Tabla 4. Principales radicales

La acumulación de estos radicales libres, causa el **estrés oxidativo**, que se define como el desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de especies reactivas y radicales libres que provocan daño a las macromoléculas y no pueden ser contrarrestando por los sistemas antioxidantes de defensa. El daño celular que producen los radicales, ocurre en los enlaces de las proteínas, fosfolípidos poliinsaturados de las membranas celulares, hidratos de carbono y ácidos nucleicos, lo que provoca una gran variedad de cambios bioquímicos y fisiológicos en la célula, ocasionados por una activación en cadena, induciendo a esto, que se generen diversas enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas y cáncer (Halliwell y Gutteridge, 1999). Existe

también la producción de RL o ER por influencias externas cuando nuestro organismo recibe el impacto de diversos contaminantes, tales como los gases provenientes de los escapes de los automóviles, la contaminación ambiental, humo del cigarrillo, algunos productos de limpieza, pesticidas, algunos fármacos, el ejercicio físico excesivo o los rayos ultravioletas del sol (Dimitros, 2006).

3. ANTECEDENTES

Actualmente la miel ha sido tema de interés por diversos investigadores, debido a la presencia de compuestos bioactivos (fenoles, flavonoides, carotenoides, aminoácidos etc.) que presentan propiedades antioxidantes, ante la presencia de radicales libres.

Meda *et al.*, (2005), en su investigación "Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity", determinó la concentración de fenoles y flavonoides totales en 27 muestras de miel de Burkina (multifloral, monoflorales y mielada). Encontró una concentración de fenoles totales en mieles monoflorares de 42.96-100 mg EAG /100g miel, flavonoides totales un rango de 0.17-6.14 mg EQ /100g miel, mientras que en las mieles multiflorales presentaron 32.59-86.07 mg EAG /100g miel y flavonoides totales de 0.41-8.45 mg EQ/100gm miel y en mieles mieladas encontró un alto contenido de fenoles en promedio de 113.98 mg EAG /100g miel y 1.85-3.62 mg EQ /100 g miel de flavonoides totales. Siendo que en la miel mielada presentó mayor cantidad de fenoles totales y una buena actividad antioxidante más sin embargo todas las muestras presentaron actividad antioxidante en un rango de 10.20 a 63.60 mg AEAC/ 100 g miel.

Turkmen *et al.*, (2006) determinó los efectos del calentamiento prolongado sobre el color y la actividad antioxidante de la miel. Las muestras de miel fueron colocadas en tubos cerrados incubados a 50 y 60°C por 12 días y 70°C por 10 días, muestreando cada 24 horas. La capacidad antioxidante la determinó por medio de la inhibición del radical DPPH. Encontrando en la primera determinación, hubo un incremento en la capacidad antioxidante, siendo más notorio en las muestras de miel calentadas a 70 °C que en las mieles de 50 y 60°. El aumento en la capacidad antioxidante de la miel que fue sometida a 70 °C su rango fue de 30 al 85 % de inhibición del radical DPPH, en base a lo que obtuvo concluyo que el tratamiento térmico incrementa los niveles de la capacidad antioxidante por la formación de productos resultantes de la reacción de Maillard sin embargo puede ser un atributo no deseable hacia el consumidor por el incremento en la coloración de la miel por la formación de pigmentos marrones.

Baltrusaityte *et al.*, (2007) en su investigación “Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts” evaluó la capacidad antioxidante de 35 muestras de mieles de la localidad de Lithuania determinó su origen floral por medio de la metodología propuesta de Louveaux y Maurizio (1978) encontrando mieles multiflorares, monoflorales y mieladas. La actividad antioxidante que realizó fue por medio de la metodología de inhibición de los radicales ABTS y DPPH reportando los resultados como % de inhibición de los radicales. Las mieles presentaron un rango de 31.1 a 86.9 % de inhibición para el radical DPPH y para la inhibición del radical ABTS fue de 50.4 - 96.8 % de inhibición. Concluyó que el ligero aumento que presentó el % de inhibición del radical ABTS en las mieles, se debe a que este radical presenta la afinidad de compuestos antioxidantes hidrófilos como hidrófobos. Sin embargo varias muestras de miel mostraron un alto % de inhibición del radical DPPH y un bajo % de inhibición en el radical ABTS.

Bertoncelj *et al.*, (2007) en su trabajo titulado “Evaluation of the phenolic content antioxidant activity and color of Slovenian honey” analizó mieles de 7 comunidades especificando su origen floral por los apicultores de Slovenian clasificándolas en monoflorales, poliflorales y bosque. Determinó el contenido total de fenoles, encontrando en las mieles monoflorales un rango de 44-245 mg EAG /100g miel, para poliflorales en promedio 157.3 mg EAG/100g miel y para miel del bosque 233.9 mg EAG/ 100g miel. En la medición de color los parámetros L a b encontró que las mieles monoflorales (cítricos y acacia) fue la que presento mayor luminosidad y la miel de bosque una menor luminosidad. Determinó la correlación que existe en el color con el contenido total de fenoles con una $r= 0.889$ considerándola como buena. La actividad antioxidante fue baja en las mieles claras (cítricos y acacia) y más alta en las mieles oscuras.

Vit *et al.*, (2008) en su estudio de Mieles checas determinó su capacidad antioxidante con el método de decoloración del catión radical ABTS, concentración de los compuestos bioactivos como fenoles y flavonoides totales, de 22 mieles florales, 15 mielada y 13 mixta. Encontrando en un rango de fenoles totales, para las mieles florales 40.09-245.02 mg EAG/100 g miel, flavonoides totales 1.09-12.88 mg EQ/100 g miel, para las mieles mixtas 47.57-258.11mg EAG/100g miel en fenoles totales, 2.69-9.67 mg EQ /100 g miel de flavonoides totales y para las mieles mieladas encontró un rango de 72.6-263.66 mg EAG/100g miel de fenoles totales

y para flavonoides totales 3.62-15.74 mg EQ/100g miel. Todas las muestras de miel presentaron según la categoría que propone en los parámetros de capacidad antioxidante como baja, media y alta las muestras analizadas en su estudio se comportaron con una actividad antioxidante media encontró un rango de 43 a 290 μ moles equivalentes Trolox. El un mayor contenido de flavonoides totales en la mieles mieladas, no encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) en promedio entre el contenido de fenoles totales en las muestras de miel. Concluye que la variabilidad de las concentraciones de los compuestos bioactivos presentes en la miel depende a la gran diversidad de especies vegetales que visitan las abejas para obtener el néctar y es de esperar que todas las mieles tengan diferente composición.

Alvarez *et al.*, 2010 en su investigación “Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation whit color, polyphenol content and other chemical compounds” analizó el contenido de fenoles, flavonoides, ácido ascórbico, hidroximetilfurfural análisis polínico, y actividad antioxidante por la metodología de FRAP. Las mieles analizadas de acuerdo a su análisis polínico, encontró que todas eran monoflorales con diferente origen floral y poco polen presente en las mieles. Determinó como un parámetro de calidad en las mieles el contenido de hidroximetilfurfural encontrando un rango de 3.3-15.9 mg / kg considerando a las mieles monoflorales frescas ya que entran dentro de las reglas establecidas por Official Journal of the European Communities, mencionando también que diversos factores influyen en los niveles de HMF como: temperatura, tiempo de calentamiento, condiciones de almacenaje, pH y fuente floral. La cantidad de fenoles totales fue de 200-590 mg EAG/kg miel y para flavonoides totales de 11.0-25.03 mg EQ/kg miel, encontrando diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las mieles monoflorales y la actividad antioxidante en un rango de 6.1 a 196.7 μ mol TE/100 g miel. Concluyo que la miel monofloral contiene una importante concentración de fenoles y flavonoides, mostrando capacidad antioxidante la cual puede ser usada como alimento de una fuente natural con propiedades antioxidantes que ayudaran al bienestar de ser humano.

Tornuk *et al.*, 2013 evaluó las propiedades bioactivas de 20 mieles artesanales de Turkia, concentración de fenoles y flavonoides totales, % de inhibición del radical DPPH, color e hidroximetilfurfural. Los parámetros que obtuvo de color en las mieles fueron en un rango de 8.88 a 18.54 de luminosidad, lo cual indica que las mieles tiene la tendencia a tonos oscuros ubicados dentro de la esfera de color por lo que consideró obscuras a todas las mieles. Por

otra parte los valores de “a” varió de 2.64 a 8.04 y “b” en intervalos de 11.50 a 23.56. Las cantidades que encontró en el contenido de HMF fue, en un rango de 0.09-4.12 mg/kg las cuales están dentro de los estándares del Codex Alimentario (2011) considerándolas como mieles frescas. Los parámetros de compuestos bioactivos determinó la cantidad de fenoles totales en un rango de 35.3 a 91.5 mg EAG /100g miel, sin embargo en 3 muestras de miel reportó la cantidad promedio de 1824.45 mg EAG/100g miel. En la concentración de flavonoides fue de 5.38-26.75 mg EQ/100 g miel. La actividad antioxidante varió entre las muestras de 54.11 a 68.94 % de inhibición del radical DPPH, lo cual atribuye al origen floral de las mieles. Encontró una correlación buena entre el contenido de fenoles y la capacidad antioxidante ($r^2= 0.906$), sin embargo concluyó que la capacidad antioxidante no solo se le atribuye a los fenoles ya que en 3 mieles que presentaron un mayor contenido de fenoles totales obtuvieron un bajo porcentaje de inhibición del radical DPPH.

Escriche *et al.*, (2013) en su trabajo titulado “Suitability of antioxidant capacity flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment determinó la actividad antioxidante, concentración de fenoles y flavonoides totales en 4 mieles de diferente origen botánico de España, dos monoflorales (cítrico, romero), multifloral y mielada fueron obtenidas directamente de los apicultores. Su experimento consistió en 3 lotes de miel, el primer lote fue analizado a temperatura ambiente, segundo lote a temperatura de 45°C por 48 horas y el tercero a 80 °C por 4 minutos. Determinó el origen botánico mediante la cuantificación de polen siguiendo las recomendaciones de la comisión internacional botánica de abejas, bajo la metodología microscópica del polen a 40x. Encontrando para la miel de cítricos un porcentaje entre 15 y 37% de predominancia de este polen, para la miel de romero encontró entre el 15 y 31% de polen considerándolas monoflorales en el caso de la miel mielada solo encontró 1.9 a 2.5% de polen y para las miel multifloral un gran porcentaje de diferentes tipos de polen fueron identificados. El contenido de HMF en las mieles que no fueron sometidas a calentamiento mostraron niveles bajos de HMF, a excepción de la miel de romero que presentó 15.6 mg/kg siendo así consideradas como frescas, el lote de mieles que fueron sometidas a 50°C alcanzó 7.65 mg/kg y las mieles que fueron sometidas a 80°C reportaron 8.18 mg/kg encontrando estos valores dentro de las normas del Codex alimentario. Los valores de luminosidad (L), obtuvo para la miel monofloral de cítricos y romero 47.99 y 39.20 respectivamente, para la miel multifloral 34.32 y la miel mielada 26.02 considerando está la que presentó menos luminosidad con respecto a las

demás. En el caso de la actividad antioxidante encontró un significativo incremento en la actividad antioxidante de 59.34 % de inhibición del radical DPPH en miles sin tratamiento térmico, y un 63.18% de inhibición en miles que fueron tratadas a 80°C. Llevo a cabo la identificación de fenoles encontrando a 2 diferentes compuestos y 8 tipos de flavonoides. Concluyo que la miel mielada fue la que obtuvo los mayores parámetros en todas las mediciones, la miel de romero y multifloral intermedios, y la miel monofloral de cítricos presentó los niveles más bajos de las variables determinadas.

Kowalski *et al.*, (2013) en su trabajo titulado “Changes of antioxidant and formation of 5-hidroxymethylfurfural inhoney during thermal and microwave processing” evaluó los cambios en la actividad antioxidante y la formación de hidroximetilfurfural en la miel durante el procesamiento térmico e radiación de microondas. Utilizó 4 tipos de miel (mielada, lima, acacia, alforfón) determinando los parámetros a temperatura ambiente (1), calentamiento a 90°C durante 10, 20, 30, 40, 50 y 60 min (3) y por último radiación de microondas a 1.26 W/g por 2, 3, 4, 5 y 6 min (2). Determinó la capacidad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS expresado como % de inhibición, fenoles totales mg EAG/100g miel e HMF mg/kg. Los resultados que obtuvo indicaron que hubo un mayor incremento de HMF en todas las muestras de miel que fueron expuestas a 90°C (3), y un menor incremento de HMF por medio de calentamiento por microondas (2). La miel mielada presentó las siguientes características en fenoles totales una concentración de 109.2 mg EAG/100g miel a temperatura ambiente (1), 105.25 mgEAG/100g miel expuesta en microondas (2) y 84.68 mgEAG/100g miel en el calentamiento convencional (3), presentó un porcentaje de inhibición para ABTS 63% (1), 55% (2) y 38.70 (3) y para DPPH 86.9 %(1), 85.48% (2) y 95.56% (3) de inhibición. Para la miel monofloral la concentración de fenoles totales 69.11 (1), 70.02 (2) y 75.67 (3) mg EAG/100g miel, en los valores obtenidos para ABTS fueron 24.69 %(1), 24.04 % (2) y 28.42 % (3) de inhibición y para DPPH 62.37% (1), 69.04% (2) y 75.88 % (3) de inhibición. En la miel de acacia encontró 38.29 (1), 37.95 (2), 38.47 (3) mg EAG/100g miel de fenoles totales, para ABTS 9.12 %(1), 9.15% (2), 9.46 %(3) de inhibición de este radical y DPPH 23.94 % (1), 23.86 % (2), 27.15 %(3) de inhibición y por último la miel de alforfón la concentración de fenoles totales fue 121.06 (1), 128.43 (2), 120.58 (3) mgEAG/100g miel, para la inhibición de radical ABTS presentó 76.21 %(1), 79.84 %(2) y 81.52 %(3) de inhibición y los valores obtenidos para DPPH fueron 68.55 % (1), 85.24 %(2) y 78.39 %(3) de inhibición siendo estos los valores que obtuvo para los tres tratamientos. Encontró un ligero

aumento en el % de inhibición para ambos radicales en las mieles que fueron sometidas a ambos tratamientos de calentamiento a excepción en la miel mielada al ser sometida a los dos tratamientos térmicos. Como se observó la miel de acacia fue la que presentó menor cantidad de fenoles totales en promedio de 38.02 mg EAG/100 g miel y un % de inhibición para ABTS y DPPH de 9.15 y 23.94 respectivamente y la que presentó en mayor cantidad de fenoles totales fue la miel de alforfón con 128.43 mg EAG/100 g miel y un incremento en ambos tratamientos el % de inhibición para DPPH y ABTS. Concluyendo que el tratamiento térmico no afectó significativamente la calidad y las propiedades antioxidantes de la miel.

