



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO DE INVESTIGACION EN
BIOTECNOLOGIA APLICADA**



**QUIMIOMETRÍA EN MIEL DE ABEJA PARA LA
DETERMINACIÓN DE AZÚCARES Y DETECCIÓN DE
ADULTERACIÓN UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA
INFRARROJA**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA APLICADA**

PRESENTA:

I.A MA. ANTONIETA RIOS CORRIPIO

DIRECTOR DE TESIS

DR. MARLON ROJAS LOPEZ

DICIEMBRE 2010



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla, Tlaxcala siendo las 11:00 horas del día 21 del mes de Octubre del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA-TLAX para examinar la tesis de titulada:

“QUIMIOMETRIA EN MIEL DE ABEJA PARA LA DETERMINACION DE AZÚCARES Y DETECCION DE ADULTERACION UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA INFRARROJA”

Presentada por el alumno:

Ríos	Corripio	María Antonieta							
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)							
		Con registro:	B	0	8	1	1	1	1

aspirante de:

Maestría en Biotecnología Aplicada

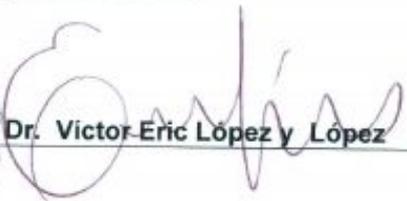
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

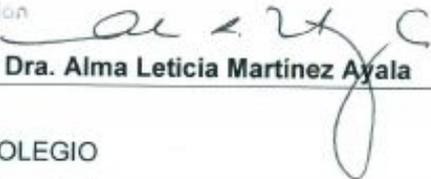
Director de tesis


Dr. Marlon Rojas López


Dra. María del Carmen Cruz López

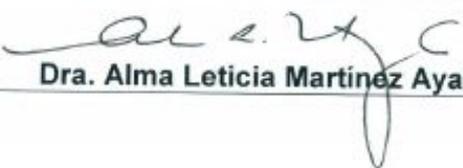

Dr. Victor-Eric López y López

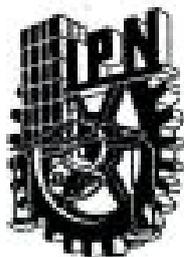

Dr. Raúl Jacobo Delgado Macuil


Dra. Alma Leticia Martínez Ayala


 Centro de Investigación
 en Biotecnología
 Aplicada

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


Dra. Alma Leticia Martínez Ayala



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tepetitla, Tlaxcala el día 29 del mes Noviembre del año 2010, el (la) que suscribe María Antonieta Ríos Corripio alumno (a) del Programa de Maestría en Biotecnología Aplicada con número de registro B081111, adscrito a CIBA-Tlaxcala, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Marlon Rojas López y cede los derechos del trabajo intitulado

**"QUIMIOMETRIA EN MIEL DE ABEJA PARA LA DETERMINACION DE AZÚCARES
Y DETECCIÓN DE ADULTERACION UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA INFRARROJA"**

, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección marlonrl@yahoo.com.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


María Antonieta Ríos Corripio

Nombre y firma.

AGRADECIMIENTOS.

Esta tesis, si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación por parte de la autora y su director de tesis, no hubiese sido posible su finalización sin la Cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación citaré y muchas de las cuales han sido un soporte muy fuerte en momentos de dificultad.

Primero y antes que nada, dar gracias a **Dios**, por estar conmigo en cada paso que doy, por acompañarme siempre en todo momento de dificultad, permitirme terminar satisfactoriamente mis estudios, por llenar mi vida de dicha y bendiciones, por fortalecer mi corazón, iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Esta tesis está dedicada a mis Padres, a quienes agradezco de todo corazón por su apoyo sin condiciones ni medida, amor, cariño y comprensión. En todo momento los llevo conmigo.

Agradezco a mis hermanas Gabriela y Socorro por la compañía y el apoyo que me brindan.

Mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis Dr. Marlon Rojas López por la colaboración, paciencia, apoyo brindados desde siempre y sobre todo por esa gran amistad que me brindó y me brinda, por escucharme y aconsejarme siempre, gracias también por brindarme su ayuda cuando más la necesitaba, por ser una persona con la que puedo contar siempre, por el cariño que me brinda y los ánimos que me da, por los momentos en los que más que un profesor se comportó como un amigo. Gracias.

A mis sinodales:

Dra. Alma Leticia Martínez Ayala

Dra. Carmen Cruz López

Dr. Eric López y López

Dr. Raúl J. Delgado Macuil

Por brindarme su apoyo, ánimo y colaboración en todo momento y sus valiosas enseñanzas.

A mis amigas del CIBA por ayudarme a crecer y madurar como persona por su apoyo y amistad.

En memoria de mi tío Manuel Corripio, siempre estarás en nuestro corazón.

En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis, con sus altos y bajos y que no necesito nombrar porque tanto ellas como yo sabemos que desde los más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

Gracias a todos. Antonieta.

INDICE

INTRODUCCION.....	11
CAPITULO I ANTECEDENTES.....	14
1.1. Situación actual del comercio y producción de la miel en México.....	15
1.2. Características organolépticas, químicas y físicas de la miel.....	18
1.3. Composición.....	19
1.3.1. Humedad.....	20
1.3.2. Constituyentes minoritarios.....	25
1.3.3. Carbohidratos.....	25
1.4. Determinación de los carbohidratos de la miel.....	28
1.5. Adulteración de la miel.....	31
1.5.1. Determinación de la adulteración de la miel.....	32
1.6. Espectroscopia infrarroja (FTIR).....	32
1.6.1. Aplicaciones de la Espectroscopia Infrarroja.....	34
1.7. Quimiometría.....	34
1.7.1. Análisis de Componentes Principales (PCA, <i>Principal Component Analysis</i>).....	35
1.7.2. Regresión de Componentes Principales (PCR, <i>Principal Component Regression</i>).....	36
1.7.3. Regresión Parcial por Mínimos Cuadrados (PLS, <i>Partial Least squares</i>).....	38
Hipótesis.....	38
Justificación.....	38
Objetivo General.....	39
Objetivos Particulares.....	39
CAPITULO II MATERIALES Y METODOS.....	40
2.1. Recolección y preparación de muestras de miel natural.....	40
2.2. Adulteración de muestras de miel.....	43
2.3. Análisis de humedad.....	44
2.4. Instrumentación.....	45
2.4.1. Refractómetros de humedad y de grados Brix.....	45
2.4.2. Espectrómetro infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR).....	46
2.5. Pre tratamiento de los datos.....	47
2.6. Análisis de datos.....	47

2.6.1. Análisis Cualitativo: Análisis de Componentes Principales (PCA, <i>Principal Component Analysis</i>).....	47
2.6.2. Análisis cuantitativo: Regresión de Componentes Principales (PCR, <i>Principal Component Regression</i>).....	47
CAPITULO III Adulteración en la miel.....	51
3.1. El espectro FTIR de la miel de abeja.....	51
3.2. Diferencias espectrales entre mieles y jarabes.....	54
3.2.1. Absorción infrarroja.....	54
3.2.2. Segunda derivada de la absorción.....	55
3.3. Discriminación de mieles auténticas y adulteradas mediante diferencias espectrales.....	57
3.4. Análisis de Componentes Principales (PCA) aplicado a grupos de muestras de miel de la zona centro del país.	58
3.5. Adulteración intencional controlada de miel de abeja con estándares de glucosa, sacarosa y fructosa.....	64
3.5.1. Adulteración con estándar de glucosa.....	64
3.5.2. Adulteración con estándar de fructosa.....	66
3.5.3. Adulteración con estándar de sacarosa.....	67
3.6. Adulteración intencional controlada de muestras de miel de abeja con diferentes jarabes: de maíz, azúcar de caña y azúcar invertido.....	69
3.6.1. Adulteración con jarabe de maíz.....	69
3.6.2. Adulteración con jarabe de azúcar de caña.....	72
3.6.3. Adulteración con jarabe de azúcar invertido.....	74
3.7. Análisis de Componentes Principales (PCA) aplicado a adulteraciones intencionales de miel de abeja con estándares de glucosa, fructosa y sacarosa.....	75
3.8. Análisis de Componentes Principales (PCA) aplicado a adulteraciones intencionales de miel de abeja con jarabes de maíz, de azúcar de caña y de azúcar invertido.....	77
3.9. Calibración y determinación del contenido de adulterante (jarabes y estándares): regresión de componentes principales (PCR, <i>Principal Component Regression</i>).....	79
3.10. Calibración y determinación del contenido de adulterante (jarabes y estándares) mediante Regresión Parcial por Mínimos Cuadrados (PLS, <i>Partial Least squares</i>).....	84

CAPITULO IV Humedad en la miel.....	93
4.1. Análisis de humedad en muestras de miel de la zona centro del país mediante (PCA, <i>Principal Component Analysis</i>).....	93
4.2. Determinación del contenido de humedad en muestras de miel empleando regresión de componentes principales (PCR, <i>Principal Component Regression</i>).....	101
4.3. Determinación del contenido de humedad en muestras de miel empleando Regresión Parcial por Mínimos Cuadrados (PLS, <i>Partial Least squares</i>)	104
CAPITULO V Azúcares en miel.....	106
5.1. Cuantificación de azúcares mayoritarios en muestras de miel de abeja mediante métodos quimiométricos validados por cromatografía de líquidos de alta resolución.....	106
5.2. Calibración y determinación del contenido de azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa y monosacáridos totales) en muestras de miel mediante Regresión de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS).....	109
CAPITULO VI CONCLUSIONES.....	114
BIBLIOGRAFIA.....	116
APENDICE	
A.1.1 Etapas del proceso de modelado.....	124
A.1.2. Análisis cualitativo.....	125
A.1.3. Análisis cuantitativo.....	130
A.1.4. Calibración y validación de un modelo de regresión.....	136

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales estados productores de miel en la República Mexicana.....	16
Tabla 2. Composición Química de la miel de abeja.....	20
Tabla 3. Potencial de Fermentación de acuerdo al contenido de humedad.....	21
Tabla 4. Principales características y Fórmula molecular de los azúcares Glucosa, Fructosa y Sacarosa.....	27
Tabla 5. Principales enzimas presentes en la miel y su función.....	30
Tabla 6. Listado de muestras de miel analizadas en este estudio.....	41
Tabla 7. Esquema de adulteración de miel con diferentes estándares y jarabes a distintas proporciones.....	44
Tabla 8. Frecuencia, grupo funcional y modo de vibración de las diferentes bandas de absorción infrarroja de la miel de abeja observadas en el espectro FTIR.....	53
Tabla 9. Parámetros estimados para los diferentes azúcares estándar como adulterantes en miel de abeja usando el método de calibración PCR.....	81
Tabla 10. Parámetros estimados para los diferentes adulterantes en miel de abeja usando el método de calibración PCR.....	83
Tabla 11. Parámetros de calibración y validación para los diferentes adulterantes (jarabes y estándares) en muestras de miel de la zona centro del país usando el método PLS.....	89
Tabla 12. Parámetros estimados para los diferentes azúcares estándar como adulterantes en miel de abeja usando el método de calibración PLS.....	90
Tabla 13. Parámetros estimados para los diferentes adulterantes en miel de abeja usando el método de calibración PLS.....	91
Tabla 14. Muestras de miel con exceso de adulterante.....	92
Tabla 15. Contenido de humedad en muestras de miel de la Región central del país (Puebla-Tlaxcala), así como de algunas otras localidades del país.....	94

Tabla 16. Determinación de humedad en muestras de miel mediante regresión de componentes principales PCR.....	103
Tabla 17. Determinación de humedad en muestras de miel de abeja mediante regresión de mínimos cuadrados parciales, PLS.....	105
Tabla 18. Composición de azúcares mayoritarios: glucosa, fructosa y sacarosa de muestras de miel de abeja analizadas en este trabajo, determinados mediante cromatografía de líquidos de alta resolución, HPLC.	108
Tabla 19. Parámetros de calibración para los diferentes azúcares mayoritarios (glucosa, fructosa y sacarosa) y monosacáridos totales usando el método PLS.	110
Tabla 20. Comparación de las mediciones obtenidas mediante HPLC y la predicción FTIR del modelo de calibración utilizando PLS.....	113

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Exportaciones de miel de abeja de México en los últimos 5 años.....	15
Figura 2. Mapa de zonas productoras de miel de abeja en la República Mexicana.....	18
Figura 3. Distribución de la producción de miel de abeja en México 2008.....	18
Figura 4. Etapas en la transformación de la miel de abeja	22
Figura 5. Diagrama de flujo de la producción de la miel de abeja.....	23
Figura 6. (a) Refractómetro de humedad y (b) de grados Brix para miel.....	45
Figura 7. Equipo de Espectroscopia Infrarroja FTIR.....	46
Figura 8. Esquema experimental que muestra la fusión entre la espectroscopia infrarroja y el análisis multivariado para dar origen a la quimiometría.	49
Figura 9. Diseño experimental implementado en la investigación de muestras de miel de abeja: su naturaleza de originalidad o alteración, calibración y cuantificación de adulterantes, así como de azúcares individuales, determinación de azúcares mayoritarios y análisis de humedad.....	50
Figura 10. Espectro FTIR típico de una muestra de miel de abeja.....	51
Figura 11. Espectro FTIR de una muestra de miel de abeja y sus principales bandas de absorción infrarroja en la región de los carbohidratos.....	53
Figura 12. Espectros FTIR de muestras de miel de abeja auténticas, así como de jarabes de glucosa, fructosa y sacarosa respectivamente.....	55
Figura 13. Segunda derivada de los espectros FTIR de muestras de miel de abeja, así como de jarabes de glucosa, fructosa y sacarosa respectivamente.....	56
Figura 14. Espectro FTIR de muestras de miel de abeja auténtica, así como de muestras de miel de abeja adulteradas con jarabe de maíz y jarabe de azúcar de caña.....	57
Figura 15. Segunda derivada de los espectros FTIR de muestras de miel de abeja auténticas (en negro), así como de muestras de miel adulteradas con jarabes de maíz y de azúcar de caña (en color).....	58
Figura 16. Gráficas de cuentas o nube de puntos obtenida mediante análisis PCA en muestras de miel de abeja de la región central del país a) con número de muestras b) con símbolos.....	60
Figura 17. Gráfica de cuentas o nube de puntos 3D obtenida mediante análisis PCA en muestras de miel de abeja de de la zona centro del país a) con número de muestras b) con símbolos.....	62

Figura 18. Gráfica de cuentas o nube de puntos obtenida mediante análisis PCA en muestras de miel de abeja de la región central del país utilizando los espectros en 2ª Derivada en el intervalo espectral de 850–1200 cm ⁻¹	63
Figura 19. Espectros FTIR de muestras de miel de abeja adulteradas con diferentes concentraciones de estándar de glucosa a) en 2D b) 3D.....	65
Figura 20. Espectros FTIR de muestras de miel de abeja adulteradas con diferentes concentraciones de estándar de fructosa a) en 2D b) 3D.....	67
Figura 21. Espectros FTIR de muestras de miel de abeja adulteradas con diferentes concentraciones de estándar de sacarosa a) en 2D b) 3D.....	68
Figura 22. Espectros FTIR de la adulteración de la miel con diferentes concentraciones de jarabe de maíz a) en 2D b) 3D.....	71
Figura 23. Espectros FTIR de muestras de miel de abeja adulteradas con diferentes concentraciones de jarabe de azúcar de caña a) en 2D b) 3D.....	73
Figura 24. Espectros FTIR de muestras de miel de abeja adulteradas con diferentes concentraciones de jarabe de azúcar invertido a) en 2D b) 3D.....	75
Figura 25. Gráfica de cuentas o nube de puntos obtenida mediante análisis PCA en muestras de miel de abeja de la zona centro del país, así como de muestras adulteradas con azúcares estándar.....	76
Figura 26. Gráfica de cuentas o nube de puntos 3D obtenida mediante análisis PCA en muestras de miel de abeja de la zona centro del país, así como de muestras adulteradas con azúcares estándar.....	77
Figura 27. Gráfica de cuentas o nube de puntos obtenida mediante análisis PCA en muestras de miel de abeja de la zona centro del país, así como de muestras adulteradas con distintos jarabes.....	78
Figura 28. Gráfica de cuentas o nube de puntos 3D obtenida mediante análisis PCA en muestras de miel de abeja de la zona centro del país, así como de muestras adulteradas con azúcares distintos jarabes.....	79
Figura 29. Modelo de Calibración en segunda derivada para predicción de estándares de (a) fructosa, (b) sacarosa, (c) glucosa, como adulterantes en miel de abeja mediante PCR.....	80
Figura 30. Modelo de Calibración en segunda derivada para predicción de (a) jarabe de maíz, (b) jarabe de azúcar invertido y (c) jarabe de azúcar de caña, como adulterantes en miel de abeja mediante PCR.....	82

Figura 31. Curvas de (a) calibración y (b) validación entre los valores establecidos y predichos mediante espectroscopia infrarroja y análisis multivariado PLS para adulteración de la miel con glucosa estándar.....	85
Figura 32. Curvas de (a) calibración y (b) validación entre los valores establecidos y predichos mediante espectroscopia infrarroja y análisis multivariado PLS para adulteración de la miel con fructosa estándar.....	86
Figura 33. Curvas de (a) calibración y (b) validación entre los valores establecidos y predichos mediante espectroscopia infrarroja y análisis multivariado PLS para adulteración de la miel con sacarosa estándar.....	86
Figura 34. Curvas de (a) calibración y (b) validación entre los valores establecidos y predichos mediante espectroscopia infrarroja y análisis multivariado PLS para adulteración de la miel con jarabe de maíz.....	87
Figura 35. Curvas de(a) calibración y (b) validación entre los valores establecidos y predichos mediante espectroscopia infrarroja y análisis multivariado PLS para adulteración de la miel con jarabe de azúcar de caña.....	87
Figura 36. Curvas de (a) calibración y (b) validación entre los valores establecidos y predichos mediante espectroscopia infrarroja y análisis multivariado PLS para adulteración de la miel con jarabe de azúcar invertido.....	88
Figura 37. Espectro FTIR típico de muestras de miel auténticas mostrando la banda de absorción del enlace H-O-H en la región de 1644 cm^{-1}	96
Figura 38. Gráfica de cuentas o nube de puntos obtenida mediante análisis PCA en muestras de miel de abeja en el rango espectral de $1500\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$, la cual separa el grupo inicial de muestras en dos grupos con distinto contenido de humedad.....	97
Figura 39. Gráfica de cuentas o nube de puntos 3D de humedad obtenida mediante análisis PCA en muestras de miel de abeja en el rango espectral de $1500\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$	98
Figura 40. Espectro FTIR típico de muestras de miel auténticas mostrando la banda de absorción del enlace -OH centrada en 3383 cm^{-1}	99
Figura 41. Gráfica de cuentas o nube de puntos de humedad obtenida mediante análisis PCA en muestras de miel de abeja analizadas en el rango espectral de $3100\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$	100
Figura 42. Curva de calibración obtenida por Regresión de Componentes Principales PCR. Esta curva predice el contenido de humedad en miel y fue calculada utilizando en el rango espectral de $1500\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$	101

Figura 43. Modelo de (a) Calibración y (b) Validación en segunda derivada para predicción de humedad en muestras de miel de la zona centro del país mediante PLS.....	104
Figura 44. Espectros FTIR de los azúcares mayoritarios (glucosa, fructosa y sacarosa) presentes en miel.....	107
Figura 45. Curvas de calibración que predicen el contenido de glucosa en miel de abeja utilizando el análisis PLS.	111
Figura 46. Curvas de calibración que predicen el contenido de fructosa en miel de abeja utilizando el análisis PLS.	111
Figura 47. Curvas de calibración que predicen el contenido de sacarosa en miel de abeja utilizando el análisis PLS.....	112
Figura 48. Curvas de calibración que predicen el contenido de monosacáridos totales en miel de abeja utilizando el análisis PLS.....	112
Figura 49. Interpretación geométrica de un PCA.....	128

Resumen

La miel es un producto alimenticio de alto valor nutricional, y está compuesta de diversos azúcares principalmente fructosa y glucosa. La determinación del contenido de azúcares individuales en miel de abeja constituye un medio importante de análisis nutricional de alimentos para evaluar la calidad y detectar adulteración. Diversas técnicas analíticas se utilizan para determinación de la autenticidad de la miel como son los métodos enzimáticos, cromatográficos, electroquímicos y espectrométricos. Sin embargo, algunos de estos métodos podrían presentar algunas desventajas o inconvenientes, como: consumir tiempo, requieren el uso de reactivos, así como una preparación especial de las muestras. La espectroscopia infrarroja (FTIR) combinada con el análisis multivariado, (fusión que es conocida como quimiometría) permite el análisis de muestras de miel con una poca o ninguna preparación de esta, reduciendo así el tiempo, el costo y la complejidad del análisis. De esta forma se determinó la autenticidad de un grupo de muestras de miel de abeja recolectadas directamente de apicultores principalmente de la región central del país (Puebla-Tlaxcala). Para cuantificar el contenido de adulterante en muestras adulteradas, se adulteraron intencionalmente muestras de miel auténtica en proporciones desde 10 a 90% con soluciones de glucosa, fructosa y sacarosa en agua ajustadas a 70 °Bx, así como con jarabes edulcorantes; posteriormente fueron analizadas mediante espectroscopia FTIR en el rango de 650 a 4000 cm^{-1} . Se utilizó además el método de muestreo por reflectancia total atenuada (ATR) y métodos de análisis multivariado para cuantificar la adulteración de las muestras de miel. De manera similar, la aplicación de la espectroscopia FTIR y métodos de análisis multivariado en muestras de miel permite estimar la composición de azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa), así como humedad sin preparación alguna de las muestras y sin separación, validando estos resultados solo una vez con alguna de las técnicas de referencia como cromatografía de líquidos (azúcares) y refractometría (humedad). Esta metodología permitió realizar análisis en mieles de un modo práctico.

Abstract

Honey is a food of high nutritional value and is mainly composed of various sugars: fructose and glucose. Determination of individual sugars in bee honey is an important way in food analysis to evaluate quality and detect adulteration. Various analytical techniques have been used to determine the authenticity of honey such as enzymatic, chromatographic, electrochemical and spectrometric methods. However, some of these methods could present some disadvantages, like: to consume time, they require the use of reagents, as well as a special preparation of the samples. The infrared spectroscopy (FTIR) combined with the multivariate analysis, (fusion that are well-known as chemometry) allows the analysis of samples of honey with little or no preparation of this, reducing therefore the time, the cost and the complexity of the analysis. From this form the authenticity of a group of samples of honey of bee collected directly of beekeepers mainly from the central region of the country (Puebla-Tlaxcala) was determined. In order to quantify the content of adulterant in adulterated samples, samples of authentic honey in proportions from 10 to 90% with glucose, fructose and sucrose solutions in water fit to 70 ° Bx, as well as with syrups sweeteners were adulterated intentionally; later they were analyzed by FTIR spectroscopy in the range of 650 to 4000 cm^{-1} . It was used in addition the attenuated total reflectance (ATR) sampling method and also multivariate analysis to quantify the adulteration of the honey samples. Of similar way, the application of FTIR spectroscopy and multivariate analysis methods in honey samples allows to evaluate the composition of sugars (glucose, fructose and sucrose), as well as humidity without none preparation of the samples and nor separation; validating these results only once with some of the standard techniques of reference like chromatography of liquids (sugars) and refractometry (humidity). This methodology allowed to realize analysis in honeys in a practical way.

INTRODUCCION

La miel es la "sustancia dulce elaborada por las abejas, a partir del néctar de las flores y de otras secreciones extraflorales, las cuales liban, transportan, transforman, combinan con otras sustancias, deshidratan, concentran y almacenan en panales" (CODEX STAN 12-1981).

El CODEX STAN 12-1981 es una norma que se aplica a todas las mieles producidas por abejas *Apis mellifera* y regula todos los tipos de presentación de la miel elaborados y destinados en última instancia al consumo directo. Se trata de un producto alimenticio que puede ser fluido, espeso o cristalizado y que contiene carbohidratos, agua, trazas de ácidos orgánicos, enzimas, aminoácidos, pigmentos, polen y cera, de los cuales algunos son agregados por las abejas y otros son derivados de las plantas (European Commission Health & Consumer Protection, 2002).

Existen numerosas referencias que muestran la gran importancia nutricional que posee la miel de abeja y otros subproductos de éste insecto como el polen. Le han sido atribuidas numerosas propiedades medicinales que han sido comprobadas por diferentes trabajos científicos (Sato et.al, 2000), algunos de los cuales destacan la miel por su poder energético, contra la anemia, dinamizante, laxante, hepatoprotector, antiséptico, antibacteriano y cicatrizante (Humbel, 2004).

En nuestro país, la actividad apícola data de épocas anteriores a la llegada de los españoles. En efecto la explotación de la abeja nativa –*Melipona* (sin aguijón)-, propició el desarrollo del comercio de miel y cera, conocida esta última como de Campeche.

A la introducción, por parte de los españoles, de la abeja europea –*Apis mellifera* (con aguijón)- se modificó el espectro comercial apícola en nuestro país a causa de que esta variedad es altamente productora de miel frente a la nativa. Esta situación cambió el aspecto productivo de la actividad. De ese modo el apicultor incorporó la tecnificación con resultados que han conducido a ocupar uno de los primeros lugares a nivel mundial, tanto por el volumen producido como por la calidad de la miel, reconocida principalmente por su sabor y aroma. Esta

calidad es la base indispensable para las mezclas de mieles que se comercializan en Europa (Farias, 2004).

La apicultura es una actividad tradicional del pueblo mexicano, principalmente en la región sur-sureste, la cual aporta la mayor parte de la producción a nivel nacional, tan solo la península de Yucatán aporta más del 30% del volumen nacional. La miel de origen mexicano es un producto altamente demandado a nivel mundial, dado el bajo consumo per cápita nacional de la miel, la mayor parte de la producción se destina al mercado internacional. México ésta considerado dentro de los principales productores y exportadores de alta calidad mundial, principalmente en la Unión Europea (Patiño, 2008).

Por otra parte el crecimiento poblacional aunado a la diversificación de los mercados ha originado un cambio constante en las condiciones de comercio. Cada día, los requisitos que deben cumplir los productos, especialmente los alimentos, son más estrictos. Aún cuando ciertos principios de calidad de los alimentos dependen de los gustos y exigencias del público, existen criterios generales para calificar un determinado producto.

Actualmente, la sociedad demanda que los alimentos que consume no causen daño a su salud, ya que existen sustancias que en forma accidental o inducida pueden contaminarlos. Es por eso, que las autoridades sanitarias de México consideran prioritario el establecimiento de políticas así como técnicas de análisis que aseguren la inocuidad de los alimentos y que garanticen su acceso al mercado nacional e internacional. En este sentido, las nuevas condiciones del mercado requieren la adopción de sistemas de producción más eficientes llevando a cabo análisis rápidos y con estrictos controles de calidad. La miel, que desde siempre ha contado con un amplio reconocimiento como alimento puro y natural no puede quedar exenta de esta dinámica. Es por eso, que quienes participan en su producción, extracción, envasado y comercialización deben corresponder a la responsabilidad que implica intervenir en este proceso (SAGARPA 2008).

La determinación del contenido de azúcares individuales en miel de abeja constituye un medio importante de análisis nutricional de alimentos para evaluar la calidad y detectar la adulteración (Rodríguez et.al, 2001). Adulteración o

sustitución de la miel con ingredientes baratos es un gran fraude económico que repercute en pérdidas económicas, y en la disminución del valor nutricional, fisicoquímico y organoléptico de la miel. Por lo tanto, la detección de la adulteración en miel es de vital importancia.

La norma para la miel CODEX STAN 12-1981 utiliza como métodos de análisis para la detección de adulteración de la miel diversas técnicas como: análisis isotópico, cromatográfico y análisis enzimáticos (Arvanitoyannis et. al, 2005). Entre ellos, el análisis de isótopos estables de carbono es una técnica de análisis estándar utilizado por muchos años. Sin embargo, aunque estas técnicas son muy precisas, presentan el inconveniente de que requieren una preparación especial de la muestra (Yande Liu et. al, 2006). Entre las técnicas alternativas que se han propuesto para este tipo de análisis se encuentra la espectroscopia infrarroja, la cual posee características atractivas. La espectroscopia infrarroja (FTIR) es una técnica que permite el análisis de muestras de miel con una poca o ninguna preparación de esta, reduciendo así el tiempo, el costo y la complejidad del análisis. El fundamento básico de esta metodología de análisis para detectar adulteración en miel de abeja es la combinación de la espectroscopia (FTIR) con los métodos de análisis multivariado: dicha combinación se le denomina Quimiometría. Dicho análisis se realiza en base a una característica química de la miel, que en este caso es el contenido de azúcares, por lo tanto la convierte en una técnica de análisis nueva e innovadora. Esta metodología hace posible entonces obtener la información específica sobre diversos parámetros simultáneamente de una manera directa, confiable y rápida. Los métodos de análisis multivariado como el Análisis de Componentes Principales (PCA) permiten establecer relaciones entre muestras para agruparlas según la similitud de sus espectros o crear agrupaciones de muestras capaces de clasificar nuevas muestras como pertenecientes a un grupo determinado de una forma objetiva. Lo cual resulta muy viable para poder detectar alteraciones debidas principalmente a la adulteración de muestras de miel original (Tzayhri et. al, 2009).

CAPITULO I

ANTECEDENTES

Conocida desde la prehistoria, la miel ha sido principalmente recolectada como alimento, medicina, cosmético y ya era consumida por el hombre. El desarrollo histórico de las sociedades humanas se ha sustentado en el uso y consumo de los recursos naturales, y el caso de la miel no es la excepción. La historia de la apicultura tiene sus raíces en los primeros asentamientos humanos. La apicultura ha sido por lo tanto, una actividad paralela al surgimiento de la civilización, de modo que su expresión no sólo se reduce a su papel alimenticio. En la cultura maya, la miel fue ampliamente utilizada para preparar el «balche», bebida compuesta por miel, que se ingería en las festividades religiosas. En la cultura prehispánica cumplía con algunas funciones básicas como son: ingrediente fundamental de bebidas alcohólicas, las que eran usadas en ritos y ceremonias, para fines medicinales y como edulcorante en una diversidad de platillos. Desde antes de la llegada de los españoles al nuevo mundo, diversas civilizaciones tenían entre sus actividades, la producción de miel, a través del cuidado y mantenimiento de la abeja nativa sin aguijón, a la que se le conoce como *Melipona beecheii*. La región y civilización que destacó en esta actividad fue la maya. La abeja sin aguijón era conocida como "Xunan kab" en su nombre maya. Los antiguos mayas dieron este nombre a la única abeja que domesticaron (*Melipona beecheii*) y de la que obtenían miel y cera. La cría de este insecto, así como la cosecha y comercialización de sus productos fue una de las actividades más importantes de la civilización maya.

Durante la conquista, la miel fue uno de los principales productos ofrecidos en el mercado de Tenochtitlán (García et.al, 2007). La introducción de la abeja europea (*Apis mellifera*) a varias regiones de nuestro país se dio durante la época colonial. Sin embargo, a pesar de las ventajas que ofreció la abeja europea como eran su docilidad y resistencia a las enfermedades, zonas de vital importancia para la apicultura como la península de Yucatán mantuvieron a la abeja *Melipona beecheii* o abeja nativa como la preferida para producir miel. De este modo como lo señalan los especialistas en el estudio de la apicultura durante varios cientos

de años se desarrollaron dos tipos de apicultura en México, aquella basada en la abeja europea y la de la península de Yucatán y otras regiones como Puebla y Michoacán, basada en el aprovechamiento de las abejas nativas. Los años que abarcan entre 1911 y 1940, el desarrollo de la apicultura fue más que lento, caracterizado por una actividad casi experimental en algunas regiones y rústica en otras más (Sanz et.al, 1970). A partir de 1950, la apicultura mexicana mostró un importante desarrollo a través de las primeras exportaciones llevadas a cabo en dos regiones distintas, iniciando con ello, la etapa de una apicultura moderna y comercial, que la ubicará en los posteriores años entre las primeras del mundo.

1.1. Situación actual del comercio y producción de la miel en México.

La apicultura mexicana es desarrollada por una población rural e indígena, siendo su principal fuente de ingresos económicos. Es una actividad importante de la cual dependen alrededor de 40, 000 apicultores que son en su gran mayoría campesinos. México cuenta con alrededor de 1.7 millones de colmenas con lo que se produce a nivel nacional un promedio de 58 mil toneladas de miel al año, de los cuales, el 44 por ciento se envía al exterior, con un valor comercial de alrededor de 60 millones de dólares (SAGARPA 2008). Como se puede observar en la figura 1, los países europeos son los principales consumidores de este producto alimenticio.

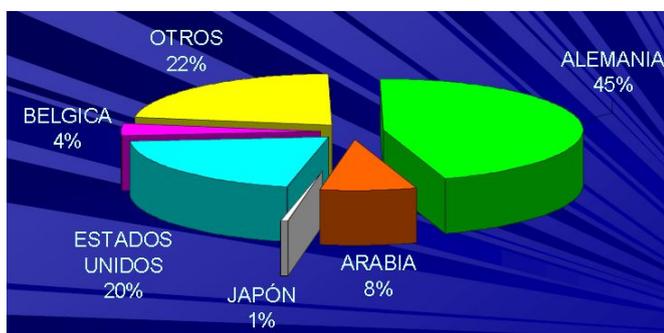


Figura 1. Exportaciones de miel de abeja de México en los últimos 5 años.

En la actualidad México es tercer exportador a nivel mundial sobresaliendo China y Argentina y ocupa el cuarto lugar a nivel internacional en cuanto a producción. Los apicultores yucatecos han logrado mantener la competitividad y calidad de la miel, de cuya producción se exporta el 85 por ciento a Alemania, Bélgica, Gran Bretaña, Holanda, España e Italia.

En la Tabla 1 se muestran los principales estados productores de miel a nivel nacional sobresaliendo el estado de Yucatán con una producción total de 9,169 toneladas de miel, seguido del estado de Campeche y ocupando el último lugar el estado de Oaxaca con una producción de 2,172 toneladas. La apicultura mexicana tiene un alto valor social y económico, se ubica entre los tres primeros lugares en el sector pecuario nacional como generadora de divisas, sobre todo porque el dulce que se produce en el país es una de las mieles de mejor calidad y más cotizadas en el mundo (García, 2007).

