



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

DIFERENCIACIÓN DE MIELES ESPAÑOLAS Y
EXTRACOMUNITARIAS APLICANDO LA
ESPECTROSCOPIA INFRARROJA EN COMBINACION
CON ANALISIS MULTIVARIANTE

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR/A: Sivera Gregori, Clemencia Liset

Tutor/a: Escriche Roberto, M^a Isabel

Cotutor/a: Conchado Peiró, Andrea

Director/a Experimental: Peral Pinto, Ana María

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNIA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL

TRABAJO FINAL DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE
LOS ALIMENTOS



**DIFERENCIACIÓN DE MIELES ESPAÑOLAS Y EXTRACOMUNITARIAS
APLICANDO LA ESPECTROSCOPIA INFRARROJA EN COMBINACIÓN CON
ANÁLISIS MULTIVARIANTE**

Curso Académico 2023-2024

Autora: Clemencia Liset Sivera Gregori

Tutora: Dña. M.^a Isabel Escriche Roberto

Cotutora: Dña. Andrea Conchado Peiró

Directora experimental: Dña. Ana María Peral Pinto

València, julio de 2024

TÍTULO: DIFERENCIACIÓN DE MIELES ESPAÑOLAS Y EXTRACOMUNITARIAS APLICANDO LA ESPECTROSCOPIA INRARROJA EN COMBINACIÓN CON ANÁLISIS MULTIVARIANTE

RESUMEN:

España es un importante productor de miel, sin embargo, las importaciones procedentes de países extracomunitarios han ido en aumento en los últimos años. El problema surge cuando estas mieles se comercializan sin indicar su procedencia de forma adecuada en la etiqueta. Esta situación además de ser fraudulenta, por el incumplimiento de la normativa comunitaria de etiquetado, ocasiona importantes pérdidas económicas para el sector apícola y desconfianza al consumidor de nuestro país. Por ello, el desarrollo de herramientas analíticas sencillas que permitan garantizar si una miel es de origen español, hoy en día es una prioridad. En este sentido, la espectroscopía infrarroja es una opción cada vez más considerada por ser rápida, sencilla y por no necesitar de personal altamente especializado. El objetivo del presente trabajo ha sido evaluar la efectividad de la espectroscopía infrarroja (ATR-FTIR) en combinación con herramientas estadísticas multivariantes para diferenciar mieles españolas y de origen asiático. Se analizó el espectro infrarrojo de 28 mieles chinas (milflores y acacia) y 72 españolas de diferentes procedencias botánicas (milflores, azahar, romero y tomillo). La caracterización fisicoquímica previa de la mieles mostró diferencias significativas entre los 6 grupos con niveles más altos de humedad para las mieles asiáticas (acacia y milfores) sin exceder del límite legislado en ningún caso. Se demostró cierta correlación entre el color y la conductividad, con valores algo elevados para algunas mieles de azahar y romero. Las variables utilizadas para la construcción de los modelos multivariantes fueron las áreas de las bandas seleccionadas de los espectros infrarrojos obtenidos del ATR-FTIR. El modelo permitió predecir la procedencia de las muestras analizadas, teniendo una buena resolución en el origen geográfico, diferenciando las mieles chinas de las mieles españolas. Sin embargo, presentaba dificultades para predecir el origen botánico, existiendo solapamiento entre las mieles monoflorales españolas. Del estudio se concluye que la técnica ATR-FTIR puede aportar valor para la diferenciación de mieles según su procedencia geográfica y, en menor medida para la monofloralidad. Sin embargo, para ser concluyentes con esta afirmación, es necesario aumentar el número de muestras de las categorías de monofloralidad y procedencia.

PALABRAS CLAVES: Miel española, miel extracomunitaria, ATR-FTIR, análisis multivariante.

Autora: Clemencia Liset Sivera Gregori

Tutora: Dña. M.^a Isabel Escriche Roberto

Cotutora: Dña. Andrea Conchado Peiró

Directora experimental: Ana María Peral Pinto

València, julio de 2024

TITLE: DIFFERENTIATION OF SPANISH AND NON-EU HONEYS USING INFRARED SPECTROSCOPY IN COMBINATION WITH MULTIVARIATE ANALYSIS

ABSTRACT:

Spain is an important honey producer, however, imports from non-Eu countries have been increasing in recent years. The problem arises when these honeys are marketed without indicating their origin properly on the label. This situation, in addition to being fraudulent due to non-compliance with EU labeling regulations, causes significant economic losses for the beekeeping sector and mistrust among consumers in our country. For this reason, the development of simple analytical tools to guarantee whether a honey is of Spanish origin is nowadays a priority. In this sense, infrared spectroscopy is an increasingly considered option because it is fast, simple and does not require highly specialized personnel. The objective of the present work was to evaluate the effectiveness of infrared spectroscopy (ATR-FTIR) in combination with multivariate statistical tools to differentiate Spanish and Asian honeys. The infrared spectra of 28 Chinese honeys (milfoil and acacia) and 72 Spanish honeys of different botanical origins (milfoil, orange blossom, rosemary and thyme) were analyzed. The previous physicochemical characterization of the honeys showed significant differences between the 6 groups with higher moisture levels for the Asian honeys (acacia and millefiori) without exceeding the legislated limit in any case. Some correlation was shown between color and conductivity, with somewhat high values for some orange blossom and rosemary honeys. The variables used for the construction of the multivariate models were the areas of the selected bands of the infrared spectra obtained from the ATR-FTIR. The model allowed predicting the origin of the samples analyzed, having a good resolution in the geographical origin, differentiating Chinese honeys from Spanish honeys. However, it presented difficulties in predicting the botanical origin, with overlap between Spanish monofloral honeys. The study concluded that the ATR-FTIR technique can provide value for the differentiation of honeys according to their geographical origin and, to a lesser extent, for monoflorality. However, to be conclusive with this statement, it is necessary to increase the number of samples in the monoflorality and provenance categories.

KEYWORDS: Spanish honey, non-EU honey, ATR-FTIR, multivariate analysis.

Author: Clemencia Liset Sivera Gregori

Academic tutor: M. ^a Isabel Escriche Roberto

Cotutor: Andrea Conchado Peiró

Experimental tutor: Ana María Peral Pinto

TÍTOL: DIFERENCIACIÓ DE MELS ESPANYOLES Y EXTRACOMUNITÀRIES APLICANT L'ESPECTROSCÒPIA INFRARROJA EN COMBINACIÓ D'ANÀLISIS MULTIVARIANT

RESUM:

Espanya és un important productor de mel, no obstant això, les importacions procedents de països extracomunitaris han anat en augment en els últims anys. El problema sorgeix quant aquestes mels es comercialitzen sense indicar la seua procedència de manera adequada en l'etiqueta. Aquesta situació a més de ser fraudulenta, per l'incompliment de la normativa comunitària d'etiquetatge, ocasiona importants pèrdues econòmiques per al sector apícola i desconfiança al consumidor del nostre país. Per això, el desenvolupament d'eines analítiques senzilles que permeten garantir si una mel es d'origen espanyol, hui dia és una prioritat. En aquest sentit, l'espectroscòpia infraroja és una opció cada vegada més considerada per ser ràpida, senzilla y per no necessitar de personal altament especialitzat. L'objectiu del present treball ha sigut avaluar l'efectivitat de l'espectroscòpia infraroja (ATR-FTIR) en combinació amb ferramentes estadístiques multivariants per a diferenciar mels espanyoles i d'origen asiàtic. Es va analitzar l'espectre infraroig de 28 mels xineses (milflors i acàcia) i 72 espanyoles de diferents procedències botàniques (milflors, flor del taronger, romer i timó). La caracterització fisicoquímica prèvia de la mels va mostrar diferències significatives entre els 6 grups amb nivells més alts d'humitat per a les mels asiàtiques (acàcia i milflors) sense excedir del límit legislatiu en cap cas. Es va demostrar una certa correlació entre el color i la conductivitat, amb valors una mica elevats per a algunes mels de flor del taronger i romer. Les variables utilitzades per a la construcció dels models multivariants van ser les àrees de les bandes seleccionades dels espectres infrarojos obtinguts del ATR-FTIR. El model va permetre predir la procedència de les mostres analitzades, tenint una bona resolució en l'origen geogràfic, diferenciant les mels xineses de les mels espanyoles. No obstant això, presentava dificultats per a predir l'origen botànic, existint solapament entre les mels monoflorals espanyoles. De l'estudi es conclou que la tècnica ATR-FTIR pot aportar valor per a la diferenciació de mels segons la seua procedència geogràfica i, en menor mesura per a la monofloralitat. No obstant això, per a ser conclouents amb esta afirmació, és necessari augmentar el nombre de mostres de les categories de monofloralitat i procedència.

PARAULES CLAU: Mel espanyola, mel extracomunitària, ATR-FTIR, anàlisi multivariant.

Autora: Clemencia Liset Sivera Gregori

Tutora: M.^a Isabel Escriche Roberto

Cotutora: Andrea Conchado Peiró

Directora experimental: Ana María Peral Pinto

València, julio 2024

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del proyecto AGROMEL: AGROALNEXT/2022/043 (Técnicas analíticas rápidas para evaluar seguridad, adulteración y trazabilidad en productos de la colmena. Aplicación a un cultivo en transición agroecológica), financiado por la Generalitat Valenciana, Next Generation European Unión y Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia del Gobierno de España.

ÍNDICE GENERAL	
ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
ÍNDICE DE TABLAS.....	II
ÍNDICE DE ECUACIONES	II
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 LA MIEL Y SU RELACIÓN CON EL HOMBRE.....	1
1.2 LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA MIEL.....	2
1.3 EL ORIGEN BOTÁNICO Y GEOGRÁFICO DE LA MIEL.....	4
1.4 ASPECTOS ECONÓMICOS Y LEGISLATIVOS DEL SECTOR APÍCOLA..	5
1.5 TÉCNICAS PARA DETERMINAR LA AUTENTIFICACIÓN DE LA MIEL ...	7
1.6. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER	9
1.7 EL EMPLEO DE HERRAMIENTAS ESTADÍSTICAS EN LA RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS EN EL ÁMBITO ALIMENTARIO.....	11
2. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO.....	12
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	12
2.2 PLAN DE TRABAJO.....	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1 MUESTRAS DE MIEL	13
3.2 ANÁLISIS PARÁMETROS FISCOQUÍMICOS	13
3.3 OBTENCIÓN DE LOS ESPECTROS ATR-FTIR	14
3.4 CREACIÓN DE LA MATRIZ DE DATOS	15
3.5 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
4.1 PARAMETROS FISCOQUÍMICOS	20
4.1.1. Comparación de medias por grupo.....	20
4.1.2. Relación entre los parámetros fisicoquímicos evaluados.....	25
4.2 ESPECTROS INFRARROJOS OBTENIDOS POR ATR-FTIR.....	26
5. CONCLUSIÓN.....	31
6. BIBLIOGRAFÍA	31
7. ANEXOS	38

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Esquema del fenómeno de absorción infrarrojo que tiene lugar en la miel durante el análisis con el equipo ATR-FTIR. Adaptada de: Bruker, 2024.	10
FIGURA 2. Equipo FTIR Agilent Cary 630 empleado para la obtención de los espectros IR. Fuente: Flexible Benchtop FTIR Spectrometer, Cary 630 FTIR Agilent, 2024.	14
FIGURA 3. Gráficos de Caja y Bigotes de la humedad (a), el color (b) y la conductividad eléctrica (c) para los 6 grupos de mieles según procedencia.	21
FIGURA 4. Representaciones de los diagramas de dispersión para la humedad, el color y la conductividad eléctrica.....	23
FIGURA 5. Representación del gráfico de matriz para los tres parámetros fisicoquímicos analizados en las muestras.	25
FIGURA 6. Gráfico de burbujas del color y la conductividad eléctrica, en función de la humedad y la procedencia.....	26
FIGURA 7. Representación de los espectros infrarrojos representativos, superpuestos entre sí, de los 6 grupos de mieles en función de su procedencia.....	26
FIGURA 8. Gráfico de puntuaciones en el plano de las funciones discriminantes del modelo LDA construido para clasificar las diferentes mieles en función de su origen geográfico y botánico.....	28
FIGURA 9. Gráfico de puntuaciones de las funciones discriminantes del modelo LDA construido para clasificar los 6 grupos de mieles según procedencia, representada la función 1 frente la función 2 (a) y la función 1 frente la función 3 (b).	29