4. OBJETIVO

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la temperatura en los compuestos fenólicos, flavonoides y la actividad antioxidante presente en diferentes mieles del estado de Hidalgo.

4.2 Objetivos específicos

- ◆ Realizar el análisis polínico cualitativo y cuantitativo de cada una de las muestras de miel para identificar su origen floral.
- ◆ Determinar el efecto de la temperatura en la medición de color y la concentración de compuesto fenólicos, flavonoides y hidroximetilfurfural.
- ◆ Evaluar efecto de la temperatura en capacidad antioxidante de las diferentes mieles por medio ABTS y DPPH.

5. HIPÓTESIS

Las mieles al ser sometidas a diferentes temperaturas, sus compuestos bioactivos así como su capacidad antioxidante, tendrán un comportamiento diferente, de acuerdo a la zona geográfica y fuente floral.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Lugar de estudio

La fase experimental se realizó en el Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICyTA) del Instituto de Ciencias Agropecuarias, de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

6.2 Materiales

Se llevó a cabo la recolección de las muestras de miel en apiarios de las 5 diferentes zonas climáticas y geográficas que presenta el estado de Hidalgo como se observa en la Figura 12, que pertenecen a los municipios de Orizatlán, Acaxochitlán, El Arenal, Tasquillo y Huehuetla; se almacenaron en frascos de plástico oscuros de 1000 mL evitando la menor concentración de aire en el recipiente. Todas las muestras fueron etiquetadas con los datos de procedencia y la fecha de cosecha, las 5 muestras, fueron de la cosecha de marzo-mayo 2012. También se utilizó una miel escogida al azar de un centro comercial, teniendo en total 6 muestras para analizar.

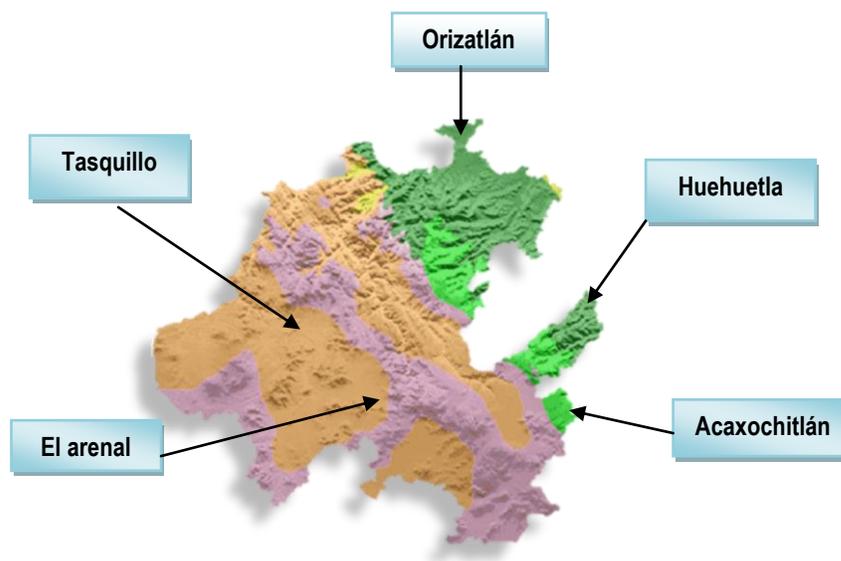


Figura 12. Muestras de mieles de 5 municipios del estado de Hidalgo

6.3 Análisis polínico cualitativo y cuantitativo

Se realizó el análisis polínico cualitativo y cuantitativo de las 6 muestras de miel, mediante el método acetolítico (Gomes, 2010, Erdtman, 1961). La acetólisis, es un proceso físicoquímico agresivo por medio de ácidos, con el fin de eliminar la materia orgánica que esté presente en la miel, para una mejor identificación y conteo total de los granos de polen. A continuación se describe los pasos a seguir para el análisis polínico.

⌘ Preparación de la muestra acetolizada

- ⌘ Se pesaron 10 g de miel con 30 mL de agua destilada a 40°C y se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min.
- ⌘ Se eliminó el sobrenadante, se agregó 5mL de ácido acético glacial (Baker, USA) y se centrifugó a 4000 rpm por 10 min
- ⌘ Se decantó el sobrenadante y se agregaron 0.5 mL de mezcla acetolítica (9mL de anhídrido acético + 1mL de ácido sulfúrico)
- ⌘ Fue calentado en baño maría a 80°C durante 5 min, se dejó enfriar, y después se adiciono 10mL de H₂O destilada y nuevamente se centrifugó.
- ⌘ Se lavó dos veces con agua destilada, dejando siempre el sedimento acetolizado.

⌘ Preparación microscópica

Se fijó el contenido del sedimento de cada miel en portaobjetos con glicerogelatina (Técnica Química, México) teñida con fucsina, de manera que abarcara toda la laminilla del cubre objetos y se dejó reposar. Las preparaciones microscópicas se estudiaron a 40X con un microscopio óptico (Olympus BX45) y las fotografías fueron tomadas con una cámara (Lumenera's INFINITY)

El conteo e identificación del polen acetolizado, se realizó mediante el uso de publicaciones especializadas (Sánchez, 2007., Trigo, 2007., Subiza, 2005) observándolas, directamente del campo microscópico de estudio para una mayor interpretación.

6.4 Procesamiento térmico

Una de las principales razones por la cual la miel recibe un tratamiento térmico es para retrasar la tendencia de cristalización y para destruir posibles microorganismos que contengan. Más sin embargo el calentamiento en la miel puede ser un efecto no muy agradable al consumidor ya que incrementa la posibilidad de generar compuestos pardos que se generan por las reacciones de Maillard y tiene a oscurecerse la miel (Hebbar, 2003., White, 1978).

Se pesaron 50 g de las diferentes muestras de miel en matraces Erlenmeyer de 250mL, colocándolos en baño maría con agitación, una vez que alcanzó la temperatura deseada (40, 50, 60, 70, y 80 °C) se mantuvo constante durante 10 min y se retiraron de baño con agitador horizontal (Scorpion Scientific) dejándolas enfriar a temperatura ambiente. Y se llevó a cabo las determinaciones de las variables de estudio.

6.5 Determinación de color

Se determinó el color de las 6 diferentes muestras de miel a través del sistema CIELab que posiciona el color en el espacio, y se define por una combinación de las coordenadas cilíndricas y cartesianas (Figura 13) donde un punto asociado a un solo color (CIE, 1976) en términos de coordenadas de los valores L* a* y b* y h.

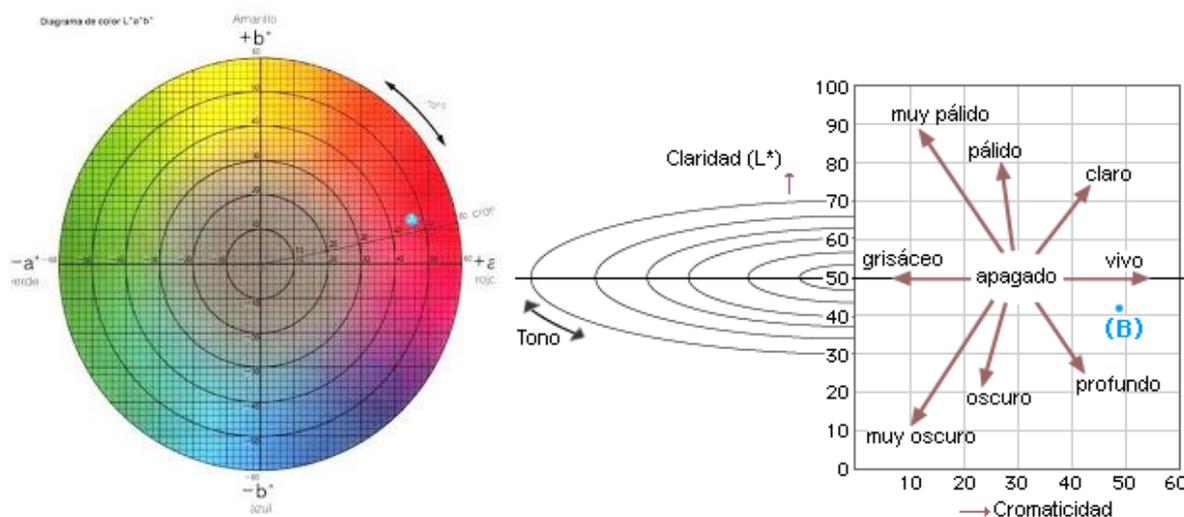


Figura 13. Diagrama del sistema de notación de color L (luminosidad), a, b, cromaticidad (Croma) y ángulo de tono (°Hue)

Para la determinación Se utilizó un colorímetro (MINOLTA CM-508d, Japón) donde, L indica la luminosidad del color, este parámetro se representa dentro de una esfera de color en una escala vertical cuyos valores van de 0 a 100. Los valores cercanos a 100 indican colores luminosos ó claros, mientras que los valores cercanos a cero indican más oscuros o negros. Como se observa en la Figura 13, está representado el diagrama de cromaticidad, los valores positivos de a^+ están en dirección de los rojos y valores negativos (a^-) en dirección a los verdes; el parámetro colorimétrico b^* define el componente amarillo para los valores positivos (b^+) y azul para los negativos (b^-). Se determinó el ángulo de Hue (h) en todas las muestras de miel, a las 6 diferentes temperaturas, este nos indica el tono dentro del diagrama cromático, comenzando en el eje $+a^*$ y se expresa en grados: 0° sería $+a^*$ (rojo), 90° sería $+b^*$ (amarillo), 180° sería $-a^*$ (verde) y 270° sería $-b^*$ (azul) como se observa en el siguiente diagrama.

6.6 Determinación de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales, se llevó a cabo mediante la metodología de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). Se pesó 5 g de miel y se adicionó 50 mL de agua destilada, se filtró con papel Whatman No.1. Se tomó 0.5 mL de la muestra en tubos de ensaye cubiertos con papel aluminio, y fueron mezclados con 2.5 mL del reactivo diluido (1:10) de Folin-Ciocalteu 0.2N (Sigma Aldrich, USA) dejándolos reposar por 5 min, posteriormente se adicionaron 2mL de la solución de carbonato de sodio al 7.5% hasta lograr una mezcla homogénea (Meda *et al.*, 2005).

Ésta se dejó reposar durante 2 horas y después se leyó la absorbancia de la mezcla en un espectrofotómetro (Varian CARY 100BIO, Italia) con celdas de cuarzo, a una longitud de onda de 760nm. Los resultados obtenidos, se expresaron en miligramos de equivalentes de ácido gálico (mg EAG/100g miel) de acuerdo a la curva de calibración obtenida para el ácido gálico (Fermont, Productos químicos Monterey) ($R^2=0.9993$) en concentraciones de 0-100 mg/L. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

6.7 Contenido de flavonoides totales

Para la determinación del contenido de flavonoides totales, se realizó mediante el método Dowd, adaptado por Arvouet-Grand *et al*, (1994). Se utilizó una solución de tricloruro de aluminio (AlCl_3) (Fermont, Monterey, Mex.) al 2% en metanol. Se pesó 1 g de miel aforado a 10 mL de metanol en agitación, esta mezcla se filtró con papel Whatman No. 1. Posteriormente se colocó 2 mL de la mezcla de miel, más 2 mL de la solución metanólica de AlCl_3 , dejándolos reposar durante 20 min en la obscuridad. Pasando este tiempo se leyeron las absorbancias con celdas de cuarzo, a 415 nm en un espectrofotómetro. El contenido total de flavonoides fue determinado usando la curva estándar con quercetina (Sigma Aldrich, USA) (0-50mg/L) ($R^2=0.9998$), los resultados fueron expresado en mg equivalentes de quercetina (mg EQ)/100g miel.

6.8 Determinación de Hidroximetilfurfural (HMF)

Utilizando el método descrito por la AOAC 980.23, 2005 se determinó, el contenido de HMF en la miel, que consistió en pesar 5 g de miel en 25 mL de agua destilada, después se adicionó 0.5 mL de Carrez I (Ferrocianuro de potasio) (J.T. Baker, USA) mezclándolo perfectamente, enseguida se agregó 0.5mL Carrez II (Acetato de zinc) y se homogenizo. Se colocó en un matraz de 50 mL y se aforó con H_2O destilada. Posteriormente se filtró el contenido, los primeros 10 mL del filtrado fueron eliminados. Se colocó en 2 tubos 5 mL del filtrado, en uno se agregó 5 mL de agua destilada y en el otro 5 mL de bisulfito de sodio al 0.2% (J. T. Baker, Germany). Se leyeron las absorbancias de la muestra y de referencia (bisulfito de sodio) a 284 nm y 336 nm.

Los cálculos para la cantidad de HMF en la miel con absorbancias de 284 nm y 336 mn se determinaron con la siguiente formula:

$$\text{HMF (100 g de miel)} = (A_{284} - A_{336}) * 14.97 * (5/\text{g muestra})$$

A_{284} = valor de la absorbancia a 284 nm

A_{336} = valor de la absorbancia a 336 nm

14.97= factor

6.9 Medición de la actividad antioxidante

Actualmente existen diversos métodos para determinar la capacidad antioxidante, los cuales se basan en su capacidad para captar radicales libres entre ellos encontramos: DPPH, ABTS, FRAP, ORAC, DMPD. Sin embargo, no existe el método ideal para evaluar el concepto de capacidad antioxidante total; para ello se emplean análisis combinados para tener una mayor interpretación de resultados (Alvarez *et al.*, 2009).

6.9.1 Determinación de la actividad antioxidante por DPPH

Para la determinación de la actividad antioxidante del radical DPPH• (2,2 Diphenil-1-picrylhydrazyl) se llevó a cabo por el método desarrollado por Brand-Willams *et al.* (1995) que consiste, en que este radical, tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido como se observa en la Figura 14, por la reacción de la presencia de una sustancia antioxidante, siendo medida espectrofotométricamente a 517 nm.