Tabla 1. Principales estados productores de miel en la República Mexicana*

Estado	Producción (toneladas)	Participación nacional total (%)
Yucatán	9,169	15.5
Campeche	8,521	14.4
Veracruz	6,614	11.2
Jalisco	5,621	9.5
Guerrero	3,836	6.5
Chiapas	2,957	5.0
Puebla	2,900	4.9
Quintana Roo	2,544	4.3
Oaxaca	2,172	3.7
Suma de estos estados	44,334	75.0
Nacional	59,069	100.0

* (Sagarpa 2007)

Actualmente la Apicultura constituye una de las pequeñas industrias rurales más activas de todo el mundo. La Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (S.A.R.H.) divide el país en varias zonas Apícolas como se muestra en la Figura 2. Todas estas en base a sus características de clima, vegetación, volúmenes de producción y sistemas que se utilizan en la cría y explotación de abejas. Estas zonas son:

- **ZONA NORTE.** Baja California Norte y Sur, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Durango, Zacatecas, y Aguascalientes. No se considera muy buena para la apicultura, pues tiene clima extremoso.

- **ZONA CENTRO.** Guanajuato, Querétaro, Estado de México, Morelos, Tlaxcala, Puebla y Distrito Federal. Se considera una zona regular, tiene buenos rendimientos por colmena y la miel que se cosecha es de buena calidad.

- **ZONA DEL PACIFICO.** Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Jalisco, Colima, Nayarit, y Sinaloa la constituyen. El clima favorece la actividad Apícola en gran medida.

ZONA SURESTE O PENINSULAR. Tabasco, Veracruz, Campeche, Yucatán y Quintana Roo. Es la mejor zona para la apicultura, con gran número de productores que compiten entre sí. (Serrano et. al,1994a).

La principal zona productora del país es la del sureste, que exporta el 99% de su producción. En esta zona, los apicultores se encuentran organizados en grandes asociaciones, a diferencia del resto de la República, en que las asociaciones son muy pocas y dispersas. En la Figura 3 se muestra la participación de la producción de miel de abeja de los principales estados de México en el año 2008; se observa que el estado de Yucatán es el que tiene mayor porcentaje de participación. Los grandes apicultores privados ejercen un gran control sobre el mercado organizado y distribuyen el producto, principalmente en las ciudades. Se puede decir que la apicultura en México, es una actividad que ofrece grandes oportunidades de desarrollo. Sin embargo, deben observarse las ventajas que ofrece cada una de las zonas geográficas en cuanto al clima y vegetación, pues de estos factores depende en gran medida la producción.



Figura 2. Mapa de zonas productoras de miel de abeja en la República Mexicana.

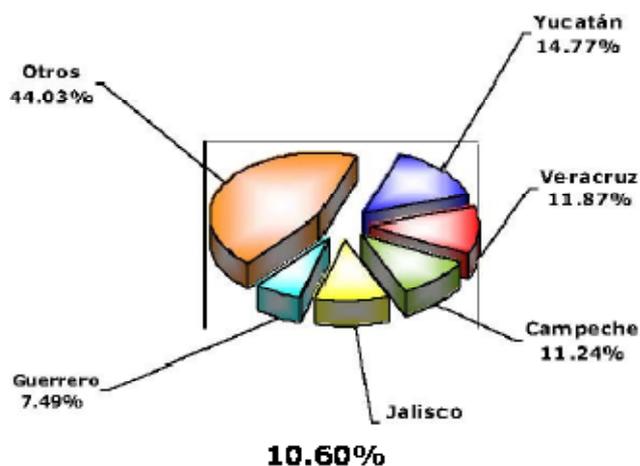


Figura 3. Distribución de la producción de miel de abeja en México 2008.

Fuente: www.siap.sagarpa.gob.mx.

1.2. Características organolépticas, químicas y físicas de la miel.

Las características físicas, químicas y organolépticas de la miel vienen determinadas por el tipo de néctar que recogen las abejas. No debe tener sabor ni aroma desagradables, debe estar libre de materia extraña y de contaminantes químicos, no debe contener aditivos alimentarios para su conservación, estar

diluida o mezclada con almidones, melazas, glucosas, dextrinas, fructosa o otros azúcares, de acuerdo a lo que establece la Norma Oficial Mexicana 823NMX-F-036-1997-NORMEX (Alimentos-Miel-Especificaciones y Métodos de Prueba).

En su estado fresco, las mieles son además productos viscosos, de sabor a la vez muy azucarado, ácido y ligeramente aromático, desprendiendo un olor característico. Por otro lado el consumidor debe adquirir una miel plena de cualidades organolépticas, exenta de alteraciones físico-químicas o bioquímicas, que hagan suponer una desviación de los procesos normales de extracción, envasado y almacenamiento del producto (González et.al, 2002).

1.3. Composición.

La miel es una sustancia muy dulce, con poder edulcorante, con virtudes dietéticas y terapéuticas, es el producto alimenticio que producen las abejas a partir del néctar de las flores para alimentar a sus larvas y asegurarse la subsistencia durante el invierno, a los que añaden sustancias propias de su organismo (enzimas) y se transforman en miel en sacos especiales situados en su esófago, almacenando y dejado madurar en los panales de la colmena. Es un producto biológico que varía notablemente en su composición como consecuencia de la flora de origen, de la zona, y de las condiciones climáticas.

La diferencia entre una miel y otra depende sobre todo de la calidad y cantidad de las plantas que florecen y producen néctar en el mismo periodo. En muchos casos, hay una fuente principal que predomina netamente sobre las demás y confiere a la miel sus peculiares características (Patiño 2008). En la Tabla 2 se muestran los valores numéricos en porcentaje del contenido de sus componentes.

Tabla 2. Composición Química de la miel de abeja*

componente	Rango	contenido típico
agua	14 - 22 %	17%
fructosa	28 - 44 %	38%
glucosa	22 - 40 %	31%
sacarosa	0,2 - 7 %	4%
maltosa	2 - 16 %	7,5%
otros azúcares	0,1 - 8 %	5%
proteínas y aminoácidos	0,2 - 2 %	
vitaminas, enzimas, hormonas ácidos orgánicos y otros	0,5 - 1 %	
minerales	0,5 - 1,5 %	
cenizas	0,2 - 1,0 %	

*(CODEX STAN- 1-2007 Miel de abeja)

1.3.1. Humedad.

Según la norma del CODEX STAN 12-1981 el contenido de agua de la miel es la medición más importante para la evaluación de la madurez y la vida útil y se relaciona directamente con la calidad de esta. Una miel con un contenido de agua de más del 18 % puede verse afectada por la fermentación.

A continuación se define el término de fermentación en miel de abeja. Todas las mieles tienen levaduras osmofílicas o sea levaduras que son tolerantes a soluciones con una concentración relativamente alta de azúcares. Una miel se

fermentará sí:

- ❖ El contenido de agua de la miel es elevado, en relación con el contenido de azúcar.
- ❖ La temperatura es adecuada.
- ❖ Si la cantidad de levaduras es suficientemente alto en relación al contenido de humedad.

Las fermentaciones de la miel ocurren en la mayoría de los casos, luego de la granulación de la misma. La remoción de hidrato de dextrina de la solución deja una fase líquida con un contenido de humedad más elevado y en la cual el contenido de humedad no está uniformemente distribuido. En el rango de humedad de la miel, un pequeño aumento en humedad puede iniciar fermentación. Usualmente la capa más diluida de la miel es la que queda más arriba en el envase y es la parte más expuesta a la intemperie y a las levaduras (Aganin et.al,1965).

En la Tabla 3 se muestra el potencial de fermentación de acuerdo al contenido de humedad en muestras de miel, se pueden observar el impacto que ocasionan los diferentes contenidos de humedad para producir la fermentación en la miel.

Tabla 3. Potencial de Fermentación de acuerdo al contenido de humedad.

Contenido de Humedad	Tendencia a la Fermentación
< 17.1 %	No hay independ. Del título de levaduras
17.1-18.0	No hay si el título es > 100/g
18.1-19.0	No hay si el título es > 10
19.1-20.0	No hay si el título es > 1
>20.0 %	Siempre hay peligro de fermentación

La miel, tal como se consume, es el resultado de las transformaciones que sufre el néctar en las glándulas de las abejas. En dicha elaboración se incluyen dos procesos diferentes: uno de ellos consiste en un cambio químico en el azúcar y el otro resulta de un cambio físico, mediante el cual se elimina el excedente de agua. Este proceso lo realizan las abejas mediante su complejo sistema glandular que culmina una vez que la miel "madura". Entonces es sellada dentro de las

celdas con opérculo de cera, que también producen las abejas. El maravilloso proceso que convierte al néctar en miel incluye modificaciones físico químicas que requieren una compleja labor de la colmena. Por su parte el apicultor necesita conocerla para extraer la miel en óptimas condiciones y con el grado correcto de humedad. En la figura 4 se muestra a manera de esquema todo lo dicho anteriormente respecto a la información que tiene que ver con la manera en que este producto alimenticio se transforma desde néctar hasta transformarse en miel.

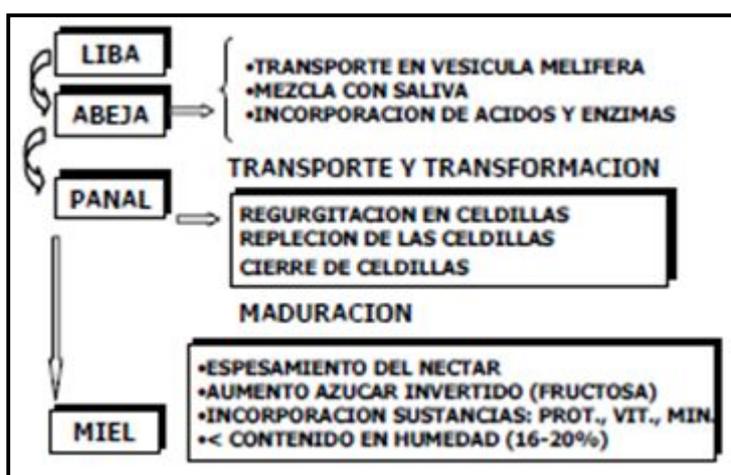


Figura 4. Etapas en la transformación de la miel de abeja

El contenido de humedad en la miel va a depender de diversos factores como son: las condiciones climáticas, flora, periodo del año, humedad inicial del néctar y grado de maduración alcanzado en la colmena así como de su origen geográfico, estas diferencias en el contenido de humedad afectan a las propiedades físicas de la miel (la viscosidad, la cristalización), también influyen en el valor de la relación glucosa/agua, intervienen en los fenómenos de granulación y marca la estabilidad del producto desde el punto de vista microbiológico (Smith, 2002) como puede verse el contenido de humedad en las gamas de miel en general, determina la base de las propiedades del producto..

Sin embargo, el contenido de agua puede ser artificialmente alterado durante el procesamiento de la miel y no es por lo tanto un indicador fiable para el origen botánico.

En la figura 5 se muestra el diagrama donde se representan las distintas etapas que se dan en el proceso de extracción y manipulación de la miel. Las diferentes etapas tienen como objetivo evitar los riesgos de fermentación y pérdida de la calidad del producto.

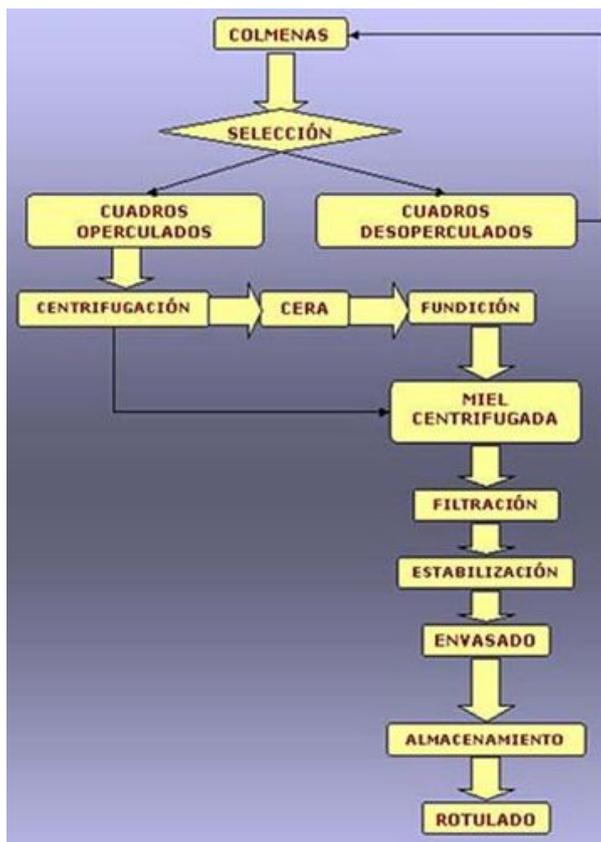


Figura 5. Diagrama de flujo de la producción de la miel de abeja.

La velocidad con que se elimina el agua del néctar fresco o miel sin madurar, está condicionada en alto grado por una serie de factores tales como las condiciones de tiempo y del flujo del néctar, la fuerza de la colonia, la cantidad y concentración de néctar traído en relación con determinada unidad de tiempo, la extensión de celdas disponibles para el almacenaje, la temperatura, la humedad y la ventilación, cuando dentro de la colmena la temperatura es alta, la velocidad de evaporación también es alta, en cambio con respecto a la humedad sucede lo

contrario, es decir, a mayor porcentaje de humedad, menor capacidad de evaporación. Es menester que se produzca un cambio del aire prácticamente continuo entre el interior de la colmena y la atmósfera exterior, para reemplazar el aire saturado de humedad del interior de las alzas (Bogdanov et. al,1997).

Cuando la humedad exterior es mayor que la interior, la acción se invierte y la miel, en particular la que está contenida en celdas sin sellar, absorbe humedad debido a las propiedades higroscópicas de los azúcares de la miel. La velocidad de la evaporación será tres veces mayor si la celda se lleno hasta una cuarta parte de su capacidad, en lugar de haber sido llenadas hasta sus tres cuartas partes. Puede ocurrir que las abejas se vean impedidas de madurar correctamente la miel debido a altos porcentajes de humedad del aire.

El contenido de humedad es el único criterio de composición de la miel, que debe ser cumplido como parte de los estándares de la miel de abejas para su comercialización mundial (González et. al, 1995).

La medida de la humedad en la miel es uno de los problemas que tiene el apicultor al mezclar las mieles, o de verificar la calidad de una miel, ya que la misma es muy higroscópica. Por encima del 60% de humedad ambiente, la miel toma humedad de ese ambiente, por debajo entrega humedad. El contenido de agua de la miel está relacionada también con otras propiedades, por ejemplo con el peso específico y el índice de refracción. Utilizando dichas propiedades se realiza la determinación refractométrica del agua en forma indirecta para la determinación de humedad (Método indirecto) (Rohman et.al, 2009).

1.3.2. Constituyentes minoritarios

Están conformados por menos del 1,5% sobre la materia seca.

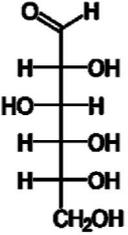
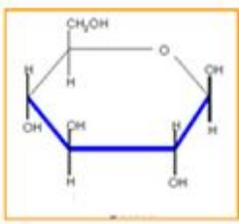
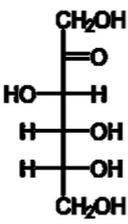
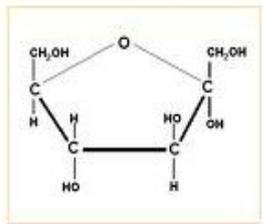
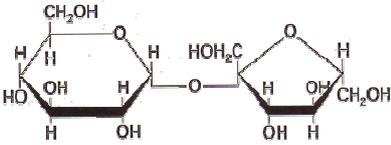
- **Ácidos orgánicos** (0,6%): ácidos glucónico (principal), acético, butírico, cítrico, fórmico (también presente en el veneno de las abejas), láctico, málico, piroglutámico y succínico. Estos dan a la miel un pH ácido, entre 3,4 y 6,1.
- **Compuestos nitrogenados** (0,4%): proteínas (0,3%), aminoácidos (0,05-0,1%) (Principalmente prolina), enzimas (amilasa, glucooxidasa).
- **Minerales** (0,1%): mayoritariamente potasio (0,05%), fósforo (0,005%), calcio (0,0048%), sodio (0,0029%) y magnesio (0,002%).

1.3.3. Carbohidratos.

Los azúcares son el constituyente mayoritario de la miel, representado del 95-99% de la materia seca. Se les atribuye gran parte de las cualidades de la miel como la viscosidad, propiedades térmicas, tendencia a la granulación, higroscopicidad, poder rotatorio, etc., White, 1975; Huidobro et.al,1984e; Serrano et al., 1994b; Cavia et. al., 2002). Los sacáridos siempre presentes en la miel son: Fructosa (30,9-44,3%), Glucosa (22,9-40,8%), Sacarosa (0,8-10%), Maltosa (0,5-2,8%), Isomaltosa (0,5-1,5%), Turanosa (0,5-1,5%), Nigerosa (0,2-1,0%). Asimismo, junto con otras sustancias como los ácidos, los compuestos nitrogenados y minerales, contribuyen decisivamente en el sabor de la miel (Huidobro et.al, 1984e). La composición en azúcares es útil para valorar el grado de pureza de la miel (Louveaux, 1985). La mayor parte de los azúcares no se encuentran en el néctar, sino que se forman durante la maduración y almacenamiento de la miel (Cordella et.al, 2003), siendo el resultado de diversos procesos enzimáticos, donde estas reacciones se basan, sobre todo, en el desdoblamiento del glúcido sacarosa en los dos componentes mayoritarios de la miel: Fructosa y glucosa (Louveaux, 1985). Los diferentes tipos de miel suelen tener los mismos azúcares aunque en cantidades variables, estando su porcentaje relacionado con la flora y en una menor influencia con el clima y origen geográfico. Los dos azúcares cuantitativamente predominantes en la miel

son la fructosa y la glucosa (Alamanni, 1994), que representan del 85 al 95% del total, estando la fructosa en mayor concentración con un 38% por término medio y la glucosa con un 31% (Louveaux, 1985). En la tabla 4. se muestran las principales características, así como su fórmula molecular de los azúcares mayoritarios que componen la miel de abeja, se puede observar como cada uno de ellos presenta características únicas. La concentración de la sacarosa es muy variable, dependiendo del tipo de miel y de su estado de maduración. El proceso de maduración de la miel se refiere a que, en el proceso de elaboración de la miel se realiza un cambio químico es decir la acción de la enzima invertasa (sacarasa), que las obreras adicionan al néctar, la cual hidroliza la sacarosa presente en el néctar a glucosa y fructosa. Altos contenidos en sacarosa pueden ser debidos a una alimentación artificial de las abejas con jarabe de sacarosa durante mucho tiempo ó debido a una maduración inadecuada (Serra et. al, 1987).

Tabla 4. Principales características y Fórmula molecular de los azúcares Glucosa, Fructosa y Sacarosa.

Azúcar	Propiedades	fórmula perspectiva de Fisher	fórmula perspectiva de Haworth
GLUCOSA	<p>Monosacárido que tiene la misma fórmula química que la fructosa pero con diferente posición relativa de los grupos -OH y O=. Es una hexosa, es decir, que contiene 6 átomos de carbono, y es una aldosa, esto es, el grupo carbonilo está en el extremo de la molécula. Es una forma de azúcar que se encuentra libre en las frutas y en la miel. La aldohexosa glucosa posee dos estereoisómeros, si bien la D-glucosa es predominante en la naturaleza. En terminología de la industria alimentaria suele denominarse dextrosa (término procedente de «glucosa dextrorrotatoria») a este compuesto. La glucosa se encuentra en la miel en un 31% en promedio</p>	$C_6H_{12}O_6$ 	
FRUCTOSA	<p>La fructosa, o levulosa, es una forma de azúcar encontrada en las frutas y en la miel. Es un monosacárido con la misma fórmula empírica que la glucosa pero con diferente estructura. Es una cetohexosa (6 átomos de carbono). La fructosa es un azúcar natural más dulce que la sacarosa. La fructosa se encuentra en la miel en un 38% por término medio, se encuentra en mayor concentración que la glucosa.</p>	$C_6H_{12}O_6$ 	
SACAROSA	<p>La sacarosa o azúcar común es un disacárido formado por alfa-glucopiranososa y beta-fructofuranosa. Su nombre químico es: alfa-D-glucopiranosil(1->2)-beta-D-fructofuranósido. Es un disacárido que no tiene poder reductor sobre el reactivo de Fehling y el reactivo de Tollens. El azúcar de mesa es el edulcorante más utilizado para endulzar los alimentos y suele ser sacarosa. La sacarosa no debe superar el 5% de acuerdo con la normativa de CODEX STAN 12-1981, en mieles también se encuentra en menor cantidad que la glucosa y la fructosa.</p>	$C_{12}H_{22}O_{11}$	

1.4. Determinación de los carbohidratos de la miel.

Los primeros métodos usados para la determinación de los azúcares no reflejaban la verdadera composición de la muestra. Además, la variabilidad debida a los métodos era mayor que la debida a las diferencias entre varios tipos de miel (Downey et. al, 1997). Actualmente existen diferentes métodos para la determinación de la concentración de azúcares en alimentos y en particular en miel, entre los que se encuentran:

- **Refractometría:** esta técnica óptica está basada en la determinación del índice de refracción, y provee información acerca de la materia seca presente en la miel proporcionando una rápida aproximación del azúcar total, así como la cantidad de fructosa y glucosa (Pomeranz et.al, 1994).

- **Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC):**

La Cromatografía líquida de alta eficacia o *High performance liquid chromatography* (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en bioquímica y química analítica. El HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. Los métodos cromatográficos son en la actualidad una herramienta imprescindible para la determinación rápida y específica de azúcares. La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) es una técnica que se ha venido usando en la industria azucarera por muchas décadas. Esta técnica permite la separación, identificación y estimación cuantitativa del azúcar presente en un rango de productos de la casa azucarera, tales como: jugo de caña de azúcar, jarabe, azúcar crudo y melaza (Casas et.al, 2001).

Esta es una de las técnicas más precisas utilizadas para la determinación de los azúcares en la miel, y ha sido incluida en la legislación española y en la Asociación Oficial de Química Analítica (AOAC 1990), se utiliza para separar y cuantificar los mono y disacáridos presentes en la miel. Se han utilizado diversos detectores acoplados a los métodos cromatográficos para identificar carbohidratos, como son detector de ionización de llama (FID) y espectrómetro de masa (MS) para GC; detección del índice refractivo (RI), detección de pulsación amperométrica (PAD), detección de la dispersión de luz por evaporación (ELSD) y MS son los detectores más comúnmente usados para HPLC.

• **Métodos enzimáticos:**

Existen métodos enzimáticos, sensibles y específicos, que se utilizan para la determinación y cuantificación de azúcares como: fructosa, glucosa y sacarosa han sido recomendados como técnica rutinaria y de investigación en la miel por su especificidad y fácil manipulación de la muestra (Haaland et.al,1988; Huidobro et.al,1984e; Farias et.al,2004; Alamanni, 1994).

Se encuentran disponibles comercialmente una serie de paquetes de reactivos especialmente preparados en composición y concentración adecuadas para ser empleados en el análisis de determinados componentes de alimentos.

Estos conjuntos de reactivos (o "kits") son ampliamente empleados en el área de análisis clínicos y de aguas, y se introdujeron con éxito en los laboratorios de análisis de alimentos, en la tabla 5. se muestran las principales enzimas que se encuentran en la miel de abeja así como la función que realiza cada una de ellas.

Tabla 5. Principales enzimas presentes en la miel y su función.

Enzima	Función
Invertasa	Convierte la sacarosa a glucosa y fructosa
Diastasa	Hidroliza el almidón a dextrinas y/o azúcar
Glucosa-oxidasa	Convierte glucosa a glucolactona; éste a su vez produce ácido glicónico y peróxido de hidrógeno.
Catalasa	Convierte el peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno
Fosfatasa Ácida	Remueve fosfatos inorgánicos de fosfatos orgánicos.

National Honey Board, citado por Aguilar (2001)

Determinación de la actividad de la glucosa-oxidasa en miel.

Para el caso de Glucosa la concentración de este azúcar se determina espectrofotométricamente por vía indirecta, determinándose el incremento en nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en forma reducida (NADPH), que se forma de la reacción entre la glucosa-6-fosfato y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en forma oxidada (NADP), en presencia de la enzima glucosa-6- fosfato deshidrogenasa, haciendo posible la elaboración de una curva de calibración que permite cuantificar el azúcar.

Determinación de la actividad de invertasa en miel.

El método se basa en la degradación del sustrato p - nitrofenil - α - D - glucopiranosido a glucosa y p - nitrofenol, éste último es transformado a nitrofenolato al adicionar una solución de término (pH 9,5). El nitrofenolato es determinado fotocolorimétricamente a 400 nm, de esta forma se obtiene la cantidad de sustrato convertido por la enzima en un intervalo de tiempo. La actividad de la enzima se expresa en unidades, donde una unidad se define como la cantidad de enzima que permite transformar un micromol de sustrato degradado en un minuto por kilogramo de miel. La actividad también puede ser expresada como número invertásico.

Determinación de la actividad de diastasa en miel

El principio de la técnica se basa en la unidad de actividad diastásica, °Goethe (°G), que es la cantidad de enzima capaz de hidrolizar una solución de almidón al 1% hasta un punto final en 1 hora a 40°C. La determinación se realiza utilizando una solución estándar de almidón capaz de generar un complejo coloreado en presencia de yodo. Por la acción de la enzima presente en la muestra de miel bajo condiciones estándar, se produce una disminución del color azul que es medido a intervalos de tiempo a una absorbancia de 660 nm.

1.5. Adulteración de la miel.

La determinación y cuantificación del contenido de azúcares individuales en miel de abeja y otros productos naturales dulces como jugos y néctares constituye una estrategia para evaluar la calidad y detectar la posible adulteración (Rodríguez et.al, 2001). La adulteración de la miel de abeja constituye un fraude que se lleva a cabo al añadir endulzantes o edulcorantes baratos que merman su calidad nutricional y sus propiedades medicinales. Ejemplos de sustitutos artificiales endulzantes de menor valor que son usados en la práctica de adulteración de la miel son: el jarabe de maíz enriquecido en glucosa, jarabe de maíz enriquecido en fructosa, así como la sacarosa (azúcar de mesa) en forma de jarabe. Se estima que más del 50% de la miel que se vende en México está adulterada, incluso se sabe de venta de alta fructosa pura como miel de abeja, y mezclas del 80% de fructosa-miel (Sagarpa 2007). Anualmente, México produce alrededor de 58 mil toneladas de miel de abeja, lo que lo ubica como el quinto productor mundial de este alimento. De esta cantidad el 58% (34 mil 220 toneladas) se destina al consumo nacional generando una derrama económica superior a 594 millones de pesos. La principal preocupación derivada de esta práctica fraudulenta es que un gran porcentaje de la miel consumida en el país adolece de ser auténtica, mientras que la miel vendida al extranjero es original. La Profeco señaló que en los últimos años la demanda de miel se ha incrementado en el país, motivada por corrientes de consumo de alimentos alternativos, funcionales y orgánicos, por lo que también han proliferado productos que se ostentan como mieles sin serlo, y

es indeseable que los consumidores sean víctimas de engaños. Algunas dependencias de Gobierno como Profeco han verificado 46 mil 754 presentaciones de productos que se anuncian como miel, de los cuales 39 mil 825 han sido inmovilizados por anunciarse como miel de maple, miel de agave, miel de maguey y miel de maíz e incluso como miel de abeja, pero sin cumplir con la normatividad. Por ser la miel un producto de la naturaleza tan noble y beneficiosa para la humanidad, es que los consumidores son exigentes al momento de adquirirla. Es un producto alimenticio altamente consumido por el hombre debido a su gran valor nutricional, y su calidad que se ve diezmada debido a la práctica de la adulteración, lo que lleva a la disminución de su valor nutricional y organoléptico.

1.5.1. Determinación de la adulteración de la miel.

La detección de adulteración en la miel se realiza empleando diversas técnicas como: análisis isotópico, cromatográfico y análisis enzimáticos (Arvanitoyannis et.al, 2005; Cordella et.al, 2003; Sivakesava et.al, 2001b). Entre ellas, el análisis del isótopo de carbono es una técnica estándar del análisis que ha sido usada durante muchos años para detectar la adulteración de la miel. Por otra parte, las técnicas cromatografías son muy precisas, sin embargo requieren el uso de reactivos y una preparación especial de la muestra (Yande Liu et. al,2006). La utilidad de estos métodos para determinar la adulteración de la miel se ha demostrado, sin embargo no constituyen una alternativa práctica debido al consumo de reactivos, tiempos largos de medición, son destructivos, y en ocasiones son costosos.

1.6. Espectroscopia infrarroja (FTIR).

La espectroscopia FTIR es una técnica analítica rápida que proporciona información cualitativa y cuantitativa valiosa de muestras sólidas, líquidas y gaseosas y tiene un elevado potencial para la elucidación de estructuras moleculares. El espectro infrarrojo de una molécula poliatómica está basado en vibraciones moleculares y la energía para producir esas vibraciones depende de la masa relativa de cada parte de la molécula (a mayor masa será necesaria más energía) y de la longitud del enlace y puede medirse en la modalidad de

transmisión o de reflectancia, siendo más popular la primera de ellas. La absorción de radiación es el resultado de los cambios energéticos producidos en las transiciones de las moléculas de unos estados de energía vibracionales a otros. Como consecuencia, el espectro infrarrojo completo de un compuesto orgánico proporciona una huella dactilar única, fácilmente distinguible del patrón de absorción infrarroja de otros compuestos, incluidos los isómeros. Además, la intensidad de la absorción es proporcional a la concentración de la especie absorbente (similar a la ley de Lambert-Beer), por lo que es posible el análisis cuantitativo, que ha aumentado en gran medida durante los últimos años. La región del infrarrojo del espectro abarca la radiación con números de onda comprendidos entre 12.800 y 10 cm^{-1} , que corresponden a longitudes de onda de $0,78$ a 1000 m . El espectro infrarrojo se divide en tres regiones denominadas infrarrojo cercano ($12.800\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$), medio ($4000\text{-}200\text{ cm}^{-1}$) y lejano ($200\text{-}10\text{ cm}^{-1}$). Las regiones del infrarrojo medio y cercano han sido las más utilizadas en la bibliografía (Tewari et.al, 2004).

Una posible ventaja de la espectroscopia infrarroja sobre otras técnicas espectroscópicas, es que prácticamente todos los compuestos interaccionan con la radiación infrarroja, y pueden por ello ser analizados de manera cualitativa y cuantitativa. Se trata de una técnica rápida, no-destructiva, que no necesita reactivos químicos y no contamina el medio ambiente y que presenta un alto grado de automatización y bajos costes de funcionamiento y mantenimiento, a la vez que ofrece un perfil general de la composición química de la muestra (huella dactilar) con elevada precisión y una detección fiable de los datos reduciendo el tiempo y la complejidad de la medición. (Edelmann et.al, 2001).

Existen varios reportes en los que se ha mostrado la viabilidad de la técnica espectroscópica FTIR para detectar y cuantificar los distintos tipos de azúcares presentes en mieles de abeja europeas y de otros lugares como Francia, Estados Unidos, Japón, España, así como algunos otros en los que se proponen diversos métodos gráfico-estadísticos para la determinación de intervalos de autenticidad y/o adulteración (Kelly et.al, 2005). Sin embargo no existe hasta ahora un método único que se considere estándar, y se aplicarán algunos de los más utilizados en el análisis de mieles de abeja de la región.

1.6.1. Aplicaciones de la Espectroscopia Infrarroja

En el control de procesos y el análisis de rutina se necesitan técnicas analíticas fiables que permitan realizar un seguimiento de los procesos. Los principales requisitos de estas técnicas son la rapidez, el alto grado de automatización y el bajo coste. Los análisis espectroscópicos directos son apropiados en este contexto, sobre todo porque las medidas pueden realizarse *on-line* o *in-line*, con escasa preparación de muestra y escaso consumo de reactivos. En el campo de los alimentos, la aplicación de las técnicas espectroscópicas en el estudio del origen (autenticidad), diferenciación y control de procesos se ha desarrollado considerablemente en los últimos años.

En relación a la adulteración de alimentos, la determinación rápida de azúcares mayoritarios en miel, puede utilizarse para detectar la adición de edulcorantes baratos a la miel de abeja (Massart et.al,1998).

1.7. Quimiometria.

Una muestra real puede contener una o más variables de interés (compuestos o sustancias) que requieran determinarse de manera individual, por lo que el incremento en el número de variables conlleva una clara dificultad en la interpretación de resultados obtenidos con instrumentos y técnicas de análisis actuales. Los métodos estadísticos univariantes permiten el análisis de conjuntos de datos discretos de una forma rápida y simple pero requieren necesariamente que las variaciones obedezcan a una sola variable. Sin embargo, la habilidad de la mente humana para entender una gran cantidad de información distribuida en n dimensiones es restringida. Un ejemplo claro de este tipo de situaciones puede observarse mediante la espectroscopia infrarroja (p.e. infrarrojo mediano, MIR). Cada espectro puede estar compuesto por varios millares de variables, y si además consideramos la elevada complejidad de la señales MIR, se hace imprescindible el uso de técnicas de análisis multivariable o multivariado, que en combinación con resultados experimentales derivados de técnicas como la espectroscopia infrarroja, nos permitan interpretar y entender estos grandes conjuntos de datos (Tzayhri et.al,2009).

El término quimiometría puede ser descrito como una herramienta que permite extraer la información relevante de datos obtenidos durante un experimento químico en este caso usando espectroscopia infrarroja y combinándola con análisis multivariado. Según el objetivo a alcanzar, se utilizan distintas técnicas estadísticas. Existen numerosos textos y publicaciones que contienen información extensa sobre la teoría y práctica de la Quimiometría (López et. al, 1996).