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Regiones espectrales seleccionadas para la obtención de las variables predictoras. Fuente: basada en QUIORED, 2002.....	16
TABLA 2. Coeficientes de asimetría y curtosis estandarizados para los parámetros fisicoquímicos (humedad, color y conductividad eléctrica) analizados.....	22
TABLA 3. Análisis estadístico descriptivo (media, desviación estándar y grupos homogéneos) y resultados del ANOVA (Razón F y Valor P) de los parámetros fisicoquímicos para el factor procedencia de la miel.	24
TABLA 4. Coeficientes de funciones discriminantes canónica estandarizados de las tres primeras funciones. La función 1 representa el 64,6% de la variabilidad, la función 2 el 84,5% y la función 3 94,6%.	27
TABLA 5. Clasificación según la pertenencia pronosticada a grupos (Original y Validación cruzada) en función de la procedencia.	30

ÍNDICE DE ECUACIONES

ECUACIÓN 1. Número de variables normalizadas generadas	17
---	----

RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030

Objetivos de Desarrollo Sostenible	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza		x		
ODS 2. Hambre cero		x		
ODS 3. Salud y bienestar	x			
ODS 4. Educación de calidad			x	
ODS 5. Igualdad de género			x	
ODS 6. Agua limpia y saneamiento			x	
ODS 7. Energía asequible y no contaminante		x		
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico	x			
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras		x		
ODS 10. Reducción de las desigualdades.		x		
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.			x	
ODS 12. Producción y consumo responsable.	x			
ODS 13. Acción por el clima			x	
ODS 14. Vida submarina		x		
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres		x		
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas		x		
ODS 17. Alianzas para lograr los objetivos		x		

El propósito del presente trabajo está alineado con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030 como:

ODS 3 - Salud y bienestar: es de vital importancia que el consumidor sepa el valor nutritivo del producto que consume y lo elija con conocimiento, por lo que, exponerlo a sustancias no declaradas o de baja calidad puede suponer un riesgo para su salud. Por ello, garantizar la autenticidad y calidad de la miel que compra es esencial para proteger la salud pública.

ODS 8 - Trabajo decente y crecimiento económico: el fraude en el etiquetado de la miel afecta principalmente a los apicultores locales, cuyos productos sostenibles se ven subvalorados en el mercado. Por lo que fomentar las practicas justas y la transparencia en el etiquetado beneficia tanto a los productores, los consumidores como a la economía del país.

ODS 12 - Producción y consumo responsables: dicho objetivo está centrado principalmente en garantizar las practicas sostenibles en la producción y el consumo de los alimentos. Por lo que abordar el fraude en el etiquetado de la miel es crucial para lograr una cadena de suministro alimentario más transparente, sostenible y ética (Naciones Unidas, 2018).

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA MIEL Y SU RELACIÓN CON EL HOMBRE

La miel es muy apreciada desde la antigüedad, constituyendo uno de los primeros alimentos empleados por el hombre para nutrirse al tratarse de un recurso natural que siempre ha tenido disponible (Ulloa et al., 2010). Fue empleada como único endulzante hasta la utilización del azúcar, introducido en Europa aproximadamente en el siglo XI (Vázquez, 1994).

La importancia que para el hombre primitivo tenía la miel ha quedado plasmada en algunas pinturas rupestres, del período Mesolítico, como las halladas en España en “La Cueva de la Araña” Bicrop, Valencia, datadas aproximadamente 7.000 a.C. En ellas aparecen representaciones de la recolección de la miel cuando aún las sociedades eran recolectoras-cazadoras y empezaban sus primeros asentamientos (Martínez, 2024) y, fue cuando el hombre aprendió a domesticar a la abeja mediante la explotación de las colmenas que apareció la apicultura (Hernandez, 2017).

La miel ha sido empleada a lo largo de la historia por las diferentes civilizaciones, no solo como alimento y edulcorante sino también con otros fines como medicamento, cosmético, conservante, etc. Las primeras referencias escritas de su uso se encontraron en una tablilla sumeria datada 2.000 a.C, en donde era prescrita por los médicos por sus propiedades medicinales para tratar multitud de enfermedades.

En la Antigua Roma se elaboraba una bebida alcohólica a partir de miel considerado como “licor de dioses”. Además, era empleada en la conservación de alimentos cubriendo ánforas de pescado y frutas con miel; incluso algunos impuestos eran recaudados haciendo pago en miel. De la Antigua Roma es originaria la expresión “Luna de miel”, todavía empleada en la actualidad, que proviene de una ancestral tradición en la que la madre de la novia dejaba cada noche en la alcoba nupcial, para los recién casados, un bote de miel para ayudarles a reponer energías.

En la Antigua Grecia, se realizaba una práctica oriental en la que se embalsamaban cadáveres con miel, como realizaron con Alejandro Magno. Esta costumbre era exclusiva de personas con un gran poder económico ya que la miel era un bien de lujo.

En el Antiguo Egipto se utilizaba en la cura de cortes, llagas o quemaduras, incluso, fueron encontradas vasijas con miel intacta junto a la tumba de Tutankamón por el 1922 (Vázquez, 1994; Apícola Monte Gayubar, 2022).

La miel también ha tenido connotaciones religiosas y mitológicas como símbolo de sabiduría y conocimiento divino, o como regalo con propiedades curativas citándose en la biblia (“Come miel, hijo mío, porque es buena; y el panal de miel dulce a tu paladar. Así será para tu alma el conocimiento de la sabiduría; si la hallas, tendrás futuro, y tu esperanza no será cortada”), o el Corán (“Tu señor ha inspirado a las abejas... De su abdomen sale un líquido de diferentes clases, que contiene un remedio para los hombres”) entre otras religiones (Alberto, 2014; Salazar, 2024).

A la miel se le atribuyen numerosas propiedades medicinales y terapéuticas, entre las que destaca su acción antiinflamatoria, ya que es una fuente natural de antioxidantes, refuerza el sistema inmunológico, y protege frente a enfermedades cardiovasculares (Ulloa et al., 2010).

Debido a la presencia de inhibinas (peróxido de hidrogeno, flavonoides y ácidos fenólicos) tiene propiedades antibacterianas; que, además, se ven favorecidas por, su bajo pH y a_w , así como por su alta concentración en azúcares (Ulloa et al., 2010). Ha sido empleada desde la antigüedad contra los

dolores de garganta o cataratas y, especialmente en tratamientos dermatológicos para quemaduras y piernas ulcerosas infectadas (Schenke et al., 2016).

En la actualidad, la tendencia del consumo de miel en el mercado global va en aumento, en parte debido a la concienciación de los beneficios de los productos naturales sobre la salud. Su consumo, tradicionalmente, se ha debido a hábitos inculcados por las familias y, si bien los jóvenes prefieren la miel líquida adquirida en supermercados, los adultos tienden a consumir mieles más densas compradas a productores locales de zonas rurales. La miel, por lo general, se consume durante el desayuno o la merienda y, acompañada de otros alimentos como la leche o el yogurt. El consumo en los hogares españoles en 2022 fue de 15.152 Tm, lo que representa que, más de la mitad de la población española consume de forma habitual este alimento con un consumo per cápita de 0,33 (MAPA, 2022).

1.2 LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA MIEL

La miel está compuesta principalmente por azúcares, agua y otros componentes minoritarios como proteínas, ácidos orgánicos, minerales, vitaminas y compuestos volátiles (García-Chaviano et al., 2024). Esta composición puede variar ligeramente en función de diversos factores como la procedencia botánica y geográfica de las plantas que liban las abejas, las condiciones edáficas, la climatológicas de la región y las prácticas apícolas (Svečnjak et al., 2015).

Los azúcares representan como mínimo 60 g/100g en mieles de flores y 45 g/100g para mieles de mielada, siendo los mayoritarios los monosacáridos glucosa y fructosa (Real Decreto 1049/2003, 2003; Ulloa et al., 2010). La dulzura de la miel está determinada por su proporción en fructosa y glucosa. La fructosa es la que aporta el sabor dulce, por lo que, mieles como la acacia con alto porcentaje de fructosa serán más dulces. También contiene, en menor proporción disacáridos, como la sacarosa que según el *Códex Alimentarius* no debe ser mayor a 5 g/100g. Si el contenido en sacarosa de una miel es superior a esta concentración, se considera adulterada. Esto puede ser ocasionado porque el apicultor corte la miel antes de que ésta madure en la colmena o bien porque no haya dejado que la abeja se coma la “pseudomiel” que ella fabrica con el alimento que se le suele poner en invierno (Ciursă et al., 2021; FAO, 2022). La miel, además, puede contener en menor medida otros azúcares más complejos (maltosa, isomaltosa, melibiosa, ramnosa) formados por la unión de fructosa y glucosa en diversas combinaciones. El alto contenido en azúcares son los responsables de su elevado valor energético, higroscopicidad y viscosidad. Los azúcares son los principales responsables de la conservación de la miel ya que ejercen una presión osmótica que permite ralentizar el desarrollo de las levaduras e impedir el crecimiento de muchos microorganismos (Kamal and Klein., 2011; Real Decreto 1049/2003, 2003).

El agua es el segundo componente más abundante en la miel. Está estrechamente relacionado con su conservación, ya que la miel es un producto muy higroscópico, al absorber fácilmente la humedad ambiental llegando a influir en su color o percepción sensorial (Kamal & Klein, 2011). Por lo general, las mieles maduras tienen un contenido de humedad inferior al 20%, a excepción de las mieles de brezo (Real Decreto 1049/2003, 2003) según lo establecido en la ley. Altos contenidos de humedad indican que la miel ha sido cortada antes de tiempo, no dejando que la abeja la madure en el panal. Además, cuanto mayor es el contenido de agua y de levaduras osmófilas más probable es que la miel se deteriore por fermentación (Kamal & Klein, 2011).

Son las elevadas concentraciones de azúcares, su bajo pH y su reducido contenido en humedad (lo que conlleva una baja a_w), así como la presencia de ciertos compuestos antimicrobianos, las que permiten que la miel tenga una larga vida útil, sea un alimento estable y poco propenso al ataque microbiano, por ello, se conserva fácilmente en un lugar fresco durante un largo periodo de tiempo sin estropearse (Lerma-García et al., 2011).

La miel contiene cantidades pequeñas de proteínas, que a su vez están conformadas por aminoácidos libres y enzimas. El aminoácido más abundante, que representa entre el 50-80%, es la prolina, caracterizada por su actividad microbiana. Se emplea como criterio de evaluación de la maduración o adulteración ya que su límite es 180 mg/kg en el caso de una miel pura. También, contiene una pequeña fracción de enzimas como la diastasa, la invertasa, la glucosa oxidasa, la catalasa, entre otras. La enzima diastasa, es amilolítica que hidroliza el almidón produciendo dextrinas. Es termolábil, por lo que, es útil como indicador de la frescura del producto. La glucosa oxidasa, convierte a la glucosa en ácido glucónico, derivándose en peróxido de hidrogeno el cuál posee acción bactericida (Da Silva et al., 2016).

Los ácidos orgánicos, son el producto de la hidrólisis de los azúcares por la acción de las enzimas. Se relacionan con el sabor, color y algunas propiedades químicas de la miel como el pH, la acidez o incluso la conductividad eléctrica. La miel es considerada un alimento ácido en la que su pH oscila entre 3,4 y 6,1. Entre ellos, el más abundante es el ácido glucónico que se emplea junto con el ácido cítrico para diferenciar la miel floral de la miel de melaza (Da Silva et al., 2016).

El contenido en elementos minerales varía en función del tipo de miel. En las mieles oscuras puede llegar hasta un 0,2%, mientras que en mieles claras es aproximadamente de 0,04%. Algunos de los microelementos más abundantes en la miel son el potasio (K), el calcio (Ca), el sodio (Na), fósforo (P), magnesio (Mg) y selenio (Se). Estos dependen del tipo de suelo en el que se encuentra la planta, por ello, son útiles para determinar la clasificación botánica de las mieles. Son relevantes por su valor nutritivo, a pesar de ello, la presencia de algunos metales pesados como el plomo, aluminio, cadmio o mercurio indican una contaminación o mal procesamiento de la miel (Da Silva et al., 2016; Escriche et al., 2017b).