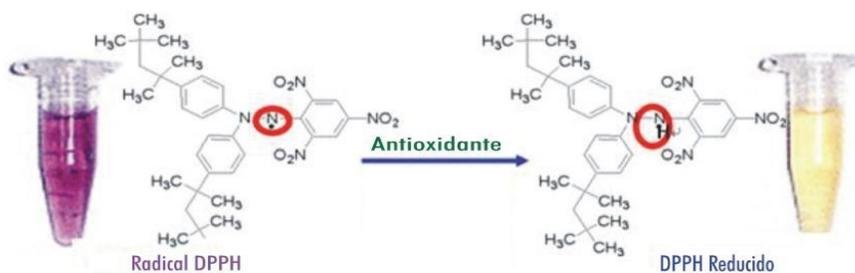


Figura 14. Reacción de reducción del radical DPPH

Generalmente los resultados para la miel, son reportados como el porcentaje de inhibición (Escriche *et al.*, 2013., Kowalski, 2013., Tornuk *et al.*, 2013., Isla *et al.*, 2011., Baltrusaityte, 2007., Turkmen, 2006) que es la cantidad necesaria de antioxidante para disminuir la concentración del radical libre (2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo) por diferencia de absorbancias en una solución metanólica como se indica en la siguiente ecuación (Alvarez, *et al.*, 2010)

$$\% \text{ inhibición} = \frac{[\text{Abs}_{\text{inicial}} - \text{Abs}_{\text{final}}]}{\text{Abs}_{\text{inicial}}} \times 100$$

Se colocaron en una celda de cuarzo 2.5 mL de DPPH (Sigma Aldrich, USA) de una solución metanólica de DPPH $6,1 \times 10^{-5}$ M y se hicieron reaccionar con 0.5 mL de solución de miel, la

mezcla se dejó reposar en la obscuridad durante 30 min, y se leyó a 517 nm el cambio de absorbancia. La actividad antioxidante fue determinada usando una curva estándar con ácido ascórbico (0-80 mg/L) ($R^2= 0.999$) y los resultados fueron expresados en mg equivalentes de ácido ascórbico (mg EAA/100gmiel).

6.9.2 Actividad antioxidante del radical ABTS

Para la determinación de la actividad antioxidante, en la inhibición del radical ABTS (2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) se realizó por la metodología por Re *et al.*, (1999) se basa en la decoloración del catión radical ABTS.

El radical ABTS (Sigma-Aldrich, Canada) 7 μ M, se hizo reaccionar con persulfato de potasio (Mallinckrodt Chemicals, USA) ($K_2 S_2 O_8$) 2.45 μ M, mezclando ambos reactivos, en una proporción de 1:1. Esta mezcla se dejó en reposo cubierta con papel aluminio aproximadamente 16 horas, antes de comenzar las determinaciones. Una vez formado el radical ABTS se diluyó con etanol al 20%, hasta alcanzar una absorbancia comprendida entre $0,7 \pm 0.01$ a 734 nm. Se midió la absorbancia inicial en una celda de cuarzo y posteriormente se agregó 100 μ L del extracto de miel, se agito rápidamente y se midió el cambio de absorbancia a los 10 min de la reacción. Se calculó la actividad antioxidante usando una curva estándar en ácido ascórbico (REASOL) (0-50 mg EAA /L), ($R^2=0.9987$) los resultados fueron expresados en mg EAA/100gmiel.

6.10 Análisis estadístico

En la cuantificación de los granos de polen se diseñó completamente al azar variando el origen floral de la miel y para efecto de la temperatura se utilizó un diseño factorial, donde los factores fueron el origen floral de la miel y la temperatura. Los resultados obtenidos se analizaron por un análisis de varianza (ANOVA). Si se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) se utilizó la técnica de comparación de medias de Tukey o las curvas de respuesta por contrastes ortogonales con ayuda del paquete estadístico NCSS (2007).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Análisis polínico cualitativo y cuantitativo

El estudio del análisis polínico de las 6 muestras de miel analizadas, se realizó mediante el recuento y la identificación total de los sedimentos que resultaron de cada miel que fue sometida al proceso de acetolisis. Las preparaciones microscópicas de todos los sedimentos acetolizados de miel, se observaron a 40x y se llevó a cabo la identificación en base a la comparación de los pólenes encontrados mediante el uso de publicaciones especializadas en polen (Bhargava *et al.*,2009; Sánchez *et al.*,2007.; Trigo *et al.*, 2007; Subiza 2005; Palacios *et al.*, 1991) la cuantificación de los pólenes presentes, consistió en determinar los porcentajes de cada tipo de polen, para ello se procedió al recuento total directamente del campo del microscopio tal como lo indica Lastra (2001), para una mayor interpretación de datos.

7.1.1 Análisis polínico de la miel de Orizatlán

La Figura 15, se muestran las fotografías a 40x del polen acetolizado, que fue encontrado en la miel de Orizatlán. Se identificaron 20 tipos diferentes tipos de polen de acuerdo a las publicaciones especializadas en polen (Bhargava *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*,2007.; Trigo *et al.*, 2007; Subiza 2005; Palacios *et al.*, 1991) los cuales se observan que tiene diferente morfología.

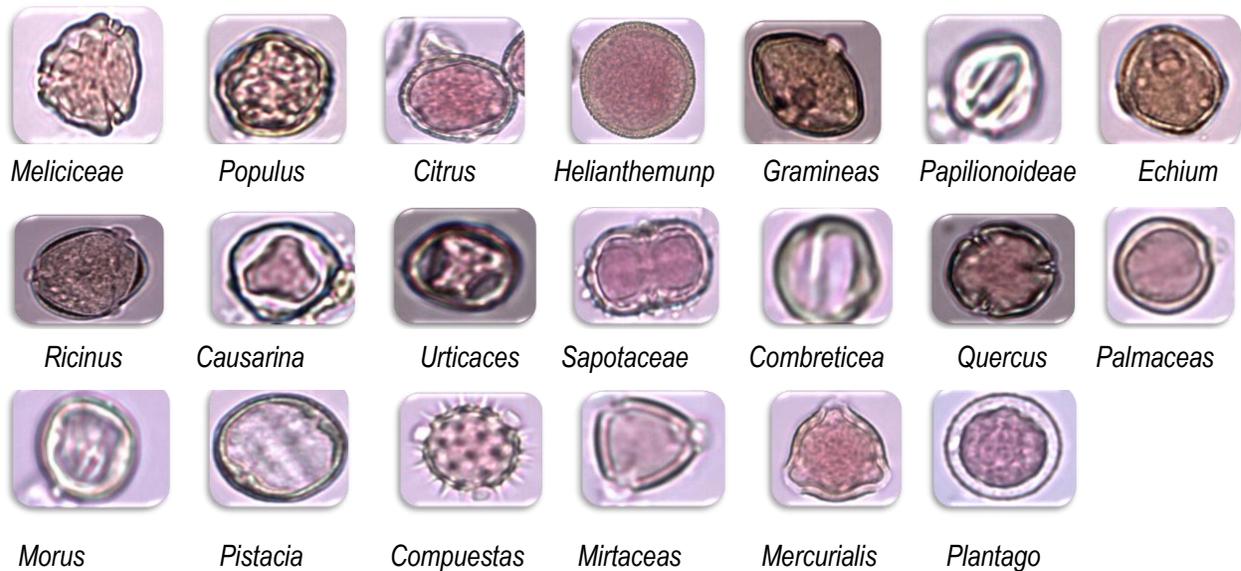


Figura 15. Diferentes tipos de polen presentes en la miel de Orizatlán

En la Figura 16 se muestra el porcentaje que corresponde a cada tipo de polen encontrado en la miel de Orizatlán, el polen *Citrus* y *Compuestas* los tipos de polen con mayor frecuencia con 12.3 y 9.2 % respectivamente, de acuerdo a estos porcentajes entran en la clasificación, como polen importante (Sawyer, 1988). De acuerdo a lo que establecen Gil, (2010); Sáenz (2000) y Pérez (1985), consideran como miel monofloral, a la miel de azar a partir de un 10 % de presencia de polen de *Citrus* debido a que la plantas de cítricos son pobres en polen, por lo tanto la miel de Orizatlan se considera miel monofloral (azar). El tipo de polen de *Compuestas*, *Papilionoideae*, *Ricinus*, *Quercus*, *Populus* estan como polen importante ya que se encuentran en un rango de 3 al 15 % (Sawyer, 1988). Hubo la presencia de diversos tipos de polen, debido a que, en el lugar donde se encuentra en apiario de Orizatlán es una zona, de gran biodiversidad de vegetación.

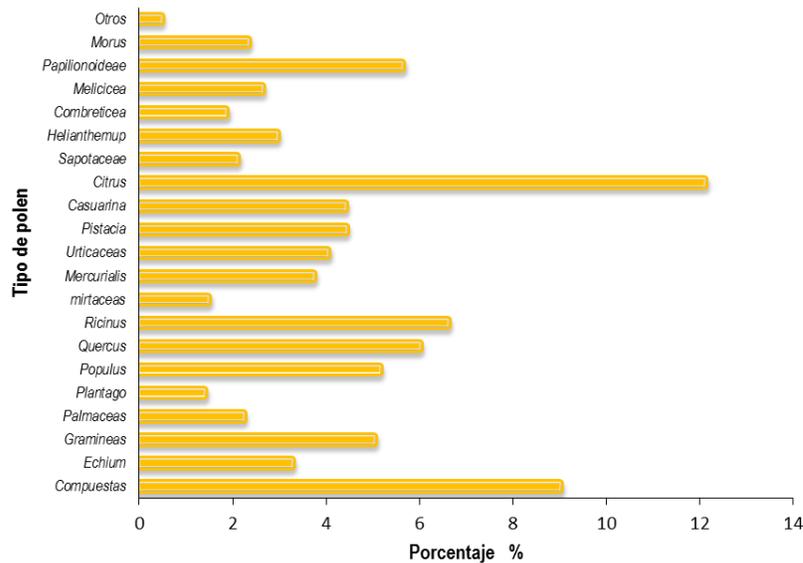


Figura 16. Frecuencia de granos de polen en la muestra de miel de Orizatlán

Garcia (2003) en su estudio de palinología de 24 muestras de miel de Murcia encontro un rango de 10 y 15 % de predominancia de polen de *Citrus* por lo cual considero las miles como monoflorales. Alvarez *et al.*, (2009) analizó por medio de acetolisis varias muestras de miles de Cuba encontrando que todas la muestras eran monoflorales de diferentes especies vegetales.

7.1.2 Análisis polínico de la miel de Acaxochitlán

En la Figura 17 se representan en fotografías observadas a 40x, los 18 diferentes tipos de polen que se identificaron en la miel de Acaxochitlán de acuerdo a las publicaciones de

(Bhargava *et al.*, 2009 Sánchez *et al.*, 2007.; Trigo *et al.*, 2007; Subiza 2005; Palacios *et al.*, 1991) por lo que se observan diferentes morfologías.



Figura 17. Diferentes tipos de polen presente en la miel de Acaxochitlán

En la Figura 18, quedan representados los porcentajes de frecuencia de los tipos de polen identificados en la miel de Acaxochitlán notándose que el tipo *Graminacea* está en mayor porcentaje con 28% por lo que es un polen acompañante (Sawyer, 1988), con respecto a los demás tipos de polen, el polen de *Crupresaceas*, *Compuestas*, *Mercurialis* y *Ericaceas* su frecuencia está en un rango de 7 a 9% por lo que se consideran polen importante, *Populus* y *Palmaceae* (1-3%) polen aliado y el tipo de polen de *Morus* como un tipo de polen esporádico en la miel de Acaxochitlán (Sawyer, 1988).

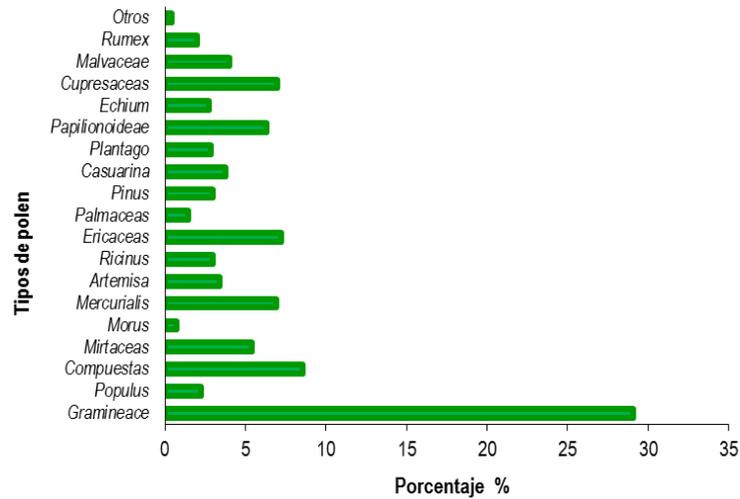


Figura 18. Frecuencia de granos de polen en la muestra de miel de Acaxochitlán

De acuerdo a lo que describen Gil, (2010), Sáenz, (2000) y Pérez,(1985), la miel de Acaxochitlán se considera multifloral debido a la gran variedad de polen encontrado y además de que ningún tipo de polen se encuentra mayor a un 45% de presencia. Lo que se observó es que el polen *Gramineacea* fue él que se encontró en mayor porcentaje, lo que indica que las abejas recolectan su néctar de los sembradíos de maíz ya que la zona de Acaxochitlán es productora de esta gramínea.

7.1.3 Análisis polínico de la miel de El arenal

En la miel de El arenal se identificaron 15 diferentes tipos de polen presentes, como se observa en la Figura 19, mostraron diferente morfología cada tipo de polen en las fotografías observadas a 40x de acuerdo a las publicaciones de polen (Bhargava *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2007; Trigo *et al.*, 2007; Subiza 2005; Palacios *et al.*, 1991).