1.7.1. Análisis de Componentes Principales (PCA, *Principal Component Analysis*).

El análisis de componentes principales (PCA) es un método estadístico multivariante de simplificación o reducción de variables que permite visualizar en un espacio de 2 ó 3 dimensiones, cuan similares o diferentes son un grupo de muestras entre sí. El PCA se considera una técnica exploratoria y de pretratamiento de los datos (reducción de dimensiones), como paso previo a la obtención del modelo de calibración. El PCA es una familia de técnicas computacionales relacionadas con el aislamiento de las fuentes de variación en un conjunto de datos. Esta variación debe interpretarse como información, por tanto, esta operación equivaldría a extraer información de ese conjunto de datos, es decir, encontrar lo que hace a una muestra diferente de otra. El PCA también cuantifica la cantidad de información útil contenida en los datos, frente al ruido presente en los mismos.

El propósito de este análisis es reducir el número de dimensiones de tal manera que se puedan visualizar fácilmente las variables, representando un alto porcentaje del conjunto de datos. Todo este procedimiento se realiza a través del análisis de la variancia y distancias entre las muestras, reducir el número de variables de un conjunto mayor, que puedan ser utilizadas en diferentes análisis o crear un conjunto completamente nuevo con menor número de variables para reemplazar parcial o completamente el conjunto original de variables. Demostraron que el método estadístico PCA podía ser usado con éxito para la clasificación geográfica correcta de mieles de distintos orígenes (Massart et.al, 1998).

La dificultad en la interpretación de los componentes principales estriba en la necesidad de que tengan sentido y midan algo útil en el contexto del fenómeno estudiado. Por tanto es indispensable considerar el peso que cada variable original tiene dentro del componente elegido, así como las correlaciones existentes entre variables y componentes principales.

1.7.2. Regresión de Componentes Principales (PCR, *Principal Component Regression*).

El proceso de calibración permite establecer la relación entre la respuesta instrumental y la propiedad del analito a determinar, utilizando para tal efecto un conjunto de muestras representativas. Los métodos cromatográficos separan previamente los analitos de una muestra antes de medir la respuesta. Por ello, para cada analito se obtiene una sola variable respuesta, lo que simplifica el proceso de calibración. Sin embargo, las técnicas espectroscópicas proporcionan información experimental que describe casi siempre a un gran número de variables respuesta simultáneamente para cada muestra, variables que en general no pueden ser asignadas a un solo analito (Por ejemplo, un espectro FTIR de miel describe la presencia de varios de sus azúcares que están presentes en la muestra al mismo tiempo). Esto ha propiciado el desarrollo de métodos de calibración capaces de relacionar múltiples variables con la propiedad a determinar. Estos métodos son conocidos como *Métodos de Calibración Multivariable*. El proceso de calibración se realiza, no sobre los datos originales, sino sobre estas nuevas variables, simplificando el modelo y la interpretación de los resultados.

La Regresión en Componentes Principales (PCR, *Principal Component Regression*), aprovecha las propiedades de la descomposición en componentes principales (PCA), realizando una regresión múltiple inversa (ILS) de la propiedad a determinar sobre los scores o cuentas obtenidos en el PCA en lugar de realizarla sobre los datos originales. Casi no existe pérdida de información útil, ya que los scores o cuentas contienen la misma información que los datos originales pero habiendo eliminado el ruido (Beebe et. al,1998).

Un parámetro importante a considerar en el desarrollo de la calibración multivariable es el rango espectral suministrado con el modelo. Cuando los métodos como PCR y PLS se emplean para construir modelos de calibración, el rango espectral debe incluir información que describa la variación en la concentración del analito, con el fin de garantizar que las regiones excluidas dominadas por ruido no puedan incorporarse en el modelo. La selección de regiones específicas puede evitar el problema de la detección de rangos espectrales no lineales. Los rangos espectrales adecuados pueden ser identificados mediante el cálculo del coeficiente de determinación para los componentes de interés (jarabes y estándares). Esto se hace mediante el cálculo de la correlación de la absorbancia a cada número de onda en el espectro de cada jarabe y estándar, regiones que muestran una correlación alta son las regiones que se deben seleccionar, mientras que las regiones que no muestran correlación o baja correlación no se toman en cuenta (Sivakesava et.al, 2001b).

El método PCR presenta las siguientes ventajas:

- Reducción de dimensiones del conjunto de datos X : mediante el uso de la PCA, se conserva la máxima cantidad de información posible. Se supone que los componentes minoritarios eliminados contienen ruido o información no relevante relacionada con la matriz Y .
- Relación con las variables originales: puesto que los componentes principales son combinaciones lineales de todas las variables manifiestas, este procedimiento las incluye en el modelo en su totalidad.
- Varianza muy elevada de las componentes principales mayoritarias: esto conduce a una regresión estable, puesto que la varianza de un coeficiente de regresión estimado es inversamente proporcional a la varianza del regresor.
- Fuentes de varianza desconocidas: la PCR permite tener en cuenta en el modelo fuentes de varianza no conocidas por el experimentador y que por ello no se han tenido en, al menos de un modo consciente, en el diseño del bloque Y . Un ejemplo de estas fuentes de varianza desconocidas podría ser una interferencia, una interacción entre el analito y otro componente, etc.

Por su capacidad de adaptación a los factores desconocidos, se dice que la PCR es un método “flexible”. Es interesante observar que la capacidad de adaptación es una consecuencia de la reducción de dimensiones, esto es, de la renuncia a intentar explicar toda la varianza contenida en los datos (Haaland et.al, 1988).

1.7.3. Regresión Parcial por Mínimos Cuadrados (PLS, Partial Least squares).

El método de Regresión Parcial por Mínimos Cuadrados (PLS, *Partial Least-Squares Regression*) es un método de calibración multivariable, fue desarrollado por H. Wold en 1975. La diferencia con el PCR es que se intenta que los primeros componentes contengan la mayor información para la predicción de una matriz Y. Para ello, durante la etapa de calibración, el algoritmo PLS utiliza tanto la información contenida en la matriz de datos (matriz X, p. ej. datos cinético espectrofotométricos) como la información contenida en la matriz de la propiedad a determinar (matriz Y, p. ej. concentraciones), obteniéndose unas variables auxiliares llamadas variables latentes, factores o componentes que tienen gran parecido a los componentes principales que se hallan a partir de un PCR (Rodríguez et.al, 2001).

HIPOTESIS

La espectroscopia Infrarroja (FTIR) en combinación con el análisis multivariado permite identificar y cuantificar los azúcares mayoritarios de la miel de abeja, así como posibles adulteraciones con jarabes.

JUSTIFICACION

Debido a la apertura comercial derivada de la globalización de la economía, y dada la problemática mencionada en el sector apicultor, impone a la apicultura mexicana el reto de mantener, fortalecer y desarrollar metodologías de fácil manejo, rápidas y de bajo costo para la detección y cuantificación de adulteración en miel de abeja, en beneficio de la apicultura mexicana y con la finalidad de que el consumidor mexicano reciba un producto de alta calidad; en este trabajo de tesis se propone el desarrollo y la aplicación de una metodología que cumpla con los requerimientos mencionados.

OBJETIVO GENERAL

Aplicar la quimiometria en miel de abeja para la determinación de azúcares y detección de adulteración mediante el uso de espectroscopia infrarroja.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer y aplicar una metodología quimiométrica para la determinación de autenticidad de muestras de miel de abeja de distintas localidades de la zona centro del país.
- Determinar el tipo de adulterante utilizado en muestras de miel natural.
- Predecir el contenido de adulterantes utilizados en muestras de miel natural mediante la determinación de curvas de calibración utilizando la metodología quimiométrica.
- Cuantificar el contenido de glucosa, fructosa, sacarosa, monosacáridos totales y humedad en muestras de miel de la zona centro del país, mediante la determinación de curvas de calibración basadas en la metodología quimiométrica utilizada.

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1. Recolección y preparación de muestras de miel natural.

Se recolectaron un total de 50 muestras de miel de abeja directamente de apicultores en su mayoría de la zona centro del País (Puebla-Tlaxcala). Este listado de muestras se presenta en la tabla 6 indicándose la fecha en que fueron recolectadas. Las muestras de miel fueron almacenadas sin refrigeración desde el tiempo de su recolección hasta su análisis. Antes de realizar las mediciones espectrales las mieles se calentaron en baño maría a 35° C para disolver cualquier material cristalino de forma manual para garantizar homogeneidad. Además de esto se ajustaron a un contenido estándar de sólidos de 70 ° Brix con agua destilada para evitar variaciones espectrales en la concentración de los azúcares. La Tabla 6 muestra la numeración asignada, el lugar de procedencia y la fecha de obtención de las muestras de miel analizadas en este trabajo de investigación.

Tabla 6. Listado de muestras de miel analizadas en este estudio.

Muestras de Miel		
No. De Muestra	Lugar de procedencia	Fecha
1	Huaquecula, Pue	OCT-NOV 2008
2	Zacatempa, Pue.	OCT-NOV 2008
3	Tochimilco, Pue.	OCT-NOV 2008
4	Tlaxcala, Tlax.	OCT-NOV 2008
5	Taxcala, Tlax.	OCT-NOV 2008
6	Muestra comercial Tienda Naturista	OCT-NOV 2008
7	Atlixco, Pue.	OCT-NOV 2008
8	Santo Domingo Atoyatempa, Pue.	OCT-NOV 2008
9	Axocopan, Pue.	OCT-NOV 2008
10	La Trinidad Tepango Pue.	OCT-NOV 2008
11	Santa Lucia Cosamaloapan, Pue.	OCT-NOV 2008
12	Santa Ana Xalmimilulco, Pue.	OCT-NOV 2008
13	Teyuca, Pue.	OCT-NOV 2008
14	San Juan Ocotepec, Pue.	OCT-NOV 2008
15	Muestra comercial Great Value	OCT-NOV 2008
16	Muestra comercial Vista Real	OCT-NOV 2008
17	Muestra comercial Carlota	OCT-NOV 2008
18	Muestra comercial La Iguana Sana	OCT-NOV 2008
19	Atlixco, Pue.	OCT-NOV 2008
20	Tlaxcala, Tlax	OCT-NOV 2008
21	Huachinango, Pue.	OCT-NOV 2008
22	Tianguistenco, Edo de México	OCT-NOV 2008
23	Muestra comercial Miel Atoyac	OCT-NOV 2008
24	Rio Verde, S.L.P.	OCT-NOV 2008
25	La galarza, Pue.	OCT-NOV 2008

Continuación de la Tabla 6.

Muestras de Miel		
No. De Muestra	Lugar de procedencia	Fecha
26	Los Molinos, Pue.	OCT-NOV 2008
27	Muestra comercial Miel de Agave	OCT-NOV 2008
28	Muestra comercial Brilbar	OCT-NOV 2008
29	Muestra comercial Miel de Maguey Concentrada	OCT-NOV 2008
30	Muestra comercial Maple karo	OCT-NOV 2008
31	Muestra comercial Kraft Log Gabin	OCT-NOV 2008
32	Miel de abeja pura Mizatlan,Veracruz	MAYO-JUNIO 2009
33	Rio Verde, S.L.P.	MAYO-JUNIO 2009
34	Nova miel Tamaulipas	MAYO-JUNIO 2009
35	Nova miel Tamaulipas	MAYO-JUNIO 2009
36	Tierra Colorada, Guerrero	MAYO-JUNIO 2009
37	Papantla, Ver.	MAYO-JUNIO 2009
38	Calpulalpan, Tlax.	MAYO-JUNIO 2009
39	Miel pura de puebla	OCT-NOV 2009
40	Atlixco Champusco, Pue.	OCT-NOV 2009
41	Atlixco Cabrera, Pue.	OCT-NOV 2009
42	Miel piedra buena, Pue.	OCT-NOV 2009
43	San Luis Potosi, S.L.P.	OCT-NOV 2009
44	Cuetzalan 2007, Pue.	OCT-NOV 2009
45	Cuetzalan 2008, Pue.	OCT-NOV 2009
46	Cuetzalan 2009, Pue.	OCT-NOV 2009
47	Panal, Campeche	OCT-NOV 2009
48	Merida, Yucatán	OCT-NOV 2009
49	Veracruz, Ver.	OCT-NOV 2009
50	Guerrero, Gro.	OCT-NOV 2009

2.2. Adulteración de muestras de miel.

Se consideraron seis adulterantes en este estudio: D-fructosa, D-glucosa, sacarosa (de grado analítico), jarabe de maíz, jarabe de azúcar invertido y jarabe de caña de azúcar. Los tres primeros fueron obtenidos de Merck, mientras que el jarabe de maíz se obtuvo de una tienda de materias primas. El jarabe de azúcar invertido se preparó a partir de azúcar de caña de la siguiente manera: 1 Kg de azúcar se mezcló con ácido cítrico, luego se le añadió el agua y se puso a hervir. Una vez que comenzó a hervir se retiró del fuego. Se enfrió hasta aproximadamente 50°C y se le añadió el bicarbonato mezclándolo para que de esta forma el azúcar invertido no tenga un pH desequilibrado.

Las adulteraciones con los estándares se prepararon con agua destilada, fructosa, glucosa y sacarosa, respectivamente, en 100% para ser utilizados como adulterantes estándar. El otro grupo de adulterantes se constituyó por jarabes baratos (jarabe de maíz, jarabe de azúcar invertido y jarabe de azúcar de caña), que se diluyeron con agua destilada a 70 ° Brix. El procedimiento de adulteración de la miel se realizó mediante la mezcla directa de cada una de las seis soluciones adulterantes con proporciones de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90% a una muestra de miel pura. La adulteración de la proporción de la miel fue de 100% - X, donde X es el porcentaje de la solución adulterante. Previamente a la mezcla, las muestras de miel se calentaron 35 ° C para disolver los sólidos. La muestra resultante fue adulterada y agitada vigorosamente para homogeneizar la mezcla. En la tabla 7 se muestran los valores porcentuales de cada adulterante utilizado para ser agregado a algunas muestras de miel de abeja.

Tabla 7. Esquema de adulteración de miel con diferentes estándares y jarabes a distintas proporciones.

ESTANDARES	ESTANDARES		
	% Fructosa	% Glucosa	% Sacarosa
	10	10	10
	20	20	20
	30	30	30
	40	40	40
	50	50	50
	60	60	60
	70	70	70
	80	80	80
	90	90	90
	100	100	100

JARABES	JARABES		
	% jarabe de maiz	% jarabe de azúcar de caña	% jarabe de azúcar invertido
	10	10	10
	20	20	20
	30	30	30
	40	40	40
	50	50	50
	60	60	60
	70	70	70
	80	80	80
	90	90	90
	100	100	100

2.3. Análisis de humedad

Las muestras se recibieron en sus respectivos recipientes de origen y se procedió a la determinación del porcentaje de humedad por el método indirecto, usando el refractómetro “Pocket” PAL-22S marca ATAGO para miel siguiendo las normas internacionales (Comisión del *Codex Alimentarius*, 2001) ya que el contenido de humedad de la miel se halla en relación con el índice de refracción, se colocaron dos gotas de la muestra para tomar una lectura. El Índice de refracción permite determinar de manera rápida y precisa la humedad de la miel. En este caso, el contenido de agua está en función inversa a su índice de refracción.

Las muestras de miel se analizaron mediante espectroscopia FTIR en el rango de 650–4000 cm^{-1} , obteniéndose espectros por duplicado y promediados para ser

utilizados en el análisis multivariado. Los rangos espectrales utilizados en este análisis fueron: $1500\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ y $3100\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$, debido a que son las dos regiones del espectro mediano infrarrojo donde el agua presenta absorciones. Las frecuencias de 1645 y 3383 cm^{-1} se usaron para desarrollar el Análisis de Componentes Principales (PCA) y las ecuaciones de calibración mediante Regresión de Componentes Principales (PCR) y Regresión de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS).

2.4 Instrumentación

2.4.1. Refractómetros de humedad y de grados Brix.

El contenido de sólidos en mieles y soluciones adulteradas fue medido por refractometría usando un refractómetro manual ATAGO benchtop modelo 2WA de Abbe[®]. (Figura 6b). Para la determinación del porcentaje de humedad se utilizó el refractómetro “Pocket” PAL-22S marca ATAGO (Figura 6a) para miel.

(a)



(b)



Figura 6. (a) Refractómetro de humedad y (b) de grados Brix para miel.

2.4.2. Espectrómetro infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR).

El equipo utilizado para la obtención de los espectros FTIR (Figura 7) en el rango MIR para el conjunto de muestras de miel recolectadas, así como las muestras adulteradas intencionalmente con estándares y jarabes fue un Espectrómetro Infrarrojo con Transformada de Fourier, marca Bruker Modelo Vertex-70. Se utilizó el programa OPUS 6.5 para la adquisición de los datos y la técnica de muestreo fue por Reflectancia Total Atenuada (ATR). La celda de medición consiste de un cristal de ZnSe de 2,8 mm de diámetro, con un índice de refracción de 2.4 a la frecuencia de 1000 cm^{-1} . La profundidad de penetración de la radiación infrarroja es de $2,0\text{ }\mu\text{m}$ en 1000 cm^{-1} para una muestra con un índice de refracción de 1,5 (que corresponde al índice de refracción de la miel). El espectrómetro está equipado con detector de sulfato de triglicina deuterado (DTGS) que funciona con una resolución de 4 cm^{-1} . Una gota de $20\text{ }\mu\text{l}$ es suficiente para obtener espectros FTIR con referencia con alta razón señal/ruido. Ciento veinte mediciones fueron realizadas para cada espectro en el rango espectral $650\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$. Cada espectro se obtuvo y se comparo contra el espectro de línea de base para la obtención del espectro de absorción. Dos mediciones por muestra se realizaron para la reducción de errores. Después de cada medición se lavó la superficie de la celda ATR con agua desmineralizada y se seco con un papel suave.



Figura 7. Equipo de Espectroscopia Infrarroja FTIR.

2.5. Pre tratamiento de los datos

Los espectros obtenidos fueron sometidos a un pre-tratamiento con el fin de reducir o eliminar la contribución del ruido. El primer pre tratamiento que se realizó fue el promediado de los espectros. Posteriormente se les realizó la segunda derivada, con el objetivo de tener una mejor definición en la intensidad de las bandas de absorción.

2.6. Análisis de datos

2.6.1. Análisis Cualitativo: Análisis de Componentes Principales (PCA, *Principal Component Analysis*).

Este análisis se realizó con el objetivo de observar agrupaciones o aglomerados de datos asociados a clases o especies, que en este estudio se refieren a mieles auténticas o puras y mieles con presencia de jarabes (adulteradas). Se utilizó el programa Minitab 13 para realizar el Análisis de Componentes Principales (PCA) de los espectros FTIR obtenidos del conjunto de muestras recolectadas, así como el conjunto de muestras adulteradas.

2.6.2. Análisis cuantitativo: Regresión de Componentes Principales (PCR, *Principal Component Regression*).

Este análisis se realizó con el objetivo de predecir el contenido porcentual de jarabe adulterante presente en miel mediante mediciones FTIR y análisis multivariado Regresión de Componentes Principales (PCR, *Principal Component Regression*), Regresión Parcial por Mínimos Cuadrados (PLS, *Partial Least squares*). Los programas Minitab 13 y OPUS 6.5 fueron usados para realizar el análisis cuantitativo PCR y PLS respectivamente mediante el desarrollo de un modelo de calibración que en PCR se modela mediante segunda derivada, mientras que en PLS se modela usando una rutina de optimización del programa OPUS 6.5 que haga mínimo el error estándar de calibración (SEC) y el error estándar de predicción (SEP). Estos errores estándar se definen como sigue:

$$SEC = \sqrt{\left(\frac{\sum_{i=1}^N (C_i - C_i^*)^2}{N - f - 1} \right)}$$

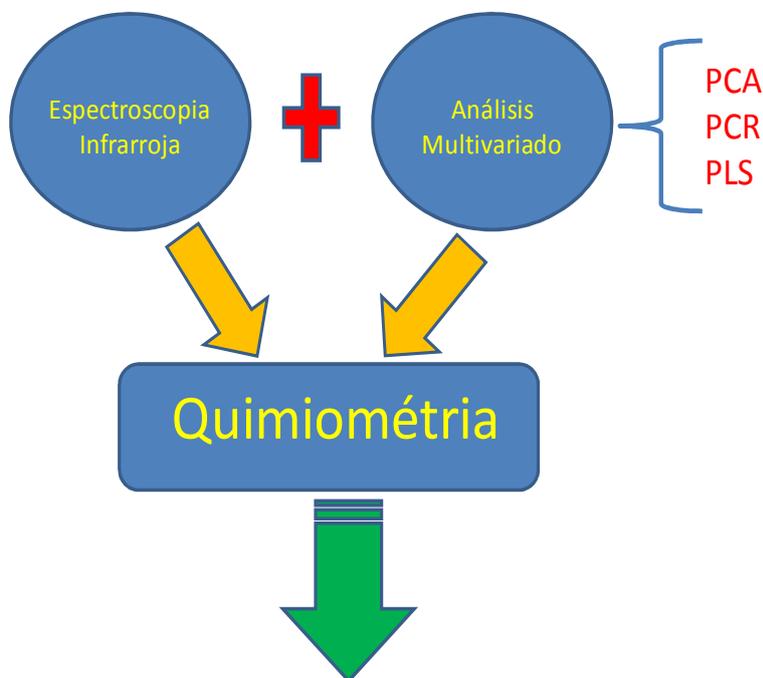
donde C_i es el valor de la propiedad de interés para la muestra i , estimado usando calibración, C_i^* es el valor conocido de la propiedad para la muestra (p.e. contenido de adulterante), N es el número de muestras usadas para desarrollar el modelo de calibración, y f es el número de factores usados para desarrollar el modelo de calibración.

Por otra parte, la capacidad predictiva de la propiedad de interés al utilizar el modelo de calibración en un conjunto desconocido de muestras (diferentes al conjunto de calibración) está dada por el error estándar de predicción (SEP):

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (c_i - \hat{c}_i)^2}{m}}$$

donde C_i es el valor de la propiedad de interés pronosticada por el modelo de calibración para la muestra i , C_i^* es el valor conocido de la propiedad para la muestra i y m es el número de muestras en el conjunto de predicción.

La figura 8 muestra un diagrama esquemático que indica la fusión entre la espectroscopia infrarroja y el análisis multivariado para dar origen a la quimiometría, que es una metodología analítica discriminativa, clasificatoria y predictiva de variables involucradas en un sistema. En esta investigación, el sistema es la miel de abeja, y las variables son por un lado los jarabes presentes en miel como adulterantes, y por otro lado los azúcares glucosa, fructosa y sacarosa, así la humedad. La discriminación de muestras de miel en auténticas y adulteradas se realiza de acuerdo a la cantidad y el tipo de jarabe presente en la muestra.



- Curvas de predicción de composición.
- Agrupaciones de datos asociadas a clases o especies.
- Intervalos o regiones de confiabilidad.

Figura 8. Esquema experimental que muestra la fusión entre la espectroscopia infrarroja y el análisis multivariado para dar origen a la quimiometría.

Finalmente, en la figura 9 se muestra el diseño experimental implementado en la presente investigación sobre miel de abeja: su naturaleza de originalidad o alteración, calibración y cuantificación de adulterantes, así como de azúcares individuales, determinación de azúcares mayoritarios y análisis de humedad empleando métodos quimiométricos.

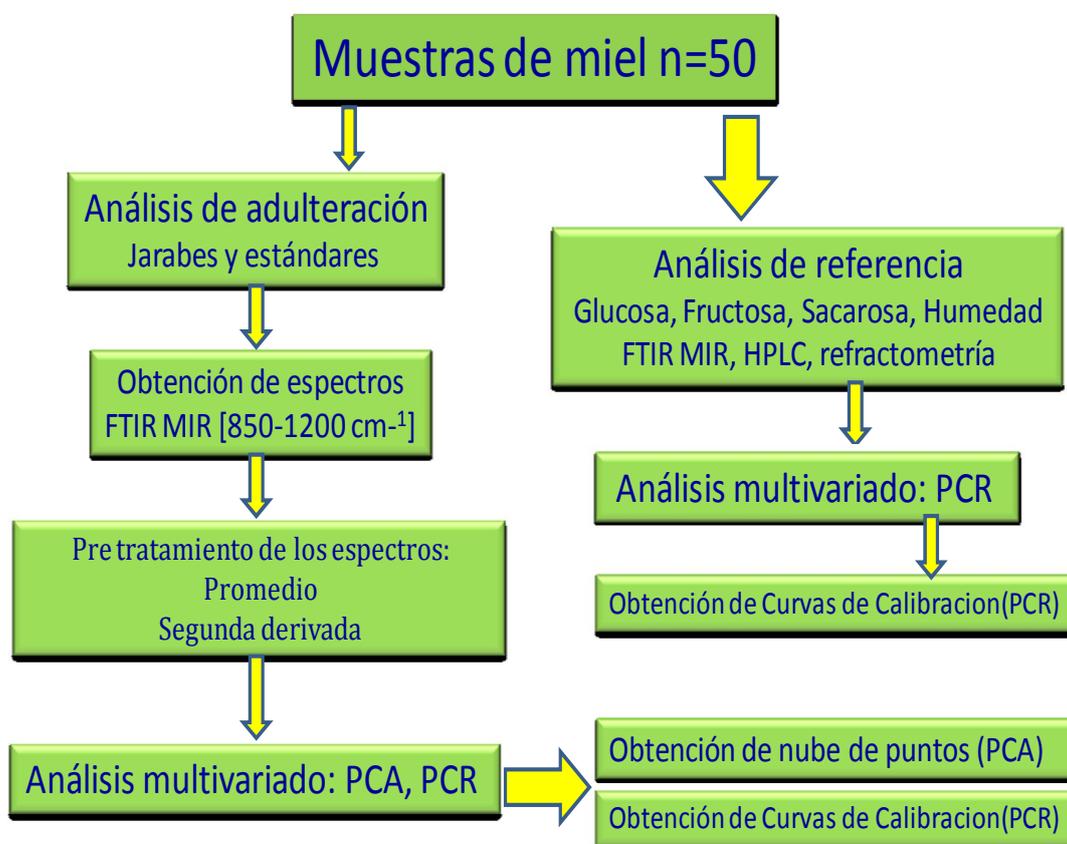


Figura 9. Diseño experimental implementado en la investigación de muestras de miel de abeja: su naturaleza de originalidad o alteración, calibración y cuantificación de adulterantes, así como de azúcares individuales, determinación de azúcares mayoritarios y análisis de humedad.

CAPITULO III

Adulteración en la miel.

3.1. El espectro FTIR de la miel de abeja.

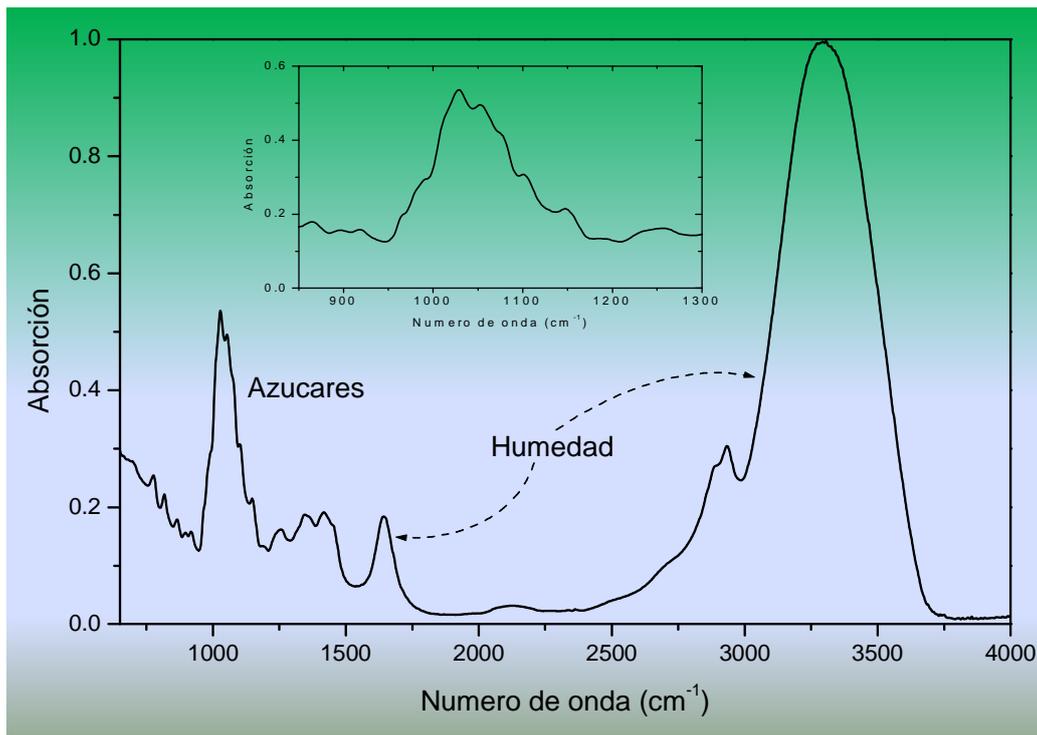


Figura 10. Espectro FTIR típico de una muestra de miel de abeja.

El espectro FTIR de una muestra a analizar refleja su composición química total desde el punto de vista vibracional-estructural. Aunque estos son en ocasiones complejos, es posible definir algunas bandas características de grupos funcionales presentes y su abundancia.

En particular, para el caso de la miel de abeja, el espectro FTIR típico se muestra en la figura 10, pueden observarse diferentes bandas de absorción, por ejemplo en la región (700-1300 cm⁻¹), la cual está asociada a la absorción de los azucres presentes en miel de abeja. Además de lo anterior, es posible también observar

bandas de absorción que están ligadas a la presencia de agua ($3300\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$) y de ($1500\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$).

En el recuadro de la figura anterior se observa solamente el espectro FTIR de la región de los azúcares; a este mismo intervalo se le conoce como la región de la huella digital donde cada azúcar presenta una banda de absorción característica. En la Figura 11 se presenta nuevamente el espectro FTIR de la miel en la región de $700\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ mostrando algunas de las principales frecuencias y grupos funcionales característicos de los monosacáridos como son glucosa y fructosa, así como a otra pequeña proporción debida a los disacáridos como la sacarosa.

Al comparar todos los espectros se encontraron áreas espectrales semejantes e intensas en la región de 3300 cm^{-1} , que corresponde a vibraciones de estiramiento de los enlaces O-H presentes en las moléculas que componen las mieles analizadas, es el grupo funcional característico de los glúcidos. La región de $750\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ corresponde a la región anomérica y es característica de la configuración del sacárido (glucosa, fructosa y sacarosa) (Tulchinsky et.al, 1976). Las bandas características de los principales grupos funcionales de los carbohidratos presentes en la miel son: 774 , 918 , 927 , 991 , 1017 , 1043 , 1110 y 1259 cm^{-1} . La asignación de grupos funcionales correspondientes a los modos de vibración está basada en la identificación de las bandas de absorción del espectro y su frecuencia con el correspondiente grupo químico que absorbe en la región MIR. La banda de 918 cm^{-1} es debida al doblez del C-H del carbohidrato, mientras que los picos observados en 1043 cm^{-1} y 1259 cm^{-1} corresponden a la extensión del enlace C-O en el grupo de C-OH, así como a la extensión del C-C en la estructura del carbohidrato. El pequeño pico en 1110 cm^{-1} se ha asignado al enlace C-O del acoplamiento de C-O-C. (Sivakesava et.al,2001a; Tewari et.al, 2004). Otra banda de absorción representativa es la correspondiente a la región de $950\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$, donde se encuentran las vibraciones de los enlaces C-O-C, muy común en azúcares. Las bandas situadas en la región entre $2850\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$ corresponden a vibraciones de extensión de los enlaces -CH, -CH₂ y -CH₃. En la Tabla 8 se resumen las principales frecuencias y sus grupos funcionales a las que están asignadas, así como los modos de vibración asociados a estas.

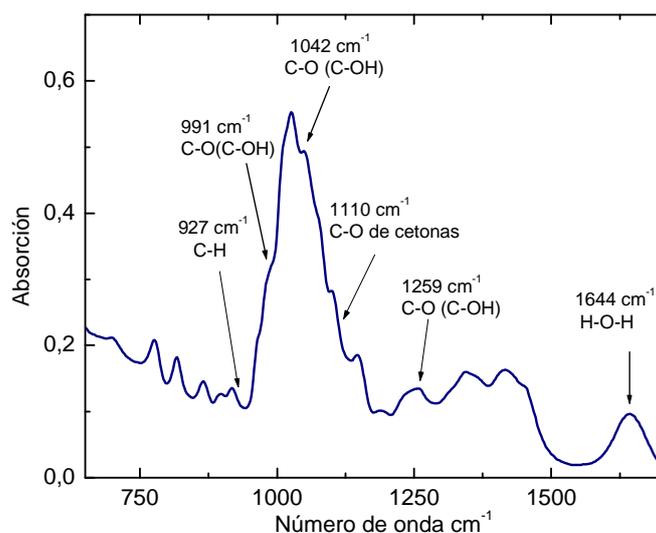


Figura 11. Espectro FTIR de una muestra de miel de abeja y sus principales bandas de absorción infrarroja en la región de los carbohidratos.

Tabla 8. Frecuencia, grupo funcional y modo de vibración de las diferentes bandas de absorción infrarroja de la miel de abeja observadas en el espectro FTIR (Sivakesava et.al, 2001a; Tewari et.al, 2004).

Frecuencia	Grupo Funcional	Modo de Vibración
927	C-H	Flexión
991	C-O(C-OH)	Extensión
1042	C-O (C-OH) C-O(C-OH)	Extensión
1110	C-O de cetonas C-O(C-O-C)	Extensión- flexión Extensión- flexión
1259	C-O(C-OH)	Extensión
1644	H-O-H	flexión
3383	-OH	Extensión
2850-2950	-CH,-CH ₂ y CH ₃	Extensión

3.2. Diferencias espectrales entre mieles y jarabes

3.2.1. Absorción infrarroja

La absorción infrarroja observada en la miel de abeja presenta un espectro típico como el ya mostrado anteriormente. Cuando se empalman los espectros de absorción de un número importante de muestras de miel de abeja como se muestra en la figura 12, se observan características muy similares entre ellos. Sin embargo, al compararlos con los espectros de jarabes o soluciones elaboradas a partir de azúcares estándar: glucosa, fructosa y sacarosa (grado analítico), se pueden observar diferencias espectrales muy notorias. En la figura 12 se incluyen solamente 26 muestras de un total de 36 las cuales presentan un patrón espectral similar, el restante número (14) no se incluyeron en este momento, pues sus diferencias sugieren adulteración, por lo que se incluyen en la sección de adulteración. Se observan picos característicos de cada tipo de azúcar en la región de la huella digital (900–1200 cm^{-1}). El jarabe de glucosa presenta su pico característico en 1027 cm^{-1} , mientras que el jarabe de sacarosa presenta dos picos característicos en 925 y 991 cm^{-1} , finalmente el jarabe de fructosa muestra un pico característico en 1052 cm^{-1} . Esto nos permitió observar que los jarabes de fructosa, glucosa y sacarosa, presentan espectros con algunas diferencias entre ellos, en la región de la “huella digital” donde cada azúcar tiene una absorción característica. Las diferencias espectrales entre los jarabes se deben a que aunque todos tienen muchos enlaces y grupos funcionales en común, poseen también algunas diferencias en la estructura de cada molécula que genera bandas y espectros diferentes. Con respecto a las diferencias espectrales entre jarabes y mieles, estas se deben a que en la miel se encuentran mezcladas las tres especies de azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) en distintas proporciones que son muy similares entre ellas, y por lo tanto se diferencian muy bien respecto al espectro de cada azúcar individual, el cual se encuentra al 100% en concentración.