Las vitaminas provienen de los granos de polen que se encuentran en suspensión en la miel, su contenido es bajo y no contribuyen significativamente en el valor nutricional. Esencialmente son del complejo vitamínico B (hidrosolubles al tener la miel poco contenido en lípidos) como la tiamina (B1), la riboflavina (B2), el ácido nicotínico (B3), el ácido pantoténico (B5), la piridoxina (B6), la biotina (B8 o H) y el ácido fólico (B9). También se encuentra presente la vitamina C, con su característico efecto antioxidante, aunque es muy susceptible a la oxidación química y enzimática lo que puede ocasionar su pérdida. Todas estas vitaminas se conservan gracias al pH ácido de la miel (Da Silva et al., 2016).

Los lípidos se encuentran en cantidades muy pequeñas de aproximadamente el 0,04%. Proviene de la planta floral y de los restos de cera. Entre ellos se encuentran los glicéridos, fosfolípidos, esteroides y ácidos grasos (Da Silva et al., 2016; Ulloa et al., 2010).

En la miel existen dos tipos de compuestos fenólicos, los no flavonoides (como el ácido fenólico) y los flavonoides (como las flavonas, flavanoles, isoflavonas entre muchos otros). Presentan funciones bioactivas ya que actúan como metabolitos secundarios para el funcionamiento normal de las plantas, además, poseen una actividad antioxidante protegiendo los lípidos. Por lo general, pueden ser utilizados como marcadores florales (Juan-Borrás et al., 2016; Escriche & Juan-Borrás, 2018; Tanleque-Alberto et al., 2020).

Los compuestos volátiles representan una fracción minoritaria, ya que están presentes en concentraciones muy bajas. Sin embargo, aportan características diferenciadoras muy importantes a las mieles monoflorales al contribuir al aroma de éstas. Estos compuestos pertenecen a diversas familias químicas (ésteres, alcoholes, ácidos, etc.). En general, los ésteres dotan a la miel de sabores dulces y afrutados, mientras que los aldehídos dan sabor fresco y herbáceo, los furanos gusto amaderado, las cetonas proporcionan olor a mantequilla y nuez mientras que los alcoholes dan lugar a sabores frescos. Se ha demostrado que algunos compuestos específicos como el metil antranilato o los licac (aldehídos) son específicos de la miel de cítrico (Escriche et al., 2017a; Escriche et al., 2021; Escriche et al., 2023a).

Ciertas características composicionales, son comunes a todas las mieles, independientemente de la procedencia del origen botánico del néctar o de las secreciones de las plantas que liban las abejas. Sin embargo, también poseen componentes minoritarios que participan decisivamente en su identificación y, que son de gran relevancia en los campos de la investigación para la diferenciación de mieles (Svečnjak et al., 2015).

1.3 EL ORIGEN BOTÁNICO Y GEOGRÁFICO DE LA MIEL

La miel es “la sustancia natural dulce producida por la abeja *Apis mellifera* a partir del néctar de las plantas o de secreciones de partes vivas de plantas o de excreciones de insectos chupadores presentes en las partes vivas de plantas, que las abejas recolectan, transforman combinándolas con sustancias específicas propias, depositan, deshidratan, almacenan y dejan en colmenas para que madure y añeje”. Se puede clasificar en “miel de flores o miel de néctar” o “miel de mielada” en función de la fuente empleada por la abeja para elaborarla (Real Decreto 1049/2003, 2003; FAO, 2022).

Por lo general, las mieles monoflorales o uniflorales son aquellas que provienen mayoritariamente de una especie vegetal concreta. Sin embargo, una miel se considera polifloral o milflores cuando no se puede clasificar como monofloral, al no poseer un polen predominante que permita atribuirle una variedad botánica determinada (Escriche et al., 2023b; Annapurna et al., 2023). Según diversos autores se clasifica como miel monofloral aquella en la que el porcentaje de granos de polen de una determinada especie botánica sea superior al 45% (Gok et al., 2015). Estas poseen unas características palinológicas, fisicoquímicas y organolépticas determinadas debido a que la flora representativa del lugar geográfico le confiere dichas propiedades específicas.

A pesar de ello, en algunos casos hay excepciones y los granos de polen se encuentran sub/sobrerrepresentados, por lo que, el porcentaje requerido para designar la monofloral puede ser inferior o superior. Por ejemplo, en la miel de naranjo (azahar) y de romero el polen está subrepresentado, por lo que, requiere únicamente presencia del 10% de *Citrus* sp. de *Rosmarinus officinalis* en las mieles para ser consideradas monoflorales de cítrico o romero, respectivamente. O la presencia de un 20% de *Robina pseudoacacia* en la miel de acacia y un 12% *Thymus vulgaris* para la de tomillo. Por el contrario, en la miel de castaño el polen está sobrerrepresentado y, requiere un 75% de *Castanea sativa* o un 70% de *Ecalyptus* sp. (Orantes et al., 2018).

En la actualidad el consumidor europeo aprecia las mieles monoflorales frente a las milflores, por ello, casi la mitad de la miel que se comercializa en Europa tiene una denominación botánica única lo que permite asignarle un precio más elevado. Esto se debe a que es más complicado lograr que la miel proceda mayoritariamente de una especie vegetal, ya que las abejas tienden a pecorear en diferentes especies botánicas. Conseguir una miel monofloral requiere de un cuidado y dedicación

especial por parte del apicultor ya que debe ubicar la colmena cerca de una planta floral única, e incluso realizar el corte y acopio sin mezclar floraciones (Svečnjak et al., 2015; MAPA, 2024).

Según el Codex Alimentarius se puede emplear una denominación botánica y/o geográfica específica para la miel siempre que ésta proceda de un lugar geográfico y fuente botánica concreta que le confiera unas características y propiedades específicas de la monofloralidad en cuestión. En él se cita textualmente: “la miel podrá designarse con el nombre de la región geográfica o topográfica si se ha producido exclusivamente en la zona a la que se refiere la denominación” y “la miel podrá designarse por su origen floral o de plantas si procede total o principalmente de esas fuentes en particular y si posee las propiedades organolépticas, fisicoquímicas y microscópicas que corresponden a dicho origen” (FAO, 2022).

Estas denominaciones repercuten en el precio al que el apicultor vende su miel y, por la que el consumidor está dispuesto a pagar más por una miel con una denominación garantizada. A pesar de que existen límites comerciales sobre el contenido polínico que permite la clasificación y denominación de las mieles según su botánica, aún no hay criterios legales que lo regulen de forma obligatoria. Esto dificulta el comercio internacional ya que los criterios varían entre países y transacciones comerciales; por ello distintos laboratorios y ciertos autores han intentado esclarecer dichos valores estableciendo límites propios (Real Decreto 1049/2003, 2003; Orantes et al., 2018).

1.4 ASPECTOS ECONÓMICOS Y LEGISLATIVOS DEL SECTOR APÍCOLA

Actualmente, España, lidera la producción de miel a nivel europeo y, al mismo tiempo, es uno de los principales productores de este alimento en el mundo. Esto se ve reflejado en los datos de la producción de miel del año 2021 en los que se logró alcanzar las 34.064 Tm (MAPA, 2023). Representando el 0,44% de la producción final ganadera y el 0,17% de la producción de la rama agraria, llegando a suponer a nivel económico un valor anual de 62 millones de euros (MAPA, 2020). En concreto, en España las tres comunidades autónomas con mayor producción de miel son: Andalucía seguida de la Comunidad Valenciana y Castilla y León. Desde el año 2003, la producción nacional de miel tiene un crecimiento estable y ligeramente ascendente, contribuyendo a la economía del país de forma significativa (MAPA, 2023).

La Unión Europea es uno de los mayores productores de miel en el mundo con 237.549 Tm anuales; sin embargo, también es el principal importador de este alimento a nivel mundial, adquiriendo anualmente 200.000 Tm, mientras que tan solo exporta unas 20.000 Tm. Estas importaciones extracomunitarias están en auge y, cobran cada vez mayor relevancia en el sector apícola (Parlamento Europeo, 2018).

China, es en la actualidad el mayor productor de miel a nivel mundial mostrando un fuerte crecimiento en los últimos años. De las importaciones de miel totales de la comunidad europea (que son unas 68.421 Tm), el 40% son de China (27.368 Tm), mientras que el 60% restante procede mayoritariamente de países como Ucrania, Argentina y México. A España, procedente de China llegan a 8.124 Tm, que representan el 34,7% de las importaciones europeas procedentes de este país (Parlamento Europeo, 2018; MAPA, 2023).

Las importaciones masivas de países asiáticos son de gran preocupación para el sector apícola, ya que su precio es muy inferior a la miel española. En el año 2023 la miel china se ha importado a un precio aproximado 1,5 €/kg, lo que conlleva una competencia “desleal o poco justa” frente los costes

de producción actual de la miel española en donde el precio asciende a 7,21 €/kg (Maté, 2023; MAPA, 2023). Es más, aún se prevé que continúe aumentando tras la problemática actual del sector como la presencia de enfermedades como la varroa (ácaro mortal para las abejas), las condiciones climatológicas desfavorables de los últimos años o los costes de transporte de colmenas trashumantes (Maté, 2023).

Las actividades fraudulentas del sector apícola se ven favorecidas principalmente por la internacionalización de los mercados. Esto se manifiesta en los informes anuales del Sistema Coordinado de Intercambio Rápido de Información para alimentos y piensos (SCIRI) en los que la miel es uno de los alimentos más afectados por el fraude, tras los productos cárnicos principalmente debido a un incorrecto etiquetado (Maté, 2023; SCIRI, 2022). Por ello, la principal forma de aminorar los efectos negativos es hacer frente a la falta de clarificación en el etiquetado de la miel. De aquí la actual demanda social y la presión de diversas organizaciones representativas del sector que consideran indispensable garantizar una información completa, clara y precisa sobre el origen de la miel, sea mezcla o no, ya que tiene un estrecho vínculo con la calidad de esta, y por tanto, con el precio que el apicultor pide y que el consumidor está dispuesto a pagar por un producto con determinadas características (Maté, 2023).

La miel, al igual que cualquier producto alimenticio ha de cumplir con el Reglamento (UE) 1169/2011 del Parlamento Europeo sobre la información alimentaria facilitada al consumidor en el etiquetado, en donde, según el artículo 26 que hace referencia al país de origen o lugar de procedencia se indica que “cuando su omisión pudiera inducir a error al consumidor en cuanto al país de origen o lugar de procedencia real del alimento” debe incluirse debidamente (Reglamento 1169/2011, 2011).

El Real Decreto 1049/2003, de 1 de agosto, por el cual se aprueba la “Norma de Calidad relativa a la miel” en España, tiene como finalidad regular en un único instrumento normativo la calidad de la miel transponiendo la Directiva 2001/110/CE del Consejo Europeo. En relación con la mención de la procedencia de la miel en el etiquetado, la Directiva dispone en el apartado 5.1.4 que deberá informarse en la etiqueta del producto el país o los países de origen donde la miel haya sido recolectada. No obstante, añade en el caso de mezcla de mieles que si procede de más de un estado miembro o tercer país, dicha mención podrá substituirse, por las siguientes denominaciones genéricas: <<mezcla de mieles de la UE>> , <<mezcla de mieles no procedentes de la UE>> o << mezcla de mieles procedentes de la UE y no procedentes de la UE>>. A pesar de ello, no exige los nombres de el/los país/es ni el porcentaje (%) de cada una de las mieles en la conformación en caso de mezcla (Real Decreto 1049/2003, 2003; Directiva 2001/110/CE, 2001). Es en este último punto donde surge el conflicto, ya que esto implica, que una miel mezcla puede contener mayor porcentaje de miel procedente de países asiáticos y un menor porcentaje de miel española, lo que supone un fraude al consumidor, al desconocer lo que adquiere, si no se indica claramente en la etiqueta. Dicha ambigüedad en el etiquetado podría generar un estigma para el prestigio de la miel nacional (Maté, 2023).

En mayo de 2020 se produjo un cambio en esta normativa (Real Decreto 523/2020), que modifica al anterior Real Decreto 1049/2003, en el que se obliga a indicar el origen geográfico específico de la miel (Real Decreto 1049/2003, 2003; Real Decreto 523/2020, 2020). La implantación de este etiquetado más detallado y obligatorio se realiza con objeto de que el cliente tenga un conocimiento del lugar de origen de la miel, para así, salvaguardar la protección del consumidor, promover la comercialización a precios justos para el apicultor y, evitar la realización de prácticas ilegítimas en relación con el origen geográfico de las mieles. Por consiguiente, de aquí el interés primordial ya que

dota al producto de transparencia y valor añadido al diferenciarlo, genera confianza en el consumidor e incluso permite la promoción de los productos locales al apicultor (Bruselas Efe-Agro, 2024).