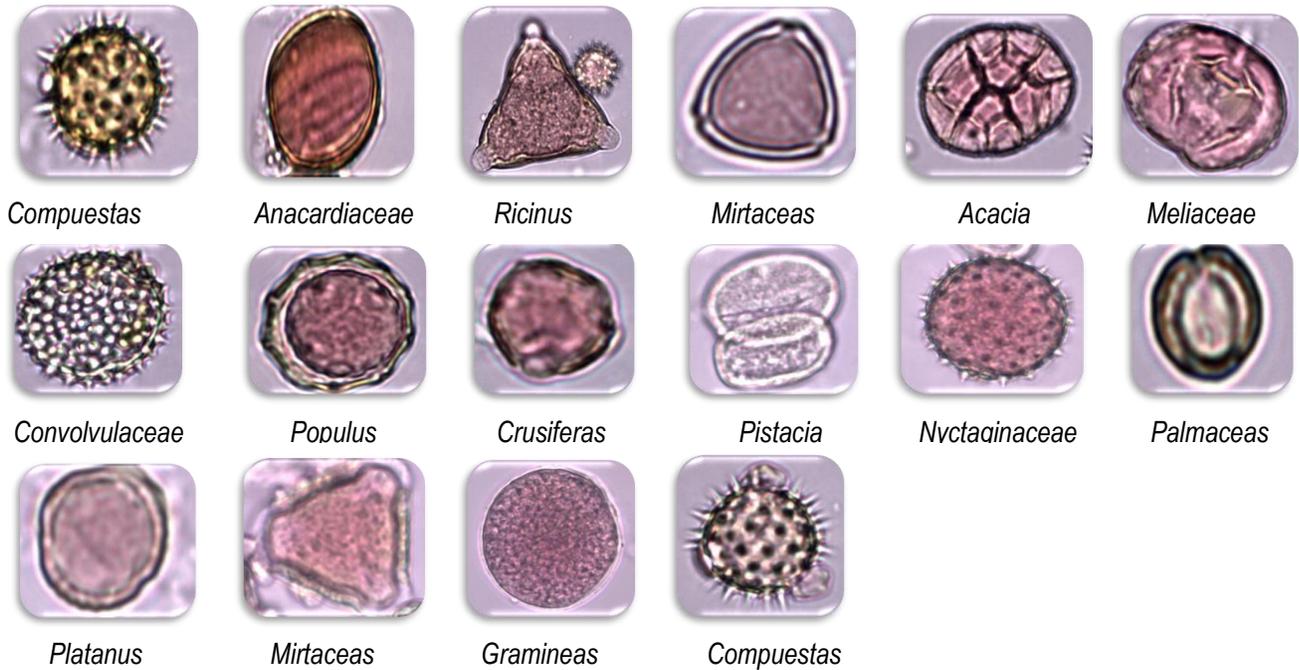


Figura 19. Diferentes tipos de polen presente en la miel de El arenal

Como se observa en la Figura 20 los porcentajes que corresponden cada tipo de polen, presente en la miel de El arenal, encontrando el polen de *Compuestas*, *Anacardiaceae* y *Convolvulaceae* (16-45%) son polen acompañante, *Ricinus*, *Meliaceae* *Nyctaginaceae* y *Gramineas* son polen importante ya que están en un rango de 3 a 15 % de frecuencia y el resto de polen corresponde a aliando con respecto a la clasificación de Sawyer (1988). Por lo que la miel de El arenal debido a su variedad de polen que está en ella se clasifica como una miel multifloral de acuerdo a Gil, 2010, Sáenz, 2000 y Pérez,1985

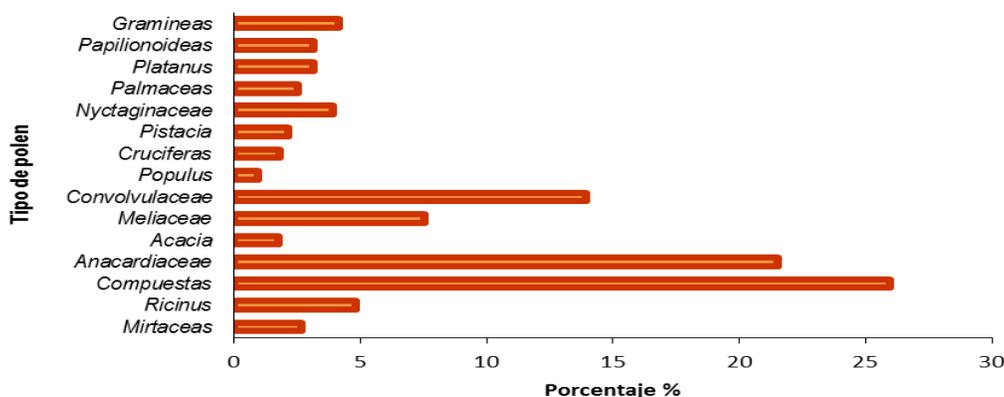


Figura 20. Frecuencia de granos de polen en la muestra de miel de El arenal

7.1.4 Análisis polínico de la miel de Tasquillo

El análisis polínico que se realizó en la miel de Tasquillo se identificó 7 diferentes tipos de polen como se observa en la Figura 21, los cuales fueron observados a 40x como se representa en las fotografías encontrando diferentes morfologías de polen (Bhargava *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2007; Trigo *et al.*, 2007; Subiza 2005; Palacios *et al.*, 1991)



Figura 21. Diferentes tipos de polen presente en la miel de Tasquillo

Como se observa en la Figura 22, los diferentes porcentajes de polen presente, en la miel de Tasquillo, en el cual el tipo *Junglas*, está presente en un 22% siendo el más representativo y *Mercurialis*, *Cruciferas*, *Ericaceas*, *Palmacea* y *Compuestas* se encuentran en un rango de 13 a 17% lo que corresponde a un tipo de polen acompañante y *Castanea* entra en la clasificación de polen importante de acuerdo a Sawyer (1988).

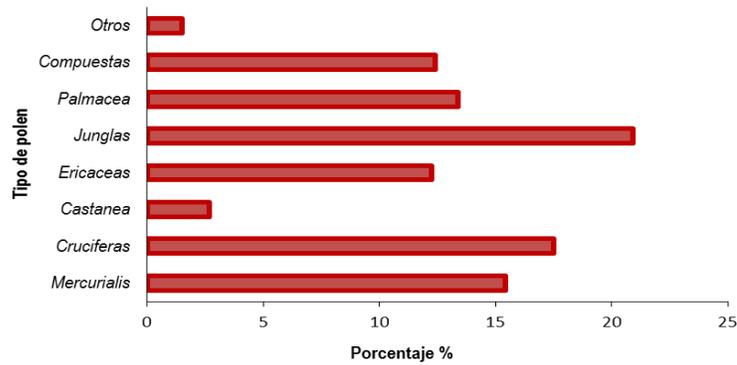


Figura 22. Frecuencia de granos de polen en la muestra de miel de Tasquillo

De acuerdo a lo propuesto por Gil (2010), Sáenz (2000) y Pérez (1985) en base a su clasificación de la miel, en cuanto a su origen floral, la miel de Tasquillo se clasifica como mielada ya que hay un predominio polen *Junglas* que pertenece a la plantas anemófilas que es característico en la miel mielada

7.1.5 Análisis polínico de la miel de Huehuetla

En el análisis polínico de la miel de Huehuetla se identificaron 20 diferentes tipos de polen como se observa en la Figura 23, las fotografías tomadas a 40x se encontrando una diversidad de morfologías polínicas que fueron identificadas y 3 tipos de polen que los cuales no se identificaron (Bhargava *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*,2007.; Trigo *et al.*, 2007; Subiza 2005; Palacios *et al.*, 1991).

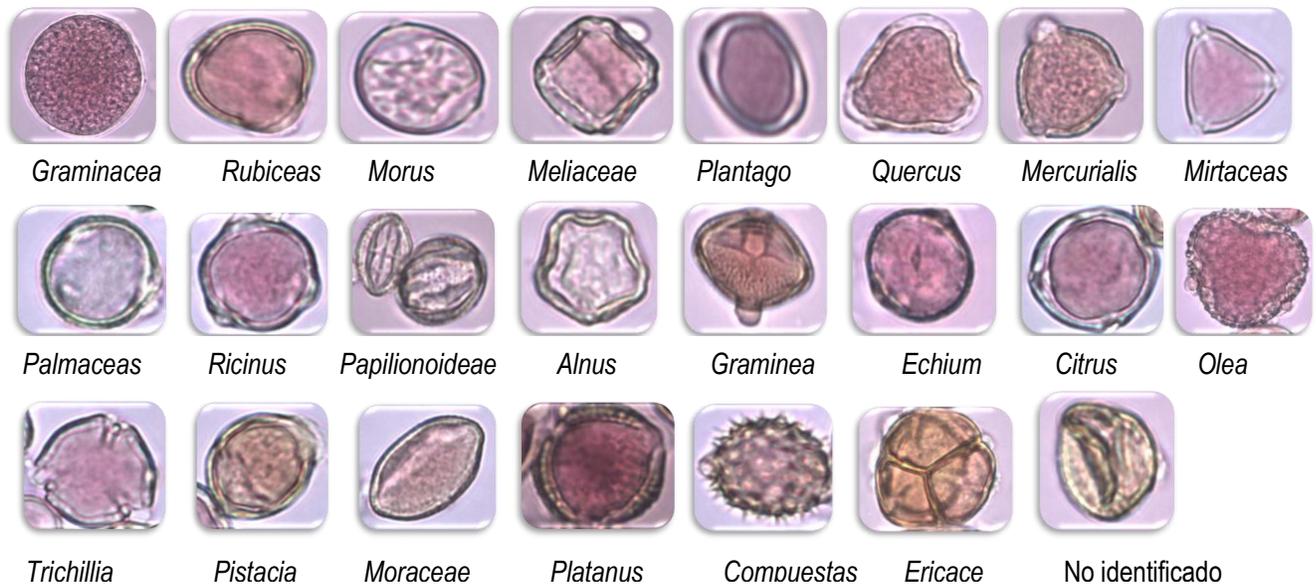


Figura 23. Diferentes tipos de polen presentes en la miel de Huehuetla

Se puede observar en la Figura 24 el polen de *Rubiceas* se encuentra en un 13%, siendo éste el que se encuentra en mayor frecuencia y esto corresponde a que la miel de Huehuetla fue recolectada de una zona donde hay plantaciones de café. Todos los tipos de polen que se identificaron entran en la clasificación de polen acompañante como lo determina, Sawyer (1988) a excepción de *Olea*, *Alanus*, *Moraceae*, y *Morus* que son tipos de polen aliado ó raro (Sawyer 1988).

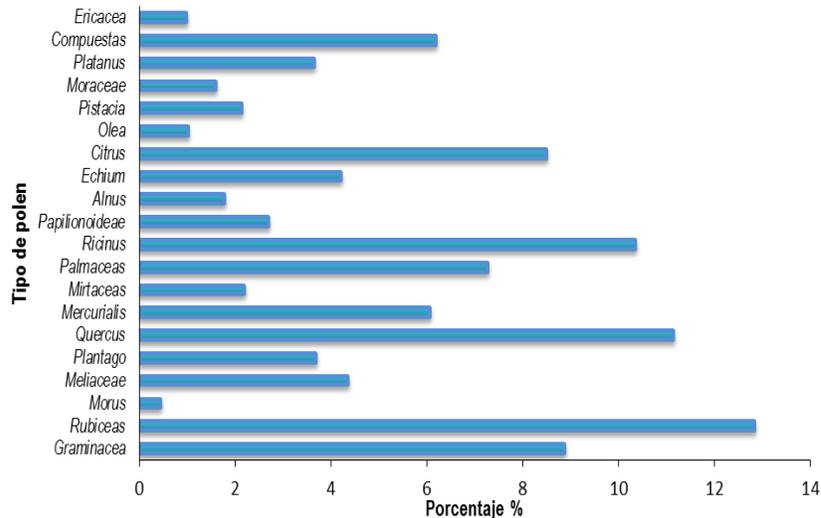


Figura 24. Frecuencia de granos de polen en la muestra de miel de Huehuetla

La miel de Huehuetla fue la que obtuvo una mayor variedad de tipos de polen con respecto a las demás mieles. Ésta se clasifica en cuando a su origen floral como miel multifloral ya que presento una gran diversidad de pole en la miel Gil (2010), Sáenz (2000) y Pérez (1985). Cabe mencionar que fue recolectada en una zona cafetalera a lo que corresponde el polen de las *Rubiceas* encontrándose, en mayor frecuencia.

7.1.6 Análisis polínico de miel Comercial

Se muestra en la Figura 25 la identificación de 7 granos de polen que fueron encontrados en la muestra de miel comercial (Bhargava *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2007.; Trigo *et al.*, 2007; Subiza 2005; Palacios *et al.*, 1991) son pocos granos a diferencia de las demás muestras, excepto la miel de Tasquillo, que igual presentó muy poca variedad de polen. Sin embargo se cree que esta miel presenta poco polen, debido a que es una miel comercial y haya

llevado un sistema de extracción más riguroso (Gil, 2010) que las mieles que fueron recolectadas.

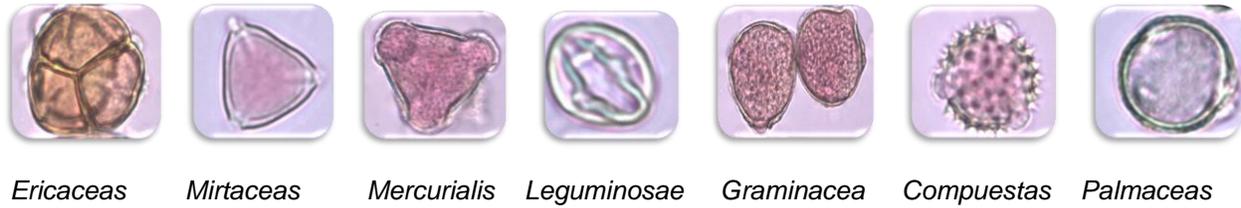


Figura 25. Diferentes tipos de polen presente en una miel Comercial

En la siguiente Figura 26, se muestran los porcentajes obtenidos de los tipos de polen presentes en la miel comercial observando que se trata de una miel multifloral ya que ningún tipo de polen predomina más del 45% (Gil, 2010, Sáenz, 2000 y Pérez,1985). El polen de *Palmaceae*, *Mercuriales*, *Ericaceae*, *Leguminosae* entran en la clasificación de acompañante con un porcentaje de 14 a 24.7% y *Mirtaceas*, *Compuestas* y *Graminaceae* en polen importante (Sawyer, 1988).