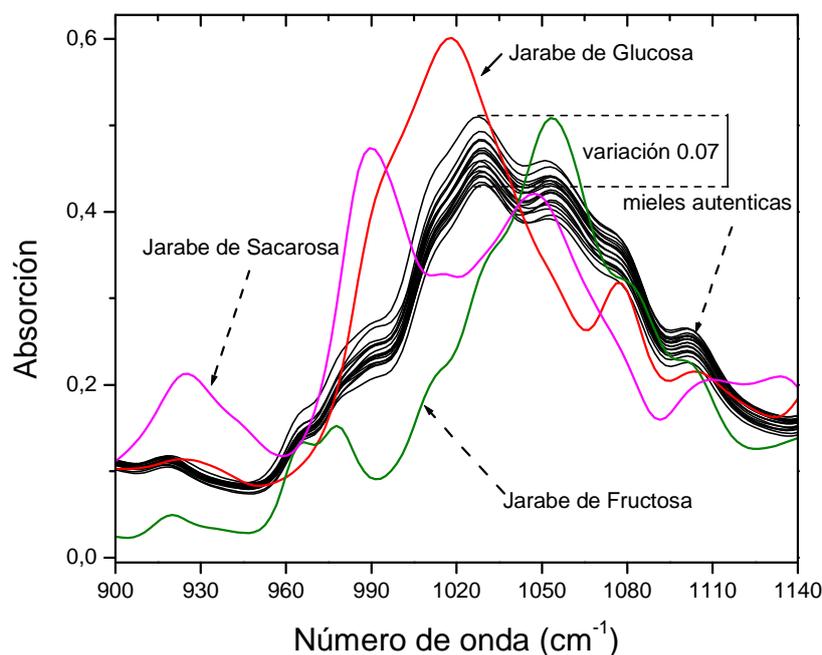


Figura 12. Espectros FTIR de muestras de miel de abeja auténticas, así como de jarabes de glucosa, fructosa y sacarosa respectivamente.

3.2.2. Segunda derivada de la absorción.

La segunda derivada es una operación matemática la cual constituye uno de los pretratamientos más utilizados en espectroscopia para minimizar desviaciones de línea base causados por efectos de dispersión y para resaltar de manera más importante las diferencias entre cada espectro experimental. En espectroscopia FTIR se utiliza para disminuir los problemas más característicos como el traslape de bandas y variaciones de línea de base. La utilización de la primera derivada elimina los términos constantes a todas las longitudes de onda, es decir, desplazamientos de línea base, mientras que la segunda derivada corrige además las desviaciones causadas por los términos que varían linealmente con la longitud de onda. Generalmente no se utilizan derivadas de orden superior, puesto que la primera y segunda derivada suelen ser suficientes. La aplicación de las derivadas permite un aumento de la resolución de bandas es decir amplifica o resalta los cambios.

La figura 13 muestra la segunda derivada de los espectros FTIR de muestras de miel de abeja, así como de jarabes de azúcares estándar en el rango de 850–1200 cm^{-1} . Al aplicarle a los espectros originales la segunda derivada, es posible observar y resaltar con mayor contraste las diferencias en la intensidad de cada uno de los espectros, ya que en muchos casos con los espectros de absorbancia pura no son tan evidentes las diferencias. De manera cuantitativa se encontró que la variación entre espectros de absorción pura (Fig.12) en miel es de 0.07, mientras que para segunda derivada la variación es de 1.34. A pesar de dicha variación, en segunda derivada se logra observar un patrón común en espectros de miel, pero las diferencias con respecto a los jarabes son contundentemente notorias.

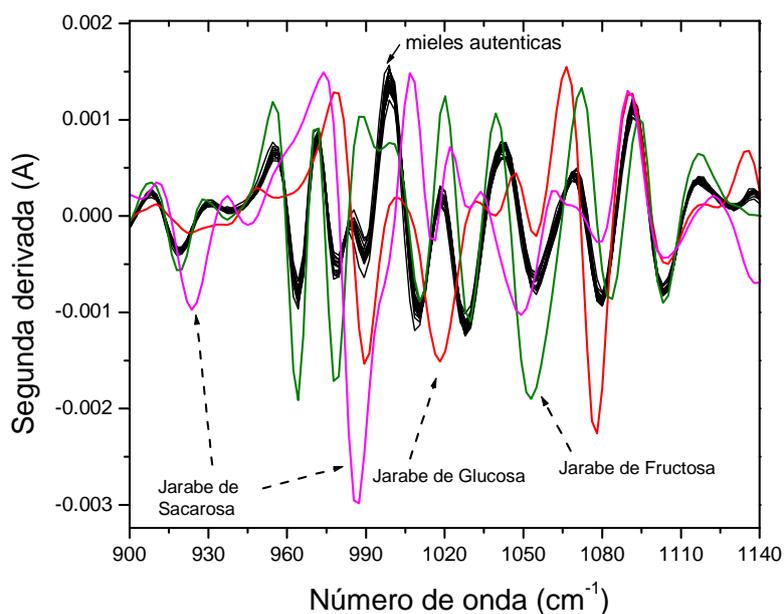


Figura 13. Segunda derivada de los espectros FTIR de muestras de miel de abeja, así como de jarabes de glucosa, fructosa y sacarosa respectivamente.

3.3. Discriminación de mieles auténticas y adulteradas mediante diferencias espectrales.

En la figura 14 se muestran los espectros FTIR de un grupo de muestras de miel consideradas como auténticas (en negro), debido a que presentan un patrón o forma de línea común de absorción, y se comparan con los espectros de otro grupo de muestras de miel (en color) que fueron compradas como auténticas, pero que en realidad han sido adulteradas con jarabes de maíz y jarabes de azúcar de caña. Se puede observar en dichos espectros la presencia de bandas características tanto de glucosa como de sacarosa, enrareciendo el espectro típico de la miel auténtica. Las muestras de miel adulteradas con jarabe de maíz muestran un pico característico en 1027 cm^{-1} , mientras que las muestras de miel adulteradas con jarabe de azúcar de caña presentan los picos característicos de ésta en 925 y 991 cm^{-1} . Se observa además que los espectros de las muestras de miel adulteradas con jarabe de maíz y sacarosa tienden a desplazarse ligeramente; esto se debe a que la interacción entre especies diferentes de compuestos y su concentración produce corrimientos hacia bajas energías.

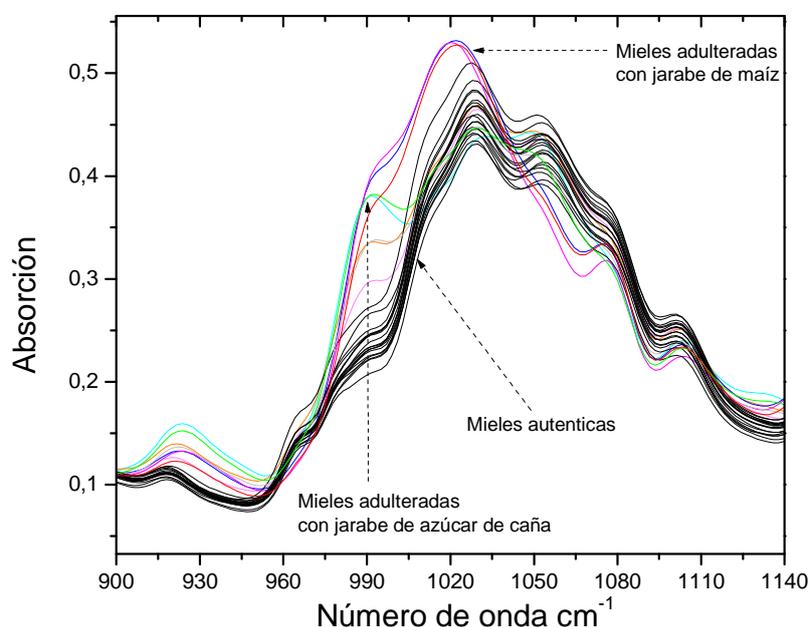


Figura 14. Espectro FTIR de muestras de miel de abeja auténtica, así como de muestras de miel de abeja adulteradas con jarabe de maíz y jarabe de azúcar de caña.

Visto desde absorción pura (es decir sin tratamiento espectral con derivadas) es ya evidente la adulteración de las mieles. Aplicando la segunda derivada a todos los espectros, son aun más evidentes las diferencias entre ambos grupos de muestras (auténticas y adulteradas), tal y como se muestra en la figura 15.

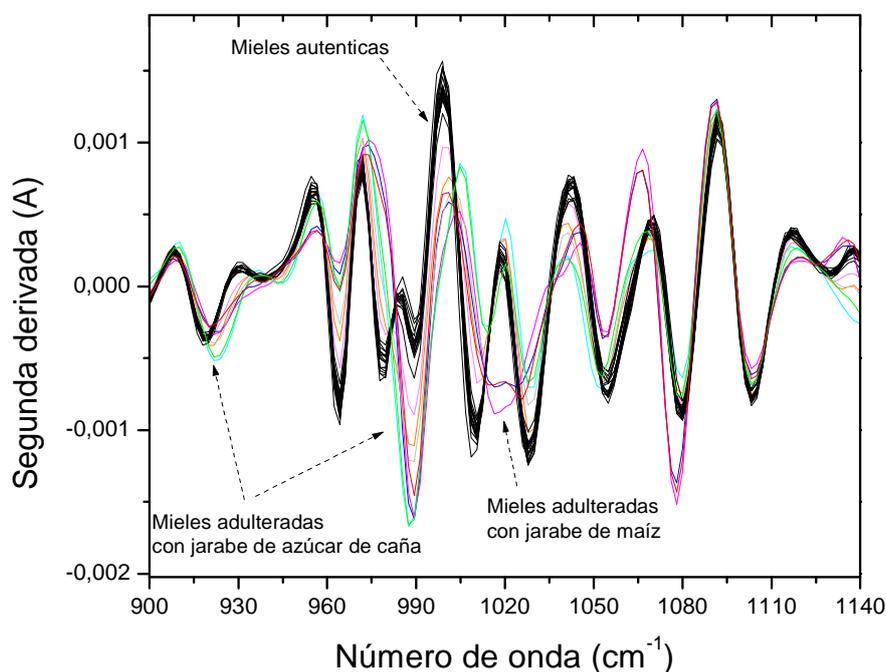


Figura 15. Segunda derivada de los espectros FTIR de muestras de miel de abeja auténticas (en negro), así como de muestras de miel adulteradas con jarabes de maíz y de azúcar de caña (en color).

3.4. Análisis de Componentes Principales (PCA) aplicado a grupos de muestras de miel de la zona centro del país.

El Análisis de Componentes Principales (PCA) es un procedimiento de reducción de dimensiones que permite comprimir la información contenida en los datos de partida (espectros FTIR), con el fin de simplificar el desarrollo de los posteriores modelos de clasificación y predicción. Al mismo tiempo que conserva la mayor cantidad de información relevante posible, se eliminan los efectos ocasionados por el ruido aleatorio y otras posibles perturbaciones. Por lo tanto, se aplicó el

análisis PCA para la clasificación de las muestras de miel que en su mayoría proceden de la zona centro del país. Como se mencionó anteriormente este es uno de los métodos de análisis multivariado que sirven para diferenciar y clasificar de manera más contundente y certera los espectros de absorción de distintos tipos de muestras (en este caso para diferenciar muestras auténticas respecto de adulteradas). Este es un método aún más certero que el análisis espectral, sobre todo cuando el análisis visual no es muy confiable o existen pocas diferencias espectrales.

En la figura 16 (a) se observa la gráfica de cuentas o nube de puntos que resulta de aplicar el análisis PCA. Se obtienen varias componentes principales, pero las 2 primeras son las que contienen la mayor cantidad de información proveniente de la matriz de absorbancias FTIR del conjunto de muestras analizadas. Por lo tanto se procede a comparar las dos primeras componentes: PC1 *vs* PC2. Este análisis se realizó utilizando el intervalo espectral de 850–1200 cm^{-1} en el cual se sitúan principalmente las absorciones de los carbohidratos presentes en la miel. Se puede observar en el diagrama PCA de forma clara la manera en que las muestras auténticas tienden a agruparse ya que presentan una característica en común que es la autenticidad. La agrupación entre estas muestras indica el grado de correlación que existe entre ellas, cuando la correlación es igual a uno, los puntos coinciden, mientras que las muestras que han sido adulteradas tienden a dispersarse (datos alejados del grupo). Sin embargo si el análisis PCA se apoya con el análisis espectral mostrado en la figuras 14 y 15, es posible además determinar el tipo de adulterante utilizado figura 16 (b).

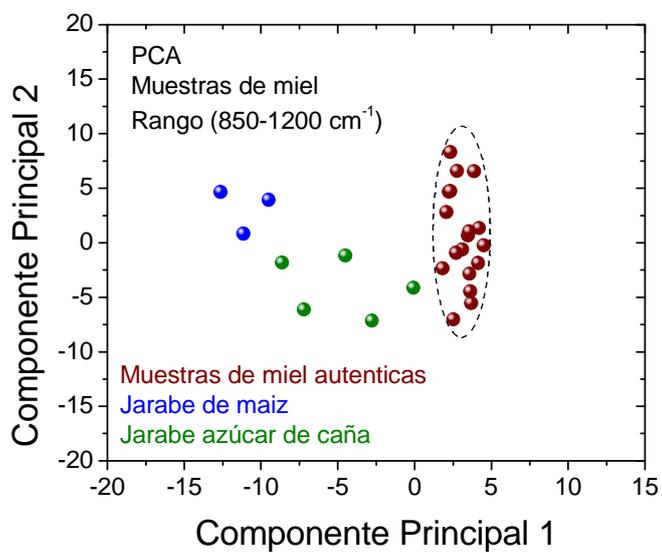
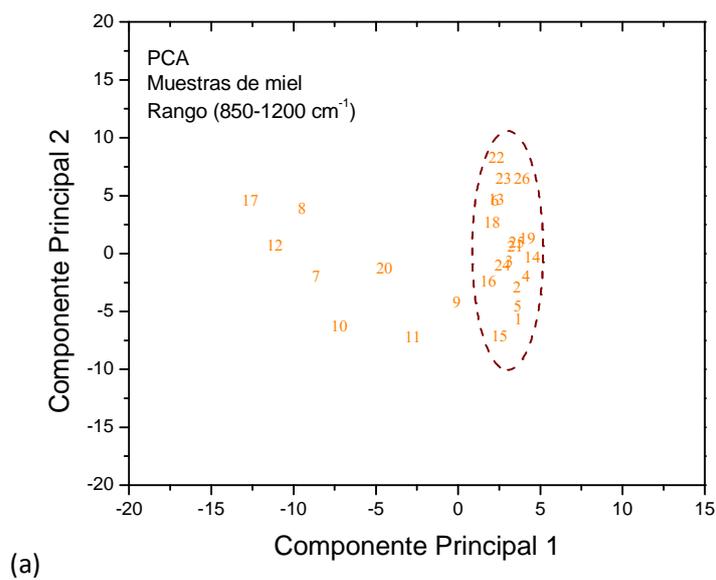
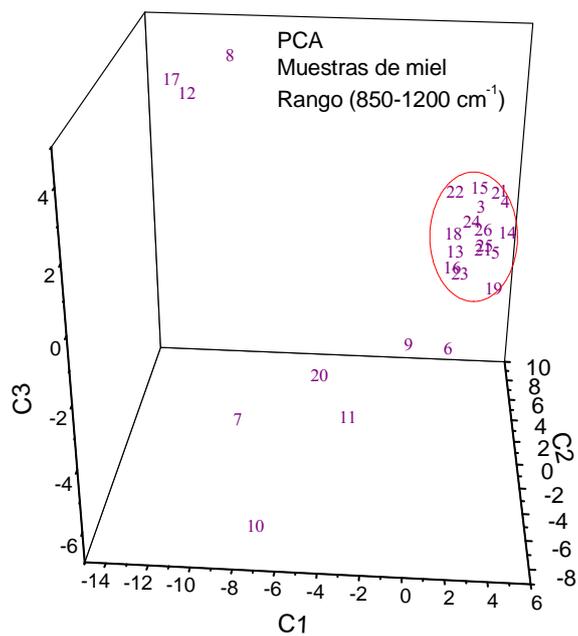
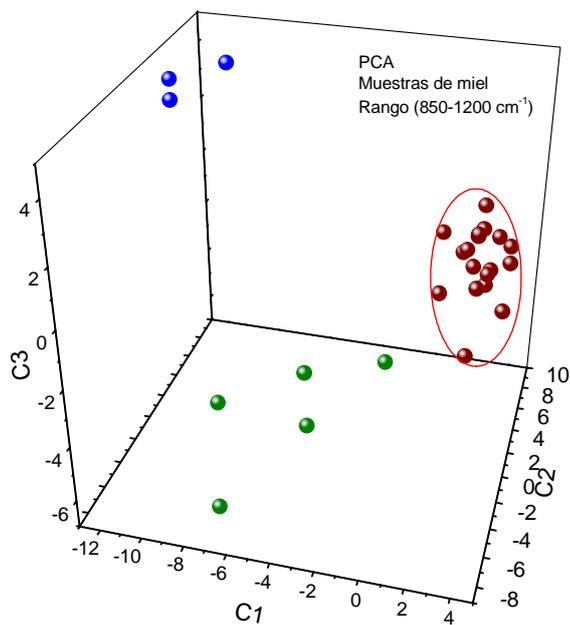


Figura 16. Gráficas de cuentas o nube de puntos obtenida mediante análisis PCA en muestras de miel de abeja de la región central del país a) con número de muestras b) con símbolos.

Una manera aún más completa de analizar los anteriores diagramas PCA es comparar las 3 primeras componentes: PC1 *vs* PC2 *vs* PC3 en un diagrama PCA tridimensional, tal y como se observa en las figura 17. Los números de entradas (8, 12 y 17) corresponden a las muestras (M9, M13, M22) y están adulteradas con jarabe de maíz (glucosa), mientras que los números de entrada (9, 10, 11, 7, 20) corresponden a las muestras (M10, M11, M12, M8 y M26) y están adulteradas con azúcar de caña (sacarosa). Esto último podría deberse además de la adulteración a una sobrealimentación intencional a las abejas con jarabe de sacarosa durante algún tiempo (Serra, 1986; Serra et. al, 1987). Nuevamente, el análisis espectral mostrado en las figuras 14 y 15 ayudaron a corroborar que estas muestras presentan exceso de azúcares debido principalmente a la adulteración.



(a)



(b)

Figura 17. Gráfica de cuentas o nube de puntos 3D obtenida mediante análisis PCA en muestras de miel de abeja de de la zona centro del país a) con número de muestras b) con símbolos.

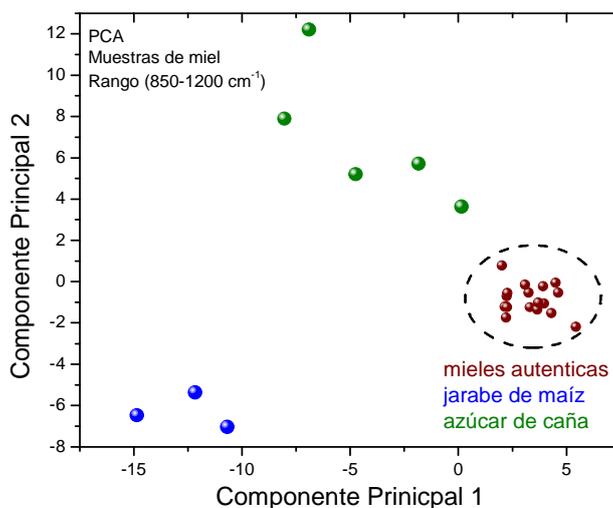


Figura 18. Gráfica de cuentas o nube de puntos obtenida mediante análisis PCA en muestras de miel de abeja de la región central del país utilizando los espectros en 2ª Derivada en el intervalo espectral de 850–1200 cm⁻¹.

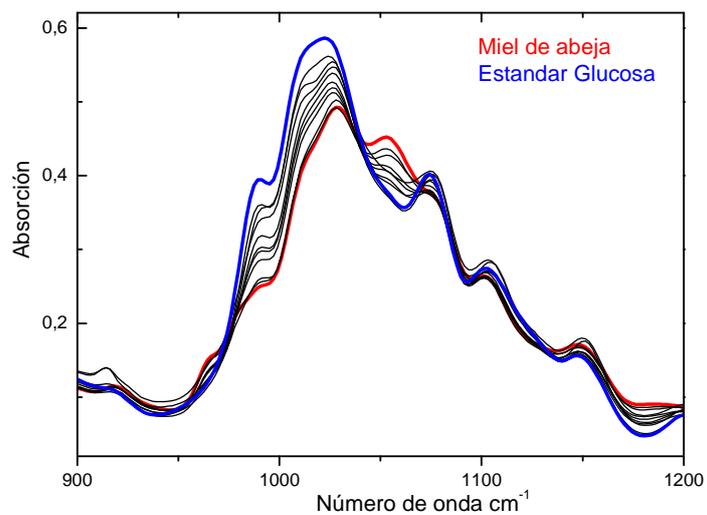
En la figura 18 se muestra la nube de puntos obtenida mediante análisis PCA en muestras de miel de abeja de la región central del país a partir de los espectros en 2ª Derivada en el intervalo espectral de 850–1200 cm⁻¹. Se observa una mejor discriminación de las muestras en comparación con la nube de puntos sin realizar tratamiento, figura 16 a y b. La principal diferencia del análisis PCA (bidimensional) entre absorción pura y segunda derivada radica en que en el primer caso se obtuvieron solo dos grupos (mieles auténticas y adulteradas), mientras que en el segundo caso se obtienen tres grupos (mieles auténticas, adulteradas con jarabe de maíz y adulteradas con jarabe de azúcar de caña).

3.5. Adulteración intencional controlada de miel de abeja con estándares de glucosa, sacarosa y fructosa.

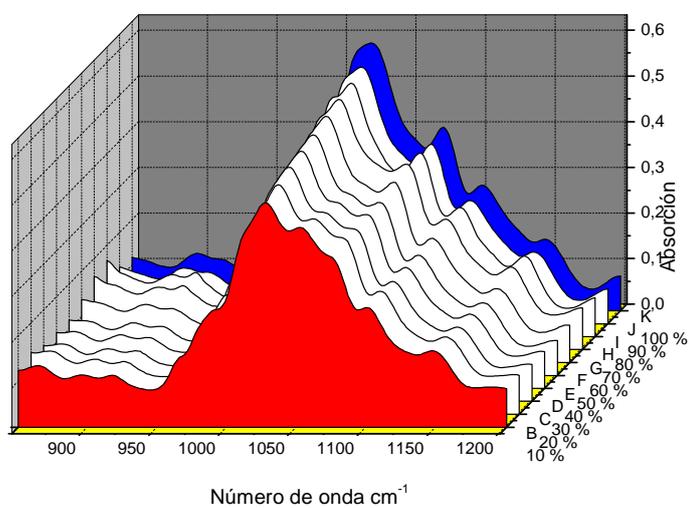
Debido a que es posible discernir no solamente muestras de miel adulteradas, sino también el tipo de adulterante utilizado en éstas (ver figuras 16-18), se procedió entonces a adulterar intencionalmente (es decir agregarle a una muestra de miel diferentes concentraciones de adulterantes) varias de las mieles determinadas mediante PCA como puras o auténticas, utilizando soluciones de azúcares estándar (glucosa, fructosa y sacarosa) de grado analítico. Esto se realizó con la finalidad de obtener los vectores de dirección asociados a cada uno de estos azúcares en las que las adulteraciones se manifiestan desde el punto de vista quimiométrico, desde miel pura, hasta el adulterante puro. Las adulteraciones intencionales controladas con los estándares se realizaron en las muestras de miel de abeja también para poder observar diferencias con respecto a los jarabes baratos, como lo son el de maíz, de azúcar invertido y de caña.

3.5.1. Adulteración con estándar de glucosa.

La glucosa en la miel se encuentra en menor cantidad que la fructosa. Un máximo de 40 % es permitido por la Norma Oficial Mexicana 823NMX-F-036-1997. En la figura 19 se muestran los espectros FTIR de la adulteración de la miel de abeja con estándar de glucosa en forma de jarabe, así como también el espectro de glucosa pura. Se observa que la banda de absorción más intensa de la molécula de glucosa en 1027 cm^{-1} aumenta sistemáticamente con la concentración de este estándar de glucosa desde 0 hasta 100%. Se observa además la manera en la que el espectro de miel de abeja se va “enrareciendo” hasta transformarse en el espectro de glucosa.



(a)

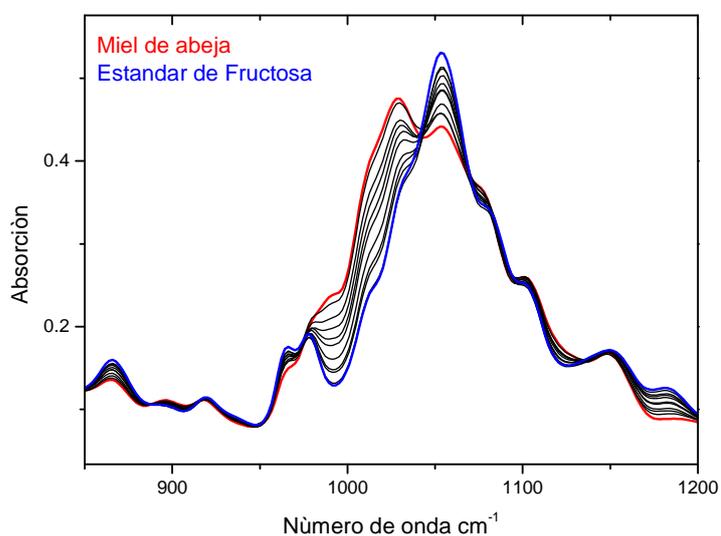


(b)

Figura 19. Espectros FTIR de muestras de miel de abeja adulteradas con diferentes concentraciones de estándar de glucosa a) en 2D b) 3D.

3.5.2. Adulteración con estándar de fructosa.

La fructosa se encuentra en mayor cantidad en la miel que la glucosa. Un máximo de 44 % es permitido por la Norma Oficial Mexicana 823NMX-F-036-1997. En la figura 20 se muestran los espectros FTIR de la adulteración de la miel de abeja adulterada con distintas proporciones de estándar de fructosa en forma de jarabe, así como también el espectro de fructosa pura. Se observa la presencia del jarabe de fructosa por un aumento gradual en la intensidad del pico característico o más intenso de la fructosa en 1052 cm^{-1} .



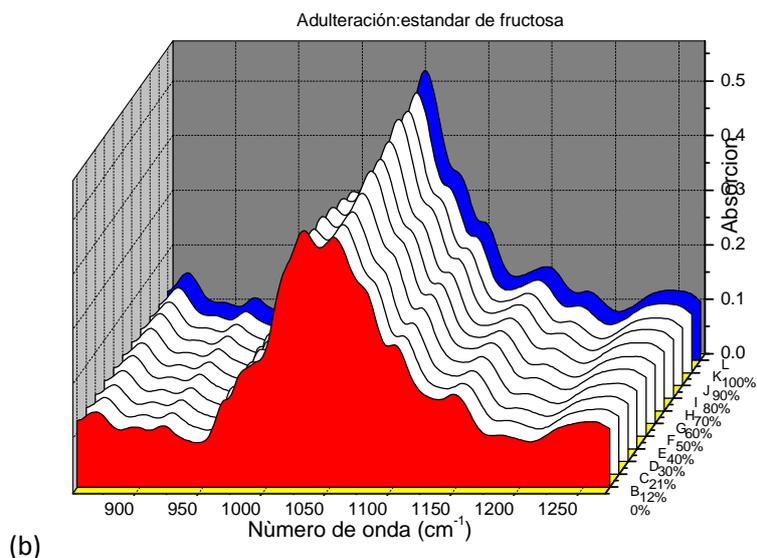
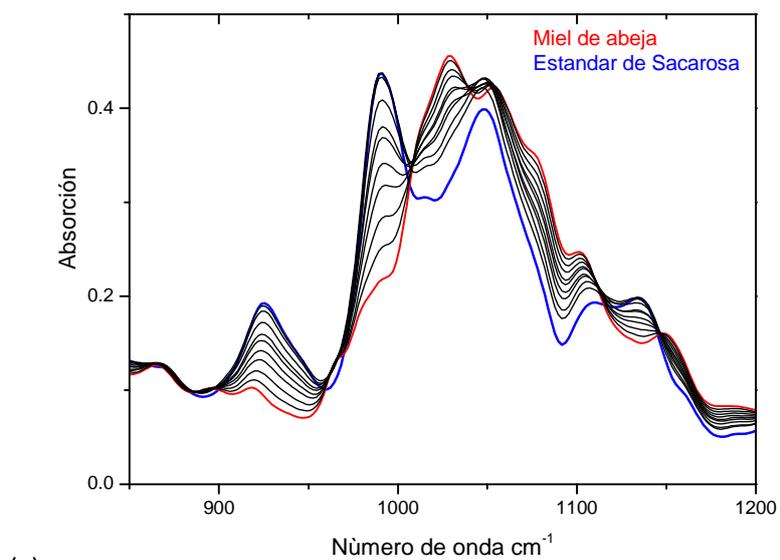


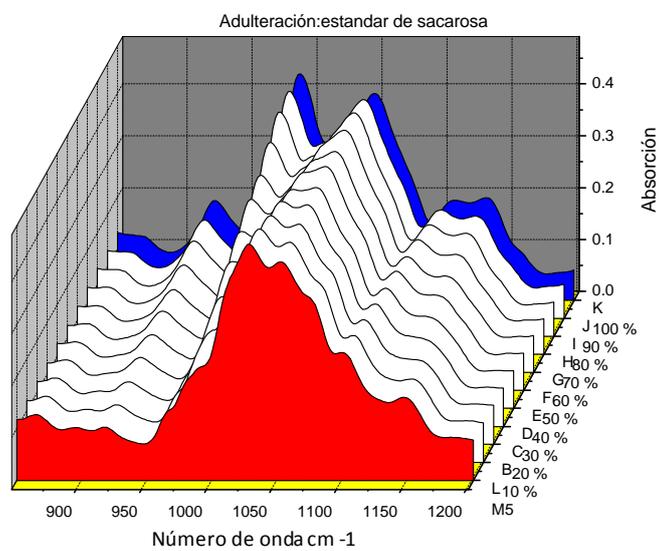
Figura 20. Espectros FTIR de muestras de miel de abeja adulteradas con diferentes concentraciones de estándar de fructosa a) en 2D b) 3D.

3.5.3. Adulteración con estándar de sacarosa.

También se realizó la adulteración con el estándar de sacarosa, y sus espectros FTIR se muestran en la figura 21. El espectro FTIR de la adulteración con este estándar presenta los picos característicos de la molécula de sacarosa en 925 y 991 cm^{-1} . Los cambios espectrales son más notables en esta adulteración que con glucosa y fructosa debido a que este azúcar está presente en la miel en cantidades muy inferiores comparadas con el contenido de glucosa y fructosa.



(a)



(b)

Figura 21. Espectros FTIR de muestras de miel de abeja adulteradas con diferentes concentraciones de estándar de sacarosa a) en 2D b) 3D.

3.6. Adulteración intencional controlada de muestras de miel de abeja con diferentes jarabes: de maíz, azúcar de caña y azúcar invertido.

La adulteración de la miel de manera deliberada por parte de los operadores del comercio de este producto o de apicultores que inescrupulosamente agregan en forma directa como sustitutos artificiales de menor valor, constituye un gran fraude económico, pues algunos apicultores motivados por una mayor ganancia económica tienden a adulterar la miel (Nagai et. al, 2006).

Por las razones expuestas y además debido a la sensibilidad de la técnica de análisis para la detección de adulterantes, se procedió a realizar adulteraciones intencionales controladas utilizando ahora jarabes baratos que pudieran ser utilizados con este propósito. Los principales adulterantes utilizados para llevar a cabo esta práctica son el jarabe de maíz (el cual está constituido en su mayoría por glucosa), jarabe de azúcar invertido y jarabe de azúcar de caña (sacarosa).

3.6.1. Adulteración con jarabe de maíz.

Una adulteración muy frecuente de la miel es el agregado de una sustancia denominada "glucosa comercial" o "glucosa de maíz", ya que ésta contiene sustancias llamadas dextrinas, que no permiten que la miel se "azucare" (Bogdanov et.al, 2004). Además, como este producto es de menor costo comparado con los demás jarabes, representa a quien comercializa la miel un beneficio económico. El jarabe de maíz es un edulcorante líquido isoglucoso, creado a partir del almidón o fécula maíz. Algunas ventajas de utilizarlo frente a sacarosa son:

- Es un monosacárido: lo hace más digestible que el azúcar que es un polisacárido.
- Su costo es relativamente más bajo: comparado con el azúcar de caña.
- Menos mano de obra: no requiere prepararlo como jarabe.
- No fermenta: es estable químicamente.

- Provoca menos pillaje: las abejas no lo detectan fácilmente.
- Es más limpio: no contiene contaminantes.