El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) ha abierto hasta el 11 de junio de 2024, un procedimiento de consulta pública del proyecto de Real Decreto 1049/2003 que modifica la actual “Norma de Calidad de la miel”. Esta futura norma establece que los Estados miembros podrán exigir la obligación de indicar en la etiqueta los porcentajes (%) para las cuatro mayores cuotas solo cuando representen más del 50% en caso de mezcla. Con esta incorporación se pretende aumentar la competitividad de las mieles españolas, reforzando el mercado nacional, para así dotar de mayor transparencia al producto posicionándolo frente las mieles importadas (MAPA, 2022; MAPA, 2024). Aunque la modificación de la Directiva europea aún está en fase de publicación, el Ministerio considera primordial aplicar estos cambios en España lo antes posible demostrando así su compromiso con el sector apícola nacional (MAPA, 2024).

Los procesos legales son costosos y requieren de mucho tiempo y, las importaciones procedentes de países extracomunitarios han ido en aumento en la última década. Por ello, la detección del fraude es un reto prioritario que solventar para el sector de la investigación (Maté, 2023). En este contexto, se hace indispensable buscar nuevas técnicas rápidas y sensibles de autenticación de la miel para identificar y garantizar el origen geográfico y/o botánico de la miel (Svečnjak et al., 2015).

1.5 TÉCNICAS PARA DETERMINAR LA AUTENTIFICACIÓN DE LA MIEL

Existen diversos métodos que permiten verificar la autenticidad de una miel. Entre los métodos clásicos que se vienen usando desde hace tiempo, destaca la melisopalinología y los análisis fisicoquímicos. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado otras técnicas más innovadoras (Gok et al., 2015).

- La melisopalinología o análisis melisopalinológico basado en la identificación de los granos de polen en función de su morfología y cantidad presente en la miel, a través de la observación en el microscopio electrónico de barrido. Es un análisis complejo, que requiere de tiempo y, de cierta experiencia de un profesional. Se realiza con el objetivo de establecer el origen botánico, a pesar de que no es el método oficial se suele emplear como análisis complementario a otras técnicas (Escriche et al., 2023b; López-García et al., 2023; Valiente et al., 2023).
- Los análisis fisicoquímicos, empleados rutinariamente, que sirven para determinar la procedencia floral. Entre ellos se encuentra el color, la humedad, el pH, la conductividad eléctrica, la actividad enzimática y óptica (relacionada con la concentración de azúcares) o incluso el HMF (5-hidroximetilfurfural) entre otros (Escriche, et al., 2017b; Tanleque-Alberto et al., 2019; Escriche et al., 2020).
 - Humedad: indica el porcentaje de agua contenido en la miel, es considerado como indicador de calidad (Escriche et al., 2017b) y, esta legislado según el Real Decreto 1049/2003, en donde no debe superar el 20%, a excepción de la miel de brezo que puede llegar hasta el 23% (Real decreto 1049/2003, 2003).

- Color: es la propiedad física percibida de forma más inmediata, está influenciada por los pigmentos presentes en la miel. Según el Real Decreto 1049/2003 “El color de la miel puede tener desde un tono casi incoloro a un tono pardo oscuro”, por lo que, cada monofloralidad presenta una tonalidad característica dotándola de un valor diferencial (Real Decreto 1049/2003, 2003). Dicho parámetro tiene relevancia en las transacciones económicas, considerado más bien como un requisito comercial (Escriche, et al., 2017b). Por ejemplo, los valores máximos en mm Pfund son para acacia, azahar, romero y tomillo de 35, 45, 35 y 84 respectivamente. La miel de acacia presenta tonalidades muy claras siendo casi transparente, por el contrario las mieles de azahar y romero son ámbar claro y, la de tomillo ámbar oscuro. En ocasiones, el consumidor asocia el color a una monofloralidad concreta de la miel. Sin embargo, dicho parámetros no está legislado a excepción de algunas mieles que poseen una Denominación de Origen Protegida (DOP) como por ejemplo la miel de la Alcarria (Real Decreto 1049/2003, 2003; Orantes et al., 2018).

- Conductividad eléctrica: está relacionada directamente con el contenido mineral de la miel. Según el Real Decreto 1049/2003 ha de ser 0,8 mS/cm como máximo para la miel de flores y como mínimo para las mieles de mielada, or ello, es un parámetro que ayuda en la clasificación de la miel. Se puede relacionar con el color de la miel siendo mayor en las mieles de color oscuro y menor en las mieles de colores claros. Por ejemplo, para las mieles de acacia, azahar, romero y tomillo es de 0,3, 0,55, 0,3, 0,6 mS/cm respectivamente como máximo según su monofloralidad (Real Decreto 1049/2003, 2003; Escriche, et al., 2017b; Orantes et al., 2018).

- Otras técnicas innovadoras y alternativas:
 - La resonancia magnética nuclear, es una técnica avanzada de caracterización de las estructuras moleculares, a nivel atómico, de distintos compuestos de la miel; permitiendo reconocer el origen botánico de la misma-(Lozano-Torres et al., 2022).
 - El Análisis de los Isótopos de Carbono Estable, del inglés Stable Carbon Isotope Ratio Analysis (SCIRA), permite detectar la adulteración por la presencia de azúcar adicionado de forma no declarada (C4), como el azúcar de caña o el jarabe de maíz. En particular, una miel no adulterada debería contener más de un 7% de azúcar (Escriche et al., 2021).
 - El análisis de la actividad enzimática permite evaluar la frescura de la miel, al conocer la concentración de diastasa en el alimento. Esta enzima disminuye su actividad con el calor y el tiempo de almacenamiento, lo que es útil para identificar si ha sufrido algún tratamiento no autorizado (Escriche et al., 2021).
 - La espectroscopia Raman, es una técnica simple, rápida, y no destructiva que ofrece información química y estructural de los compuestos orgánicos de la miel (Sobrinó Gregorio et al., 2016).
 - La calorimetría diferencial de barrido o de sus siglas DSC, es una técnica de análisis termoanalítica sensible, rápida y sencilla, que se caracteriza por necesitar escasa muestra. Está basada en las propiedades térmicas, por lo que, al aportar calor de forma controlada y estudiando las curvas de temperatura vs tiempo se pueden examinar los cambios físicos que tienen lugar (Sobrinó Gregorio et al., 2017; Tanleque-Alberto et al., 2021).

- La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica sustentada en la amplificación in vitro de un segmento de ADN mediante una reacción enzimática. Es apropiada, en el caso de la miel, para identificar su origen botánico permitiendo conseguir a partir de una pequeña cantidad de muestra obtener muchas copias de un segmento de ADN de interés. El uso de esta técnica se ha incrementado en los últimos años en el sector alimentario (Sobrino Gregorio et al., 2019b).
- La lengua electrónica se trata de un instrumento analítico que está compuesto por distintos sectores químicos y que, con la ayuda del tratamiento estadístico se puede determinar el origen y la calidad de la miel (Sobrino Gregorio et al., 2018; Sobrino Gregorio et al., 2019a).
- La cromatografía de gases se emplea en el análisis de los compuestos volátiles presentes en la miel. Está basada en la volatilidad y polaridad de las sustancias químicas, asimismo son los perfiles de volatilidad los que permiten identificar el origen geográfico y/o botánico. Su principal inconveniente es que requiere de mucho tiempo, del uso de productos químicos y además es una técnica destructiva (Gok et al., 2015; Tanleque-Alberto et al., 2019).
- El análisis sensorial resulta significativo para evaluar la calidad organoléptica y por tanto, predecir el éxito del alimento en el mercado. Las características organolépticas son las que con mayor facilidad puede evaluar el consumidor. Dicha técnica es complementaria a las técnicas fisicoquímicas (Piana, 2004; Escriche et al., 2020).
- La Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) es una técnica rápida, barata y no destructiva. Es más, no requiere de reactivos ni tampoco personal altamente especializado. Y cuando se complementa con la quimiometría, es útil para detectar adulteraciones en la miel o incluso su origen, ya sea geográfico o botánico. (Gok et al., 2015c).

1.6. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER

A través de ella, se recopila información a nivel molecular de los componentes presentes en el alimento con tan solo un reducido contenido de muestra; por ello, su principal ventaja es que permite clasificar una gran multitud de muestras en un breve periodo de tiempo (Gok et al., 2015). Esto es gracias a que estudia la interacción entre la radiación electromagnética y la materia (Ciursă et al., 2021b). La radiación infrarroja comprende longitudes de onda entre 800 y 200.000 nm, dividida en 3 zonas: el infrarrojo cercano o NIR ($12.500 - 4.000 \text{ cm}^{-1}$), el infrarrojo medio o MIR ($4.000 - 660 \text{ cm}^{-1}$) y el infrarrojo lejano o FIR ($660-50 \text{ cm}^{-1}$). De estas tres, es la región media o MIR, la que ofrece abundante información estructural.

Una variante del FTIR es el ATR-FTIR, que hace referencia a la Reflectancia Total Atenuada. Es un accesorio del equipo FTIR que mide los cambios en un haz infrarrojo reflejado internamente cuando entra en contacto con una muestra. El ATR-FTIR permite estudiar las vibraciones de los enlaces de los compuestos químicos en el IR o, dicho de otro modo, permite identificar los enlaces químicos en diferentes regiones del espectro infrarrojo en función de su vibración. El FTIR es una clase de espectrofotómetro de IR medio que, en lugar de realizar un barrido de frecuencias para obtener el espectro, llevan a cabo un barrido interferométrico sometiendo a la muestra a radiación infrarroja policromática. Tiene un rango espectral de $4.000 - 600 \text{ cm}^{-1}$ y una resolución de $1,5 \text{ cm}^{-1}$. Una de sus principales ventajas es que permite realizar múltiples barridos espectrales para una misma muestra (Gok et al., 2015; Bruker, 2024).

Con la espectroscopía de IR medio se obtiene un espectro causado por los fenómenos de absorción, reflexión o emisión que se dan cuando la radiación electromagnética interacciona con el objeto de estudio, en donde cada pico del espectro corresponde a una vibración específica de los enlaces químicos de los macro/microelementos de la muestra (Gok et al., 2015).

La Figura 1 representa el fenómeno de absorción IR que tiene lugar en el equipo FTIR para una muestra de miel, siendo su funcionamiento similar para otro tipo de productos. El equipo consta de una fuente de luz infrarroja que emite un haz de radiación IR. Este haz IR incidente se dirige hacia el cristal óptico denso, ubicado en un ángulo específico, que tiene un alto índice de refracción. El haz no atraviesa el cristal, sino que debido a la reflectancia interna total, se desvía y refleja repetidamente dentro de él creando una onda evanescente cerca de la superficie del cristal. Esta onda se extiende más allá del cristal y alcanza la muestra. La muestra contiene moléculas que son capaces de absorber la energía IR en función de sus grupos funcionales, generando así vibraciones moleculares al absorber parte de esta energía IR de la onda evanescente. Un detector sensible, es capaz de identificar y registrar la señal resultante midiéndola y es el interferograma el que genere el espectro infrarrojo (Bruker, 2024) .

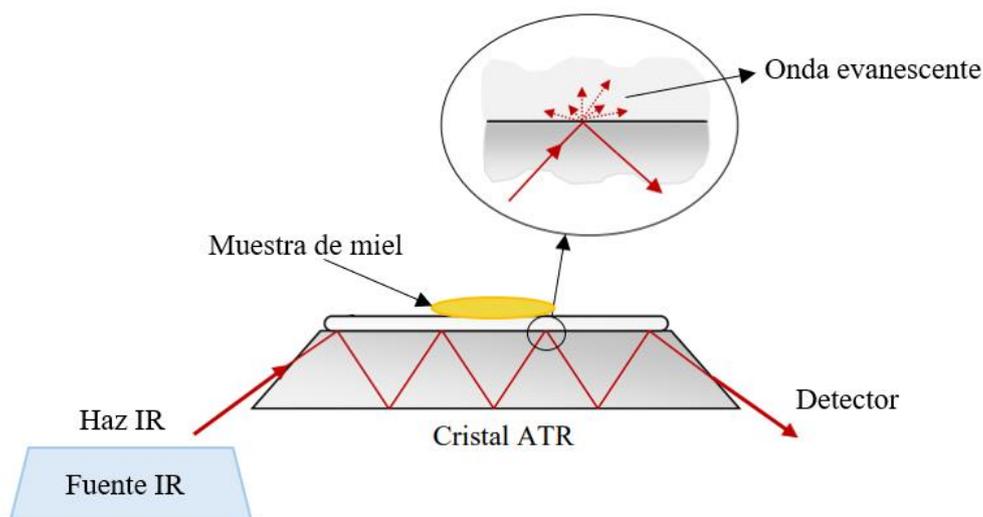


FIGURA 1. Esquema del fenómeno de absorción infrarrojo que tiene lugar en la miel durante el análisis con el equipo ATR-FTIR. Adaptada de: Bruker, 2024.