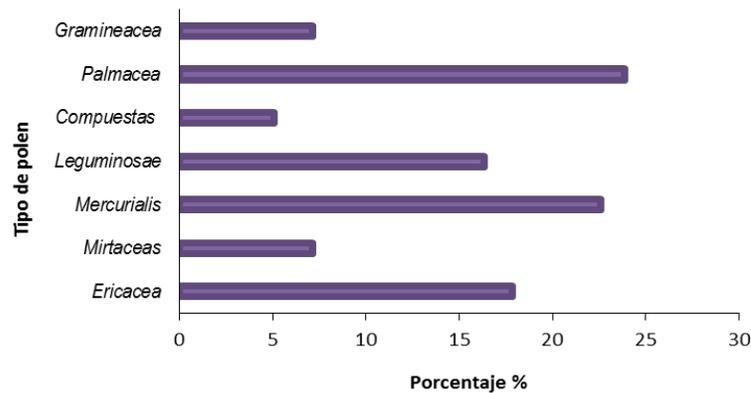


Figura 26. Frecuencia de granos de polen en la muestra de miel comercial

Tras el análisis polínico de las 6 muestras de miel se logró clasificarlas en base a su origen botánico como lo indican diversos autores (Gil, 2010., Hernández, 2010., Lastra, 2001., Saenz *et al.*, 2000., Piana., 1988., Louveaux, 1978 y Erdtman, 1961). Encontrando que la miel de Orizatlán fue monofloral, Acaxochitlán, El arenal, Huehuetla y Comercial fueron multiflorales y por último la miel de Tasquillo fue clasificada como mielalá. Por lo que el análisis polínico es una metodología muy utilizada para poder tipificar el origen floral y geográfico de las mieles.

En la Figura 27, se muestra la cantidad de granos de polen, para cada tipo de miel encontrando diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las mieles, la cual varió de 787 a 4989 núm. polen/10 g miel, siendo la miel de Huehuetla, la que presentó mayor cantidad de polen y la miel comercial menor cantidad. Según Gil (2010) asocia la cantidad de polen presente en cada miel al tipo de extracción que fue sometida, quedado en las diferentes etapas del procesamiento y al origen floral del que provenga la miel.

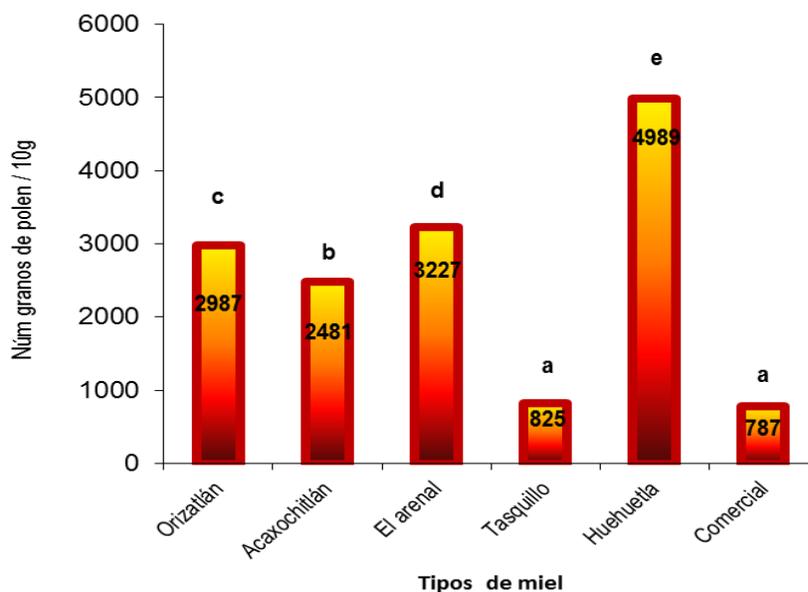


Figura 27. Cantidad de granos de polen en las diferentes mieles

Las 6 muestras de miel fueron clasificadas en base a su riqueza polínica de acuerdo a lo propuesto por Maurizio (1939), encontrando que la miel de Tasquillo presentó solo 825 granos de polen/10g miel y la miel comercial 787 granos de polen/10g miel en base a esto entran en la clase I ya que el contenido de polen fue menor a 2,000 granos de polen/10 g miel y las mieles de Huehuetla, El arenal, Orizatlán y Acaxochitlán entran en la clasificación II ya que están en un rango mayor a 2,000 granos de polen pero menor a 10,000 granos de polen/10g miel como se observa en la Figura 27. Como se pudo observar, su riqueza polínica es variable en cada tipo de miel, se cree que las principales causas son por el método de extracción con el que fue procesada o bien por el origen floral (Gil 2010., Maurizio, 1939).

Para poder observar, las diferencias entre las mieles analizadas se llevó a cabo la clasificación con respecto al origen botánico que se realizó por medio del análisis polínico encontrando

que la miel de Orizatlán es monofloral (azar), la miel de Tasquillo, mielada y las miles de Acaxochitlán, El arenal, Huehuetla y Comercial son multiflorales por lo antes ya mencionado, pero para fines de una mayor identificación de las muestras de miel las identificaremos en todas las variables de respuesta con el nombre del lugar de origen.

7.2 Determinación de compuestos bioactivos

7.2.1 Fenoles totales

En la Figura 28 se puede observar la concentración de fenoles totales expresados en mg EAG/100g miel, de las 6 muestras de miel a diferentes temperaturas (20,40, 50, 60, 70 y 80 °C) encontrando diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ellas. La miel de Orizatlán, El arenal y Comercial obtuvieron la menor concentración de fenoles totales en promedio 42.67 mg EAG/100g miel y en mayor concentración la miel de Huehuetla, Acaxochitlán y Tasquillo con 57.9, 97.9 y 158 mg EAG/100g miel respectivamente. Estos valores fueron similares a los encontrados por Meda *et al.*,(2005) quienes reportaron una concentración en mieles monoflorales en un rango de 42.96-100 mg EAG/100g miel, y en mieles multiflorales 32.59-86.07 mg EAG/100g miel.

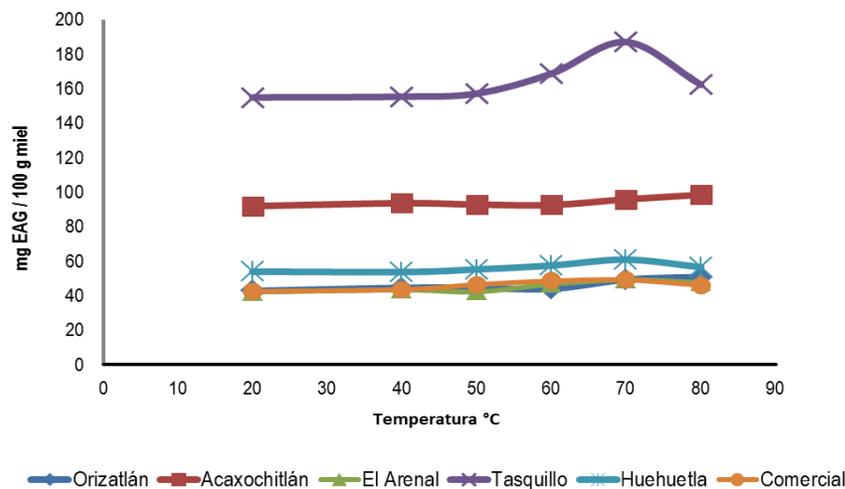


Figura 28. Concentración de fenoles totales a diferentes temperaturas de los 6 tipos de miel.

Kowalski *et al.*, 2013, Meda *et al.*, 2005 reportaron en mieles mieladas una concentración de fenoles totales de 109,22 y 113.98 mg EAG/100g miel estos valores son inferiores a los que se obtuvieron en esta investigación en la miel de Tasquillo (mielada), pero valores similares

a lo obtenido por Vit *et al.*, (2008) (72.6- 263.66 mg EAG/100g miel) e inferior a lo que reportaron Bertoncej *et al.*, (2007) en miles mieladas con 233.9 mg EAG/100g miel.

La miel de Orizatlán, Acaxochitlán, El arenal y Huehuetla se observa una curva de respuesta lineal ($p < 0.01$), mientras en la miel de Tasquillo la curva de respuesta fue cuadrática ($p < 0.05$) encontrando la máxima concentración a los 70°C. Al igual la miel comercial mostró un efecto cuadrático ($p < 0.01$). Este comportamiento también lo reportó Kowalski *et al.*, 2013 en mieles que fueron sometidas a procesamientos térmicos y en algunos tipos de miel incrementaban la concentración de compuestos fenólicos. La mieles analizadas en esta investigación (monofloral, mielada y multiflorales) presentaron un rango de 42.67 a 187 mg EAG/100g de fenoles totales, la variabilidad que se encontró, se puede atribuir al diferente tipo de néctar recolectado, debido a que las abejas visitan una gran diversidad de especies vegetales para obtener el néctar y todas las muestras de miel fueron de diferentes zonas geográficas del estado de Hidalgo. Alvarez *et al.*, (2010) y Gil, (2010) determinan que la composición química de la miel depende de su origen floral.

7.2.2 Flavonoides totales

Otro de los compuestos bioactivos que se determinó, fueron los flavonoides totales en las mieles a diferentes temperaturas como se representan en la Figura 29, encontrando diferencias significativas ($p < 0.05$). Las mieles de Orizatlán, Arenal y Tasquillo presentaron una curva de respuesta lineal ($p < 0.01$), mientras la miel de Acaxochitlán y Huehuetla su comportamiento fue cuadrático ($p < 0.01$) encontrado una mayor concentración de flavonoides a 70 y 50°C respectivamente, pero en la miel comercial no se presentó efecto por la temperatura. En las seis diferentes muestras de miel se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) mostrando una mayor concentración de flavonoides en la miel de Tasquillo (mielada) con 6.4 mgEQ/100g miel, seguida de la miel de Acaxochitlán y Huehuetla con 5.2 y 3.5 mgEQ/100g miel respectivamente como se puede observar en la Figura 29. Blasa *et al.*, (2006) reportaron en la miel de acacia cruda y procesada un rango de 0.4 a 1.1 mgEQ/100g miel, siendo estos valores inferiores a los nuestros, pero similares en las mieles miliflores que analizó con 1.1-2.8mg EQ/100g miel.

Los valores reportados en esta investigación son similares a los encontrados por Meda *et al.*, (2005), Vit *et al.*, (2008), Tornuk *et al.*, (2013), pero inferiores a los reportados por Alvarez *et al.*, (2009) en mieles monoflorales de Cuba reportando una concentración de 11.0 a 25.03

mgEQ/kg miel. Como se puede observar la miel de Tasquillo (mielada) presentó una mayor concentración de flavonoides con 6.4 mgEQ/100g miel, este valor fue similar a los encontrados por Vit *et al.*, (2008), en la mieles mieladas que analizaron reportando una concentración de 3.6 a 15.74 mg EQ/100g miel. Se muestra también que la temperatura tuvo un efecto en los flavonoides, principalmente al no encontrar una disminución de estos a causa de la temperatura. Badui, (1990) describe que los flavonoides son moléculas más estables a los tratamientos térmicos.

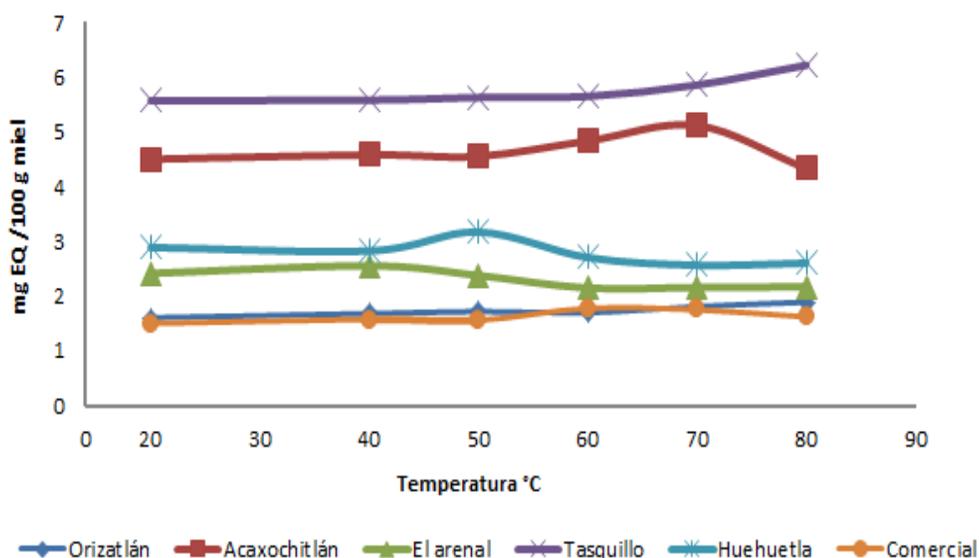


Figura 29. Concentración de Flavonoides totales en cada tipo de miel a diferentes temperaturas

7.3 Determinación de Hidroximetilfurfural (HMF)

En la Tabla 5, se muestra cómo va aumentando la concentración de HMF en las mieles que fueron expuestas a diferentes temperaturas, encontrando diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ellas. Se observa que la miel que presentó mayor concentración de HMF fue la miel Comercial, esto puede deberse a que pudo haber sufrido un previo procesamiento térmico antes de ser expuesta a la venta, ya que el calor tiene un efecto importante en la formación de este compuesto (White, 1982). Los valores obtenidos de HMF de las mieles, fue en un rango de 0.80 a 7.54 mg HMF/kg miel siendo concentraciones bajas de HMF y están dentro de la cantidad permisible por la norma oficial Mexicana y el Codex Alimentarius (2001), los

cuales establecen que el límite máximo que debe contener una miel fresca es de 40mg/Kg, considerando el HMF como un parámetro de calidad, aplicado a las mieles (Whithe, 1980) lo cual nos indican que las mieles analizadas son mieles frescas y de buena calidad a pesar de que fueron calentadas durante 10 minutos constantes a las temperaturas establecidas. Los valores que reportó Tornuk *et al.*, (2013) en mieles artesanales de Turquía a temperatura ambiente 0.09-4.12 mg/kg, son similares a los encontrados en el presente trabajo, los valores que reportó Escriche *et al.*, (2013) quien analizó mieles tratadas térmicamente a 50 y 80°C encontró una mayor concentración de HMF, en las mieles que fueron sometidas a 80°C, sin embargo no sobrepasan el límite permitido, por lo que son consideradas como mieles frescas.