En la figura 22 se muestran los espectros FTIR de una muestra de miel de abeja adulterada a distintas proporciones de jarabe de maíz así como también el espectro de jarabe de maíz. Se presentan los espectros en el intervalo de 800–1200 cm^{-1} que es la región del mediano infrarrojo donde los carbohidratos muestran absorción, y por lo tanto los espectros son más sensibles a la adulteración con los jarabes mencionados.

De manera muy similar a la adulteración con estándar de glucosa, la adulteración de la miel con jarabe de maíz, muestra un aumento sistemático de la banda de absorción más intensa de la molécula de glucosa en 1027 cm^{-1} con la concentración del jarabe de maíz desde 0 hasta 100%.

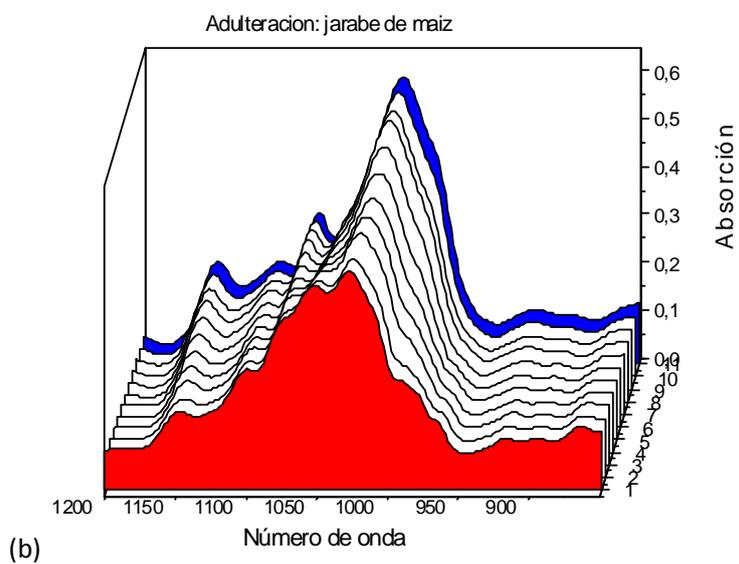
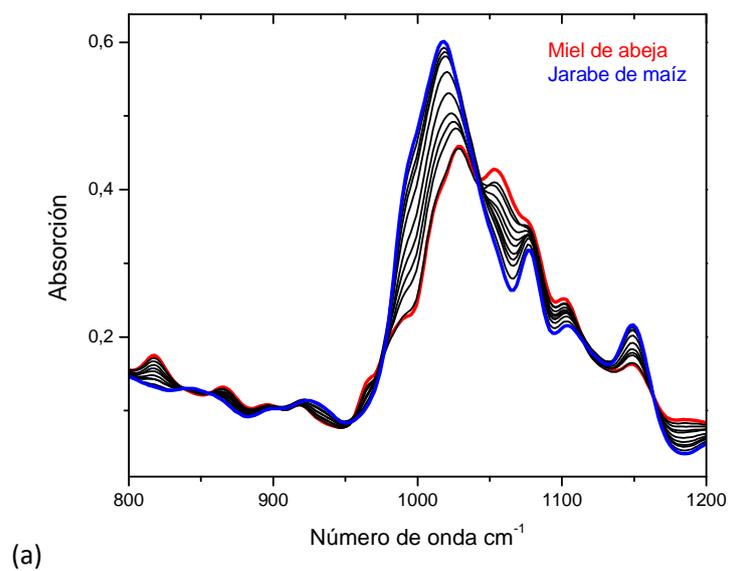
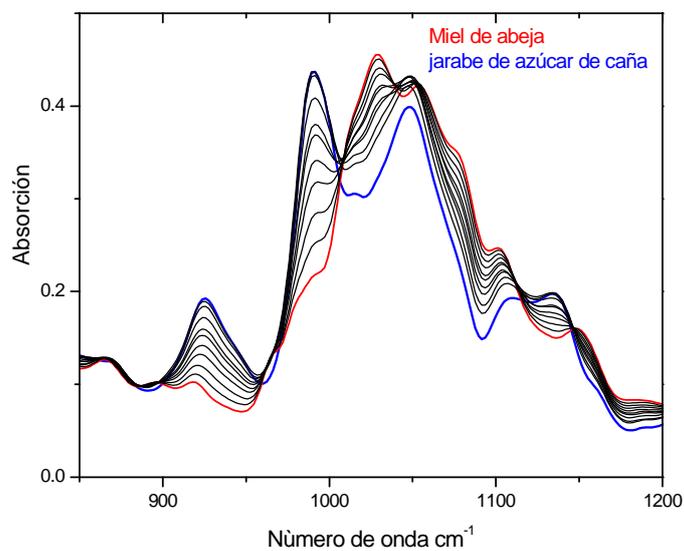


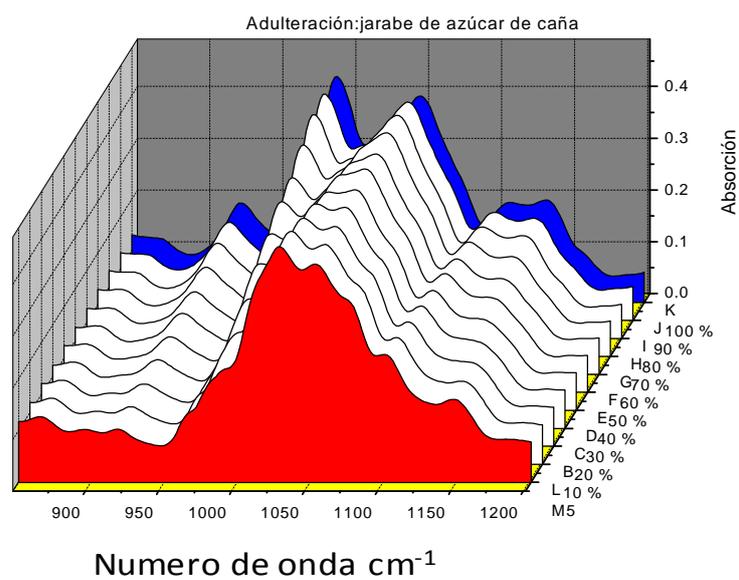
Figura 22. Espectros FTIR de la adulteración de la miel con diferentes concentraciones de jarabe de maíz a) en 2D b) 3D.

3.6.2. Adulteración con jarabe de azúcar de caña.

La sacarosa es un disacárido formado por la unión de fructosa y glucosa; Aunque la miel presenta otros disacáridos en mayor cantidad, de estos, sólo la sacarosa es importante con fines de estándares de calidad. Un máximo de 5% es permitido por la mayoría de los países que compran miel del exterior. Un porcentaje de sacarosa mayor del 8% está asociado a la adulteración o a un manejo deficiente de la alimentación con jarabe, lo cual de por sí es una adulteración, evitaría el que se pueda vender en el mercado y es penalizable por ley. El azúcar de caña es probablemente el sustituto de miel más utilizado en apicultura para alimentar a las abejas ya que resulta muy atractivo y de fácil digestibilidad para las abejas. La concentración de sacarosa es muy variable, dependiendo del tipo de miel y de su estado de maduración (Taormina et. al, 2001). En la figura 23 se muestran los espectros tanto de una muestra de miel auténtica como de las adulteraciones de la misma con azúcar de caña. Se observan los picos característicos de 925 C-O-C que corresponde al enlace glucosídico que presenta la sacarosa y en 991 cm^{-1} que corresponde a C-O (C-OH). Se observa la manera como gradualmente van aumentando su intensidad conforme se incrementa la concentración de este azúcar.



(a)



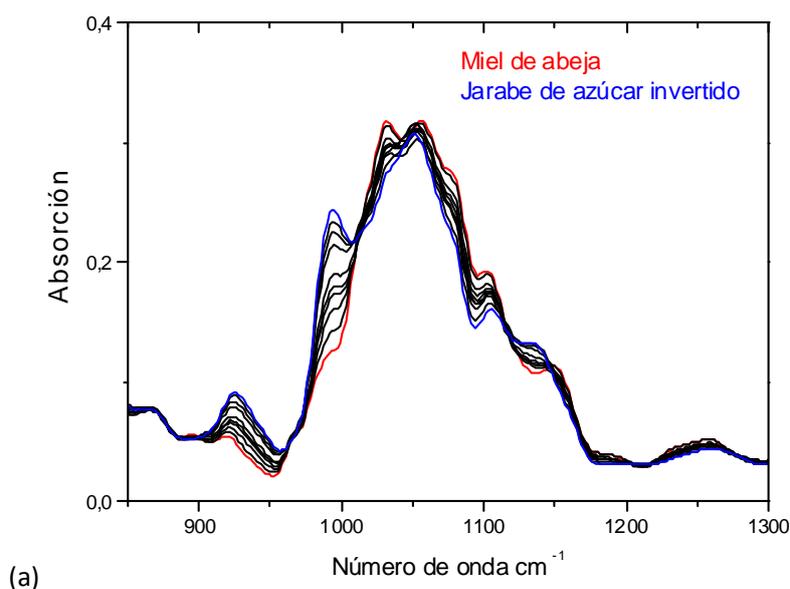
(b)

Figura 23. Espectros FTIR de muestras de miel de abeja adulteradas con diferentes concentraciones de jarabe de azúcar de caña a) en 2D b) 3D.

3.6.3. Adulteración con jarabe de azúcar invertido.

El azúcar invertido es la combinación de glucosa y fructosa. Se obtiene a partir de la hidrólisis del azúcar común (Sacarosa). Para ello se prepara un almíbar y se lo acidifica utilizando ácido cítrico. Como resultado de esto, se elimina un puente de oxígeno, transformando la solución acuosa de sacarosa en una solución acuosa de glucosa + fructosa.

En la figura 24 se muestran los espectros FTIR de una muestra de miel de abeja adulterada a distintas proporciones de azúcar invertido, así como también el espectro de azúcar invertido puro. Se observan las diferencias espectrales desde el espectro característico de la miel hasta el de azúcar invertido debido a la presencia gradual de este con picos característicos en 925 y 991 cm^{-1} .



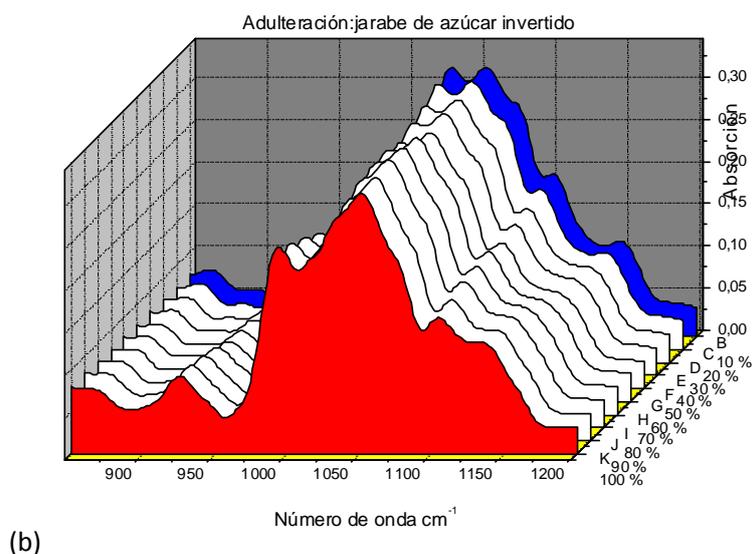


Figura 24. Espectros FTIR de muestras de miel de abeja adulteradas con diferentes concentraciones de jarabe de azúcar invertido a) en 2D b) 3D.

3.7. Análisis de Componentes Principales (PCA) aplicado a adulteraciones intencionales de miel de abeja con estándares de glucosa, fructosa y sacarosa.

Para determinar el tipo de adulterante se utilizó el análisis de componentes principales (PCA), el cual nos permitió observar agrupaciones o dispersiones de datos asociados a mieles auténticas y adulteradas a partir de los espectros FTIR obtenidos de las muestras de miel, así como de las adulteraciones intencionales con los azúcares estándar.

En la figura 25 se muestra la nube de puntos graficada para las componentes principales 1 y 2. La aglomeración central de datos corresponde a muestras de miel auténtica, mientras que los que se muestran en azul corresponden al grupo de muestras adulteradas intencionalmente con glucosa estándar. En color verde aparecen los resultados asociados a las muestras adulteradas intencionalmente con fructosa estándar y en color violeta las muestras adulteradas intencionalmente con sacarosa estándar. Puede observarse además la manera en

la que quedan definidos los ejes o vectores de dirección de cada azúcar individual. Los símbolos representan las adulteraciones realizadas y medidas experimentalmente mediante FTIR, mientras que los vectores son ajustes lineales de mínimos cuadrados a los datos experimentales. En la figura 26 se grafican las primeras 3 componentes PC1 *vs* PC2 *vs* PC3 en un diagrama PCA tridimensional, en el cual se observa la formación de una pirámide con estos mismos ejes de azúcares. En este diagrama las muestras de miel auténtica tienden a agruparse en la parte central o cúspide de la pirámide mientras que las aristas representan las direcciones y la posición en las que aparecen las adulteraciones intencionales, tal y como lo muestran los puntos experimentales. Este resultado sugiere que combinaciones de dos o más azúcares se situarían en los planos formados por cada arista o eje dependiendo de los azúcares que constituyan el adulterante.

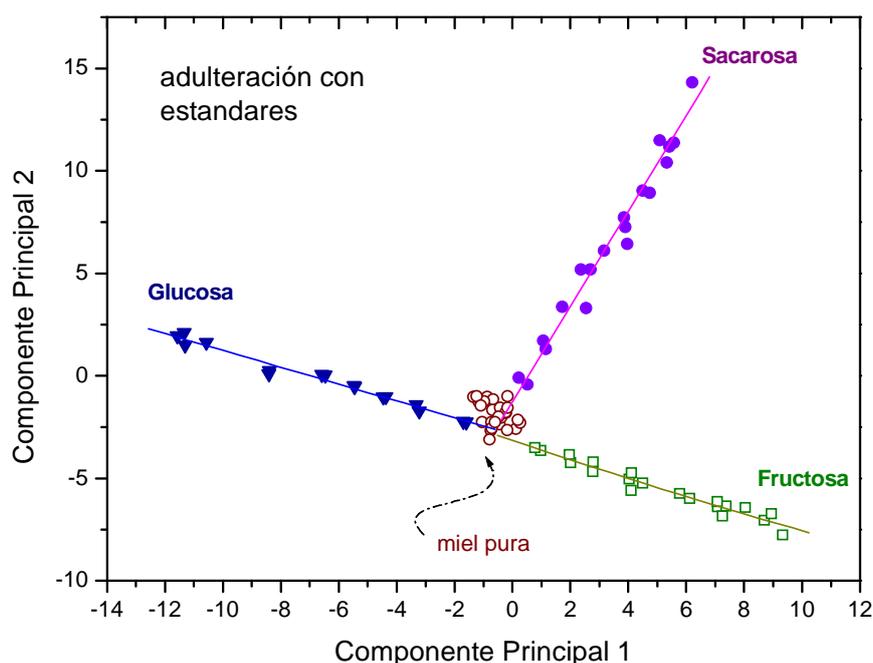


Figura 25. Gráfica de cuentas o nube de puntos obtenida mediante análisis PCA en muestras de miel de abeja de la zona centro del país, así como de muestras adulteradas con azúcares estándar.

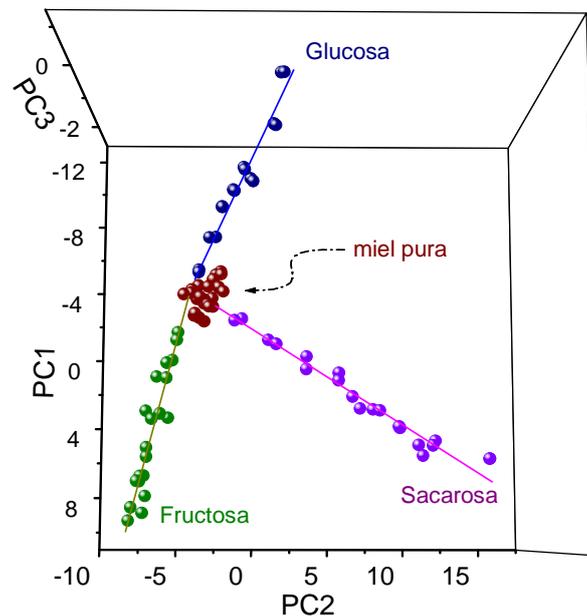


Figura 26. Gráfica de cuentas o nube de puntos 3D obtenida mediante análisis PCA en muestras de miel de abeja de la zona centro del país, así como de muestras adulteradas con azúcares estándar.

3.8. Análisis de Componentes Principales (PCA) aplicado a adulteraciones intencionales de miel de abeja con jarabes de maíz, de azúcar de caña y de azúcar invertido.

De la misma manera como se hizo para los azúcares estándar, se llevo a cabo el análisis de componentes principales PCA, a partir de los espectros FTIR de las muestras de miel de abeja, así como de las adulteraciones intencionales con jarabes de maíz, de caña y de azúcar invertido.

Nuevamente, el análisis PCA permitió observar agrupaciones o dispersiones de datos asociados a la naturaleza de cada muestra analizada. En la figura 27 se observa la nube de puntos PCA de las dos primeras componentes PC1 vs PC2 aplicada al conjunto de muestras de miel auténticas y al conjunto de muestras adulteradas intencionalmente con los jarabes. La aglomeración de datos en la parte central corresponde a muestras de miel auténtica, mientras que los datos

que se muestran en color azul corresponden al grupo de muestras adulteradas intencionalmente con jarabe de maíz. En color verde se muestran los datos correspondientes a las muestras adulteradas intencionalmente con jarabe de azúcar invertido y en color violeta las muestras adulteradas intencionalmente con jarabe de azúcar de caña. Se puede observar que se definen de manera clara los ejes asociados a los diferentes adulterantes. De esta forma, mediante el análisis PCA es posible clasificar o discriminar la naturaleza de las muestras de miel estudiadas, en este caso en base a su autenticidad.

En la figura 28 se muestra la misma gráfica de cuentas o nube de puntos en forma tridimensional PC1 vs PC2 vs PC3 para una mejor apreciación de las direcciones en las que aparecen las adulteraciones con jarabes.

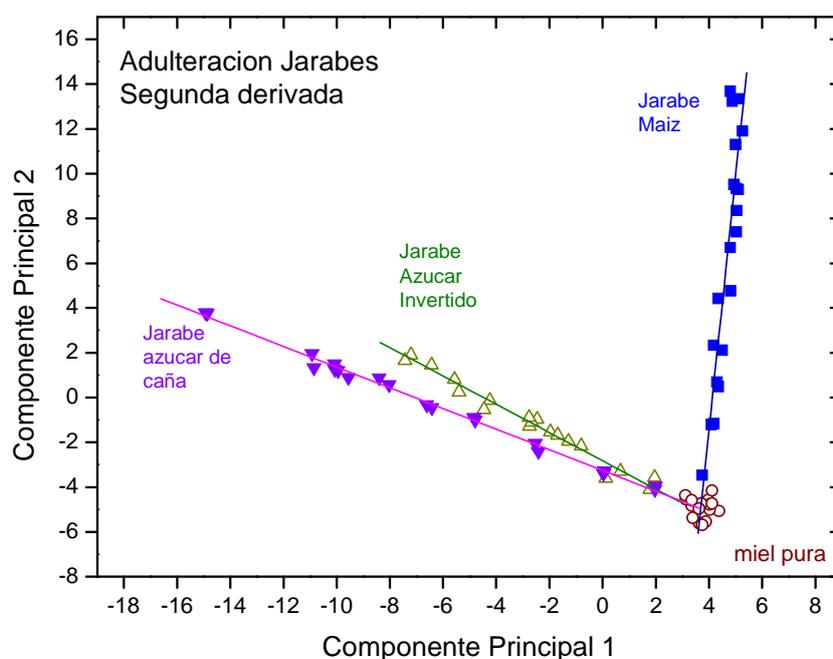


Figura 27. Gráfica de cuentas o nube de puntos obtenida mediante análisis PCA en muestras de miel de abeja de la zona centro del país, así como de muestras adulteradas con distintos jarabes.

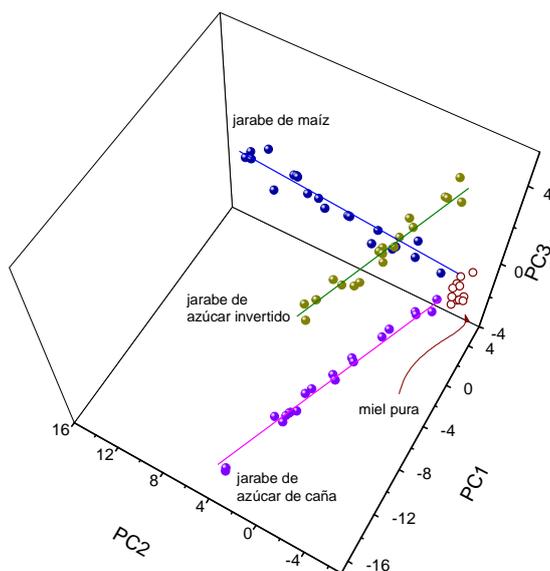


Figura 28. Gráfica de cuentas o nube de puntos 3D obtenida mediante análisis PCA en muestras de miel de abeja de la zona centro del país, así como de muestras adulteradas con azúcares distintos jarabes.

3.9. Calibración y determinación del contenido de adulterante (jarabes y estándares): regresión de componentes principales (PCR, *Principal Component Regression*).

La región del espectro entre 850 y 1200 cm^{-1} fue la que mostro ser la más idónea debido a sus adecuados coeficientes de determinación R^2 para los jarabes y estándares, por lo tanto fue seleccionada para el modelo de calibración de cada adulterante. La miel autentica fue considerada como la base, mientras que cualquier complemento adicional de jarabe o estándar se consideraba como adulteración. Se utilizó el modelo de calibración PCR-2^a derivada, y en el cual se utilizaron los espectros obtenidos en segunda derivada para predecir la concentración del jarabe o estándar en las muestras de miel. Todos los métodos de calibración dieron resultados satisfactorios para la estimación del contenido de jarabes o estándares en la miel. En la figura 29 se muestran las curvas de calibración obtenidas para la predicción de estándares de glucosa, fructosa y sacarosa como adulterantes en miel de abeja mediante PCR y en la Tabla 9 se presentan los parámetros estimados para los estándares usando el método de

calibración PCR. De manera similar se obtuvieron los coeficientes de determinación para la adulteración de la miel con jarabes, como se muestra en la figura 30, obteniéndose para jarabe de maíz un valor R^2 de 0.998, para jarabe de azúcar de caña un valor R^2 de 0.996, y para jarabe de azúcar invertido un valor R^2 de 0.994. En la Tabla 10 se muestran también los parámetros estimados para los diferentes adulterantes (jarabes) en miel de abeja usando el método de calibración PCR.

En general, los valores de R^2 obtenidos fueron bastante aceptables para todas las modelaciones PCR para predecir contenido de jarabes adulterantes. Estos resultados son comparables a los obtenidos por otros autores.

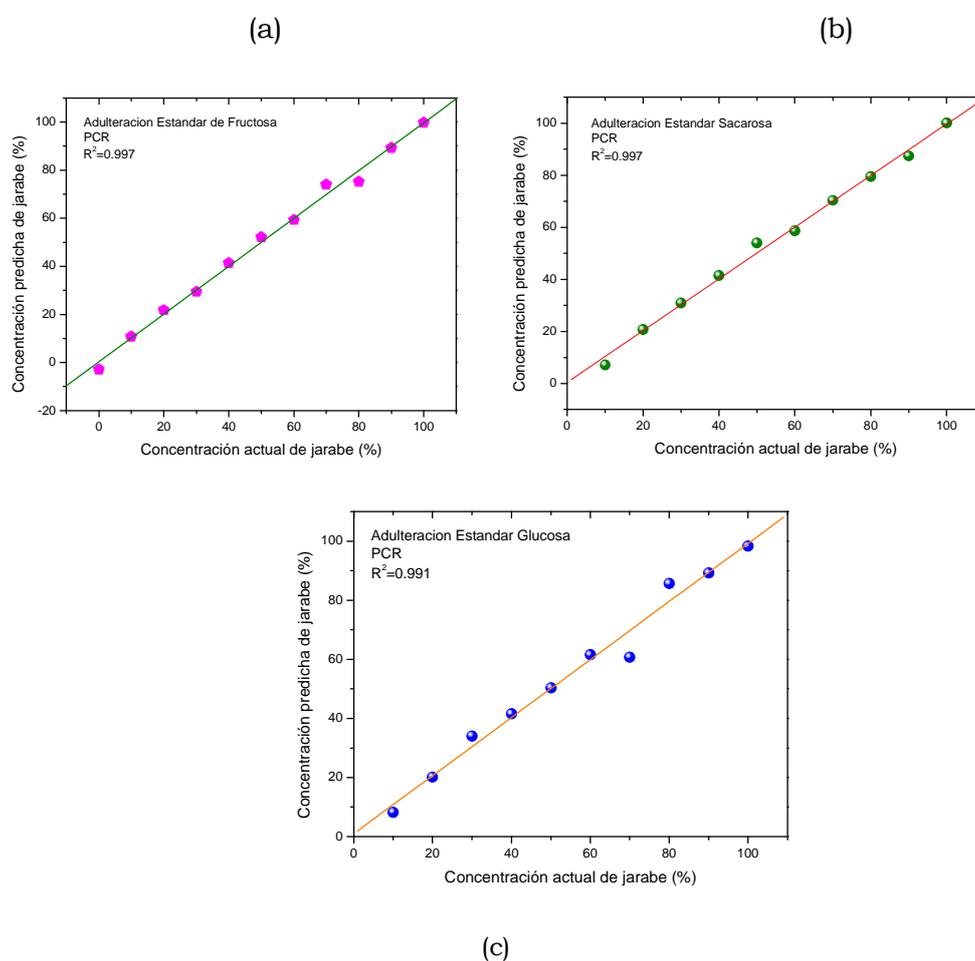


Figura 29. Modelo de Calibración en segunda derivada para predicción de estándares de (a) fructosa, (b) sacarosa, (c) glucosa, como adulterantes en miel de abeja mediante PCR.

Tabla 9. Parámetros estimados para los diferentes azúcares estándar como adulterantes en miel de abeja usando el método de calibración PCR.

	ESTANDAR GLUCOSA	ESTANDAR FRUCTOSA	ESTANDAR SACAROSA
Concentración Actual %	Concentración Predicha de jarabe % (2a derivada) $R^2 = 0.991$	Concentración Predicha de jarabe % (2a derivada) $R^2 = 0.997$	Concentración Predicha de jarabe % (2a derivada) $R^2 = 0.997$
10	8.24	10.80	7.19
20	20.17	21.75	20.78
30	34.04	29.46	31.01
40	41.59	41.38	41.487
50	50.40	52.10	54.00
60	61.54	59.29	58.68
70	60.74	73.99	70.40
80	85.68	75.13	79.49
90	89.23	89.23	87.41
100	98.31	99.74	100.08

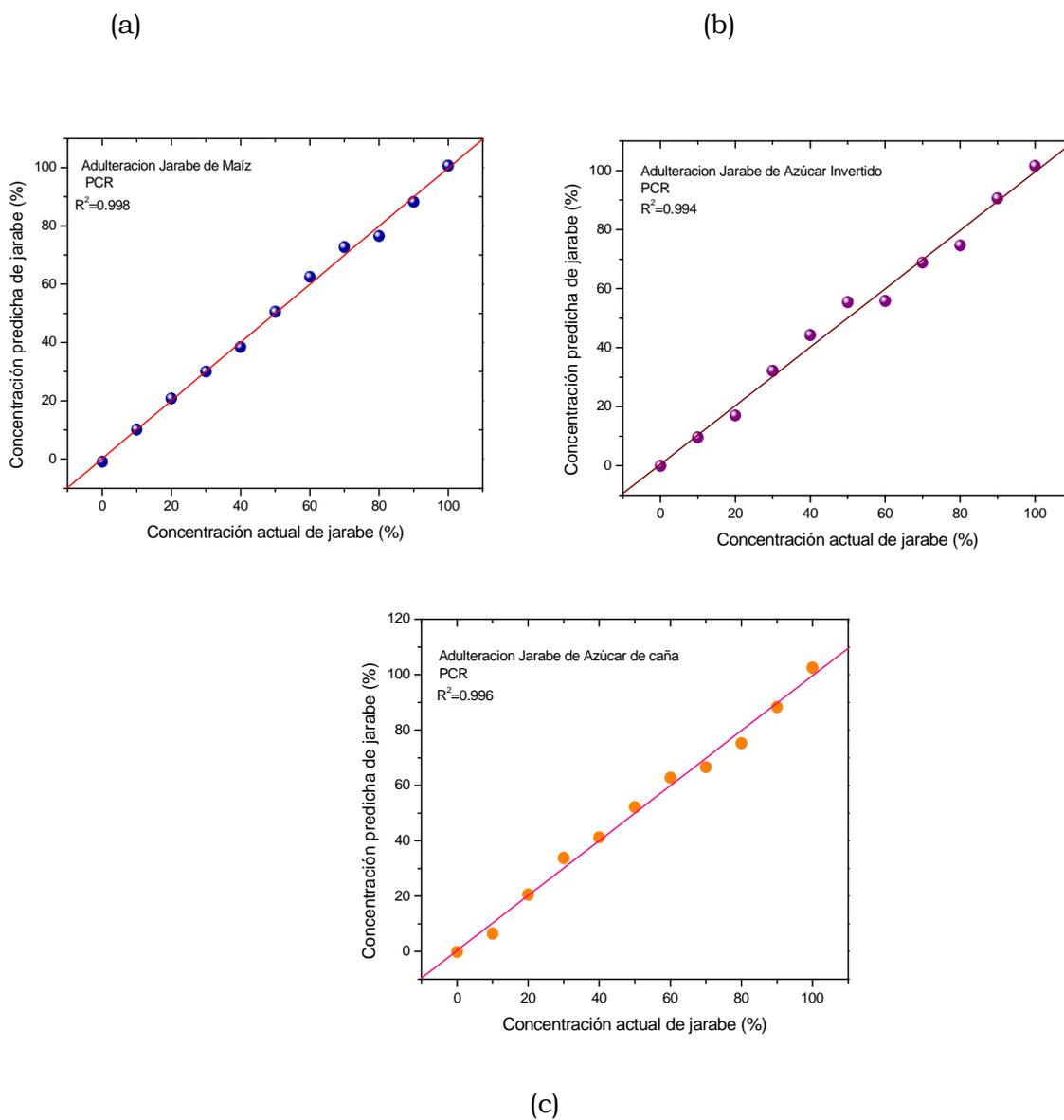


Figura 30. Modelo de Calibración en segunda derivada para predicción de (a) jarabe de maíz, (b) jarabe de azúcar invertido y (c) jarabe de azúcar de caña, como adulterantes en miel de abeja mediante PCR.

Tabla 10. Parámetros estimados para los diferentes adulterantes en miel de abeja usando el método de calibración PCR.

	JARABE DE MAÍZ	JARABE DE AZÚCAR DE CAÑA	JARABE DE AZÚCAR INVERTIDO
Concentración Actual %	Concentración Predicha de jarabe % (2a derivada) $R^2 = 0.998$	Concentración Predicha de jarabe % (2a derivada) $R^2 = 0.996$	Concentración Predicha de jarabe % (2a derivada) $R^2 = 0.994$
10	10.21	6.55	9.62
20	20.81	20.59	17.05
30	30.04	33.79	32.19
40	38.46	41.28	44.26
50	50.55	52.23	55.86
60	62.50	62.87	55.86
70	72.75	66.60	68.79
80	76.52	75.28	74.61
90	88.28	88.35	90.59
100	100.69	102.52	101.55

3.10. Calibración y determinación del contenido de adulterante (jarabes y estándares) mediante Regresión Parcial por Mínimos Cuadrados (PLS, Partial Least squares).

Se realizó una calibración PLS con validación cruzada, y el estadístico utilizado para la comparación de los modelos fue PRESS (la suma de cuadrados residuales de la predicción). Para los dos grupos analizados (jarabes y estándares) el procedimiento utilizado consideró el uso de varios factores para alcanzar la capacidad predictiva del modelo de regresión. Así, se utilizó el número de factores que produjeron el valor más óptimo para tres indicadores comunes: R^2 , SEC y SEP. R^2 es una medida de la variación en la variable respuesta (contenido de adulterante) explicada por el modelo de regresión. SEC (error estándar de calibración) es una medida del error de calibración expresado en unidades de la medición original (Workman 2001, Iurlina et. al, 2005). Finalmente SEP (error estándar de predicción) es la capacidad predictiva de la propiedad de interés al utilizar el modelo de calibración en un conjunto desconocido de muestras (Mark, 2001).

Un modelo de calibración puede tener un muy alto coeficiente de determinación. Sin embargo, esto puede deberse a un sobreajuste producido al utilizar una gran cantidad de variables latentes, lo que da lugar a una pobre capacidad predictiva cuando el modelo es utilizado con el conjunto de predicción (Al-Jowder et. al, 1999). La calidad de los modelos en los conjuntos de calibración y predicción se evaluó en base a la optimización de los tres parámetros mencionados anteriormente R^2 , SEC y SEP.

Los espectros FTIR para cada conjunto de calibración fueron sometidos a la rutina PLS del Programa QUANT de análisis multivariado con el fin de obtener modelos de calibración para cada adulterante (jarabes y estándares). Los modelos de calibración óptimos para la determinación del contenido de adulterante (jarabes y estándares) en la miel se construyeron sobre la base de los más bajos valores de SEC y SEP, así como el más alto R^2 . En la Tabla 11 se muestran los valores optimizados de R^2 , SEP y SEC obtenidos para cuantificar el contenido de adulterantes (jarabes y estándares) en miel. Los valores de R^2 para la mayoría de

los adulterantes fueron mayores a 0.99. En particular los valores de R^2 para el proceso de calibración se obtuvieron en el rango de 0.98–0.99 y para el proceso de validación los valores de R^2 estuvieron en el rango de 0.97–0.99 dependiendo del adulterante. El error estándar de calibración se obtuvo en el rango de 0.307–4.3, mientras que para el error estándar de validación se obtuvieron resultados en el rango de 1.55–4.82.

Las figuras 31–36 muestran las curvas de calibración de los adulterantes (jarabes y estándares) determinados por PLS. En las tablas 12 y 13 se presentan los valores predichos de los adulterantes (estándares y jarabes) determinados por PLS.