Otra ventaja con respecto a los anteriores métodos es que al tratarse de un equipo con pocos elementos a través de los cuales ha de pasar la radiación se consigue perder menos intensidad. Esto le permite detectar absorciones de energía más débiles y, en consecuencia, ser un método más sensible (Gok et al., 2015).

Este método se emplea habitualmente como análisis cualitativo, a pesar de ello, también tiene aplicaciones cuantitativas. Esto se explica por la Ley de Lambert-Beer, por la que la transmisión de la luz a través de una capa de partículas decrece exponencialmente con la distancia, permitiendo la cuantificación. Otro beneficio de dicha técnica es su utilidad tanto para muestras líquidas como sólidas, es por ello, que tiene una amplia aplicación en el ámbito de la investigación de los alimentos (Gok et al., 2015c; Cortés et al., 2018; Quelal-Vásconez et al., 2018).

1.7 EL EMPLEO DE HERRAMIENTAS ESTADÍSTICAS EN LA RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS EN EL ÁMBITO ALIMENTARIO

El análisis de datos multivariantes es esencial para investigar la calidad de los alimentos debido a la complejidad de los productos alimenticios y sus cambios durante el almacenamiento. Tradicionalmente, la investigación en alimentos se centraba en un único atributo de calidad alimentaria (por ejemplo la textura, la actividad enzimática o el color, etc). Este enfoque univariante es la estrategia más sencilla para evaluar la calidad de los alimentos y, sin duda, es muy valiosa. Sin embargo, esta estrategia ignora la complejidad de los productos alimentarios y las posibles interacciones entre los diferentes atributos. En la práctica, la calidad de los alimentos representa el resultado de una compleja interacción de múltiples compuestos y reacciones (Buvé et al., 2022). Existen muchos ejemplos de trabajos precedentes que utilizan el análisis multivariante para el análisis de mieles (Terrab et al., 2003; Nozal et al., 2005). En la literatura reciente se han descrito diversos métodos para determinar el origen geográfico y botánico de la miel, entre los que destaca el uso de análisis multivariante. Esta técnica resulta de gran utilidad para determinar el origen botánico y verificar la autenticidad y adulteración de la miel (Maione et al., 2019).

El análisis multivariante de datos se refiere al análisis estadístico de una colección de variables aleatorias. En la aplicación de análisis multivariante para la determinación del origen de la miel, la mayoría se centran en el origen botánico y sólo unos pocos tienen por objeto el origen geográfico (Siddiqui et al., 2017). El estudio de los parámetros fisicoquímicos se realiza habitualmente en segundo lugar. La ventaja de utilizar análisis de datos multivariantes combinado con el análisis de las propiedades fisicoquímicas es que permite identificar patrones ocultos a través de sofisticados métodos matemáticos y estadísticos que no siempre se perciben de forma intuitiva (Maione et al., 2019).

2. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO

2.1 OBJETIVO GENERAL

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la efectividad de la espectroscopía infrarroja (ATR-FTIR) en combinación con herramientas estadísticas multivariantes, para diferenciar mieles según su procedencia geográfica y botánica.

2.2 PLAN DE TRABAJO

Para alcanzar el objetivo planteado, se llevaron a cabo las siguientes etapas:

1. Revisión bibliográfica que permite estudiar la literatura científica sobre el tema a tratar.
2. Análisis de los parámetros fisicoquímicos (humedad, color y conductividad eléctrica) y comparación estadística de medias según la procedencia de las muestras utilizando el Análisis de la Varianza (ANOVA).
3. Obtención de los espectros infrarrojos de las muestras mediante un equipo ATR-FTIR, y de las áreas correspondientes de diferentes regiones espectrales.
4. Evaluación de la capacidad predictiva del análisis discriminante lineal para clasificar las distintas procedencias en las muestras en función de la información contenida en los espectros infrarrojos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MUESTRAS DE MIEL

Para la realización del estudio se emplearon 100 muestras de miel recolectadas entre los años 2023 y 2024, procedentes de: España y China, que fueron proporcionadas por diferentes empresas del sector apícola valenciano.

➤ Origen España: 72 mieles de diversos orígenes botánicos.

De las cuales:

- 21 mieles de azahar
- 18 mieles de romero
- 22 mieles de tomillo
- 11 mieles milflores

➤ Origen China: 28 mieles de diversos orígenes botánicos.

De las cuales:

- 6 mieles de acacia
- 22 miles milflores

En la Tabla 1 de Anexos se detallan los códigos de estas, así como su procedencia geográfica y su origen botánico determinado según la clasificación botánica que se realizó en el Laboratorio de la Miel (LABMIEL) de la Universitat Politècnica de València, acreditado por la ENAC en la norma ISO 17025.

3.2 ANÁLISIS PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS

En todas las muestras estudiadas se analizó la humedad, el color y la conductividad eléctrica ya que son unas de las analíticas más demandadas por las empresas envasadoras de miel cuando la compran a sus proveedores por su valor comercial, legislativo y de calidad.

El color de las muestras de miel se determinó con un colorímetro digital *C 221 Honey Color Analyzar, Hanna Instruments* que mide la transmitancia de la luz. El análisis consistió en introducir la muestra en una cubeta hasta el límite. En caso de cristalización la miel se licua en estufa entre 50-60°C hasta que quede traslúcida. El resultado se expresa en mm Pfund (Escriche et al., 2017b).

Los análisis de humedad y conductividad eléctrica se realizaron según la Orden del 12 junio 1986 y, los métodos propuestos por la International Honey Commission; mientras que los límites para dichos parámetros fisicoquímicos se encuentran legislados en el Real Decreto 1049/2003.

La humedad de las muestras fue determinada a través del índice de refracción que se obtuvo con un refractómetro *ATAGO 3T, Japón* conectado a un baño termostatzado a 20°C. Se colocaba una pequeña gota de miel no cristalizada creando una capa fina y fluida, leyendo de forma directa en la escala. Con el valor del índice de refracción obtenido y haciendo uso de la tabla de Chataway se calculó el contenido en humedad correspondiente. La temperatura debe ser controlada con un rango de aceptación de $\pm 1^\circ\text{C}$.

La conductividad eléctrica de la miel se evaluó a través de un conductímetro *Seven Multi Mettler Toledo* con control de la temperatura a 20°C. Se determinó previamente los gramos de miel necesarios en función de su contenido en humedad anteriormente analizado. Posteriormente, se realizó la disolución al 20% sobre su materia seca y, se midió la conductividad con la sonda tras una calibración previa, y tras la estabilización del valor. En concreto la conductividad eléctrica según la legislación se expresa en mS/cm, pero el equipo la proporciona en $\mu\text{S}/\text{cm}$ por lo que requiere de una conversión (Real Decreto 1049/2003; International Honey Commission, 1997; Orden del 12 junio 1986).

3.3 OBTENCIÓN DE LOS ESPECTROS ATR-FTIR

Los espectros infrarrojos de las muestras de miel fueron obtenidos mediante el equipo *FTIR Agilent Cary 630*. Este equipo está basado en la Espectroscopía de Infrarrojo Por Transformada de Fourier; y a través del *Software MicroLab FTIR* se recopilaba la información analizada.

El análisis se realiza a temperatura ambiente y tan solo requiere de una homogenización previa de la muestra. En primer lugar, se obtuvo un blanco con la celda (1 de la Figura 2) sin muestra para comprobar la pureza espectral registrando el espectro del elemento ATR vacío. Posteriormente, se situó una pequeña gota de la muestra de miel correspondiente que se deseaba analizar sobre la superficie del cristal de reflexión de diamante/ZnSe (Seleniuro de Zinc) (1 de la Figura 2). Por último, se ajustó el tornillo (2 de la Figura 2) que permitió la adecuada dispersión evitando la formación de burbujas de aire que podrían interferir en la respuesta. Las medidas se tomaron por triplicado, analizando tres veces cada muestra en las mismas condiciones y, por lo tanto obteniendo tres espectros entre 4.000 a 650 cm^{-1} que contenían información de las vibraciones moleculares específicas de los compuestos químicos de la miel (Annapurna et al., 2023).



FIGURA 2. Equipo FTIR Agilent Cary 630 empleado para la obtención de los espectros IR.

Fuente: Flexible Benchtop FTIR Spectrometer, Cary 630 FTIR Agilent, 2024.

Se tuvo un especial cuidado en la correcta limpieza del equipo tras la realización de cada medición. Esta se llevó a cabo con un papel de celulosa húmedo y un posterior secado con otro seco, asegurándose de que la superficie del diamante quede totalmente seca, ya que el equipo es bastante sensible a la humedad y se desea obtener un dato lo más representativo posible.

3.4 CREACIÓN DE LA MATRIZ DE DATOS

El equipo FTIR está asociado al programa *Software MicroLab FTIR* que permite procesar la información, al guardar y almacenar los espectros infrarrojos de cada muestra de miel analizada. Este documento, en formato CSV, contiene los datos de las diferentes longitudes de onda del infrarrojo con la intensidad asociada a cada una de estas. Posteriormente con la ayuda del programa *SpectraGryph v 1.2.16.1* se pueden visualizar las áreas de los espectros infrarrojos pertenecientes a las muestras de miel analizadas. Cada una de las 100 muestras descritas anteriormente se analizaron por triplicado con el fin de controlar la variabilidad en la medición. Se obtuvo de esta forma una matriz de datos formada por 300 mediciones y 34 áreas correspondientes a cada una de las 34 regiones espectrales seleccionadas, obteniéndose así una matriz de datos de 300 x 34. Estas 34 regiones espectrales, tal como se muestran en la Tabla 1 se dividen en los diferentes grupos químicos funcionales básicos y en la huella dactilar del alimento. En particular, esta huella dactilar o también denominada perfil químico de una sustancia química es una región espectral única para cada alimento que permite su diferenciación e identificación. Por ello, tiene numerosas aplicaciones en el campo de la seguridad alimentaria, siendo cada vez más empleada a la hora de hacer frente el fraude alimentario, al proporcionar información sobre la autenticidad de los alimentos (Ciursă et al., 2021b).

Como preparación de los datos para el análisis, se obtuvieron las medias de las tres repeticiones por muestra, una vez evaluada la repetitividad de las medidas; quedando así ahora una matriz de datos de 100 x 34.

La región más importante para la discriminación de las muestras de miel es la correspondiente a los hidratos de carbono (1756 a 753 cm^{-1}). Por ello, para la realización del estudio no se tuvo en cuenta aquellas regiones entre 3.672 y 2584 cm^{-1} pertenecientes al agua. Las diferencias en las bandas de absorción en estas regiones están determinadas por la variación del contenido de agua, proteínas o la interacción entre el agua y los hidratos de carbono que no aporta valor a la diferenciación de las muestras (Concha-Herrera et al., 2009; Saucedo-Hernández et al., 2011; Vergara-Barberán et al., 2015), tal y como se muestra en la Tabla 1. Creando una matriz de datos de dimensiones 100 x 28.

Una vez se eliminaron las 6 regiones correspondientes al agua, se procedió a normalizar las 28 variables resultantes de la diferencia entre las 34 regiones originales y estas 6. El objetivo de esta normalización es emplear una escala común que maximice las diferencias, así como minimizar otras causas de variabilidad que puedan afectar a la intensidad de los picos.

Entre los métodos de normalización disponibles, se optó por el de normalización por cocientes ya que existen estudios previos que lo utilizan con éxito para la caracterización de medidas obtenidas con FTIR (Concha-Herrera et al., 2009; Saucedo-Hernández et al., 2011; Vergara-Barberán et al., 2015). Este método consiste en obtener el cociente entre todos los pares de variables, generados por cada variable y cada una de sus sucesoras. Por ejemplo, la primera región V7 se dividió por la V8, resultando la variable normalizada $V7/V8$; la variable V8 se dividió por la variable V9, obteniendo la variable $V8/V9$. Este procedimiento se repite hasta obtener la última variable ($V33/V34$).