Tipo de miel	Temperatura °C					
	20°C	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C
	mg HMF/kg					
Orizatlán	0.80 a A	1.16 b A	1.26 b A	1.28 b A	1.31 b A	1.64 c A
Acaxochitlán	4.40 a B	4.64 ab B	4.69 ab B	4.76 ab B	4.89 bc B	5.28 c B
El arenal	3.04 a C	3.35 ab B	3.39 ab B	3.44 ab B	3.49 b B	4.54 c B
Tasquillo	5.09 a D	5.25 ab C	5.28 ab C	5.47 ab C	5.61 b C	5.72 b C
Huehuetla	2.32 a E	3.48 b D	3.54 b D	3.60 b D	3.91 bc D	4.16 c D
Comercial	7.09 a F	7.14 ab E	7.36 ab E	7.43 ab E	7.54 bc E	7.53 c E

Tabla 5. Las letras minúsculas a, b, c y d indican las diferencias que hubo en la concentración de HMF para cada tipo de miel a diferentes temperaturas y las letras mayúsculas indican las diferencias que hay en la concentración de HMF en las seis muestras de miel en cada temperatura.

Los resultados obtenidos en esta investigación fueron inferiores a los que reportó Isla *et al.*, (2011) en su análisis en miles del noroeste de Argentina reportando valores de 13 a 49 mg/kg sin ser expuestas a ningún tratamiento térmico. Kowalski *et al.*, (2013) encontró niveles muy elevados de HMF en mieles que expuso a procesos térmicos reportando un rango de 2.04 a 94.33 mg/kg siendo estos valores muy superiores a los reportados en esta investigación. Los resultados obtenidos confirman con otros autores que el calentamiento incrementa la concentración de HMF en las mieles que son sometidas a tratamientos térmicos (Bath y Singh 1999; Hebbar *et al.*, 2003; Tosi *et al.*, 2002)

7.4 Actividad antioxidante

7.4.1 Actividad antioxidante del radical DPPH

En la Figura 30 se representa la capacidad antioxidante que mostraron las mieles a diferentes temperaturas hacia el radical DPPH encontrando diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ellas. La miel de Acaxochitlán y Comercial tuvieron una curva de respuesta lineal, mientras que la miel de Orizatlán, El arenal, Tasquillo su curva de respuesta fue cuadrática encontrando la mayor actividad antioxidante a los 70°C, y la miel de Huehuetla no presentó ningún efecto a todos los tratamientos de temperatura. En general todas las mieles presentaron capacidad antioxidante contra el radical DPPH y ésta iba incrementado su capacidad antioxidante, conforme al aumento de temperatura, al que fueron sometidas las mieles. En la miel de El arenal se observa que a partir de los 60 °C incrementa su actividad antioxidante, por lo que la temperatura si tuvo un efecto más notorio sobre esta miel. La miel de Tasquillo y Acaxochitlán presentaron una mayor actividad antioxidante en promedio 59.3 y 51.86 mg EAA/100g miel respectivamente y el resto de las mieles en promedio 22.39 mg EAA/100g miel.

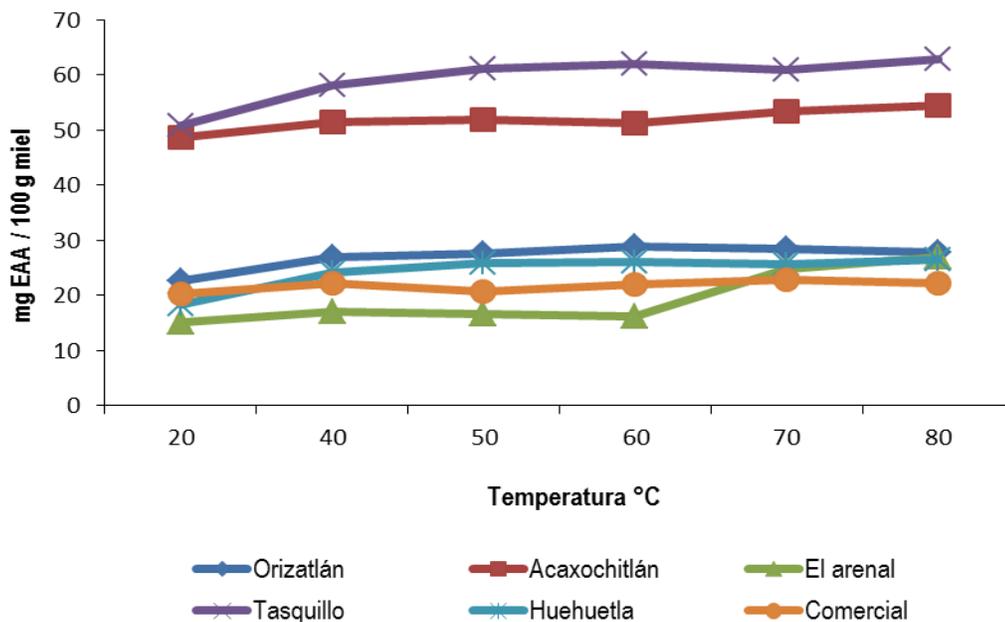


Figura 30. Actividad antioxidante del radical DPPH de mieles de Hidalgo a diferentes temperaturas

Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Meda *et al.*, (2005) encontrando una actividad antioxidante entre 10.20 a 65.86 mg EAA/100g miel en la mieles que analizó

de Burkina. Tornuk *et al.*, (2013) reporta valores superiores a los reportados en este trabajo en un rango de 53.33 a 110.536 mg EAA/100g miel en mieles artesanales de Turkia, al igual que Lachman *et al.*, (2010) en su análisis de actividad antioxidante para el radical DPPH en mieles Checas reporta en un rango de 98.73 a 441.98 mg AAeq/kg⁻¹.

Diversos autores han reportado el incremento de la actividad antioxidante en mieles que han sido expuestas a algún tratamiento térmico similar a lo que se obtuvo en esta investigación, (Kowalski *et al.*, 2013, Escriche *et al.*, 2013, Turkmen *et al.*, 2006) esto lo atribuyen a la generación de compuestos que se desencadena, por la Reacción de Maillard y presentan cierta actividad antioxidante. Similares estudios llevados a cabo por Yanagimoto *et al.*, (2002) demostraron que varios compuestos de grupos heterocíclicos encontrados en la reacción de Maillard presentaron diferentes capacidades antioxidantes.

Otros autores Escriche *et al.*, (2013)., Tornuk *et al.*, (2013)., Alvarez *et al.*, (2009)., Baltrusaite *et al.*, (2007)., Meda *et al.*, (2005) deducen, que la actividad antioxidante que presentan las mieles está relacionada con su origen floral.

7.4.2 Actividad antioxidante del radical ABTS

En la Figura 31 se muestra que todas las mieles presentaron diferente capacidad antioxidante hacia el radical ABTS encontrando diferencias significativas entre ellas ($p < 0.05$) debido a que todas las mieles son de diferente origen floral. La miel Comercial presentó una curva de respuesta lineal por lo que no le afectó la temperatura en su actividad antioxidante, mientras que la miel de Orizatlán, Acaxochitlán, El arenal, Tasquillo y Huehuetla presentaron una curva de respuesta cuadrática siendo a los 70°C presentaron una mayor actividad antioxidante en la inhibición del radical ABTS. La miel de Tasquillo obtuvo una mayor actividad antioxidante con 30.94 mg EAA/100g miel y la que presentó menor capacidad antioxidante fue la miel de El arenal, Comercial y Huehuetla. Los valores reportados por Lachman *et al.*, (2010) en diferentes mieles Checas, son superiores a los mostrados en el presente trabajo en un rango de 431.38 a 1026 mg EAA/kg⁻¹. Vit *et al.*, (2008) y Cimpoi *et al.*, (2013) reportaron diferente actividad antioxidante en el radical ABTS en las mieles analizadas reportando en un rango de 43.55 a 290 $\mu\text{mol Trolox}/100 \text{ g}$ y 64 a 1156 $\mu\text{mol Trolox}/100 \text{ g}$ respectivamente. Isla *et al.*, 2011 y Baltrusait *et al.*, (2007) encontraron diferente actividad antioxidante al radical ABTS con diferentes mieles (monoflorales,

multiflorales y mielada) por lo que son similares a lo que presentaron las mieles analizadas en esta investigación.

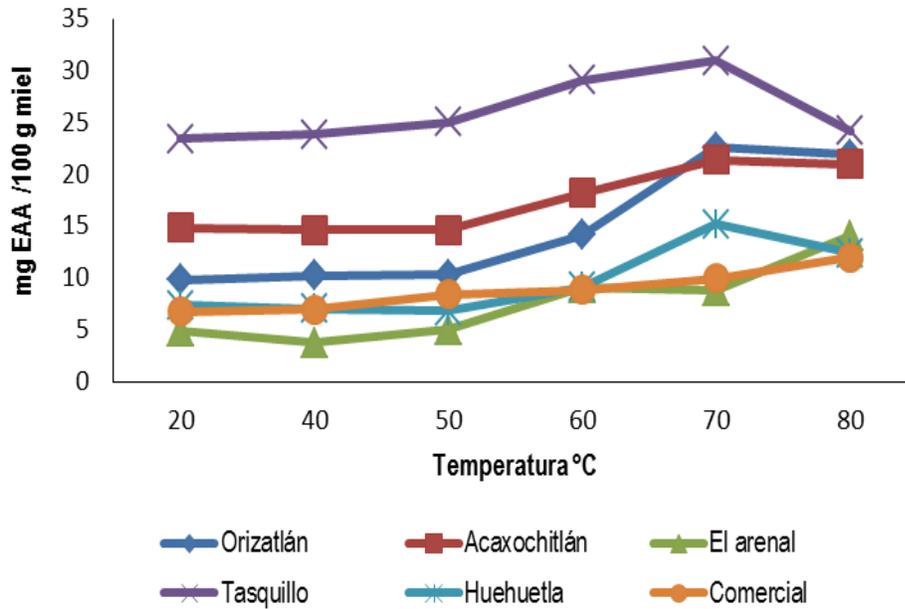


Figura 31. Porcentaje de inhibición del radical ABTS de miles a diferentes temperaturas

Kowalski *et al.*, (2013) encontraron en su estudio, que algunas muestras de miel presentaron una mayor actividad antioxidante en la inhibición del radical ABTS al final del procesamiento térmico, mientras que en otras disminuyó o se mantuvo igual su actividad antioxidante en las diferentes mieles que analizó los resultados son similares a los reportados en esta investigación.

Por lo que cabe destacar que las diferentes muestras de mieles de cada zona geográfica que se recolectaron del estado de Hidalgo, presentaron actividad antioxidante para la inhibición de los dos radicales, DPPH y ABTS y esta varía dependiendo de la fuente floral de las mieles, y también puede atribuirse a los productos resultantes de la Reaccion de Maillard.

Las metodologías que se utilizaron DPPH y ABTS son pruebas que se basan en la decoloración de los radicales y como se muestra en la Figura 32 la decoloración de los radicales (a) ABTS y (b) DPPH, observando que la miel de Tasquillo (4) y Acaxochitlán (2) mostraron una mayor actividad antioxidante hacia los dos radicales, de ahí que se observan una mayor decoloración.

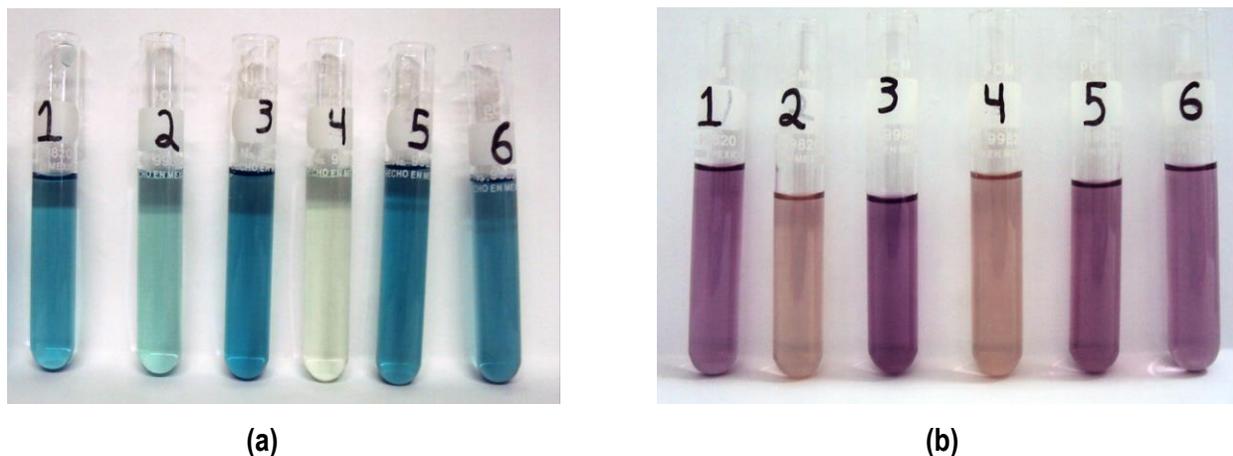


Figura 32. Decoloración de los radicales (a) ABTS y (b) DPPH que presentaron los 6 tipos de miel (1) Orizatlán, (2) Acaxochitlán, (3) El arenal, (4) Tasquillo, (5) Huehuetla y (6) Comercial.

7.5 Determinación de Color

En la Figura 33 se muestra el color de las 6 diferentes mieles, el tipo de tono fue determinado por medio del ángulo Hue (h) que se expresa en grados (0° a 360°) ubicados en el diagrama de cromaticidad, encontrando diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ellas, como se muestra en la Tabla 6. De acuerdo a los ángulos obtenidos de las mieles, todos los valores se ubican en el rango de cromaticidad de 0° a 90° que va de color rojo-amarillo (Figura 13). La miel de Orizatlán y comercial mostraron ángulos más cercanos al color amarillo 74.3° y 73.4° respectivamente siendo las mieles más claras y las mieles de Acaxochitlán y Tasquillo presentaron valores más rojizos ubicados dentro del diagrama de cromaticidad 39.5° y 44.4° grados.



Figura 33. Diferentes tipos de color de las muestras de miel 1. Orizatlán, 2. Acaxochitlán, 3. El arenal, 4 Tasquillo, 5. Huehuetla y 6. Comercial.

El tono de color para la miel de Acaxochitlán, El arenal y Tasquillo al ser expuesta a las diferentes temperaturas no presentaron diferencias ($p < 0.5$) en su color, mientras que la miel de Orizatlán, Huehuetla y Comercial sí presentaron diferencias significativas en su tono ($p < 0.05$) al haber sido sometidas a las diferentes temperaturas.