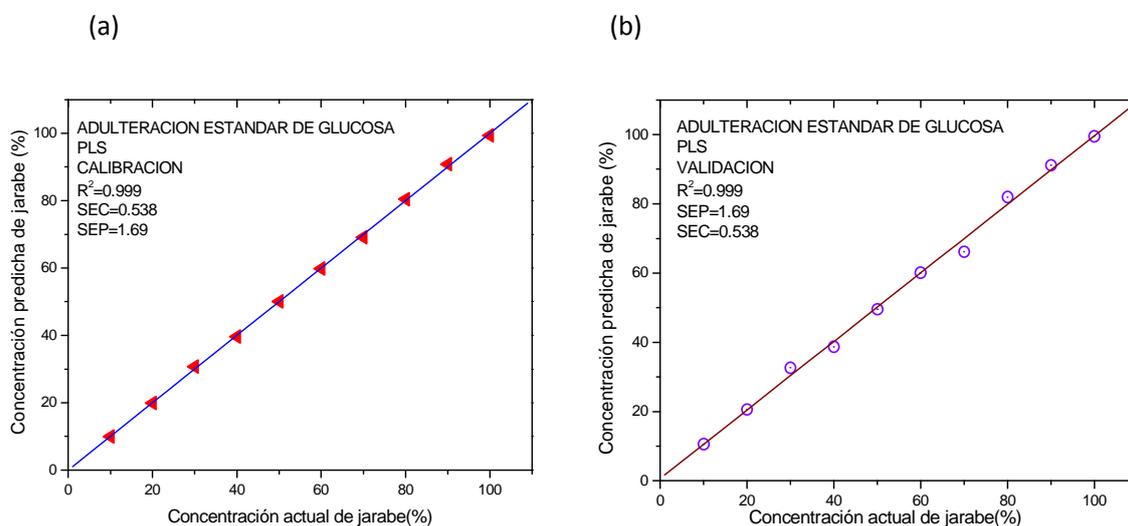


Figura 31. Curvas de (a) calibración y (b) validación entre los valores establecidos y predichos mediante espectroscopia infrarroja y análisis multivariado PLS para adulteración de la miel con glucosa estándar.

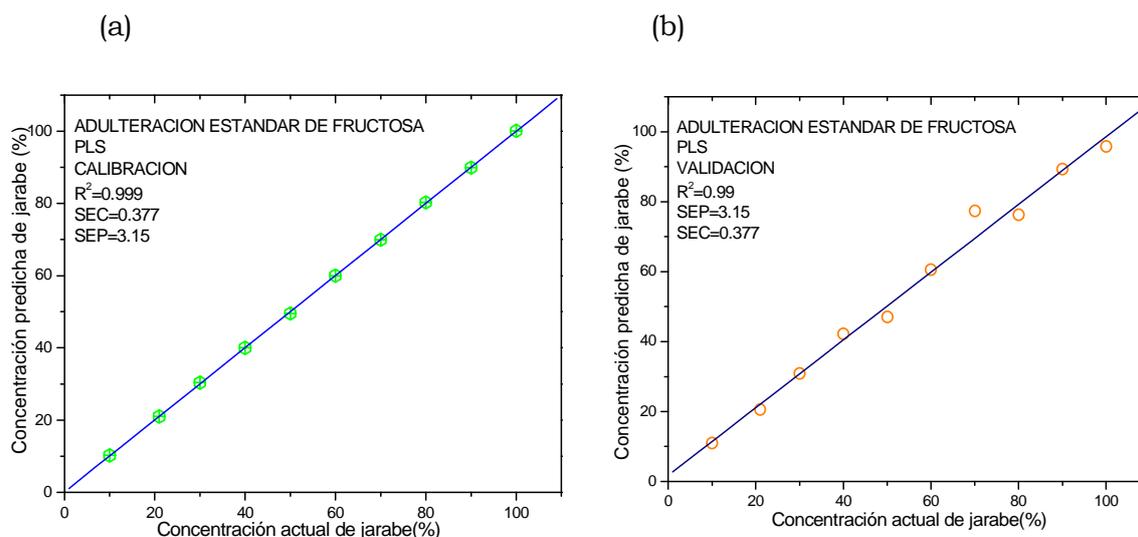


Figura 32. Curvas de (a) calibración y (b) validación entre los valores establecidos y predichos mediante espectroscopia infrarroja y análisis multivariado PLS para adulteración de la miel con fructosa estándar.

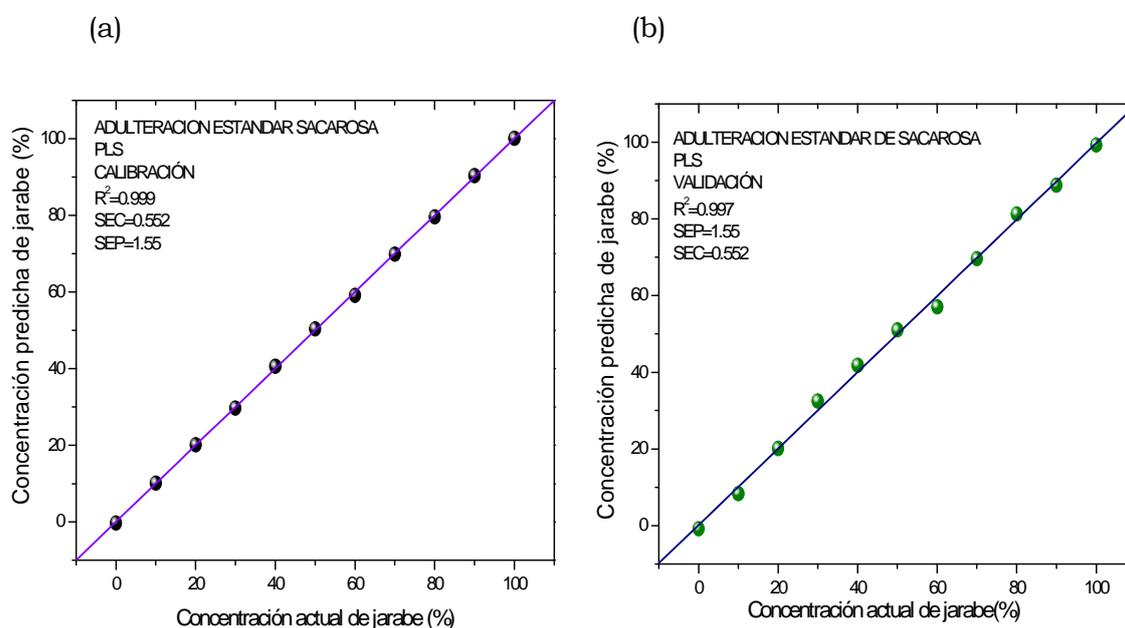


Figura 33. Curvas de (a) calibración y (b) validación entre los valores establecidos y predichos mediante espectroscopia infrarroja y análisis multivariado PLS para adulteración de la miel con sacarosa estándar.

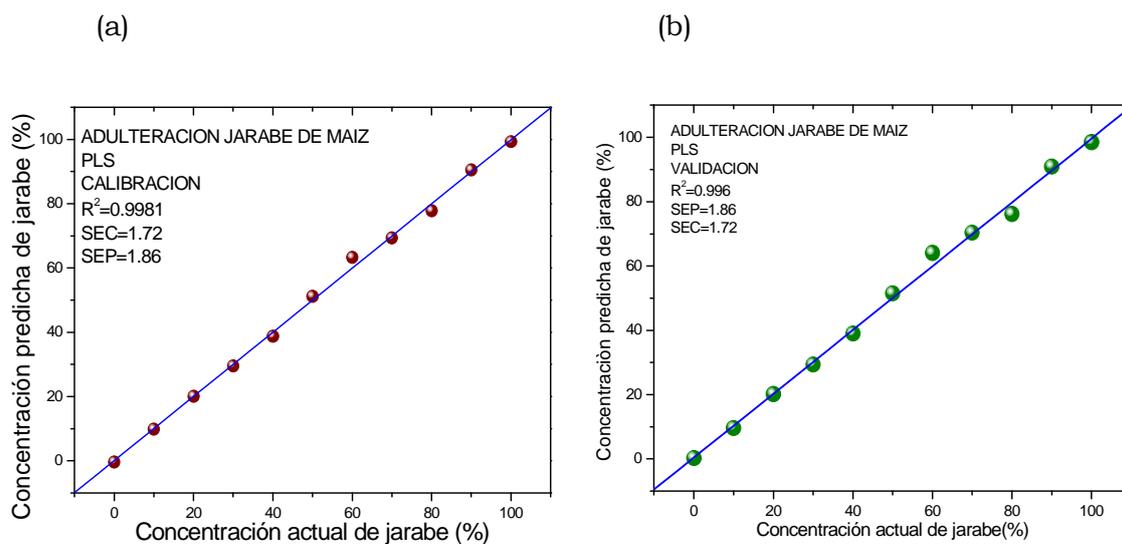


Figura 34. Curvas de (a) calibración y (b) validación entre los valores establecidos y predichos mediante espectroscopia infrarroja y análisis multivariado PLS para adulteración de la miel con jarabe de maíz.

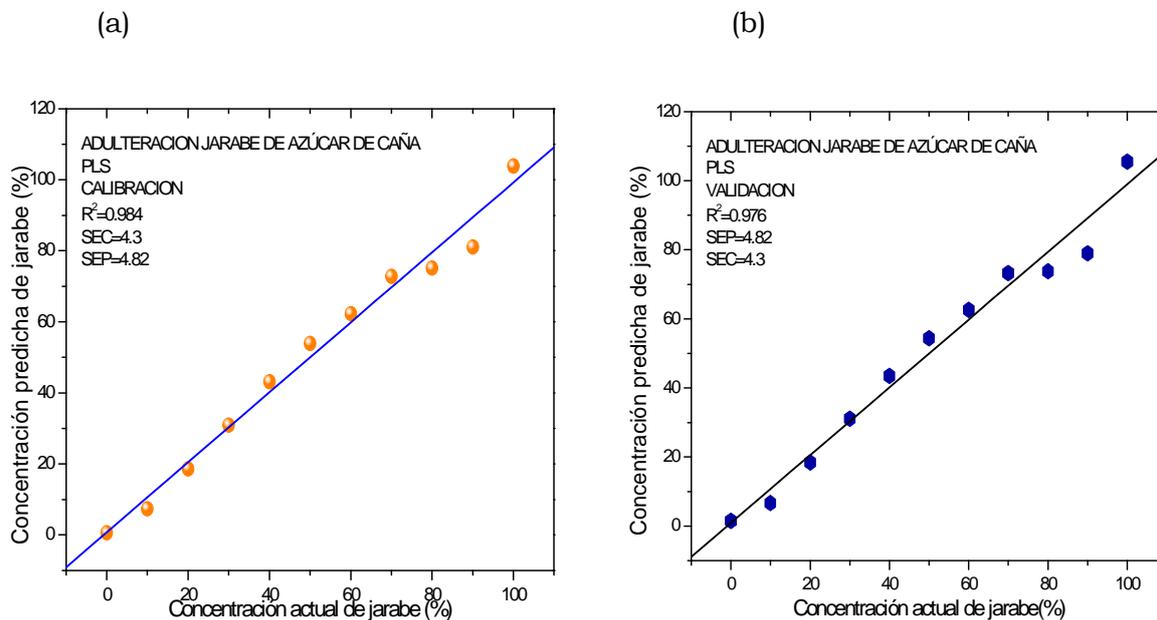


Figura 35. Curvas de(a) calibración y (b) validación entre los valores establecidos y predichos mediante espectroscopia infrarroja y análisis multivariado PLS para adulteración de la miel con jarabe de azúcar de caña.

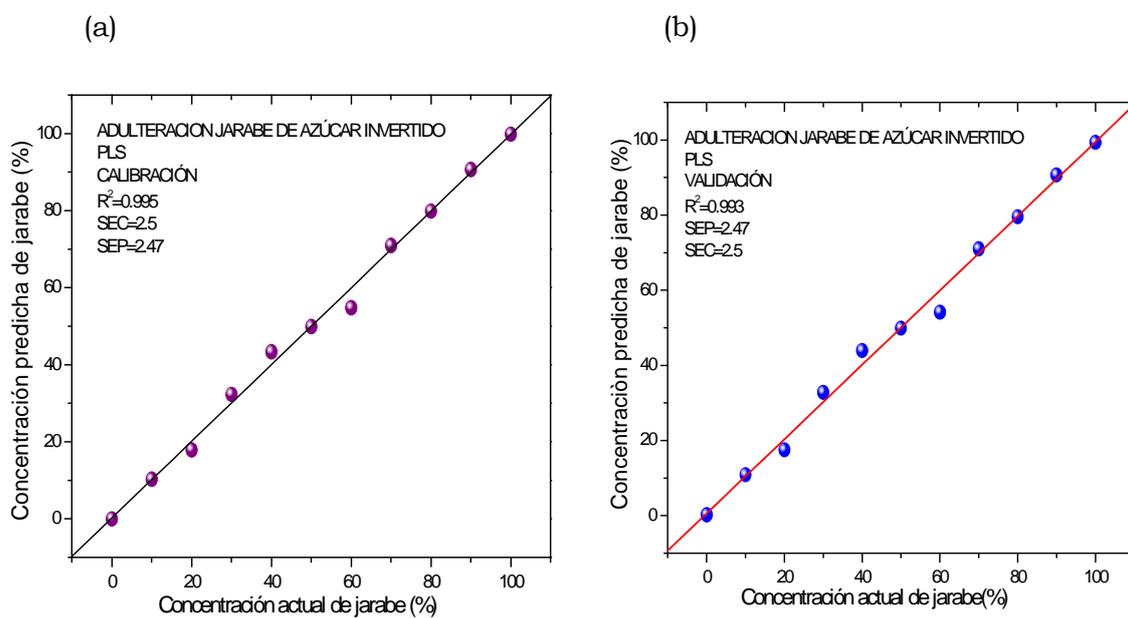


Figura 36. Curvas de (a) calibración y (b) validación entre los valores establecidos y predichos mediante espectroscopia infrarroja y análisis multivariado PLS para adulteración de la miel con jarabe de azúcar invertido.

Tabla 11. Parámetros de calibración y validación para los diferentes adulterantes (jarabes y estándares) en muestras de miel de la zona centro del país usando el método PLS.

ADULTERANTE	No. de factores	CALIBRACIÓN		VALIDACIÓN	
		R ²	SEC	R ²	SEP
JARABES					
Jarabe de maíz	3	0.998	1.72	0.996	1.86
Jarabe de azúcar de caña	1	0.984	4.3	0.976	4.86
Jarabe de azúcar invertido	2	0.995	2.5	0.993	2.47
ESTANDARES					
Glucosa	6	0.999	0.583	0.999	1.69
Fructosa	6	0.999	0.377	0.99	3.15
Sacarosa	4	0.999	0.552	0.997	1.55

Tabla 12. Parámetros estimados para los diferentes azúcares estándar como adulterantes en miel de abeja usando el método de calibración PLS.

	ESTANDAR GLUCOSA	ESTANDAR FRUCTOSA	ESTANDAR SACAROSA
Concentración	Concentración	Concentración	Concentración
Actual %	Predicha de jarabe % $R^2 = 0.999$ 6 FACTORES	Predicha de jarabe % $R^2 = 0.999$ 6 FACTORES	Predicha de jarabe % $R^2 = 0.999$ 4 FACTORES
10	10.27	10.23	10.19
20	20.31	21	20.17
30	30.23	30.34	29.74
40	39.39	40.01	40.59
50	50.29	49.49	50.45
60	59.76	59.98	59.12
70	69.84	69.96	69.86
80	80.04	80.26	79.67
90	90.47	89.87	90.4
100	99.73	100.1	100.1

Tabla 13. Parámetros estimados para los diferentes adulterantes en miel de abeja usando el método de calibración PLS.

	JARABE DE MAIZ	JARABE DE AZÚCAR DE CAÑA	JARABE DE AZÚCAR INVERTIDO
Concentración Actual %	Concentración Predicha de jarabe % R ² =0.998 3 FACTORES	Concentración Predicha de jarabe % R ² =0.984 1 FACTOR	Concentración Predicha de jarabe % R ² =0.995 2 FACTORES
10	9.92	7.45	10.34
20	20.15	18.65	17.89
30	29.64	30.93	32.29
40	38.79	43.13	43.42
50	51.28	53.95	49.92
60	63.39	62.34	54.81
70	69.41	72.82	70.95
80	77.82	75.11	79.83
90	90.56	81.9	90.67
100	99.34	103.9	99.85

Todos los métodos de calibración proporcionaron resultados satisfactorios para la estimación del adulterante (jarabes y estándares) en miel. Las pruebas de validación con PLS y PCR mostraron que el método PLS tiene precisión mayor. Los resultados obtenidos para los estándares y jarabes muestran altos coeficientes de determinación y bajos errores de calibración (SEC) y de predicción (SEP), indicando que la técnica espectroscópica es capaz de predecir el contenido de adulterante en todas las muestras de miel estudiadas por espectroscopia infrarroja y análisis multivariado PLS.

En la tabla 14. Se muestra como un ejemplo de aplicación de la metodología propuesta en este trabajo de investigación se encuentra la predicción de adulteración de mieles de abeja adquiridas como auténticas directamente de comerciantes de miel y apicultores. Puede observarse que estas muestras de miel presentan exceso de adulterante.

Tabla 14. Muestras de miel con exceso de adulterante.

Muestras adulteradas con jarabe de maíz	
M9	55.79 %
M13	62.23 %
M22	66.14 %
Muestras adulteradas con jarabe de azúcar de caña (sacarosa)	
M10	44.54 %
M11	38.94 %
M12	60.98 %
M8	63.15 %
M26	61.07 %

CAPITULO IV

Humedad en la miel

4.1. Análisis de humedad en muestras de miel de la zona centro del país mediante (PCA, *Principal Component Analysis*)

El contenido de agua es una de las características importantes que posee la miel de abeja porque influye en el peso específico, en la viscosidad, en el sabor, y condiciona por ello la conservación, la palatabilidad, la solubilidad y, en definitiva el valor comercial. Mientras que el porcentaje de humedad permanezca por debajo de 18% será difícil que un microorganismo pueda reproducirse en ella. Por encima de ese valor pueden aparecer procesos fermentativos (Defernez et. al, 1995).

Hoy en día, diversas técnicas se aplican para determinar la composición elemental y las propiedades fisicoquímicas de la miel y otros alimentos. Entre las nuevas técnicas analíticas, la espectroscopia FTIR, basada en la absorción de la luz infrarroja por la materia, parece poseer un gran potencial para la determinación cualitativa y cuantitativa de los principales componentes químicos de los alimentos. Un total de 36 muestras de miel de abeja se utilizaron para este análisis. La Tabla 15 muestra el contenido porcentual de humedad de las muestras de miel que se utilizaron en esta investigación. La determinación se hizo por el método de refractometría, y se observa que existen variaciones porcentuales del contenido de humedad en cada una de las muestras recolectadas. Siendo la muestra de San Luis Potosí la que presento menor contenido de humedad, 13 % en comparación con las muestras de la sierra norte de Puebla, que presentaron los más altos contenidos de humedad entre 25 y 26 %, incluso se rebasa lo permitido por la norma. Es evidente que el contenido de humedad es bajo en las muestras de miel que se obtiene de las llanuras en comparación con las de las zonas montañosas. Miel con menor contenido de humedad tendrá una vida útil más larga.

Tabla 15. Contenido de humedad en muestras de miel de la Región central del país (Puebla-Tlaxcala), así como de algunas otras localidades del país.

Muestras de Miel		
No. De Muestra	Lugar de procedencia	% Humedad
1	Huaquechula, Pue.	17.9
2	Zacatempa, Pue.	17
3	Tochimilco, Pue.	14
4	Tlaxcala, Tlax.	16.2
5	Tlaxcala, Tlax	16.3
7	Atlixco Cabrera, Pue.	13.5
8	Santo Domingo Atoyatempa, Pue.	16.9
9	Axocopan, Pue.	15.5
10	La Trinidad Tepango, Pue.	14.1
11	Santa Lucia Cosamaloapan, Pue	15.5
12	Santa Ana Xalmimilulco, Pue.	14.6
13	Teyuca, Pue.	13.8
14	San Juan Ocotepc, Pue.	15.5
20	Tlaxcala, Tlax.	18.9
19	Atlixco, Pue.	15.8
21	Huauchinango, Pue.	16.9
22	Tianguistenco, Edo de México	14.7
24	Rio Verde, S.L.P.	17.3
25	La galarza, Pue.	16.8
26	Los Molinos, Pue.	16
32	Mizatlan, Ver.	15.8
34	Tampico, Tamp.	14.2
35	Tampico, Tamp.	16.2
36	Tierra Colorada, Gro.	15.1
37	Papantla, Ver.	15.6
38	Calpulalpan, Tlax.	15.4
39	Puebla, Pue.	16.5
40	Atlixco Champusco, Pue.	15.3
41	Atlixco Cabrera, Pue.	15.9
42	Piedra buena, Pue.	17.2
43	San Luis Potosí, S.L.P.	13
44	Cuetzalan 2007, Pue.	25.5
45	Cuetzalan 2008, Pue.	25.1
46	Cuetzalan 2009, Pue.	24.2
47	Panal, Camp.	20.1
48	Mérida, Yuc.	18.7

De acuerdo a los valores encontrados en las mieles estudiadas, los porcentajes de humedad en algunas muestras superaron los parámetros máximos establecidos concluyéndose que por este motivo en las mismas puede existir la posibilidad de fermentación durante el almacenamiento debido a la actividad de levaduras osmófilas (Molan, 1992a).

Muestras de zonas de la sierra norte de Puebla presentaron altos contenidos de humedad, esto se debe a que el clima de donde provienen estas muestras influye para que el contenido de humedad aumente en relación con las demás muestras. La precipitación pluvial representa un factor típico, y es de esperarse que donde ésta sea elevada, lo sea también la humedad relativa; lo que influye en el contenido de humedad de la miel madura. Valega, 2008, señaló que en los trópicos el contenido de humedad de la miel puede ser alto; debido a que las abejas tienen dificultad en evaporar el agua frente a la alta humedad relativa en el aire.

El espectro FTIR de miel es dominado por la absorción de azúcares, en la región de $750\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$, sin embargo la presencia de agua puede ser fácilmente identificada por la observación de una banda ancha en la región de $3200\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$, que es característica de las vibraciones de extensión del grupo funcional --OH . Existe además otra banda de absorción en el intervalo de vibración de $1500\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$, siendo el pico característico de flexión H--O--H en 1644 cm^{-1} . El agua tiene 3 modos de vibración en el espectro Infrarrojo. Dos modos son de tensión y uno de flexión. La tensión puede ser simétrica cuando los dos enlaces O--H se alargan al mismo tiempo. En una tensión asimétrica un enlace O--H se alarga, mientras que el otro enlace O--H se comprime. La flexión de tipo tijera se produce cuando el ángulo H--O--H disminuye y aumenta de manera alternada (Wahdan, 1998). La Figura 37 muestra los espectros FTIR de las diferentes muestras de miel analizadas en la región de $1500\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$. Se observa la banda ensanchada centrada alrededor de 1644 cm^{-1} y que está asociada principalmente a la presencia de grupos hidroxilos O--H . Se observan diferentes intensidades de la banda en 1644 cm^{-1} . Estas variaciones de intensidad se asocian directamente al contenido de humedad en cada una de las muestras de miel dependiendo del

lugar geográfico donde fueron recolectadas.

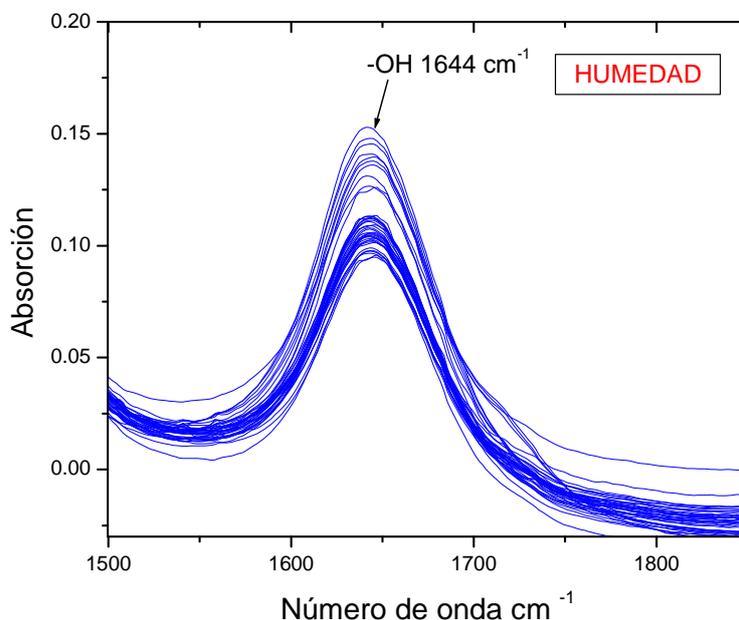


Figura 37. Espectro FTIR típico de muestras de miel auténticas mostrando la banda de absorción del enlace H-O-H en la región de 1644 cm^{-1} .

El desarrollo de modelos Quimiométricos basados en la señal infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR-ATR) ha demostrado ser una opción atractiva para identificar además de las adulteraciones, para determinar simultáneamente la composición química, como la humedad y los azúcares.

En la figura 38 se observa la gráfica de cuentas o nube de puntos con las dos primeras componentes PC1 y PC2 que se obtuvo mediante el análisis PCA de los espectros FTIR de las muestras de miel en el rango de longitud de onda de $1500\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ (región que describe la presencia de humedad) para la discriminación o clasificación de las muestras de miel de acuerdo a sus contenidos de humedad. El diagrama PCA muestra que existe una separación en dos grupos de muestras de diferente contenido de humedad. Un grupo corresponde a muestras de miel con un contenido de humedad de entre 13 y 20 % de humedad y el otro grupo

que corresponde a muestras de miel que tienen un contenido de humedad superior al 20 %.

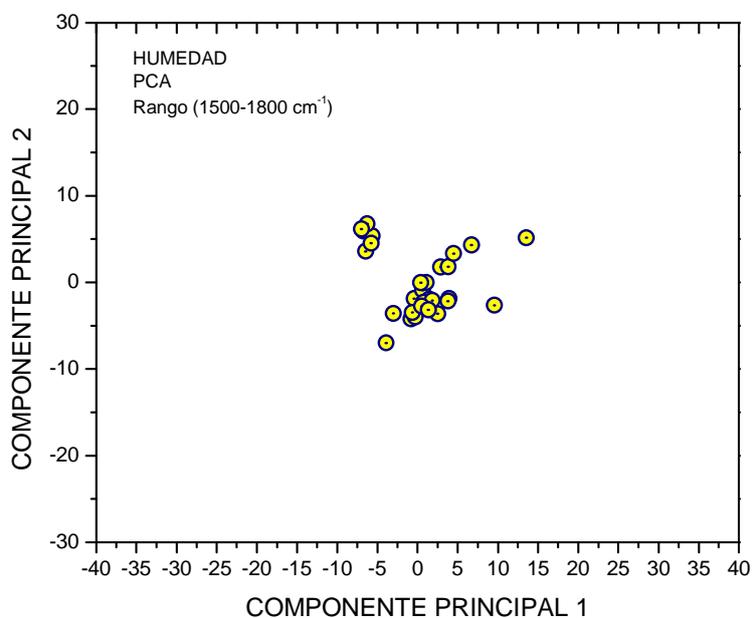


Figura 38. Gráfica de cuentas o nube de puntos obtenida mediante análisis PCA en muestras de miel de abeja en el rango espectral de $1500-1800\text{ cm}^{-1}$, la cual separa el grupo inicial de muestras en dos grupos con distinto contenido de humedad.

La figura 39 muestra la gráfica de cuentas o nube de puntos 3D usando las tres primeras componentes PC1, PC2 y PC3 obtenidas mediante PCA de los espectros FTIR de las muestras de miel en el rango de número de onda de $1500-1800\text{ cm}^{-1}$.

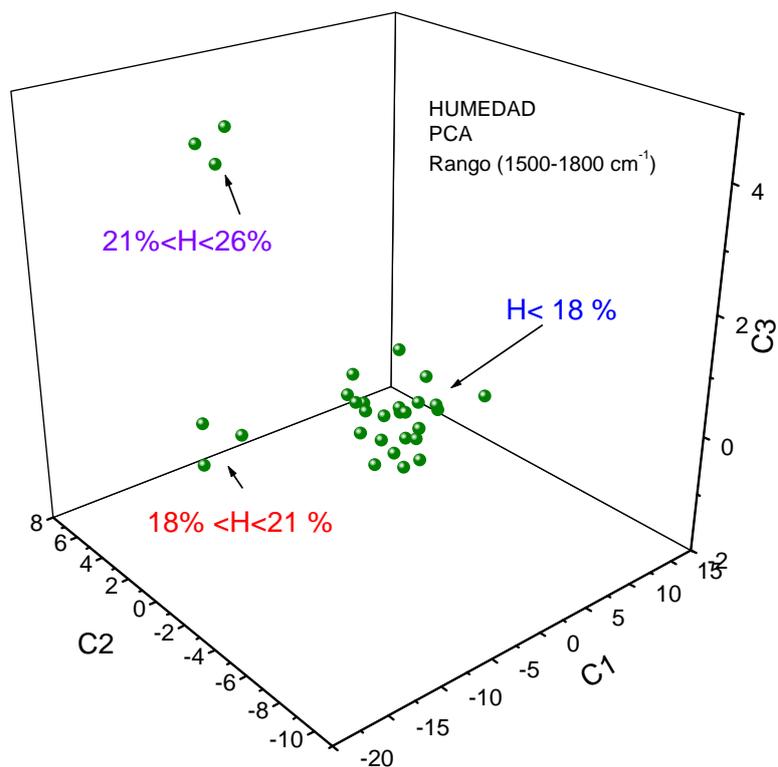


Figura 39. Gráfica de cuentas o nube de puntos 3D de humedad obtenida mediante análisis PCA en muestras de miel de abeja en el rango espectral de 1500-1800 cm⁻¹.

En la figura 40 se observan los espectros FTIR de muestras de miel pero ahora para el rango espectral de 3100-3600 cm⁻¹. Se observa claramente la banda de absorción de 3383 cm⁻¹ que es causada por la vibración -OH de extensión de los enlaces de hidrógeno y oxígeno.

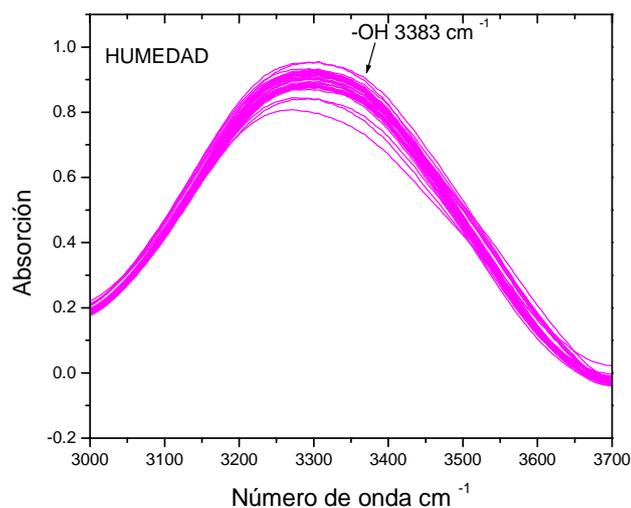


Figura 40. Espectro FTIR típico de muestras de miel auténticas mostrando la banda de absorción del enlace -OH centrada en 3383 cm⁻¹

En la figura 41 se muestra la gráfica de cuentas o nube de puntos de las dos primeras componentes PC1 y PC2 que se obtuvo mediante PCA de los espectros FTIR de las muestras de miel en el rango de número de onda de 3100-3600 cm⁻¹ para la discriminación de las muestras de miel de acuerdo con sus contenidos de humedad. Se observa una correcta clasificación de las muestras por PCA en base al contenido de humedad, las muestras tienden a agruparse en dos grupos al igual que en el rango de 1500-1800 cm⁻¹ uno que corresponde a las muestras con un contenido de humedad menor al 20 % y otro grupo con un contenido de humedad mayor al 20 %.

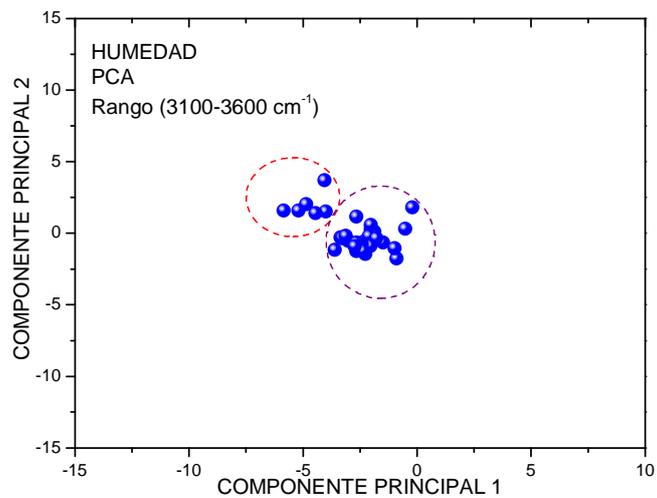


Figura 41. Gráfica de cuentas o nube de puntos de humedad obtenida mediante análisis PCA en muestras de miel de abeja analizadas en el rango espectral de 3100-3600 cm⁻¹.

4.2. Determinación del contenido de humedad en muestras de miel empleando regresión de componentes principales (PCR, *Principal Component Regression*).

La figura 42 muestra la curva de calibración del contenido de humedad en las muestras de miel analizadas en el rango de número de onda de 1500-1800 cm^{-1} .

Se obtuvo un valor R^2 de 0.878 para la relación entre el valor de humedad (medida por refractometría) y el valor predicho usando FTIR mediante regresión de componentes principales PCR.