TABLA 1. Regiones espectrales seleccionadas para la obtención de las variables predictoras. Fuente: basada en QUIORED, 2002.

Nº de región	Región (longitudes de onda cm ⁻¹)	Grupos funcionales
1	3672-2981	-NH ₃ (aminoácido) -O-H (agua) -O-H (ácido)
2	2981-2949	-C-H (CH ₃)
3	2949-2909	-C-H (ácido)
4	2909-2891	-C-H (carbohidrato)
5	2891-2776	-C-H (carbohidrato)
6	2776 -2584	-C-H (aldehído)
7	1756-1534	-H-O-H (agua) -C=O (carbohidrato) -N-H (amida)
8	1514-1437	-O-H (agua) -O-H (alcohol) -C-H (alqueno)
9	1437-1391	-C-H -C-O-H
10	1391-1348	-O-H (alcohol) -N-H (amida) -C-N (amida)
11	1348-1318	-O-H (alcohol) -N-H (amida) -C-N (amida)
12	1318-1283	-O-H (alcohol) -N-H (amida) -C-N (amida)
13	1283-1257	-C-C (carbohidrato) -C-O (fenol)
14	1257-1238	-C-C (carbohidrato) -C-O (fenol)
15	1238-1215	-C-C (carbohidrato) -C-O (fenol)
16	1215-1199	-OH (alcohol) -C-O (carbohidrato)
17	1199-1175	-OH (alcohol) -C-O (carbohidrato)
18	1175-1131	-C-O (éter) -C-O (alcohol)
19	1131-1120	-C-O (éter)
20	1129-1095	-C-O (éter)
21	1095-1064	-C-O (alcohol)
22	1064-1039	-C-O (alcohol)
23	1039-1017	-C-O (alcohol)
24	1017-994	-C-O (alcohol)
25	994-970	-C-H (carbohidrato)
26	970-939	-C-H (carbohidrato)
27	922-902	-C-H (carbohidrato)
28	902-883	-C-H (carbohidrato)
29	883-858	-C-H (carbohidrato)
30	883-858	-C-H (carbohidrato)
31	858-839	-C-H (carbohidrato)
32	839-798	-C-H (carbohidrato)
33	798-775	-C-H (carbohidrato)
34	775-753	-C-H (carbohidrato)

El número de variables normalizadas generadas de acuerdo con este método puede calcularse por combinatoria. La Ecuación 1 muestra el número de variables normalizadas generadas en función del número original de variables ($n = 28$).

$$\text{Número de variables normalizadas generadas} = n \cdot \binom{n-1}{2} = 28 \cdot \binom{28-1}{2} = 378 \quad (\text{Ec.1})$$

De acuerdo con el método, no se repite el procedimiento a los cocientes inversos. Es decir, el cociente V8/V7 contiene la misma información que el cociente V7/V8, aunque invertida. Este método de normalización permitió magnificar las diferencias pudiendo observar la posible variabilidad entre muestras con mayor facilidad. De esta forma se crea una matriz de datos con 378 variables normalizadas, que se utilizarán en el modelo como variables predictoras. Por tanto, la matriz de datos final contenía 100 filas, correspondientes a la media de cada una de estas tres repeticiones y 378 columnas, generando así una matriz de 100 x 378.

3.5 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Para la descripción de los datos a nivel univariante se han calculado los estadísticos descriptivos y se han obtenido gráficos de caja y bigotes y gráficos de burbujas y dispersión.

El análisis de los parámetros fisicoquímicos se ha realizado mediante Análisis de la Varianza Simple (ANOVA). Esta herramienta estadística permite comparar las medias de diferentes grupos para determinar si al menos uno de ellos es significativamente diferente a los demás. Para ello, se basa en la descomposición de la varianza observada en la variable cuantitativa, en este caso cada uno de los parámetros fisicoquímicos. En dos términos: la variabilidad explicada por el modelo y la variabilidad residual. El modelo analiza la variabilidad explicada para el origen geográfico y botánico de las mieles, es decir, la aplicación del análisis a cada parámetro fisicoquímico analiza en qué medida la variabilidad del parámetro puede explicarse mediante el origen botánico y geográfico. La variabilidad restante, no explicada por el modelo, es la variabilidad residual, debida al error.

La estimación del modelo ANOVA se basa en la hipótesis nula de que no hay diferencias significativas entre las medias de las diferentes características de las mieles de diferentes procedencias. La hipótesis alternativa plantea que el menos una de las medias de las características de las mieles es significativamente diferente. Como resultado de la tabla ANOVA se obtienen dos estadísticos que indican si debe rechazarse la hipótesis nula, y por tanto, aceptar la hipótesis alternativa: el estadístico F y el p-valor (significación estadística). Un valor alto del estadístico F indica que la variabilidad entre las medias de los grupos es mayor que la variabilidad dentro de los grupos. Por otro lado, si el p-valor es menor que el nivel de significancia (0.05 para un nivel de confianza del 95%), se rechaza la hipótesis nula y se concluye que hay diferencias significativas en función del origen.

La estimación de los modelos ANOVA requiere el análisis de tres hipótesis sobre los datos: normalidad, homocedasticidad e independencia. La normalidad se puede probar mediante diversos métodos. Es posible presentar un gráfico de probabilidad normal o un histograma de la variable de estudio. Sin embargo, este método no se ha aplicado al análisis de cada uno de los parámetros fisicoquímicos debido a la marcada segmentación de los datos en función del origen. Los parámetros

fisicoquímicos varían en gran medida en función del origen, lo que da lugar a la mezcla de poblaciones. Por ello, la hipótesis de normalidad se ha explorado a través de los coeficientes de asimetría y curtosis estandarizados. Se acepta que las variables se encuentran dentro los límites establecidos para las distribuciones simétricas y mesocúrticas cuando estos coeficientes se encuentran dentro de los límites de -2 y +2.

La hipótesis de homocedasticidad se ha explorado por medio de los gráficos de dispersión y comparación de desviaciones típicas entre distintos orígenes. Es posible realizar otro tipo de contrastes específicos para esta hipótesis, como el contraste de Levene o la aplicación de ANOVA sobre los residuos al cuadrado. Sin embargo, estos métodos no resultan aplicables en este trabajo ya que el número de observaciones es muy reducido en determinadas categorías.

Por último, la hipótesis de independencia se asume que se cumple gracias al rigor con el que se han realizado las mediciones. Puesto que se ha seguido un procedimiento metodológico en la recolección de datos, se puede asumir que ninguna medición se ha visto influida por otra anterior, ni ha influido en otra posterior. Los gráficos exploratorios y modelos ANOVA se han estimado utilizando el programa *Statgraphics Centurion 19*.

El análisis de los espectros se ha realizado mediante análisis lineal discriminante utilizando el programa *SPSS versión 25*. El Análisis Lineal Discriminante (LDA) es una técnica estadística empleada para encontrar una combinación lineal de características que caracteriza o separa dos o más clases de objetos o eventos. En este trabajo el Análisis Lineal Discriminante se ha utilizado para discriminar entre diferentes tipos de muestras, como distintas mieles monoflorales, en función del conjunto de variables normalizadas obtenidas a partir del espectro generado por la técnica de espectroscopía infrarroja.

En el análisis de los espectros FTIR cada espectro representa una serie de intensidades medidas a distintas longitudes de onda. El análisis de estos datos requiere una normalización para que tengan una misma escala, facilitando la comparación.

El análisis lineal discriminante busca proyectar los datos de las variables normalizadas a un espacio de menor dimensión. Este espacio generalmente se representa mediante una o dos funciones discriminantes (una línea o un plano) de tal manera que se maximice la separabilidad entre los distintos orígenes de las mieles. Se realiza una reducción de la dimensionalidad de las variables normalizadas del FTIR similar a la que se realizaría con Análisis de Componentes Principales, pero centrándose en maximizar la separabilidad entre los diferentes orígenes.

Este análisis asume que los datos dentro de cada clase siguen una distribución gaussiana (normal) y que todas las muestras pertenecientes a cada origen comparten una matriz de covarianza común.

Para obtener las funciones discriminantes, el programa calcula para cada origen botánico y geográfico la media de todas las variables normalizadas y la matriz de covarianza dentro de los orígenes (S_w) y entre orígenes (S_b). A partir de ambas variables, se obtiene una matriz de discriminación que combina la información en ambas. Para obtener las funciones discriminantes se diagonaliza esta matriz de discriminación, es decir, se calculan los autovalores y autovectores de la matriz. Los vectores propios asociados con los mayores valores propios son las direcciones de máxima discriminación y corresponden a las primeras funciones discriminantes, que son las que habitualmente se retienen.

Para evaluar cuántas funciones discriminantes deben retenerse se evalúa el valor Lambda de Wilks. Este estadístico mide la proporción de la varianza total en las variables normalizadas generadas por el FTIR que no es explicada por las diferencias entre los orígenes. Un valor de Lambda de Wilks cercano a 0 indica que hay una buena discriminación entre los orígenes, es decir, la varianza entre los grupos es grande comparada con la varianza dentro de los grupos. En trabajos similares sobre aplicación de FTIR para la diferenciación de mieles según orígenes se han seleccionado funciones con lambda de Wilks cercanos a 0.2. Pueden incluso seleccionarse valores superiores, cuando el número de grupos a discriminar sea superior a 3 (Concha-Herrera et al., 2009; Lerma-García et al., 2011; Saucedo-Hernández et al., 2011; Vergara-Barberán et al., 2015) y siempre que su inclusión mejore la interpretabilidad de los resultados.

Una vez seleccionado el número de funciones discriminantes, se proyectan los datos originales en el subespacio formado por los vectores propios seleccionados. Estas representaciones pueden realizarse en dos o tres dimensiones.

La validación de los resultados se ha realizado con validación cruzada dejando uno fuera (leave one out). Esta técnica de validación se utiliza en técnicas de clasificación, entre otras como holdout (segmentar la muestra en dos partes, para entrenamiento y validación) y k-fold (segmentar la muestra en k submuestras, para entrenar y validar en cada una de ellas). En la validación cruzada dejando uno fuera, cada muestra en el conjunto de mieles se usa una vez como conjunto de prueba mientras el resto de las c de miel se usan como conjunto de entrenamiento. Esto se repite tantas veces como muestras haya en el conjunto de datos, y se promedian los resultados para obtener una medida del rendimiento del modelo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PARAMETROS FISICOQUÍMICOS

4.1.1. Comparación de medias por grupo

Se analizaron los parámetros fisicoquímicos de humedad y conductividad eléctrica debido a su relevancia legislativa y, el color por su implicación comercial. Con el fin de tener una visión global de la variabilidad de estos parámetros para las mieles estudiadas, se han representado los gráficos de Caja y Bigotes (Figura 3). Estos gráficos aportan información visual y resumida de las medidas de posición más características (min, Q1, mediana, media, Q3 y máx) (Romero & Zúnica, 2013).

La Figura 3a muestra la caracterización por humedad, la Figura 3b por color mientras que la Figura 3c por conductividad eléctrica. En ellas se observa un patrón similar entre las mieles de acacia y milflores china. En donde las muestras de acacia presentan los valores más elevados de humedad y los valores más bajos de color y conductividad eléctrica, en comparación con el resto de las muestras. Las muestras de milflores china presentan valores más elevados de humedad que las muestras del milflores española, así como valores más bajos de color y conductividad eléctrica. Las mieles de azahar y romero tienen comportamientos similares para los tres parámetros fisicoquímicos analizados. Las muestras de azahar y romero presentando valores bajos de color y conductividad eléctrica por detrás de las mieles de acacia y por delante de las mieles de tomillo. Por el contrario, las muestras de tomillo presentan cierta similitud con las mieles de azahar y romero pero con algunas diferencias. Las muestras de tomillo presentan valores más elevados para los tres parámetros fisicoquímicos, en comparación con las mieles de azahar y romero.

La acacia y la milflores china muestran anchuras de caja (50% central de los datos, rango intercuartílico) más estrechas. Es evidencia de dispersión más pequeña en estas muestras de esta procedencia. Al contrario que las muestras de romero, azahar, tomillo y milflores española que presentan cajas más amplias, evidenciando una mayor dispersión debida a la naturaleza las muestras.