Tipo de miel	20°C	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C
	h	h	h	h	h	h
Orizatlán	74.3 c D	73.2 b E	71.0 a E	71.0 a E	70.8 a E	70.5 a D
Acaxochitlán	39.5 a A	39.4 a A	39.1 a A	39.4 a A	38.5 a A	37.6 a A
El arenal	59.8 a C	59.4 a D	60.2 a D	60.0 a D	59.7 a D	59.0 a C
Tasquillo	44.4 a A	44.0 a B	43.9 a B	43.7 a B	42.3 a B	41.3 a A
Huehuetla	53.0 c B	49.8 ab C	50.1 bc C	50.1 bc C	49.2 ab C	48.7 ab B
Comercial	73.4 c D	71.0 bc E	70.5 ab E	69.8 ab E	69.9 ab E	68.7 ab D

Tabla 6. Determinación de color de las 6 diferentes muestras de miel del estado de Hidalgo; las letras mayúsculas A, B, C, D, E, F indican las diferencias de tono de todas las mieles a las diferentes temperaturas que fueron expuestas y las letras minúsculas a, b, c indican las diferencias en el cambio de tono de color para cada tipo de miel de 20 a 80 °C.

En la Tabla 7 queda representada la luminosidad (L) y los parámetros a^+ y b^+ de las seis muestras de miel, encontrando diferencias significativas entre ellas ($p < 0.05$). La miel Comercial y Orizatlán presentaron una mayor luminosidad ya que obtuvieron valores de 40.73 y 40.39 respectivamente siendo estos los más cercanos a 100, lo que indica que son más claras y el resto de las mieles que están en un rango de 28 a 35 estos valores, son más cercanos a cero lo que indica que son más oscuras ubicándolos dentro del diagrama de cromaticidad. Los parámetros a^+ y b^+ de las 6 diferentes muestras de miel, presentaron valores de a^+ y su tendencia es hacia roja y valores de b^+ con tendencia hacia amarillo.

Tipo de miel	Luminosidad	a+	b+
Orizatlán	40.39 ± 1.15 c	5.52 ± 0.49 a	16.80 ± 0.45 d
Acaxochitlán	28.26 ± 0.48 a	10.91 ± 0.90 d	8.81 ± 0.87 a
El arenal	35.95 ± 1.09 b	8.66 ± 0.34 c	14.82 ± 0.61 c
Tasquillo	28.03 ± 1.65 a	9.79 ± 2.15 d	8.59 ± 2.26 a
Huehuetla	31.02 ± 0.61 a	9.30 ± 0.44 d	10.61 ± 0.56 b
Comercial	40.73 ± 1.18 c	6.59 ± 0.11 b	16.99 ± 1.69 d

Tabla 7. Determinación de los parámetros de color de las 6 diferentes muestras de miel del estado de Hidalgo; las letras indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras en Luminosidad, a⁺ y b⁺.

En la investigación de Tornuk *et al.*, 2013 en mieles artesanales obtuvo un rango de luminosidad de 8.88 a 18,54 comparado con lo obtenido en esta investigación, fueron mucho más bajos ya que las mieles que analizó tuvieron la tendencia de ser más oscuras y los parámetros de a⁺ y b⁺ son similares a los encontrados en esta investigación, ya que fueron positivos y tienden los valores de a⁺ de 2.64 a 8.04 y los valores de b⁺ 11.50 a 23.56 ubicándose sus resultados dentro de la misma área del diagrama de cromaticidad de 0 a 90°.

Los resultados que obtuvo Bertoneclj *et al.*, (2007) en mieles analizadas de Eslovenia fueron similares a los obtenidos en esta investigación ya que se determinó en su estudio mieles claras y mieles oscuras, pero obtuvieron valores negativos de a⁻ lo que indican a una tendencia hacia verde principalmente en la mieles monoflorales de Acacia y Lima, en mieles mieladas los valores de a⁺ y b⁺ presentaron un rango de 8.18 a 10.14 y 32.88 a 34.98 respectivamente, siendo esto similar a lo obtenido en esta investigación.

Las diferentes muestras de mieles presentaron diferentes tonos, luminosidad y parámetros a⁺ y b⁺ siendo que cada muestra de miel se recolectó de diferente zona geográfica del estado de Hidalgo, lo cual indica que el color va a variar dependiendo del tipo de fuente botánica que recolecta la abeja tal como lo indican diversos autores (Turnok *et al.*, 2013, Vit *et al.*, 2008 Pereyra *et al.*, 1999).

Algunos investigadores han encontrado que las mieles que son más oscuras tienen un alto contenido de fenoles y consecuentemente una alta capacidad antioxidante (Beretta *et al.*, 2005, Frankel *et al.*, 1998) por lo que, se encontró en esta investigación ya que la miel de Tasquillo y Acaxochitlán fueron las mieles más oscuras y también presentaron una mayor concentración de compuestos fenólicos y una mayor actividad antioxidante.

7.6 Correlaciones de los parámetros determinados con las 6 muestras mieles

En la Tabla 8 se encuentran las correlaciones de las seis muestras de miel relacionadas con los parámetros determinados. La correlación que mostraron los fenoles totales presentes en las muestras de miel, entre la actividad antioxidante hacia el radical DPPH en general fue mala, a excepción de la miel de Acaxochitlán que tuvo una buena correlación ($r= 0.892$) con la actividad antioxidante para el radical DPPH, por lo que indica que los fenoles presentes son responsables de la inhibición de este radical. Se muestra también una excelente correlación en la inhibición del radical ABTS con la concentración de fenoles totales en las mieles de Orizatlán, Tasquillo, y Huehuetla 0.934, 0.931 y 0.887 respectivamente por lo que indica que los fenoles presentes en estas tres muestras si actúan para inhibir este radical. Las correlaciones determinadas por Cimpoi *et al.*, (2013) son similares a las nuestras ya que reportó una buena correlación entre los fenoles totales y la actividad antioxidante de DPPH con una $r=0.856$, indicando también que los compuestos fenólicos son uno de los principales responsables de la actividad antioxidante de la miel, al igual a lo reportado por Bertoneclj *et al.*, (2007) encontró un coeficiente de correlación de $r= 0.93$ entre el contenido de fenoles y su capacidad antioxidante (FRAP) en mieles de Eslovenia.

Tipo de miel	Fenoles/ DPPH	Fenoles/ ABTS	Flavonoides/ DPPH	Flavonoides/ ABTS	HMF/ DPPH	HMF/ ABTS	Fenoles/ HMF	Flavonoides/ HMF
Orizatlán	0.494	0.934	0.627	0.891	0.788	0.720	0.811	0.924
Acaxochitlán	0.892	0.796	0.091	0.388	0.937	0.805	0.930	0.08
El arenal	0.797	0.784	0.604	0.833	0.814	0.882	0.569	0.525
Tasquillo	0.436	0.931	0.547	0.086	0.802	0.511	0.65	0.870
Huehuetla	0.520	0.887	0.262	0.825	0.950	0.614	0.583	0.466
Comercial	0.631	0.591	0.750	0.473	0.652	0.903	0.876	0.729

Tabla 8 Coeficiente de correlación de cada miel con las variables determinadas (Fenoles, Flavonoides, DPPH, ABTS e HMF)

La correlación que mostraron los flavonoides presentes en las seis muestras de miel con respecto a la actividad antioxidante hacia el radical DPPH, no fue buena en ninguna muestra de miel, sin embargo si hubo una buena correlación en la concentración de flavonoides presentes en las mieles de Orizatlán, El arenal y Huehuetla en la capacidad antioxidante del radical ABTS como se puede observar en la Tabla 8. Gheldof *et al.* (2002) mencionaron que

los compuestos fenólicos como los fenoles simples y los polifenoles que encontramos a los flavonoides, contribuyen significativamente en la actividad antioxidante de la miel.

Al igual se encontró una muy buena correlación de las mieles, entre la actividad antioxidante del radical DPPH y la concentración de hidroximetilfurfural, por lo que indica que el HMF presente tiene una fuerte relación para inhibir este radical, a excepción de la muestra Comercial ($r=0.652$) (Tabla 8). La miel Comercial, El arenal y Acaxochitlán mostraron una buena correlación de HMF, en la actividad antioxidante del radical ABTS con valores de $r=0.903$, 0.884 y 0.808 respectivamente. En el caso de fenoles con HMF la miel de Orizatlán, Acaxochitlán, y comercial tuvieron una buena correlación (0.81 , 0.93 y 0.876) y en la correlación de flavonoides con el contenido de HMF la miel de Orizatlán y Tasquillo mostraron una buena correlación de $r=0.924$ y 0.870 respectivamente (Tabla 8). Estos resultados son similares a los que reportaron Kowalski *et al.*, 2013 en los coeficientes de correlación entre el HMF con la actividad antioxidante para ABTS, DPPH y la concentración de fenoles totales de $r = 0.8157$, 0.824 y 0.959 respectivamente.

7.6.1 Coeficientes de Correlación de color con Fenoles, Flavonoides, DPPH, ABTS y HMF

En la Tabla 9 se muestran las correlaciones que se determinaron con el tono de color de las 6 mieles con la capacidad antioxidante, los compuestos bioactivos y el contenido de HMF. Se observa que la miel de Acaxochitlán mostro una excelente correlación entre el tono de color y los fenoles totales ($r = 0.967$) los cual indica que el color está ligado a los compuestos fenólicos. En flavonoides la miel de Tasquillo mostró una excelente correlación ($r= 0.974$) con el color y el resto de las mieles presentaron una mala correlación (Tabla 9). En cuanto a la actividad antioxidante la miel de Orizatlán, Acaxochitlán y Huehuetla presentaron una muy buena correlación en la inhibición del radical DPPH con $r= 0.881$, 0.866 y 0.941 respectivamente, mientras que el resto de las muestras fue regular.

El tono de color de la miel Comercial presentó una mayor correlación con el radical ABTS $r= 0.85$ y el resto de las muestras de miel presentaron una correlación mala.

Sin embargo se observa que el color de tono de las muestras de miel presentó una muy buena correlación con el contenido de hidroximetilfurfural a excepción de la miel de El arenal con $r=0.068$.

Tipo de miel	Color/ Fenoles	Color/ Flavonoides	Color/ DPPH	Color/ ABTS	Color/ HMF
Orizatlán	0.658	0.797	0.881	0.680	0.87
Acaxochitlán	0.967	0.181	0.866	0.766	0.92
El arenal	0.350	0.009	0.636	0.495	0.068
Tasquillo	0.566	0.974	0.606	0.255	0.92
Huehuetla	0.528	0.444	0.941	0.567	0.99
Comercial	0.730	0.643	0.732	0.853	0.88

Tabla 9 Coeficiente de correlación entre el color con, fenoles, flavonoides, DPPH, ABTS y HMF

Cimpoiú *et al.*, (2013) considera una buena correlación la que obtuvo en la cantidad de fenoles con la intensidad de color ($r= 0.7343$) siendo este valor inferior a lo que se reportó en esta investigación.

La intensidad de color está relacionado con los pigmentos presentes en la miel (compuestos fenólicos, carotenoides, etc.) los cuales se sabe que tienen propiedades antioxidantes. (Cimpoiú *et al.*, 2013)

8. CONCLUSIONES

Se determinó que la miel de Orizatlán es monofloral ya que presentó mayor predominancia en el contenido de polen de *Citrus*, la miel de Tasquillo debido a la presencia del polen de tipo *Junglas* es considerada como una miel mielada mientras que la miel de Acaxochitlán, El arenal, Huehuetla y Comercial son multiflorales ya que no predominó ningún tipo de polen mayor a 45%.

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en cuanto al número de granos de polen presentes en la miel siendo la miel de Huehuetla la que presentó mayor cantidad de granos de polen.

Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la concentración de fenoles, flavonoides totales, hidroximetilfurfural, actividad antioxidante (DPPH y ABTS) y color en todas las muestras de miel atribuidos a su diferente fuente floral.

Se encontró que las curvas de respuesta (Lineal o Cuadrática) en fenoles, flavonoides, hidroximetilfurfural, actividad antioxidante (DPPH y ABTS) y color con respecto a la temperatura dependen del tipo de miel y los coeficientes de correlación de fenoles, flavonoides y hidroximetilfurfural con color y actividad antioxidante también dependen de cada tipo de miel.

La miel que presentó la mayor concentración de compuestos bioactivos (fenoles y flavonoides totales) y actividad antioxidante hacia los dos radicales ABTS y DPPH fue la de Tasquillo (mielada).

Por lo que la miel que se produce en el estado de Hidalgo se considera como un alimento funcional con propiedades antioxidantes las cuales aportaran beneficios a la salud humana proporcionándoles a estas mieles un valor agregado.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez-Suarez J M., Tulipani, S., Romandini, S., Vidal, A.,(2009). Metodological Aspects about Determination of Phenolic Compounds and In Vitro Evaluation of Antioxidant Capacity in the Honey: A Review. *Current Analytical Chemistry* 5, 203-302.
- Alvarez –Suarez J M., Tulipani S., Diaz D., Estevez Y., Romandini S. (2010). Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food and Chemical Toxicology*. 48 2490-2499.
- Antolovich, M., Prenzler, P. Robards K., Ryan D., (2000) Sample preparation in the determination of phenolic compound in fruits, *Analyst* 125,989-1009.
- AOAC Official Methods 80.23 “Hydroxymethylfurfural in Honey, spectrophotometric method“, Chapter 44, pag. 32; AOAC 18th edition 2005.
- Arvanitoyannis, I.S., Van Houwelingen-Koukaliaroglou, M., Functional foods: A survey of health claims, pros and cons, and current legislation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2005, 45,385-404.
- Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., Lergret, P (1994). Standardisation dun extrait de propolis et identification des principaux constituants. *J. Pharm. Belgique*. 49, 462-468.
- Badui D, S.(1999) *Química de los alimentos*. Pearson Educación. ISBN 986-444-152-5. p 394-396.
- Baltrusaityte, V., Rimantas, V P., Ceksteryte V., (2007). Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chemistry* 101, 502-514.
- Bath, P.K., & Singh, N. (1999). A comparison between *Helianthus annuus* and *Eucalyptus lanceolatus* honey. *Food Chemistry*, 67 (4), 389-397.
- Benedetti, L y Pieralli, L. (1990). *Apicultura*. Ediciones Omega. S. A. Barcelona. P 90-91, 152-154, 305-307.
- Beretta, G., Granata, P., Ferrero. M., Oriolo, M., & Maffci Facino, R. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric / fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 533, 185-191.