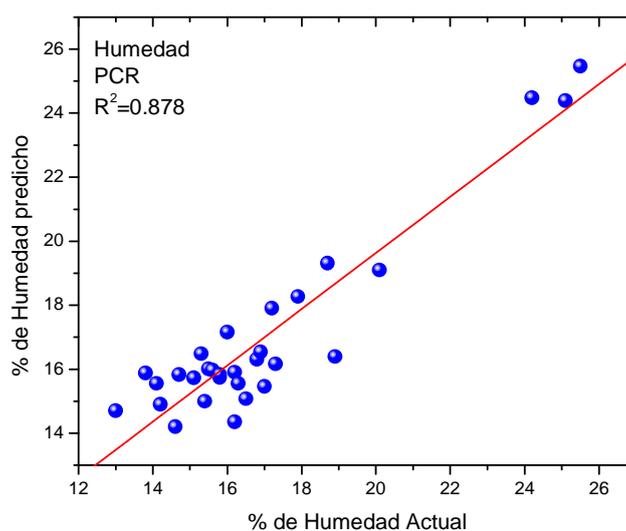


Figura 42. Curva de calibración obtenida por Regresión de Componentes Principales PCR. Esta curva predice el contenido de humedad en miel y fue calculada utilizando en el rango espectral de 1500-1800 cm^{-1}

De igual manera se realizó la curva de calibración para el contenido de humedad mediante PCR pero ahora en el rango de 3100-3600 cm^{-1} . Se obtuvo un valor R^2 de 0.50. Lo que sugiere que este último rango no es tan confiable para predecir el contenido de humedad en miel. Esto puede deberse a que en el rango de 3100-3600 cm^{-1} se encuentran presentes otros enlaces que podrían

influir en el análisis. A diferencia de este último, el coeficiente de correlación que se obtuvo en el rango de 1500-1800 cm^{-1} fue mayor (0.878) y es el adecuado para realizar predicciones de contenido de humedad. En la tabla 16 se presentan los valores predichos de humedad por espectroscopia infrarroja en las muestras de miel utilizando este rango por PCR.

Tabla 16. Determinación de humedad en muestras de miel mediante regresión de componentes principales PCR. $R^2 = 0.878$, S.D=1.032

No. de Muestra	Lugar de procedencia	% Humedad actual Refractometría	% de Humedad Predicha FTIR	Error
1	Huaquecula, Pue.	17.9	18.26	0.36
2	Zacatempa, Pue.	17.0	15.46	1.53
4	Tlaxcala, Tlax.	16.2	15.90	0.29
5	Tlaxcala, Tlax.	16.3	15.55	0.74
8	Santo Domingo Atoyatempa	16.9	16.54	0.35
10	La Trinidad Tepango, Pue.	14.1	15.55	1.45
11	Santa Lucía Cosamaloapan, Pue.	15.5	16.01	0.51
12	Santa Ana Xalmimilulco, Pue.	14.6	14.20	0.39
13	Teyuca, Pue.	13.8	15.88	2.08
20	Tlaxcala	18.9	16.39	2.50
19	Atlixco, Pue.	15.8	15.74	0.05
22	Edo de México Tianguistenco	14.7	15.83	1.13
24	Rio Verde San Luis Potosí	17.3	16.16	1.13
25	La galarza, Pue.	16.8	16.31	0.48
26	Los Molinos, Pue.	16.0	17.15	1.15
32	Miel de abeja pura Mizatlan, Veracruz	15.8	15.83	0.03
34	Nova miel Tamaulipas	14.2	14.89	0.69
35	Nova miel Tamaulipas	16.2	14.35	1.84
36	Tierra Colorada Guerrero	15.1	15.72	0.62
37	Papantla veracruz	15.6	15.97	0.37
38	Calpulalpan, Pue.	15.4	14.99	0.40
39	Miel pura de puebla, Pue.	16.5	15.07	1.42
43	San Luis Potosi.	13.0	14.70	1.70
44	Cuetzalan 2007, Pue.	25.5	25.46	0.03
45	Cuetzalan 2008, Pue.	25.1	24.38	0.71
46	Cuetzalan 2009, Pue.	24.2	24.48	0.28
42	Miel piedra buena, Pue.	17.2	17.90	0.70
40	Atlixco champusco, Pue.	15.3	16.48	1.18
47	Campeche	20.1	19.09	1.00
48	Merida, Yucatán	18.7	19.31	0.61

4.3. Determinación del contenido de humedad en muestras de miel empleando Regresión Parcial por Mínimos Cuadrados (PLS, Partial Least Squares).

La rutina de análisis PLS calculó el rango óptimizado por el programa Quant en 1320–1990 cm^{-1} ya que éste fue el mejor para obtener un modelo de calibración con los mejores valores de R^2 , SEC y SEP. En la figura 43 se presentan las curvas de calibración y validación para humedad.

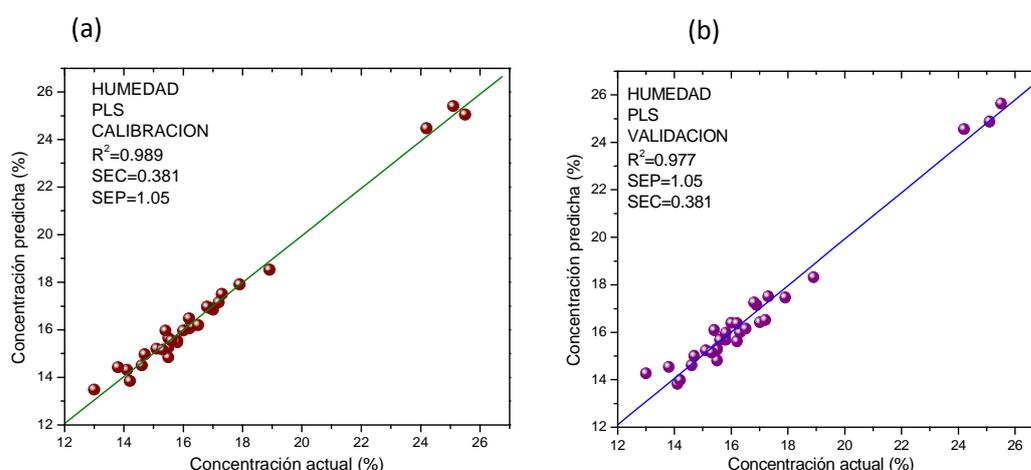


Figura 43. Modelo de (a) Calibración y (b) Validación en segunda derivada para predicción de humedad en muestras de miel de abeja de la zona centro del país mediante análisis PLS.

Los resultados obtenidos mostrados en la Fig. 43 lucen aceptables, debido a que el coeficiente de determinación en la calibración fue de $R^2=0.989$ y en la validación de $R^2=0.977$. En la Tabla 17 se muestran los valores predichos de humedad en miel de abeja de las muestras analizadas en este trabajo mediante PLS. Comparando las tablas 16 (PCR) y 17 (PLS) se observa de manera clara que el análisis PLS presenta un parámetro $R^2=0.989$ mientras que para PCR el parámetro $R^2=0.878$. De manera similar, el análisis PLS presentó una desviación estándar S.D=0.311 mientras que para PCR S.D=1.032. De esta forma se determinó que el método PLS predice de una manera más precisa la determinación del contenido de humedad en miel de abeja por espectroscopia infrarroja y análisis multivariado.

Tabla 17. Determinación de humedad en muestras de miel de abeja mediante regresión de mínimos cuadrados parciales, PLS.R² =0.989, S.D=0.311,SEC=0.381

No. de Muestra	Lugar de procedencia	% Humedad actual	% de Humedad	Error
		Refractometría	Predicha FTIR	
1	Huaquecula, Pue.	17.9	17.91	0.01
2	Zacatempa, Pue.	17.0	16.85	0.15
4	Tlaxcala, Tlax.	16.2	16.06	0.14
5	Tlaxcala, Tlax.	16.3	16.16	0.14
8	Santo Domingo Atoyatempa	16.9	16.92	0.02
9	Axocopan, Pue.	15.5	14.84	0.66
10	La Trinidad Tepango, Pue.	14.1	14.32	0.22
11	Santa Lucía Cosamaloapan, Pue.	15.5	15.26	0.24
12	Santa Ana Xalmimilulco, Pue.	14.6	14.51	0.09
13	Teyuca, Pue.	13.8	14.43	0.63
14	San Juan Ocotepec, Pue.	15.5	15.66	0.16
20	Tlaxcala	18.9	18.53	0.27
19	Atlixco, Pue.	15.8	15.53	0.37
22	Edo de México Tianguistenco	14.7	14.97	0.27
24	Rio Verde San Luis Potosí	17.3	17.51	0.21
25	La galarza, Pue.	16.8	16.97	0.17
26	Los Molinos, Pue.	16.0	15.97	0.03
32	Miel de abeja pura Mizatlan,Veracruz	15.8	15.48	0.32
34	Nova miel Tamaulipas	14.2	13.85	0.35
35	Nova miel Tamaulipas	16.2	16.48	0.28
36	Tierra Colorada Guerrero	15.1	15.21	0.11
37	Papantla veracruz	15.6	15.55	0.05
38	Calpulalpan, Pue.	15.4	15.97	0.57
39	Miel pura de puebla, Pue.	16.5	16.2	0.3
40	Atlixco champusco, Pue.	15.3	15.17	0.13
43	San Luis Potosi.	13.0	13.49	0.49
44	Cuetzalan 2007, Pue.	25.5	25.06	0.44
45	Cuetzalan 2008, Pue.	25.1	25.41	0.31
46	Cuetzalan 2009, Pue.	24.2	24.48	0.28
42	Miel piedra buena, Pue.	17.2	17.16	0.04

CAPITULO V

Azúcares en miel

5.1. Cuantificación de azúcares mayoritarios en muestras de miel de abeja mediante métodos quimiométricos validados por cromatografía de líquidos de alta resolución.

En los últimos años, el análisis de las características químicas y sensoriales de la miel ha recibido cada vez más atención (Al Somal et. al, 1994; Adcock,1962; Arvanitoyannis et. al, 2005; Blanco et. al, 2005; Cordella et .al, 2003; Belitz et. al, 1997; Tien et. al, 1997). La aplicación de una técnica analítica como la espectroscopia infrarroja en combinación con los métodos de análisis multivariado (fusión que se conoce como quimiometría), ha mostrado tener capacidad para determinar diferentes características químicas de la miel (Tuck et. al, 2002; Willix et. al, 1992; Broad et. al, 2002; Cordella et. al, 2003; Serrano et. al, 1994b).

Existe una gran variedad de métodos para el análisis de azúcares en alimentos y bebidas. Los métodos cromatográficos son en la actualidad una herramienta imprescindible para el análisis de hidratos de carbono de manera específica. Esta técnica permite la separación, identificación y estimación cuantitativa del azúcar presente. Las aplicaciones del análisis de azúcares desarrolladas durante los últimos años están orientadas hacia el control de procesos, desarrollo de productos y control de calidad del producto acabado (determinación de la autenticidad y adulteración).

Como una metodología alternativa y complementaria a los métodos separativos existentes para el estudio y cuantificación de azúcares, se ha propuesto la espectroscopia infrarroja, cuyos resultados procesados mediante técnicas de análisis multivariado como el análisis de componentes principales (PCA), regresión de componentes principales (PCR) y regresión parcial por mínimos

cuadrados (PLS) permiten realizar una adecuada determinación y cuantificación de los azúcares mayoritarios en muestras de miel de abeja. En particular, el análisis multivariado por mínimos cuadrados parciales, PLS, el cual es validado con mediciones HPLC de estos azúcares (ver Tabla 18), resulta una metodología práctica, económica y en términos generales viable para cuantificación de azúcares en miel. En la figura 44 se muestran los espectros FTIR de los azúcares mayoritarios que están presentes en la miel como son: glucosa, fructosa y sacarosa. Se observan las principales bandas de absorción para cada azúcar en el rango de 850-1200 cm^{-1} que es la región en el espectro más sensible a la absorción de estos azúcares.

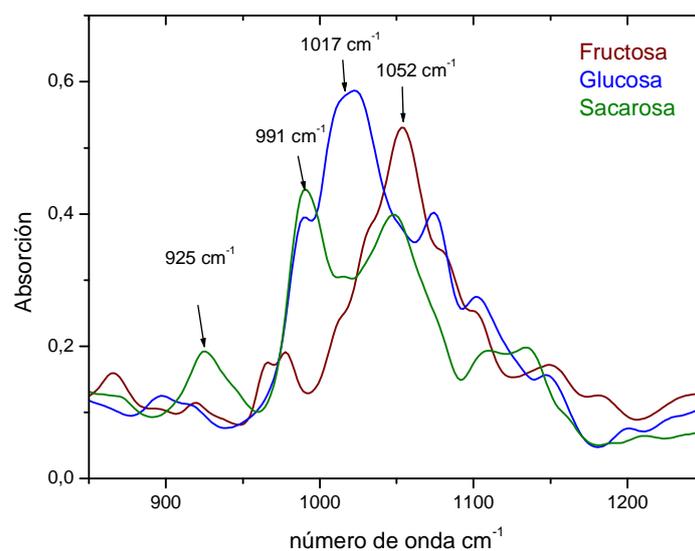


Figura 44. Espectros FTIR de los azúcares mayoritarios (glucosa, fructosa y sacarosa) presentes en miel.

Tabla 18. Composición de azúcares mayoritarios: glucosa, fructosa y sacarosa de muestras de miel de abeja analizadas en este trabajo, determinados mediante cromatografía de líquidos de alta resolución, HPLC.

No. DE MUESTRA	% Glucosa	%Fructosa	% Sacarosa
M1	20.9	51.4	5.62
M2	17.57	44.16	4.32
M5	18.1	37.98	4.6
M7	20.6	15.32	12.2
M16	9.04	18.88	2.52
M18	29.42	34.27	3.45
M19	12.37	28.71	2.76
M20	13.64	32.99	3.41
M21	25.08	54.08	5.53
M25	17.1	43.71	5.33
M32	21.13	52.06	7.5
M33	29.62	48.12	3.72
M34	17.99	42.04	6.34
M35	22.29	46.85	5.58
M36	12.7	28.02	4.86
M37	18.68	44.58	6.82
M38	18.64	44.63	3.25
M39	20.36	46.78	6.28
M43	22.37	46.85	6.99
M44	30.49	32.29	8.94
M45	18.45	32.52	9.57
M46	19.1	33.66	9.18

Se muestran en la Tabla 18 los valores experimentales de los azúcares glucosa, fructosa y sacarosa presentes en 22 muestras miel de abeja determinados por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Las muestras fueron clasificadas como auténticas mediante análisis de componentes principales (PCA). La medición cromatográfica de los azúcares de estas muestras tuvo como objetivo validar las predicciones numéricas obtenidas por quimiometría.

5.2. Calibración y determinación del contenido de azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa y monosacáridos totales) en muestras de miel mediante Regresión de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS).

Se desarrollaron modelos de calibración y de validación para la predicción de la concentración de cada uno de los azúcares mayoritarios (glucosa, fructosa y sacarosa) y monosacáridos en muestras de miel, en base a la información contenida en los espectros FTIR mediante regresión parcial por mínimos cuadrados Parciales con el uso del software QUANT 6.5. La predicción obtenida para cada uno de estos azúcares se validó mediante mediciones de referencia obtenidas por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) mostrados en la Tabla 18.

El primer paso en el desarrollo de los modelos de calibración fue la optimización de los parámetros R^2 , SEC y SEP, cuyo número óptimo de factores fue de 8 a 10. La calidad de los modelos se evaluó sobre la base de dos indicadores: R^2 , SEC (error estándar de calibración) y SEP (error estándar de predicción). El coeficiente de determinación fluctuó entre 0,941 y 0,998. Por su parte el valor de SEC se obtuvo en el rango de 0.148 a 3.66; estos resultados están en congruencia con los reportados en estudios previos (González et. al, 1998). Los resultados obtenidos para los azúcares y monosacáridos muestran altos coeficientes de determinación y bajos errores de calibración (SEC), aunque no muy bajos valores de predicción (SEP). Sin embargo los valores obtenidos de R^2 y SEC después del procedimiento de optimización para cuantificación de los azúcares mayoritarios y monosacáridos resulta ser muy satisfactorio y adecuado, pues la curva de calibración obtenida (construida por mediciones HPLC y mediciones FTIR) se apega de manera adecuada a los resultados experimentales. Los parámetros optimizados de los modelos PLS se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Parámetros de calibración para los diferentes azúcares mayoritarios (glucosa, fructosa y sacarosa) y monosacáridos totales usando el método PLS.

Azúcares	Calibración			Validación	
	No. de Factores	R ²	SEC	R ²	SEP
Glucosa	10	0.998	0.341	0.52	4.85
Fructosa	10	0.941	3.51	0.26	13.5
Sacarosa	8	0.997	0.148	0.83	1.32
Monosacáridos totales	10	0.962	3.66	0.32	19.9

En las figuras 45-48 se muestran las curvas de calibración PLS obtenidas en este estudio, las cuales predicen el contenido de azúcares mayoritarios en muestras de miel de abeja. El “eje x” describe el valor actual determinado mediante HPLC, mientras que el “eje y” describe la predicción (FTIR) para las muestras de miel analizadas en esta sección, las cuales se mencionan en la Tabla 18. Los parámetros R² para todos los azúcares son mayores a 0.94, lo que demuestra que el procedimiento empleado podría ser utilizado para la medición rápida y simultánea de los azúcares en la miel sin ningún tipo de manipulación química ni física (separación por columna). De las predicciones obtenidas para los azúcares mayoritarios se puede observar por el valor de SEC que el contenido de fructosa es el que resulta más “difícil” de predecir y la razón tiene su origen en la ubicación de la frecuencia principal de vibración de la fructosa ubicada en 1052 cm⁻¹, la cual se encuentra en medio de las contribuciones principales del espectro de glucosa ubicadas en 1017 y 1075 cm⁻¹ respectivamente. A pesar de esta desventaja, resulta muy adecuada la predicción de la fructosa y de los demás azúcares, así como de la cantidad total de monosacáridos presentes en miel de abeja. En la Tabla 20 se muestran los resultados de las mediciones de los azúcares mayoritarios obtenidos mediante la técnica de validación HPLC, así como su predicción FTIR obtenida usando el método de análisis PLS.

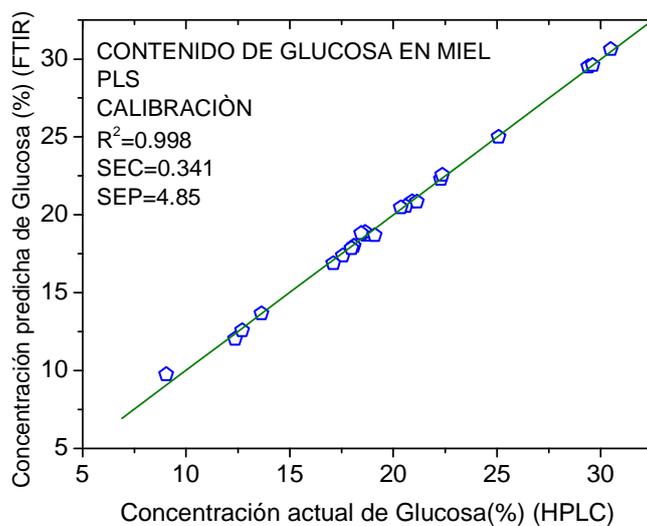


Figura 45. Curvas de calibraci3n que predicen el contenido de glucosa en miel de abeja utilizando el an3lisis PLS.

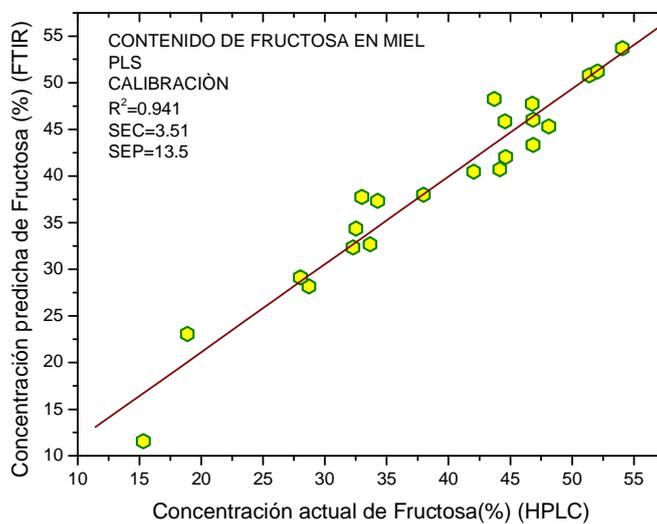


Figura 46. Curvas de calibraci3n que predicen el contenido de fructosa en miel de abeja utilizando el an3lisis PLS.

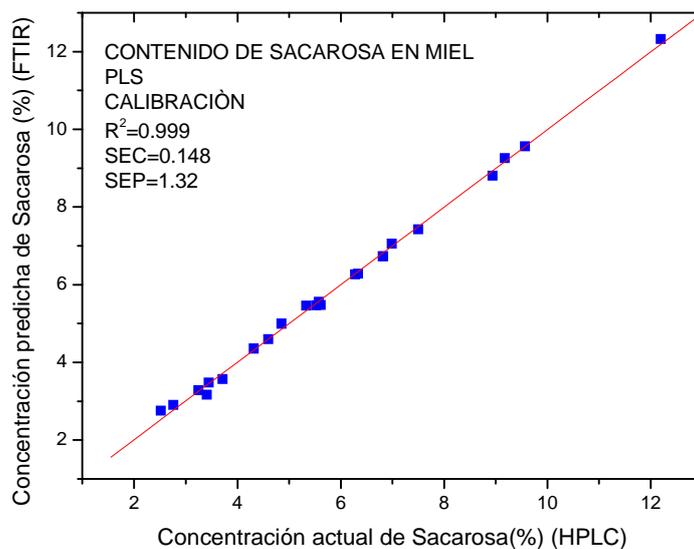


Figura 47. Curvas de calibración que predicen el contenido de sacarosa en miel de abeja utilizando el análisis PLS.

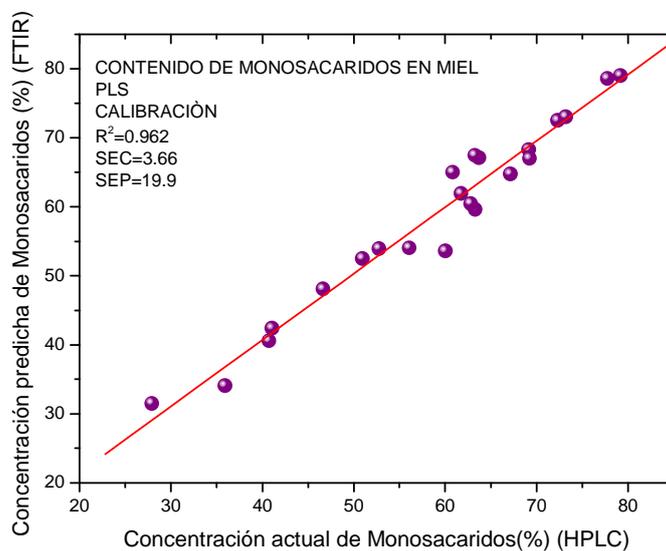


Figura 48. Curvas de calibración que predicen el contenido de monosacáridos totales en miel de abeja utilizando el análisis PLS.

Tabla 20. Comparación de las mediciones obtenidas mediante HPLC y la predicción FTIR del modelo de calibración utilizando PLS.

No. DE MUESTRA	% Glucosa		% Fructosa		% Sacarosa	
	HPLC	FTIR	HPLC	FTIR	HPLC	FTIR
M1	20.9	20.86	51.4	50.8	5.62	5.47
M2	17.57	17.38	44.16	40.72	4.32	4.35
M5	18.1	18.00	37.98	37.98	4.6	4.6
M7	20.6	20.56	15.32	11.56	12.2	12.32
M16	9.04	9.75	18.88	23.06	2.52	2.75
M18	29.42	29.52	34.27	37.32	3.45	3.47
M19	12.37	12.04	28.71	28.17	2.76	2.91
M20	13.64	13.66	32.99	37.74	3.41	3.16
M21	25.08	25,01	54.08	53.69	5.53	5.46
M25	17.1	16.89	43.71	48.28	5.33	5.46
M32	21.13	20.84	52.06	51.23	7.5	7.42
M33	29.62	29.61	48.12	45.32	3.72	3.56
M34	17.99	17.85	42.04	40.47	6.34	6.28
M35	22.29	22.29	46.85	43.34	5.58	5.55
M36	12.7	12.57	28.02	29.13	4.86	4.99
M37	18.68	18.71	44.58	45.87	6.82	6.72
M38	18.64	18.89	44.63	42.05	3.25	3.28
M39	20.36	20.47	46.78	47.75	6.28	6.26
M43	22.37	22.57	46.85	46.05	6.99	7.05
M44	30.49	30.64	32.29	32.34	8.94	8.80
M45	18.45	18.81	32.52	34.36	9.57	9.56
M46	19.1	18.69	33.66	32.67	9.18	9.25

De esta forma se ha mostrado una aplicación que tiene la espectroscopia infrarroja y el análisis multivariado para predecir de una forma practica el contenido de azúcares en muestras de miel de abeja. Los resultados se validan solo una vez mediante mediciones de referencia por cromatografía de líquidos y se construyen modelos de calibración para cada tipo de azúcar, los cuales se pueden determinar posteriormente para un número considerable de muestras con solamente medir su espectro FTIR sin ninguna preparación previa de la muestra. Metodologías como la propuesta en este estudio resultan ser útiles para aplicaciones prácticas en el sector alimentario y agropecuario.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES

- ✓ Mediante el uso de espectroscopia infrarroja y análisis multivariado se implementaron y utilizaron modelos quimiométricos para el estudio de la autenticidad, falsificación, adulteración, cuantificación de azúcares individuales mayoritarios y humedad de la miel de abeja en muestras de la zona centro del país.
- ✓ Se determinaron tres vectores de adulteración de miel de abeja con los azúcares estándar grado analítico (glucosa, fructosa y sacarosa), así como con los jarabes edulcorantes (de maíz, de azúcar de caña y de azúcar invertida) a partir del análisis de componentes principales PCA de muestras adulteradas sistemática e intencionalmente con éstos estándares.
- ✓ Se desarrolló y aplicó un modelo quimiométrico FTIR-(PLS, PCR) que predice el contenido de adulterante presente en muestras de miel de abeja, mediante la determinación de curvas de calibración validadas con ensayos de adulteración intencional controlada.
- ✓ Se desarrolló y aplicó un modelo quimiométrico FTIR-(PLS, PCR) que predice el contenido de humedad en muestras de miel de abeja, mediante la determinación de curvas de calibración validadas con refractometría.
- ✓ Se desarrolló y aplicó un modelo quimiométrico FTIR-PLS que predice el contenido de azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) presente en miel de abeja, mediante la determinación de curvas de calibración validadas con cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).
- ✓ La metodología implementada y aplicada requiere solamente mediciones FTIR de muestras de miel de abeja sin preparación alguna, para cuantificar propiedades químicas y físicas en tiempos de análisis muy cortos contribuyendo así a un ahorro en tiempo de muestreo, reactivos y sin contaminación.

- ✓ El método implementado provee de una herramienta analítica que permite realizar discriminaciones de autenticidad y determinación de adulteraciones, azúcares mayoritarios y humedad en muestras de miel de distintas localidades del país. Esto podría contribuir al estudio y manipulación de la miel en beneficio del consumo nacional y de exportación de este importante producto alimenticio.

PERSPECTIVAS

En esta tesis se ha aplicado la espectroscopia infrarroja FTIR en combinación con métodos de análisis multivariado (PCA, PCR y PLS) para el desarrollo de una metodología de análisis, dirigida a la detección de adulteración y control de calidad de la miel de abeja. El control de calidad en cualquier tipo de industria exige la determinación de numerosos parámetros químicos y también físicos mediante los cuales se quiere asegurar que el producto que se pone a la venta cumplirá todos los requisitos que exige el consumidor. El objetivo principal de este trabajo es poder aplicar esta metodología de detección de adulteración de miel de abeja directamente al sector apicultor de nuestro país donde existe de manera real esta demanda. Proporcionando algunas ventajas de este análisis en comparación con los métodos convencionales como es: Llevando a cabo este análisis in situ y de manera rápida y a un bajo costo. También podría gestionarse la aplicación de esta nueva metodología como técnica de análisis para la detección de adulteración en miel de abeja en la norma mexicana que actualmente la regula en nuestro país.

BIBLIOGRAFIA

- Adcock, D. (1962). The effect of catalase on the inhibine and peroxide value honey. *Journal of Apicultural Research*, v.1, pp: 38-40.
- Aganin, A. V. (1965) Determination of maximum water content of honey by the method of suspended drops. *Trudy saratov. zootekh. vet. Inst.* 13: 316-321.
- Al Somal, N., Coley, K.E., Molan, P.C., Hancock, B.M. (1994). Susceptibility of helicobacter pylori to the antibacterial activity of manuka honey. *J.R. Soc. Med.* 87 (1), 9-12.
- Alamanni, M.C. (1994). Determinazione enzimatica di glucosio, fruttosio e saccarosio e ricerca di polisaccaridi del mais in campioni di miele. *La Rivista di Scienza dell'Alimentazione*, anno 23, n° 1, 81-86.
- Allen, J. F., Kautz, H., Pelavin, R., and Tenenberg, J. (1991). *Reasoning About Plans*. Morgan Kaufmann Publishers: San Mateo, CA.
- Al-Jowder, O., Defernez, M., Kemsley, E. K., & Wilson, R. H. (1999). Mid-infrared spectroscopy and chemometrics for the authentication of meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3210–3218.
- Al-Jowder, O., Kemsley, E. K., and Wilson, R. H. (2002). Detection of adulteration in cooked meat products by mid-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1325–1329.
- A. Rohman, Y.B. Che Man. (2009). Analysis of Water Content in Soap Formulation Using Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *Journal of Applied Sciences Research*, 5(7): 717-721.
- Arvanitoyannis, I., Chalhouh, C., Gotsiou, P., Lydakis-Simantiris, N., & Kefalas, P. (2005). Novel quality control methods in conjunction with chemometrics (multivariate analysis) for detecting honey authenticity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 193–203.

- Arvanitoyannis, I., & Tzouros, N. E. (2005). Implementation of quality control methods in conjunction with chemometrics toward authentication of dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 231–249.
- Arvanitoyannis, I., & Vlachos, A. (2007). Implementation of physicochemical and sensory analysis in conjunction with multivariate analysis towards assessing olive oil authentication/adulteration. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 441–498.
- Arvanitoyannis, I., Tsitsika, E. V., & Panagiotaki, P. (2005). Implementation of quality control methods (physicochemical, microbiological and sensory) in conjunction with multivariate analysis towards fish authenticity. *International Journal of Food Science and Technology*, 40, 237–263.
- B. López, M. J. Latorre, M. I. Fernández, M. A. García, S. García y C. Herrero. 1996. *Química de los Alimentos, Volumen 55, Número, páginas 281-287*
- Beebe, K.R., Pell, R.J. and Seasholtz, M.B. (1998) *Chemometrics: A Practical Guide*, In: Beebe, K.R. (ed). John Wiley & Sons, Inc. pp. 245-339.
- Belitz, H.D. Y Grosch, W. (1997). *Química de los alimentos*. 2ª Ed. Acribia S.A.Zaragoza. pp: 152-173; 923-955
- Blanco, M. and Alcalá, M. (2005) Use of Near-Infrared Spectroscopy for Off-line Measurements in the Pharmaceutical Industry. In: Bakeev, K. (ed) *Process Analytical Technology*. Blackwell publishing, Oxford, pp 362-391.
- Bogdanov S, Martin P, Lullman C. Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie* 1997; Extra issue 1:59.
- Bogdanov, S. (2004). Contaminantes de la colmena. *Vida Apícola.*, 127:50-51.
- Bogdanov, S., Ruoff, K. Y Persano Oddo, L. (2004). Physico-chemical

methods for the characterisation of unifloral honeys: A review. *Apidologie* 35, S4-S17.

- Broad, N., Graham, P., Hailey, P., Hardy, A., Holland, S., Hughes, S., Lee, D., Prebble, K., Salton, N. and Warren, P. (2002) Pharmaceutical applications, guidelines for the development and validation of near-infrared spectroscopic methods in the pharmaceutical industry. In Chalmers, J.M. and Griffiths, P.R. (eds); *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. Vol. 5; John Wiley & Sons Ltd; Chichester, UK, pp. 3590–3610.
- Casas Cardoso Lourdes, Cabrera Díaz Vladimir, Fajardo García Raúl; Determinación de azúcares reductores en miel final por Cromatografía Líquida de Alta Resolución Facultad de Química y Farmacia, UCLV.Cuba,2001.
- Cavia, M.M., Fernández-Muiño, M.A., Gómez-Alonso, E., Montes-Pérez, M.J., Huidobro, J.F., Sancho, M.T. (2002). Evolution of fructose and glucose in honey over one year: influence of induced granulation. *Food Chemistry* 78, 157-161.
- Cordella, C., Faucon, J.-P., Carbol-Bass, D., & Sbirrazzuoli, N. (2003). Application of DSC as a tool for honey floral species characterization and adulteration detection. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 71, 279–290.
- Defernez, M., Kemsley, K. E., & Wilson, R. H. (1995). Use of infrared spectroscopy and chemometrics for the authentication of fruit purees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1, 109–113.
- Downey, G., Briandet, R., Wilson, R. H., & Kemsley, K. E. (1997). Near-mid-infrared spectroscopies in food authentication: Coffee varietal identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4357–4361.
- Edelman, A., Diewock, J., Schuster, K. C., & Lendl, B. (2001). Rapid method for the discrimination of red wine cultivars based on mid-infrared spectroscopy of phenolic wine extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1139–1145.