Respecto a los valores anómalos, se considera que no deben eliminarse del análisis. Pues todas la muestras cumplen la legislación establecida en el Real Decreto 1049/2003 en relación con la humedad ($<20\%$) y la conductividad eléctrica ($<0,8\text{ mS/cm}$), sin embargo que el color no está legislado. Los valores anómalos identificados simplemente superan el límite de $1.5 \times$ rango intercuartílico correspondiente a la anchura de la caja (Romero & Zúnica, 2013).

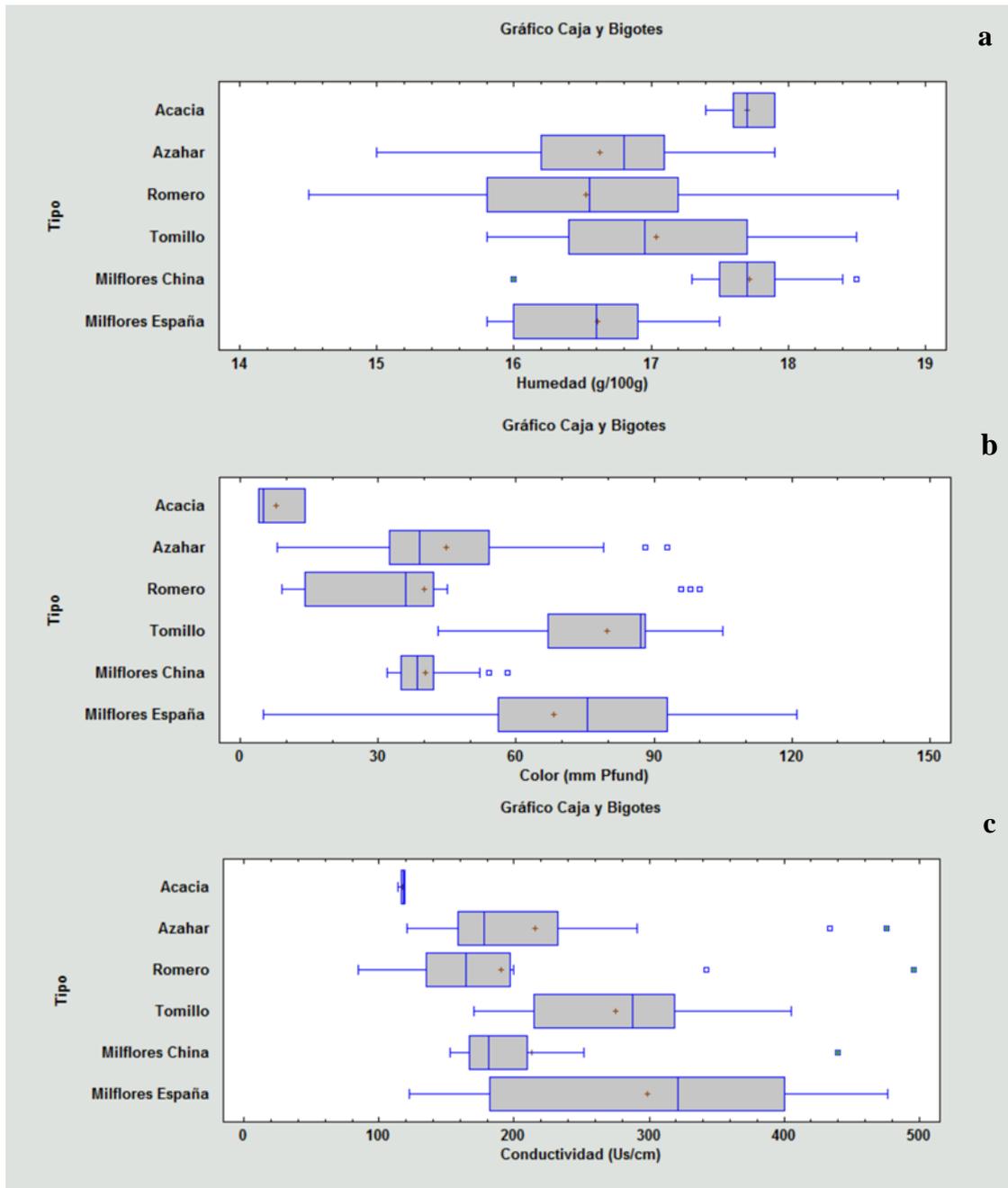


FIGURA 3. Gráficos de Caja y Bigotes de la humedad (a), el color (b) y la conductividad eléctrica (c) para los 6 grupos de mieles según procedencia.

Para analizar la significación estadística del efecto de la procedencia en cada uno de los parámetros fisicoquímicos, se han estimado tres modelos de análisis de la varianza simple (ANOVA).

Como paso previo a la estimación de los modelos ANOVA, se examina el cumplimiento de las hipótesis requeridas de: normalidad, independencia y homocedasticidad (Métodos estadísticos para ingenieros, 2013).

Respecto a la normalidad, la Tabla 2 muestra los coeficientes estandarizados de asimetría y curtosis de los parámetros fisicoquímicos para los 6 grupos en función de su procedencia. En general, se observa que la mayoría se encuentra dentro del rango [-2, 2]. Por esta razón, puede considerarse que las distribuciones son simétricas y mesocúrticas, no excesivamente alejadas del modelo de la distribución normal (Métodos estadísticos para ingenieros, 2013). Las mayores desviaciones respecto a este rango se encuentran en las muestras de milflores chinas y en la conductividad eléctrica de las muestras de azahar.

TABLA 2. Coeficientes de asimetría y curtosis estandarizados para los parámetros fisicoquímicos (humedad, color y conductividad eléctrica) analizados.

	Humedad (g/100g)		Color (mmPfund)		Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	
	Coefficiente Asimetría Estandarizado	Coefficiente Curtosis Estandarizado	Coefficiente Asimetría Estandarizado	Coefficiente Curtosis Estandarizado	Coefficiente Asimetría Estandarizado	Coefficiente Curtosis Estandarizado
Acacia	-0,527	-0,046	0,870	-0,957	-1,572	1,538
Azahar	-0,492	-0,558	1,900	0,665	3,396	2,990
Romero	0,191	-0,0172	2,199	0,655	3,316	3,862
Tomillo	0,238	-1,044	-1,00	-0,156	-0,005	-0,486
Milflores China	-3,388	6,517	2,312	0,355	4,205	4,329
Milflores España	0,435	-0,289	-0,922	-0,146	-0,268	-0,776

Respecto a la hipótesis de homocedasticidad, los gráficos de dispersión mostrados en las Figura 4 muestran la distribución de los parámetros para los 6 grupos en función de la procedencia. Se aprecia que la dispersión de las muestras de acacia y milflores china es inferior a las de las muestras españolas en los tres parámetros. Sin embargo, las muestras de procedencia española presentan valores de dispersión similares. Estas diferencias se deben a la naturaleza de las muestras comparadas y son inherentes al estudio que se plantea (Svečnjak et al., 2015a). La presencia de diferencias en la dispersión se evidencia en la Tabla 3 donde se muestran las desviaciones de cada parámetro en función de la procedencia.

Por tanto, la hipótesis de homocedasticidad se cumple parcialmente para la mayoría de las muestras, con marcadas diferencias en las muestras de milflores china y acacia.

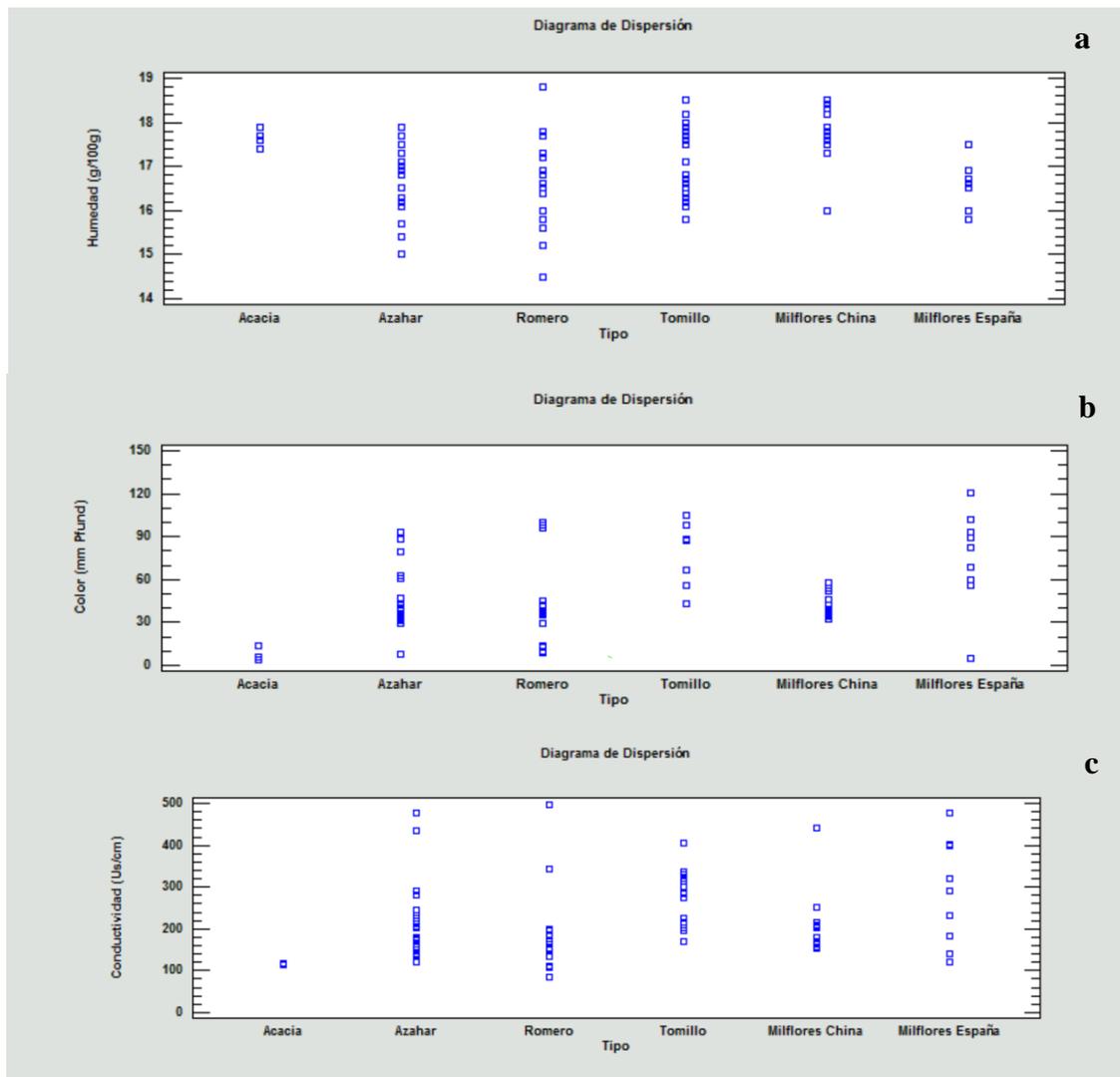


FIGURA 4. Representaciones de los diagramas de dispersión para la humedad, el color y la conductividad eléctrica.

Respecto a la hipótesis de independencia, se asume su cumplimiento en base al rigor de la metodología empleada para recopilar los datos. Es decir, las mediciones en cada muestra no se ven afectadas por las anteriores gracias al método empleado.

Por tanto, aunque no se puede asegurar el cumplimiento estricto de las hipótesis para la estimación de modelos ANOVA, se observa que las desviaciones son moderadas. Se ha optado por estimar estos modelos y no modelos no paramétricos, porque los modelos ANOVA son robustos al incumplimiento de alguna de estas hipótesis, siempre y cuando las desviaciones sean asumibles (Blanca et al., 2017).

TABLA 3. Análisis estadístico descriptivo (media, desviación estándar y grupos homogéneos) y resultados del ANOVA (Razón F y Valor P) de los parámetros fisicoquímicos para el factor procedencia de la miel.