- Bertoncelj J., Dobersek U., Jamnik M., Golob T., (2007). Evaluation of phenolic content, antioxidant activity and color of Slovenian honey. *Food Chemistry* 105, 822-828.
- Bhargava H.R., Jyothi J.V.A., Bhushanam M., Surendra N.S. (2009). Pollen Analysis of Apis Honey, Karnata, India. School of Chemical & Biotechnology. APIACTA 44 pp 14-19.
- Blasa M, Candiracci M, Accorsi A, Piacentini MP, Albertini MC and Piatti E. (2006). Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chemistry*, 97:217–222.
- Bogdanov, S. Ruoff, K. Y Persano Oddo, L. (2004) Physico-chemical methods for the Characterisation of unifloral honey. A review. *Apidologie* 35, 54-517.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran. Flavonoids as antioxidants : determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 1990, 186, 343-355.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie.* 28, 25-30.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, *Nutrition reviews.* 56, 377-333.
- Browne, C.a. (1908) Chemical analysis and composition of american Honeys. United.States. Department of Agriculture, Bureau. Chemistry, Bulletin. 110: 1-93.
- Cimpoi, C., Hosu, A., Miclaus, V., Puscas, A. (2013). Determination of the floral origin of some Romania honeys on the basis of physical and biochemical properties. *Journal of Spectrochimica Acta Part A; Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 100: 149-154.
- CIE (1976). Colorimetry. 2nd Ed. Publication 15-12.
- Codex Alimentarius, (2001). Revised Codex Standard for Honey. Codex Stan 12-1981. Codex Alimentarius Commission. Rev. 1(1987), Rev. 2(2001).
- Dimitrios, B. (2006). Sources of natural phenolic antioxidants *Trends in Food Science & Technology.* 17, 505–512.
- Duthie, G.G., Gardner, P.T., Kyle, J.A.M. (2003). Plant polyphenols: are they the new magic bullet?. *Proc. Nutr. Soc.*, 62, 599-603.

- Erdtman, G. (1961): The acetolysis method. A revised description. *Svenk. Bot. Tidskr.* 54: 561-564.
- Escrache I., Kadar M., Juan-Borras M., Domenech E. (2013). Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment. *Food Chemistry* 142 p. 135-143.
- FAO. Comisión del Codex Alimentarius Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Proyecto de Norma Revisado del Codex para la Miel CX/S 00/3 Noviembre 1999.
- Finkel. T. Holbrook. N.J.(2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 408 239-47.
- Frankel, S., Robinson, G. E., & Berenbaum, M.R. (1998). Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. *Journal of Apicultural Research*, 37, 27-31.
- Ghedolf, N., Wang, X. H. (2002). Identification and quantification of antioxidant components of honey from various floral sources. *Journal of Agricultural and food Chemistry* 50, 5870-5877.
- Gil. A., (2010). Tratado de nutrición. Composición y calidad nutritiva de los alimentos. Editorial Panamericana. España. Pág. 223-245.
- Gomes. S., Dias .L. G, Moreira. (2010). Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. *Food and Chemical Toxicology* ;48, 544-548
- Gutierrez R. J., Trejo L. O. Camacho N.S., Castañeda J, Cruz R. S., Avilés Q. P., Castillo G. R. (1995). Hidalgo noble y generoso. *Geografía e Historia*. Limusa, Editorial Limusia.
- Halliwell. B. Gutteridge. J. (1998). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd Ed. Oxford Science Publications. Oxford. pp 936
- Hebbar, H. U., Nandinin, K., Lakshmi, M., & Subra,anian, R. (2003). Microwave and Infrared Heat Processing of Honey and Its Quality. *Food Science and Technology Research*, 9 (1), 49-53.
- Herrero. F., (2004). Las abejas y la miel. *Caja España*. Pág. 5-10
- Hooper, L., Cassidy, A. (2006) A review of the health care potential of bioactive compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 1805-1813.

- Isla M.I., Craig A., Ordoñez R., Zampini C., Sayago., Bedascarrasbure., Alvarez A., Solomon V. Maldonado L.(2011). Physico chemical and bioactive properties of honeys from Northwestern Argentina. *LWT- Food Science and Technology*. 44 , 1922-1930.
- Kowalski S. (2013) Changes of antioxidant activity and formation of 5-hydroxymethylfurfural in honey during thermal and microwave processing. *Food Chemistry*. 13, 00471-8.
- Kroon, P.A. Clifford, M.N Crozier A.,Donovan, J. L. Manach, C., Williamson, G. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am. J. Clin Nutr*. 2004, 80,15-21.
- Lachman J;Orsak M; Hejtmankova A; Kovarova E. (2010). Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. *Food Science and Technology* 43 p. 52-58.
- Lambert, J, D., Hong J., Yang, G., Liao, J, Yang, C.S. (2005). Inhibition of carcinogenesis by poliphenols: Evidence from laboratory investigations. *Am J. Clin. Nutr*. 81, 284-291.
- Lastra. M. J. 2001. *Bosques naturales de Austrias*. Universidad de Oviedo. I.S.B.N.;84-8317-246-1. Pág. 125-133
- Louveaux, J., Maurizio, A., Vorwhol, G. (1978). *Methods of Melissopalimology*. *Bee World* 59:139-157.
- Marti del Moral A.L. Martínez-Hernández, J.A., (2005). ¿Sabemos realmente que comemos?: Alimentos transgénicos, ecológicos y funcionales. ENUSA. Barañain, Navarra.
- Martinez-Flores, S., González-Gallego, J., Culebras, J.M., Tuñon, J.(2002). Los flavonoides; propiedades y acciones antioxidantes, *Nutr. Hosp*. 17, 271-278.
- Maurizio A. (1939). Untersuchungen zur quantitativen. Pollen-analyse des Honigs. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. U.Hyg* 30: 27-69
- Mazza, G. (2000). *Alimentos Funcionales – Aspectos bioquímicos y de procesado*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza (España).
- Meda. A., Lamien Ch., Romito. M., Millogo. J. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*. 91, 571-577

- Milium V.G. (1939). Why does honey discolor during processing and storage? *Am. Bee J.* 79(9):445-447.
- Nichenametla, N. S., Taruscio, T. G. (2006). A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition.* 46, 161-183.
- Niva, M. (2007). "All foods affect health": Understandings of functional foods and healthy eating among health-oriented Finns. *Appetite* 48,(3), 384-393.
- Norma Mexicana NMX-F-036-NORMEX-2006, Alimentos – Miel – Especificaciones y Métodos de Prueba
- Norma Oficial Mexicana NOM-145-SCFI-2001, Información comercial - Etiquetado de miel en sus diferentes presentaciones.
- Norma Mexicana NMX-FF-094-SCFI-2008, Productos Alimenticios No Industrializados para Consumo Humano-Polen (pollinis)-Especificaciones. *Jac,P., Polasek, M., J. Pharma. Biomed.analysis* 2006, 40,805-814.
- Ohama, M., Ikeda M., Moriyama H. (2006). Health food and Foods with health claims in Japan, *Toxicology*, 221 95-11
- Ortiz. V. A., (1992). Contribuciones a la denominación de origen de la miel alcarria. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. España.
- Palacios, R., B. Ludlow-Wiechers, R. Villanueva. (1991). Flora palinológica de la Reserva de la Biosfera de Sian' Ka'an, Quintana Roo, México. Centro de Investigaciones de Quintana Roo CIQRO. 321 p.
- Pereyra G A., Burin L., Buera M del P., (1999). Color changes during storage of honeys in relation to their composition and initial color. *Food Research International* 32 185-191.
- Pérez, Z.A. Gómez (1986). Análisis polínico de las mieles de Navarra Húmeda del Noroeste. *Actas del VI Simposio de Polinología, A.P.L.E* p. 239-245. Salamanc.
- Piana, M. L., Persano, L., Bentabol, A., Bruneau, E., Bogdanov, S., Guyot- Declerck, C.(2004). Sensory analysis applied to honey: State of the art. *Apidologie* 35 (Suppl.) S26–S37

- Pierre. J., Prost. P., (2007). Apicultura conocimiento de la abeja y manejo de la colmena. Mundi prensa. Madrid España.p.202-223
- Rao, B.P., Zurreis,S., Balasangameshwer, C.N. (2006). Caracterización Fisicoquímica de los complejos de hidroxietil-ciclodextrina y ciclodextrina de rifampicina. *Ars Pharm*, 47,37-59.
- Re. R., Pellegrini. N., Proteggente. A., Pannala. A., Yang. M. Rice Evans., C(1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical action decolonization assay free Radical Biology and Medicine, 26;1231-1337.
- Renaud, S., de Lorgeril, M. Wine, (1992) Alcohol platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. 339, 1523-1526.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant. Sci*, 2, 152-152.
- Rivas P, E. (1992). Hidalgo entre selva y milpas la neblina. Monografía Estatal. Secretaría de Educación Pública. México.
- Sáenz-Laín C, Gómez-Ferreras C (2000). Mielles Españolas. Características e identificación mediante el análisis de polen. Editorial Mundi-Prensa. España 105 pp
- Sanchez-Dzib Y. (2007). Morfología polínica de especies de plantas en la selva mediana subperennifolia en la Cuenca del Río Candelaria, Campeche. Tesis de Licenciatura, Universidad autónoma de Campeche. México.189
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., Goñi I. (2007) Intake and bioproaccessibility of total phenols in a whole diet. *Food Chemistry*. 101, 492-501
- Sawyer, R. (1988). Honey Identification. Cardiff Academic Press. Cardiff, U. K. pp. 55-73.
- Scalbert, A. Manach, C.Morand, C. Remesy, C. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45,287-306
- Serrana Ríos M., Sastre-Gallego A., Cobo Sanz, J.M,(2005). Tendencias en alimentación funcional: Temas seleccionados You & Us, Madrid
- Shimizu T. (2003). Health claims on functional foods: The Japanese regulations and a international comparison, *Nutr.Res.Rev*. 16, 241-252
- Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology* 299, 152-178.

- Skibola, C.F., Smith, M,T (2000). Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic. Biol. Med* 29, 375-383.
- Subiza J. Pólenes en Internet. Utilidad Clínica de www.polenes.com. En: Polinosis II. Valero AL y Cadahía, eds. Barcelona: MRA ediciones SL-Lab Menarini 2005. p. 197-205.
- Subovsky M., Sosa López A., Rolla R., Castillo A., Aleman M., (2000). Cambios en la formación del hidroximetilfurfural en mieles sometidas a calentamiento XXI Congreso Argentino. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. Universidad Nacional del Nordeste Corrientes, Argentina. *Tecnología Química*,(2000).
- Sun, J., Chu, Y.F. Wu, X., Liu, R. M. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J. Agra Food Chem.* 50, 7449-7454.
- The National Honey Board. (2003). Honey- Healt and therapeutic qualities.390 Lashley Stret Longmont. www.nhb.org.
- Terrab, A., Gonzalez –Miret L. Y Heredia, F.J. (2004).Colour characterization of thyme and avocado honeys by diffuse reflectance spectrophotometry and spectroradiometry. *Eur. Food:Res. Technol.* 218, 488-492.
- Tornuk F; Karaman S; Ozturk I; Toker O; Tastemur B; Sagdic O. (2013). Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. *Industrial Crops and Products* 48 p. 124-131.
- Tosi, E., Ciappini, M., Re, E.,& Lucero, H. (2002). Honey thermal treatment effects on hydroxymethylfurfural content. *Food Chemistry*, 77(1), 71-74.
- Trigo P, MM, Melgar C, m., García, J., Recio C, M., Docampo F, S., Cabezudo A, B. (2007). El polen en la atmósfera de Vélez-Málaga. Concejalía de Medio Ambiente. Ayuntamiento de Vélez- Málaga. ISBN: 978-84.58 430-14-4.
- Turkmen N., Sari F., Poyrazoglu E, Velioglu S. (2006). Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chemistry* 95, 653-657.
- Ventura, F. L., Guerrero & J. Serio. (1990). Influencia de la temperatura de almacenamiento en la estabilidad del zumo de naranja envasado en tetra Brik. *Alimentos Equipos y Tecnologia XII* 95-98.
- Vit P., Gutierrez M, G., Titera D., Bednar A,j., Malaver R. (2008). Mieles checas categorizadas según su actividad antioxidante. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*; 42 (2): 237-44
- White J.W.Jr. & Siciliano (1980). Hidroxymethyl-Furfural and Honey adulteration. *J.Assoc. Off. Anal. Chem.* 63 (1) 7-10.

White , J.W. (1978). Honey Advances in Food Research, 24, 287-375. Ed. Boar Academic Press. New York. San Francisco London.

Yanagimoto, K., Lee, K.-G., Ochi, H., Shiba-moto, T (2002). Antioxidative activity of heterocyclic compounds found in coffee volatiles produced by Maillard reaction. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 5480-5484

10. ANEXOS

Recomendaciones

- ⌘ Identificación de los compuestos bioactivos presentes en la miel con actividad antioxidante

- ⌘ Determinar la similitud de los compuestos bioactivos entre el origen botánico y la miel



La Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Colima,
La Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad
Autónoma de Nuevo León y la División Ciencias de la
Vida de la Universidad de Guanajuato

Otorgan la presente

CONSTANCIA

A

**Suárez Vargas A., Pimentel González D.J., Quintero Lira A. , Figueira
A.C, Güemes Vera N y Campos Montiel R.G.**

Por su participación con el trabajo:

“CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE MIELES ARTESANALES CON
DIFERENTE CONTENIDO DE POLEN” en el marco del XV Congreso
Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Colima, Col., 23 y 24 de Mayo de 2013

M. C. Daniel Jacobillo Cano

Director de la FCQ

Dra. Ma. Gpe. De Jesús Alanís Guzmán

Jefe del Depto. de Alimentos, FCB

Dr. Gerardo Martínez Soto

Director del Depto. de Alimentos, DICIVA

Este documento quedó registrado en la Dirección General de Educación Continua en
Libro: 1 foja: 80 Colima, Col., México; 24 de mayo de 2013
Registro STPS: R6UCO-6209190013



Universidad Veracruzana

Universidad Veracruzana

Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias



Otorga la presente constancia a:

**C. Suárez Vargas A., Vernon Carter E. J., Pimentel González D. J., Quintero Lira A., Hernández Fuentes A. D.,
Figueira A. C. y Campos Montiel R. G.**

Por su participación como **PONENTE** en el **SIMPOSIUM DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA** con el trabajo titulado: **"Análisis polínico de diferentes mieles del estado de Hidalgo"**. Realizado en la Ciudad de Tuxpan de R. Cano, Ver. del 25 al 27 de septiembre de 2013.

Dr. Arturo Serrano Solis
Director de la Facultad

Mtro. Marco Antonio Alarcón Zapata
Coordinador de Simposium