- European Commission Health & Consumer Protection (2002). Opinion of the Scientific Committee on veterinary measures relating to public health on honey and microbiological hazards – Directorate C- Scientific Opinions. Council Directive 2001/110/EC relating to honey.
- Farias Arizpe Jose Rodolfo. 2004.Revista “Claridades Agropecuarias”.Abril No.128.
- Garcia Diaz Miguel Angel. Sistema Nacional de Identificacion de la miel. San Jose Costa Rica.Mayo 2007.
- González G, González C, Pérez S, Gómez O. Características fisicoquímicas de la miel producida en el estado de Durango [resumen]. IX Seminario de Apicultura. Colima, Colima. 1995.
- Gonzalez, M. I., Márquez, M. E., Sanchez, S. I., & Gonzalez, R. B. (1998). Detection of honey adulteration with beet sugar using stable isotope methodology. *Food Chemistry*, 61, 281–286.
- González, M., de Lorenzo, C. 2002. Calidad sensorial de las mieles de Madrid: (II) correlación con el análisis instrumental. *Alimentaria*. Abril, 103.
- Haaland, D.M. and Thomas, E.V. (1988). Partial least-squares methods for spectral analyses.1.Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information, *Anal. Chem.*, 60(11),1193-1202.
- Huidobro, J.F.; Simal, J.; (1984e). Contribución a la determinación a la determinación de azúcares en la miel. *Anales de la Bromatología*, XXXVI-2, 274-264.
- Humbel, L. (2004). Apiterapia, una solución integral de la salud en un espíritu de desarrollo sostenible. *Vida Apícola.*, 128:14-15.
- Iurlina, M.O. y Fritz, R. (2005). Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. *International Journal of Food Microbiology* 105: 297–304.

- Kelly, D. J. F., & Downey, G. (2005). Detection of sugar adulterants in apple juice using Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3281–3286.
- Kemsley, E. K., Holland, J. K., Defernez, M., and Wilson, R. H. (1996). Detection of Adulteration of Raspberry Purees Using Infrared Spectroscopy and Chemometrics. *J. Agric. Food Chem.*, 44 (12), pp 3864–3870.
- Louveaux, J. (1985). Le miel. *Cah. Nutr. Diét.*, XX, 1, 57-70.
- Mark, H. (2001) Qualitative discriminant analysis. In Burns, D. and Ciurczak, E.W. (eds); *Handbook of Near-Infrared Analysis*, 2nd Edition; Marcel Dekker; New York, pp. 351–362.
- Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., De Jong, S. P., Lewi, J. and Smeyers-Verbeke, S.(1998). Principal Components. In: Vandeginste B.G.M. and Rutan, S.C. (ed), *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B*, Elsevier pp. 207-241.
- Molan, P.C. (1992a). The antibacterial activity of honey. The nature of the activity. *Bee world*, 73 (1): pp: 5-28.
- Molan, P.C. (1992b). The antibacterial activity of honey. Variation in the potency of the antibacterial activity. *Bee world*, 73 (1): pp: 59-76.
- Molan, P.C. Y Russell, K. M. (1989). Non peroxide antibacterial activity in some New Zealand honeys. *J. Apic. Res.*, 27, 62-67.
- Nagai, T., Inoue, R., Kanamori, N., Suzuki, N., Nagashima, T. (2006). Characterization of honey from different floral sources. Its functional properties and effects of honey species on storage of meat. *Food Chemistry* 97: 256-262.
- Noa, M. Y Mas R. (1998). Effect of D-002 on the pre-ulcerative phase of carrageenaninduced colonic ulceration in the guinea pig. *J Pharma Pharmacol.* 50: 549-553.

- Patiño Ramos Ruby. 2008. "EXPORTACIÓN DE MIEL EMPLEANDO LA CARTA DE CRÉDITO IRREVOCABLE Y CONFIRMADA".
- Pomeranz, Y.; Meloan, C. E. Refractometry and Polarimetry. In *Food Analysis*; Pomeranz, Y., Meloan, C. E., Eds.; Chapman and Hall: New York, 1994; pp 430-447.
- Rodriguez-Saona, L. E.; Fry, F. S.; McLaughlin, M. A.; Calvey, E. M. (2001). Rapid analysis of sugars in fruit juices by FT-NIR spectroscopy. *Carbohydr. Res.*, 336, 63-74.
- Rohman Abdul Che Man B. Yaakob. 2009. Potential Use of FTIR-ATR Spectroscopic Method for Determination of Virgin Coconut Oil and Extra Virgin Olive Oil in Ternary Mixture Systems. *Food Anal. Methods*.
- Sabatini, A. (1991). II Miele: origine, composizione, proprietà. *L'Italia Agricola*, 1, 151-160.
- Sanz, B. & Triguero, A. (1970). Composición química y espectro polínico de mieles españoles. *Anales de Bromatología*, XXII, 377-406.
- Sato, T., Miyata, G. (2000). The nutraceutical benefit, Part III: Honey. *Nutricion* 16: 468-469.
- Serra, J. Y Gómez, A. (1986). Determinación de la miel adulterada. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 4, 143.
- Serra, J., Gómez, A. Y Gonell, J. (1987). Composición, propiedades fisico-químicas y espectro polínico de algunas mieles monoflorales de España. *Alimentaria*, 185, 61-84.
- Serrano, B.R. B., Vilanueva, M. T. O., Marquina, A. D. (1994a). La miel. Edulcorante natural. I. Origen, clasificación y propiedades. *Alimentaria*. Junio, 25-28.
- Serrano, B.R.B., Vilanueva, M.T.O., Marquina, A.D. (1994b). La miel. Edulcorante natural. II. Composición, producción y legislación. *Alimentaria*. Junio, 29-35.

- Sivakesava, S., & Irudayaraj, J. (2001b). Prediction of inverted cane sugar adulteration of honey by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Food Science*, 66, 972–978.
- Smith, B.C., 2002, *Quantitative Spectroscopy: Theory and Practice*, Elsevier, USA.
- Taormina, P.J., Niemira, B.A., Beuchat, L.R., (2001). Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *Int.J.Food Microbiol.*69 (3), 217-225.
- Tewari, J., & Irudayaraj, J. (2004). Quantification of saccharides in multiple floral honeys using transform infrared microattenuated total reflectancespectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3237–3243.
- Tien, L. L., & Shau, M. (1997). Quality analysis of Longan honey in Taiwan market. *Journal of Food Science Taiwan*, 24, 479–489.
- Tuck, K. & Hayball P. (2002). Major phenolic compounds in olive oil. *J Nutr Biochem.*13:636-644.
- Tulchinsky, V. M., Zurabiab, S. F., Asankozhoev, K. A., Kogan, G. A., & Khorlin, A. V.(1976). Study of the infrared spectra of oligosaccharides in the region 1000–400 cm₋₁. *Carbohydrate Research*, 51, 1–8.
- Tzayhri Gallardo-Velázquez, Guillermo Osorio-Revilla, Marlene Zuñiga-de Loa, Yadira Rivera-Espinoza. (2009). Application of FTIR-HATR spectroscopy and multivariate analysis to the quantification of adulterants in Mexican honeys. *Food Research International* 42 313–318.
- Valega Orlando Frescura Calidad y Adulteraciones De La Miel.2008.
- Wahdan Han. (1998). Causes of the antimicrobial activity of honey. *Infection*. 26:26.Wedmore, E. B. (1955). The accurate determination of the water content of honey. I.Introcutions and results. *Bee world*, 36 (11),

197-206.

- White, J.W. Jr. (1975). The hive and the honey bee. Dadant & Sons, Inc., Hamilton, Illinois, 491 - 530.
- Willix, D.J., Molan, P.C., Harfoot, C.G. (1992). A comparison of the sensitivity of wound-infecting species of bacteria to the antibacterial activity of manuka honey and other honey. J. Appl. Bacteriol. 73 (5),388-394.
- Wold, S. (1978) Cross-Validatory Estimation of the Number of Components in Factor and Principal Components Models, *Technometrics* 20, 397-405.
- Workman JJ. 2001. NIR Spectroscopy calibration basics. In Burns DA, EW Ciurczak eds. Handbook of Near-Infrared Analysis. New York. 814 p.
- Yande Liu.;Yibin Ying.; Haiyan Yu and Xiaping Fu. Comparison of the HPLC Method and FT-NIR Analysis for Quantification of Glucose, Fructose, and Sucrose in Intact Apple Fruits J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 2810-2815.

APENDICE

Aplicación del análisis multivariado aplicado a curvas espectrales: Quimiometría

A.1.1. Etapas del proceso de modelado

La aplicación de la quimiometría a un problema o proceso real implica el desarrollo y evaluación de un modelo conocido como *modelo quimiométrico*, cuya finalidad es realizar análisis cualitativo y/o cuantitativo, y se desarrolla en varias etapas. De modo general, estas etapas tienen una serie de características comunes. A continuación se describen con más detalle cada una de ellas (Blanco et.al ,2005).

1 - Selección del conjunto de calibración

Las muestras que van a ser utilizadas para el desarrollo del modelo deben ser representativas de toda la variabilidad que pueda darse durante el proceso, con la finalidad de obtener métodos analíticos robustos (Arvanitoyannis et. al, 2007). Según el modelo a desarrollar, la variabilidad que las muestras deben cubrir es distinta. En los modelos cuantitativos, las muestras quizá deban contener esta variabilidad además de cubrir el rango del parámetro a determinar, por ejemplo la concentración del analito.

2 - Métodos de referencia

El desarrollo de modelos cuantitativos requiere el conocimiento previo de las variables que van a ser determinadas. Para ello se utilizan los métodos de referencia que deben proporcionar valores precisos y exactos, ya que de ello dependerá la calidad del modelo a desarrollar (Bogdanov et. al, 2004).

3 - Pretratamiento espectral

En el caso particular de la espectroscopia infrarroja, una vez obtenidos los espectros MIR de las muestras seleccionadas, puede ser necesario aplicar un pretratamiento espectral que permita aumentar la relación señal/ruido y por ende acrecentar la señal correspondiente al analito de interés. No todos los

pretratamientos consiguen ambos objetivos simultáneamente, por lo que la selección del más apropiado puede ser diferente según sea el caso.

4- Selección, cálculo y evaluación del modelo quimiométrico

El cálculo del modelo quimiométrico seleccionado (cualitativo o cuantitativo) se realiza con un conjunto de muestras llamadas grupo de calibración. Durante el desarrollo del modelo se evalúan distintos parámetros implicados en el cálculo (pretratamiento e intervalo espectral, umbral de identificación, número de factores, errores de calibración, entre otros). Una vez obtenido el modelo, su capacidad predictiva es evaluada mediante un segundo conjunto de muestras, independiente al anterior. En caso de la obtención de resultados de predicción no satisfactorios, el modelo debe ser recalculado (Beebe et.al,1998).

A.1.2. Análisis cualitativo

El análisis de componentes principales (PCA) es un método estadístico multivariante de simplificación o reducción de variables que permite visualizar en un espacio de 2 ó 3 dimensiones, cuan similares o diferentes son un grupo de muestras entre sí (Molan et. al, 1989). La dimensión de una tabla de casos variables con datos cuantitativos, para obtener otra de menor número de variables, combinación lineal de las primitivas, que se denominan componentes principales (PC) o factores, cuya posterior interpretación permitirá un análisis más simple del problema estudiado. El PCA se considera una técnica exploratoria y de pretratamiento de los datos (reducción de dimensiones), como paso previo a la obtención del modelo de calibración.

El PCA es una familia de técnicas computacionales relacionadas con el aislamiento de las fuentes de variación en un conjunto de datos. Esta variación debe interpretarse como información, por tanto, esta operación equivaldría a extraer información de ese conjunto de datos, es decir, encontrar lo que hace a una muestra diferente de otra. El PCA también cuantifica la cantidad de información útil contenida en los datos, frente al ruido presente en los mismos.

Los datos de partida en un PCA son, en general, los contenidos en la tabla de casos-variables $n \times p$, (por ejemplo las absorbancias de espectros MIR) El proceso aborda seguidamente el cálculo de las componentes principales. Los componentes C serán combinaciones lineales de las p variables x_1, \dots, x_p de la forma:

$$C_1 = a_{11}x_1 + \dots + a_{1p}x_p$$

.

.

.

$$C_p = a_{p1}x_1 + \dots + a_{pp}x_p$$

Donde los a representan los pesos de cada variable en cada componente.

Existirán tantos componentes $C_1 \dots C_p$ como número de variables. Cada componente explica una parte de la varianza total, considera ésta como una manera de valorar la información total de la tabla de datos. En PCA se suele utilizar el concepto varianza explicada, que mide el porcentaje de la varianza total que es explicado hasta la componente principal en cuestión (se trata de una varianza acumulada). Si se consigue encontrar pocos componentes (k) capaces de explicar casi toda la varianza total, podrán sustituir a las variables primitivas. Normalmente, sólo las primeras componentes principales contienen información útil, mientras que las últimas sobre todo describen ruido, por ello es útil estudiar sólo las primeras componentes principales (por lo general las primeras tres) en lugar del conjunto de datos de partida no sólo porque reduce la complejidad de la matriz de datos, sino también porque asegura que el ruido no es confundido con información (Molan, 1992b). La interpretación de los resultados obtenidos con PCA para una clasificación, se lleva a cabo a partir de una representación de los *scores* o *cuentas* de las muestras de un PC frente a los *scores* de otro(s) PC. Si existe una relación entre las muestras, en el gráfico de los *scores*, los puntos

aparecerán agrupados; mientras que si las muestras no se asemejan entre si, los puntos aparecerán dispersos entre si (Noa et. al,1998).

Geométricamente, el PCA es un cambio en la dirección y dimensionalidad de los ejes. Busca las direcciones ortogonales que explican la máxima variabilidad de las muestras y las utiliza como nuevos ejes de coordenadas llamados componentes principales (PCs) para representarlas. El primer componente principal es la dirección que explica la máxima variabilidad; el segundo se escoge de tal forma que sea perpendicular al primero y que explique la máxima variabilidad una vez extraída la explicada por el primer componente principal, y así sucesivamente. Para poder definir estos nuevos ejes se utilizan sus *loadings* o cargas que son los cosenos de los ángulos que forman con los ejes antiguos. Los *scores* son las coordenadas de las muestras en estos nuevos ejes.

La técnica de componentes principales es debida a (Hotelling, 1933), aunque sus orígenes se encuentran en los ajustes ortogonales por mínimos cuadrados introducidos por Pearson (1901). Su utilidad es doble:

- a) Permite representar óptimamente en un espacio de dimensión pequeña, observaciones de un espacio general p-dimensional. En este sentido, los componentes principales es el primer paso para identificar las posibles variables latentes (no observadas) que generan los datos.
- b) Permite transformar las variables originales, en general correlacionadas, en nuevas variables no correlacionadas, facilitando la interpretación de los datos.

Este método permite analizar datos “*en bruto*” o estandarizados, en una matriz de correlación o una matriz de covarianza. El propósito de este análisis es reducir el número de dimensiones de tal manera que se puedan visualizar fácilmente las variables, representando un alto porcentaje del conjunto de datos. Todo este procedimiento se realiza a través del análisis de la variancia y distancias entre las muestras, reducir el número de variables de un conjunto mayor, que puedan ser utilizadas en diferentes análisis o crear un conjunto completamente nuevo con menor número de variables para reemplazar parcial o completamente el conjunto original de variables. Herrero y Peña 1993, demostraron que el método estadístico PCA podía ser usado con éxito para la clasificación geográfica correcta de mieles

de distintos orígenes.

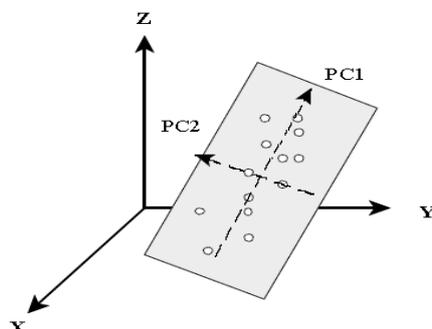


Figura 49. Interpretación geométrica de un PCA.

La dificultad en la interpretación de los componentes principales estriba en la necesidad de que tengan sentido y midan algo útil en el contexto del fenómeno estudiado. Por tanto es indispensable considerar el peso que cada variable original tiene dentro del componente elegido, así como las correlaciones existentes entre variables y componentes principales. Un componente es una función lineal de todas las variables, pero puede estar muy bien correlacionado con algunas de ellas, y menos con otras. En este sentido, cada variable puede ser representada como una función lineal de los k componentes retenidos, donde los pesos o cargas de cada factor (cargas factoriales o *factor loadings*) en la variable coinciden con los coeficientes de correlación. El cálculo matricial permite obtener de forma inmediata la tabla de coeficientes de correlación variables-componentes ($p \times k$), que se denomina matriz de cargas factoriales:

$$x_1 = r_{11}C_1 + \dots + r_{1k}C_k$$

.

.

.

$$x_p = r_{p1}C_1 + \dots + r_{pk}C_k$$

Estas ecuaciones, contrarias a las inicialmente planteadas, son de mayor utilidad

en la interpretación de los componentes.

Aparte de los *loadings*, otro conjunto de atributos que caracteriza a cada componente de un modelo de CP son los *scores* o *cuentas*, que describen las propiedades de las muestras. Los *scores* describen la estructura de datos en términos de patrones de muestra y sobre todo muestran diferencias o parecidos entre muestras. Cada muestra tiene un *score* en cada CP, que refleja la posición de la muestra a lo largo de ese CP.

Un dato discrepante u *outlier* es una muestra que parece tan diferente de las demás que puede que no sea bien descrita por el modelo o que ejerza demasiada influencia sobre él. Como consecuencia, es posible que uno o más componentes del modelo se dediquen exclusivamente a intentar describir porqué esa muestra es diferente de las demás, incluso aunque esto sea irrelevante para la estructura presente en las otras muestras.

En PCA, los datos discrepantes han sido detectados utilizando, de forma conjunta, las gráficas de *scores*, los residuos y el *leverage*:

- Las gráficas de *scores* muestran el patrón de la muestra de acuerdo con una o dos componentes y permiten detectar muestras que estén muy alejadas del resto y que podrían ser datos discrepantes.
- Residuos: miden en qué medida las muestras o variables se ajustan al modelo determinado por las CPs. Las muestras con elevados residuos están mal descritas por el modelo y no encajan bien con las demás muestras, por lo que serían posibles datos discrepantes (Wold, 1978).

La distancia de Mahalanobis se basa en cálculos sobre el espacio de los componentes principales. De un modo análogo, cada clase se define como una elipse obtenida a partir de un PCA. La identificación de la muestra se realiza a través de la diferencia entre el centroide de la clase con la muestra desconocida (Mark, H. ,2001). Su uso en la evaluación de la autenticidad de los productos alimenticios ha sido reportado, por ejemplo: en los purés (Defernez et. al, 1995;Kemsley et. al 1996) , aceite de oliva (Arvanitoyannis et. al, 2007), productos de carne (Al-Jowder et. al 1999), pescado (Arvanitoyannis et. al, 2005),

zum de manzana (Kelly et. al 2005), café (Downey et.al, 1997), productos lácteos (Arvanitoyannis et.al, 2005), entre otros.

A.1.3. Análisis cuantitativo

El proceso de calibración permite establecer la relación entre la respuesta instrumental y la propiedad a determinar, utilizando a tal efecto un conjunto de muestras representativas. La espectroscopia MIR proporciona un gran número de variables respuesta para cada muestra, variables que en general no pueden ser asignadas a un solo analito. Esto ha propiciado el desarrollo de métodos de calibración capaces de relacionar múltiples variables con la propiedad a determinar. Estos métodos son conocidos como Métodos de Calibración Multivariantes. La regresión es un término genérico para todos los métodos que intentan ajustar un modelo a los datos observados con el objetivo de cuantificar la relación entre dos grupos de variables. El modelo obtenido puede ser usado bien para describir la relación entre los dos grupos de variables o bien para predecir nuevos valores. En la regresión lineal simple se obtienen modelos capaces de predecir una variable respuesta conociendo los valores de otra variable correlacionada con ella y que se utiliza como variable predictora. En este apéndice se amplían los métodos de predicción cuantitativos, considerando los casos en los que es necesario tener en cuenta varias variables predictoras para predecir una única respuesta (regresión múltiple), o también para predecir varias respuestas interdependientes (regresión multivariante).

A) Regresión en Componentes Principales (PCR)

En la regresión lineal múltiple, el modelo se obtiene utilizando directamente las variables manifiestas como predictoras. En cambio, en el método de regresión de componentes principales (PCR), se realiza primero un análisis de componentes principales y luego se establece el modelo de MLR utilizando una selección de los componentes principales como variables predictoras. La PCR es, por tanto, una combinación entre PCA y MLR, que se lleva a cabo en dos etapas:

- Análisis de componentes principales: se aplica sobre la matriz de datos inicial X (variables independientes o predictoras), reduciendo las dimensiones de los datos de partida.

- Proceso de regresión: de las variables Y (variables dependientes o respuesta) sobre una selección de las componentes principales obtenidas a partir de X .

La primera etapa convierte la PCR en una herramienta estadística de grandes posibilidades como método de calibración multivariante. El proceso de reducción sólo se aplica a los datos de X , mientras que Y permanece invariante. Hay que tener en cuenta que los datos de Y no influyen en absoluto en la obtención de las componentes principales de X . El paso clave para llevar a cabo una regresión útil, usando los componentes principales como el conjunto de variables independientes, implica la eliminación de los *scores* y *loadings* no significativos de los datos (Massart et.al, 1998).

El primer paso del PCR consiste en realizar una descomposición de la matriz

\mathbf{X} en sus componentes principales:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{P}^T + \mathbf{E}$$

Donde \mathbf{T} es la matriz de scores, \mathbf{P}^T la matriz transpuesta de loadings y \mathbf{E} el residual. Una vez elegido el número de componentes principales que se considere como óptimo para describir la matriz \mathbf{X} , ésta se puede representar por su matriz de scores \mathbf{T} :

$$\mathbf{T} = \mathbf{X}\mathbf{P}$$

Hasta aquí lo que se ha realizado es un PCA, obteniendo a partir de la matriz de datos \mathbf{X} la matriz de scores \mathbf{T} y la de loadings \mathbf{P} . A continuación, la matriz de datos \mathbf{Y} se puede calcular según la expresión:

$$\mathbf{Y} = \mathbf{T}\mathbf{B} + \mathbf{E}$$

siendo \mathbf{B} la matriz de regresores que se halla por mínimos cuadrados conociendo los valores de \mathbf{Y} del conjunto de calibración:

$$\mathbf{B} = (\mathbf{T}^T\mathbf{T})^{-1}\mathbf{T}^T\mathbf{Y}$$

El símbolo $\hat{}$ indica valores calculados. Una vez calculados los regresores y por lo tanto establecido el modelo de calibración, se pueden realizar los cálculos para

predecir un conjunto de nuevas muestras. Se calculan los scores de las muestras de predicción \mathbf{T}^* a partir sus espectros \mathbf{X}^* y de los loadings \mathbf{P} calculados en la calibración:

$$\mathbf{T}^* = \mathbf{X}^* \mathbf{P}$$

y se utiliza la matriz de regresores calculada también en la calibración, junto con los scores de estas muestras, para el cálculo de la propiedad a determinar en las muestras desconocidas:

$$\mathbf{Y} = \mathbf{T}^* \mathbf{B}^*$$

Uno de los principales problemas con PCR es que los componentes principales que mejor representan la matriz de los datos espectroscópicos, \mathbf{X} , pueden no ser los más apropiados para la predicción de las propiedades de los analitos que queremos determinar (Massart et.al, 1998).

El método PCR presenta las siguientes ventajas:

- Reducción de dimensiones del conjunto de datos X : mediante el uso de la PCA, se conserva la máxima cantidad de información posible. Se supone que los componentes minoritarios eliminados contienen ruido o información no relevante relacionada con la matriz Y .
- Relación con las variables originales: puesto que los componentes principales son combinaciones lineales de todas las variables manifiestas, este procedimiento las incluye en el modelo en su totalidad.
- Varianza muy elevada de las componentes principales mayoritarias: esto conduce a una regresión estable, puesto que la varianza de un coeficiente de regresión estimado es inversamente proporcional a la varianza del regresor.
- Fuentes de varianza desconocidas: la PCR permite tener en cuenta en el modelo fuentes de varianza no conocidas por el experimentador y que por ello no se han tenido en, al menos de un modo consciente, en el diseño del bloque Y . Un ejemplo de estas fuentes de varianza desconocidas podría ser una interferencia, una interacción entre el analito y otro componente, etc.

Por su capacidad de adaptación a los factores desconocidos, se dice que la PCR es un método “flexible”, mientras que la MLR, que carece de esa capacidad, es un método “rígido”. Es interesante observar que la capacidad de adaptación es una consecuencia de la reducción de dimensiones, esto es, de la renuncia a intentar explicar toda la varianza contenida en los datos.

B) Regresión Parcial por Mínimos Cuadrados (PLS)

En PCR se utilizan los componentes principales del bloque X como variables predictoras. Sin embargo, los componentes principales interpretan y modelan la varianza contenida únicamente en el bloque X , y por tanto no tienen por qué estar correlacionados con las respuestas. De hecho, ciertas respuestas pueden estar correlacionadas con componentes que expliquen muy poca varianza. En estos casos, la PCR suele dar modelos de regresión con más vectores de los necesarios, y al contrario, algunos vectores importantes pueden quedar excluidos. En la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) se utilizan como variables predictoras vectores que explican menos varianza que los componentes principales, pero a cambio están más correlacionados con las respuestas. Dichos vectores se suelen denominar “variables latentes”. La expresión “variable latente” significa que el vector en cuestión ha sido optimizado desde el punto de vista de su utilización como variable predictora para predecir una respuesta dada o un pequeño grupo de respuestas.

Como sucede en PCR, el máximo número de variables latentes que se pueden extraer es igual al número de variables manifiestas. Sin embargo, en la construcción del modelo de regresión se utilizarán sólo las k primeras variables latentes, siendo k igual al número de fuentes de varianza significativas presentes en el bloque X , que además estén correlacionadas con la respuesta. En PLS, y debido a la participación de la respuesta en la construcción de las variables latentes, éstas son distintas para cada respuesta. Por esta razón, si se quiere predecir otra respuesta, se debe repetir todo el procedimiento. En este sentido, la PLS es distinta de la PCR, en la cual, las variables predictoras (los componentes principales del bloque X) son siempre las mismas, independientemente de cuál

sea la respuesta que se quiera predecir. Básicamente, los *scores* o *factores* de PLS se interpretan de la misma forma que los *scores* de PCA: son las coordenadas de las muestras a lo largo de los componentes del modelo. La única diferencia en PLS es que se pueden considerar dos conjuntos diferentes de componentes, según si se quiere observar la variación en el espacio X o Y .

A partir de este punto, la conversión de los datos en información útil requiere el uso de herramientas matemáticas y estadísticas pertenecientes a la quimiometría que, inicialmente, se utilizan para anular fuentes de variabilidad de la señal.

Durante el desarrollo de modelos de calibración basados en una reducción de variables, uno de los parámetros a determinar experimentalmente es el número de factores necesario para definir el modelo. Cuanto mayor sea el número de factores, el porcentaje de información incluida en el modelo es mayor y los errores de calibración disminuyen, sin embargo la complejidad del modelo aumenta. Es por ello que se debe llegar a una solución de compromiso tratando de obtener el modelo más simple con la mejor capacidad predictiva. Uno de los criterios establecidos para esta selección es la elección del número de factores que suministre el menor error de predicción (Wold et. al, 1978), Haaland et. al ,1988).

El SEC es el error estándar de calibración, una medida del error de predicción expresado en unidades de la medición original (Workman, 2001). Esto está dado por la siguiente ecuación:

$$SEC = \sqrt{\left(\frac{\sum_{i=1}^N (C_i - C_i^*)^2}{N - f - 1} \right)}$$

donde C_i es el valor de la propiedad de interés para la muestra i , estimado usando calibración, C_i^* es el valor conocido de la propiedad para la muestra (p.e. contenido de adulterante), N es el número de muestras usadas para desarrollar el modelo de calibración, y f es el número de factores usados para desarrollar el modelo de calibración.

Por otra parte, la capacidad predictiva de la propiedad de interés al utilizar el modelo de calibración en un conjunto desconocido de muestras (diferentes al conjunto de calibración) está dada por el error estándar de predicción (SEP):

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (c_i - \hat{c}_i)^2}{m}}$$

donde C_i es el valor de la propiedad de interés pronosticada por el modelo de calibración para la muestra i , C_i^* es el valor conocido de la propiedad para la muestra i y m es el número de muestras en el conjunto de predicción.

Después del análisis de componentes principales, el conjunto de muestras aparece formando un elipsoide, en el cual se establece un radio que permitirá la detección de anómalos (“*outliers*”) utilizando la distancia de Mahalanobis global (GH) (se suele emplear un valor de GH de 3). Durante la calibración, es posible eliminar información redundante, identificando las muestras con un espectro muy similar a otras presentes en la misma población, seleccionando así aquellas que recogen la máxima variabilidad.

La PLS presenta las siguientes ventajas en comparación con el método de PCR:

- Se reduce el impacto sobre el modelo de las variaciones del bloque X que no tienen correlación con la respuesta.
- Puesto que se evitan las direcciones del espacio poco correlacionadas con las respuestas, el número óptimo de vectores a incluir en el modelo de regresión suele ser menor que el PCR, con lo que se gana en sencillez, sin perder exactitud en las predicciones.

Según algunos autores, la regresión por mínimos cuadrados parciales es un método mucho más robusto que la PCR ya que los parámetros del modelo no varían mucho cuando se toman nuevas muestras de calibración del total de la población.

A.1.4. Calibración y validación de un modelo de regresión

La validación de un método de ensayo tiene como finalidad demostrar la idoneidad de dicho método para el propósito por el que ha sido diseñado. Para que un método de análisis pueda ser validado, es necesaria la determinación y evaluación de una serie de parámetros que definen la calidad del método de ensayo. Existen numerosas guías para la validación de métodos analíticos (Broad et.al, 2002).

Mediante la validación del método se establece si los parámetros de calidad satisfacen los requisitos de una aplicación analítica concreta. Para ello, se requiere experimentación y comparación con valores de referencia bien conocidos. Los objetivos de una validación analítica son:

- Garantizar la coherencia entre los resultados obtenidos y las necesidades.
- Asegurar la calidad y constancia de la calidad de la información obtenida.
- Caracterizar métodos y herramientas analíticas.

Dependiendo de la naturaleza y la finalidad del método analítico los parámetros a evaluar son distintos. Puesto que se ha utilizado la espectroscopia MIR, y debido a las características de esta técnica, las estrategias para la validación son distintas que para las técnicas convencionales.

Una vez eliminada la información redundante, se procede al cálculo de la ecuación que nos permitirá correlacionar los valores de laboratorio con la información espectral MIR, y obtener así el modelo de calibración necesario para la futura predicción de muestras desconocidas. (p.e. el contenido de adulterante y porcentaje de humedad). Para este proceso, se pueden utilizar diferentes métodos de regresión multivariante como PCR (*“principal component regression”*) y PLS (*“partial least squares”*). La construcción del modelo implica una serie de tratamientos previos de la señal para continuación hallar la relación más simple

entre la señal analítica y la propiedad a determinar, ya sea estableciendo la relación con la concentración de un analito o con parámetros físicos de la muestra, o bien estableciendo las características que definen una clase y fijando las fronteras que la separan de otra u otras clases.

En este paso, el porcentaje de predicción está condicionado por el valor estadístico GH (GH<3 indica que la muestra pertenece a la población).

El objetivo de una calibración consiste en la obtención de ecuaciones predictivas que correlacionen la información espectral con los valores analíticos generados por métodos tradicionales de referencia. Lógicamente, para la calibración, es esencial seleccionar una población de muestras que representen la mayor heterogeneidad del producto a calibrar.

La confiabilidad del modelo de calibración se evalúa inicialmente mediante un proceso de validación cruzada, en el que se calculan distintas ecuaciones y se procede a seleccionar aquella que mejor predice los datos de referencia (la que tiene un valor más alto de coeficiente de correlación y más bajo del error estándar de validación cruzada, es decir menor SEC y SEP). Esta ecuación se valida nuevamente con muestras externas no implicadas en el desarrollo de la calibración, utilizando para ello diversos estadísticos (*e.g.*, desviación estándar del conjunto laboratorial, error estándar de predicción, etc.).

Normalmente, un modelo de calibración se construye a partir de un conjunto de datos de entrenamiento, de forma que el mejor modelo será aquel que ofrezca las mejores predicciones para los datos del conjunto de validación. El criterio de validación se basa en el cálculo del error de predicción, expresado como una suma de cuadrados, *PRESS*, cuya ecuación es la siguiente:

$$PRESS = \sum_{i=1}^m (c_i - \hat{c}_i)^2$$

Donde m es el número total de muestras, c es el valor medido de la propiedad y \hat{c} el valor estimado por el modelo.

En general, la mayoría de los métodos de calibración suelen elegir el valor de PRESS mínimo como criterio para seleccionar el modelo final. Es bastante común utilizar el método de validación cruzada (*cross-validation*). En la validación cruzada, las muestras se dividen en subgrupos o segmentos. Cada vez, se construye un modelo utilizando todos los datos excepto uno de los segmentos, que se utiliza posteriormente para calcular el PRESS. Al final se elige el modelo que posea el mínimo valor de PRESS global. La aproximación más común consiste en desarrollar m procesos de calibración omitiendo una observación cada vez.

Para establecer la bondad del ajuste, es decir, la cantidad de la variable respuesta explicada por las predictoras, se utiliza el *coeficiente de correlación múltiple* r . Los valores del coeficiente de correlación múltiple oscilan entre -1 (correlación negativa perfecta) y 1 (correlación positiva perfecta), mientras que un valor de $r = 0$ indica que no existe correlación. El cuadrado de este coeficiente nos proporciona el *coeficiente de determinación*, que cuantifica los cambios de la variable dependiente que han sido explicados por la ecuación de regresión. Dado que se describe la variable dependiente mediante varias variables, se utiliza el *coeficiente de determinación múltiple*, que viene definido de la siguiente forma:

$$R^2 = \frac{\text{Suma de cuadrados explicada}}{\text{Suma de cuadrados total}}$$

Este coeficiente representa el porcentaje de cambios de la variable dependiente que es explicado, de manera conjunta, por las variables incluidas en la ecuación de regresión. Los valores del coeficiente de determinación múltiple oscilan entre 0 (no existe correlación) y 1 (correlación perfecta). A partir de esto y según la definición, se deduce que uno de los objetivos de la regresión es incrementar el valor de ambos coeficientes (Kelly et. al, 2005).

El objetivo final de todo proceso de calibración es el desarrollo de un método de trabajo de rutina que permita predecir valores de parámetros analíticos sin necesidad de analizar las muestras en el laboratorio por los métodos tradicionales

(mas que solo una vez al inicio). Para ello, una vez obtenida una ecuación robusta, sólo es necesario escanear una muestra y, a partir de la información espectral generada, el modelo quimiométrico predecirá todos los parámetros para los que se haya calibrado éste.