	Humedad (g/100g)		Color (mm Pfund)		Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)	
	Promedio	(SD)	Promedio	(SD)	Promedio	(SD)
Acacia	17,7	(0,2) ^{bc}	7,7	(5,0) ^a	117,5	(2,2) ^a
Azahar	16,6	(0,8) ^{ab}	44,8	(21,4) ^b	215,5	(92,2) ^b
Romero	16,5	(1,1) ^a	39,9	(29,1) ^b	190,2	(106,9) ^{ab}
Tomillo	17,0	(0,8) ^{bc}	79,9	(20,28) ^c	275,3	(63,8) ^c
Milflores China	17,7	(0,5) ^c	40,3	(7,6) ^b	213,0	(117,6) ^{ab}
Milflores España	16,6	(0,6) ^{ab}	68,2	(38,5) ^c	298,5	(98,1) ^c
Razón F	7,97		9,78		4,17	
p - valor	0,0000		0,0000		0,0020	

Para cada variable las diferentes letras (a, b y c) en superíndice de la desviación estándar (SD) dentro de una misma fila/columna indican los grupos homogéneos entre los que hay diferencias significativas a un nivel de confianza del 95% según el test LSD.

Tal como se observa en la Tabla 3 existen diferencias significativas en los 3 parámetros fisicoquímicos para los 6 grupos en función de su procedencia. Las desviaciones estándar más elevadas las presentan las mieles de romero y milflores españolas. Se observa en la tabla que las mieles chinas (acacia y milflores) tienen los valores más elevados de humedad, a pesar de ello, cumplen con los requisitos legales ($< 20\%$) (Real Decreto 1049/2003). Esto se puede deber principalmente a las prácticas apícolas llevadas a cabo en los países asiáticos que suelen recolectar la miel con una mayor humedad, sin dar tiempo a que la abeja la opercule y se deshidrate correctamente, considerándose una “miel inmadura” (Arce, 2024). Teniendo en cuenta la monofloralidad de las mieles analizadas, se observa que el color y la conductividad se encuentran, en general, dentro de los valores habituales para estas variedades. Se observan algunos valores extremos, superándose en ciertas muestras los 90 mm Pfund, en paralelo a los valores altos de conductividad que superan los 500 $\mu\text{S/cm}$. Sin embargo, todas las mieles se encontraron en el rango de sus valores legislativos característico de las mieles de flores, menor de 800 $\mu\text{S/cm}$ (Orantes et al., 2018).

4.1.2. Relación entre los parámetros fisicoquímicos evaluados

Con la intención de continuar estudiando más a fondo la relación entre los 3 parámetros fisicoquímicos analizados en las muestras de mieles según procedencia se obtiene el gráfico de matriz.

En la Figura 5 se presenta el gráfico de matriz de los tres parámetros fisicoquímicos analizados para los 6 grupos en función de la procedencia. Esta figura muestra los gráficos de dispersión correspondientes a los tres pares de variables en los elementos fuera de la diagonal. En la diagonal se muestran los gráficos de caja y bigotes de cada parámetro fisicoquímico. Se puede observar que existe una relación directa y moderada entre el color y la conductividad eléctrica de las muestras. Esto significa que aquellas muestras que presentan valores más bajos de color también tienen valores bajos de conductividad y viceversa. Esto se debe principalmente a que se ha comprobado en diversos estudios que el color y la conductividad eléctrica son parámetros que están correlacionados entre sí, y viene afectados por el contenido mineral y, por ende el origen geográfico y botánico de la miel (Escriche, et al., 2017b).

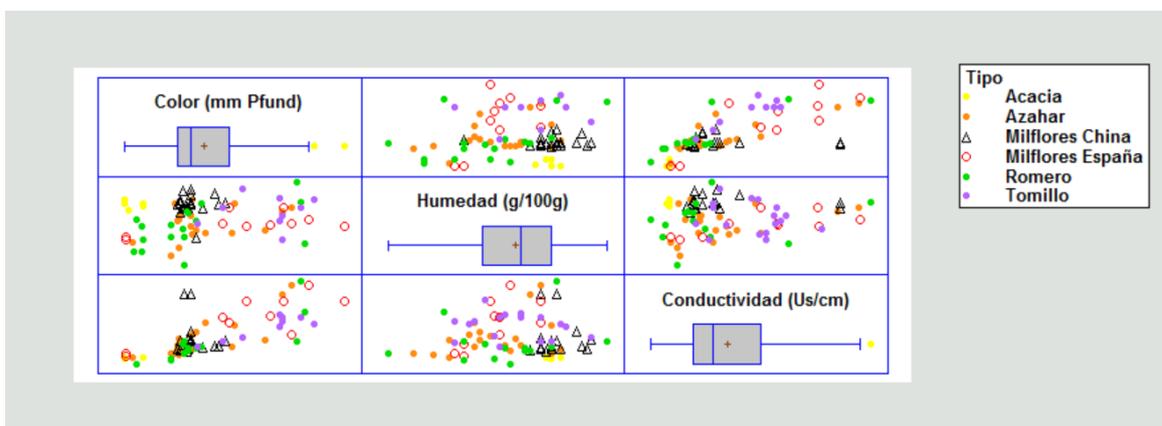


FIGURA 5. Representación del gráfico de matriz para los tres parámetros fisicoquímicos analizados en las muestras.

Para profundizar en esta relación directa y moderada entre color y conductividad, la Figura 6 muestra el gráfico de burbujas con ambos parámetros en los ejes (X y Y). En dicha figura los 6 grupos de mieles están representados por diferentes colores en función de su procedencia, mientras que el grosor de la burbuja representa la humedad. Además de confirmar la relación entre color y conductividad, se aprecia que las muestras de acacia y milflores chinas (representadas en amarillo relleno y negro hueco) muestran los valores más bajos de color y conductividad eléctrica, y los valores más elevados de humedad. Esta figura también muestra que la humedad y la procedencia son independientes de la relación entre color y conductividad eléctrica.

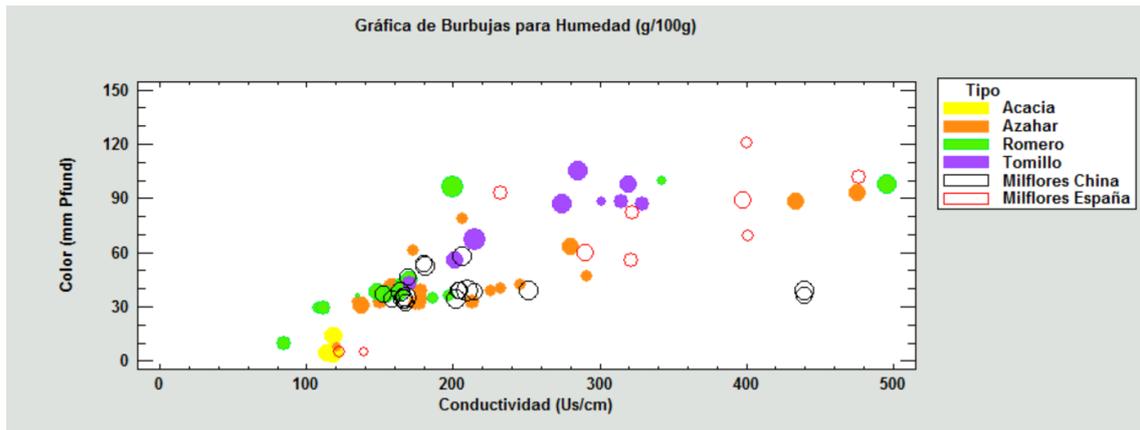


FIGURA 6. Gráfico de burbujas del color y la conductividad eléctrica, en función de la humedad y la procedencia.

Una vez finalizada la segunda etapa de trabajo correspondiente al análisis de los parámetros fisicoquímicos, se confirma que todas las muestras cumplen los requerimientos a nivel legislativo (humedad y conductividad eléctrica). Además, se observa que las muestras de miel de acacia y milflores china son las que presentan los valores de color y conductividad eléctrica más bajos. En este aspecto, la conductividad eléctrica y el color presenta valores en línea con su monofloralidad (Orantes et al., 2018).

4.2 ESPECTROS INFRARROJOS OBTENIDOS POR ATR-FTIR

La tercera etapa del trabajo del presente estudio se centró en la observación de las diferencias espectrales de las 34 regiones seleccionadas comprendidas entre 4.000 y 500 cm^{-1} . La Figura 7 muestra la superposición de 6 espectros representativos de cada uno de los 6 grupos según procedencias de mieles analizadas y mencionadas con anterioridad en Materiales y Métodos.

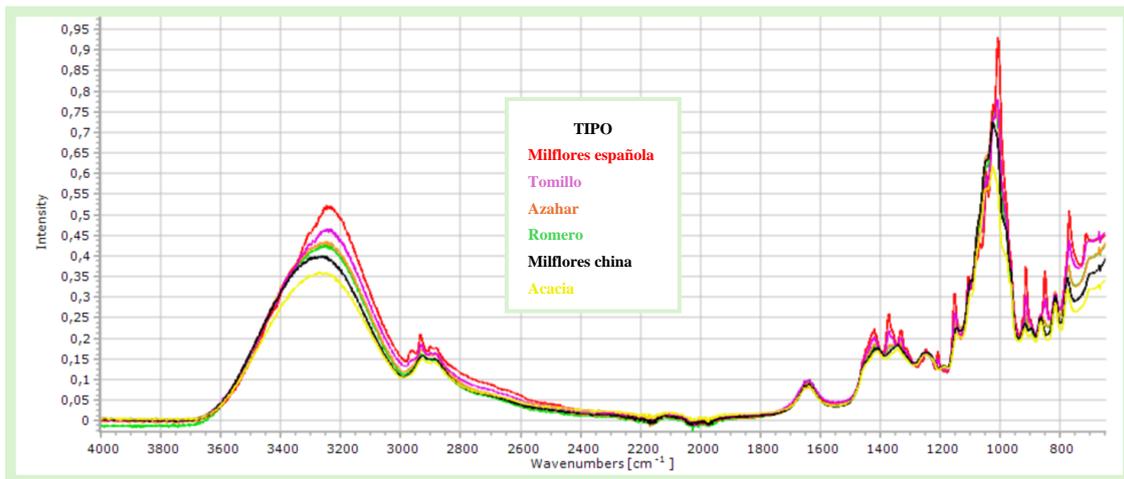


FIGURA 7. Representación de los espectros infrarrojos representativos, superpuestos entre sí, de los 6 grupos de mieles en función de su procedencia.

Tras la obtención de los espectros infrarrojos, se procedió con la cuarta y última etapa del trabajo. En esta etapa se ha estimado un modelo de clasificación basado en análisis lineal discriminante (LDA) donde la variable dependiente es la procedencia y las variables independientes son las 378 variables normalizadas generadas a partir de los espectros. De esta forma se pretendió evaluar en qué medida el espectro predice la procedencia de una muestra de miel.

Como resultado de este análisis discriminante se obtuvieron dos funciones discriminantes, con valor de Lambda de Wilks de 0,246, cuyo valor es aceptable (Vandeginste, 1998). Sin embargo, en este trabajo se ha considerado una tercera función discriminante, a pesar de que su inclusión incrementa el valor del Lambda de Wilks hasta 0.503, este valor es similar al reportado en trabajos de clasificación en otras matrices alimentarias y un número elevado de categorías (Cortés et al., 2019). Esta tercera función se incluyó con el fin de mejorar los resultados de clasificación entre procedencias. El porcentaje de variabilidad explicado con dos funciones discriminante es 84.5% (función 1: 64.6%, función 2: 19.9%, función 3: 10,1%), mientras que se incrementa hasta 94.6% con la tercera dimensión.

La Tabla 4 muestra los coeficientes estandarizados de las funciones discriminantes canónicas. Esta tabla contiene la selección de las variables más influyente en la construcción del modelo y obtención de las funciones discriminantes. Estas variables más influyentes presentan mayores valores de coordenadas en valor absoluto. Como se observa, el algoritmo seleccionó 8 variables predictoras. Esta selección de variables se produce porque hemos seguido un procedimiento stepwise (paso a paso). Por ello, esta tabla presenta las variables con contribuciones significativas al modelo de clasificación.

Resulta positivo que el modelo de clasificación se ha construido utilizando pocas variables predictoras (Vergara-Barberán et al., 2015). Las variables que tienen mayor peso (en valor absoluto) en las tres primeras funciones discriminantes son: V9/V20, V9/V22, V21/V29, V23/V28. En concreto para la función 1 fueron: V9/V20 y V23/V28, para la función 2 V9/V22 y V21/V29 mientras que para la función 3 fue V23/V28. En donde las principales regiones de longitud de onda seleccionadas por el algoritmo para construir el modelo LDA y que permiten, por lo tanto la diferenciación por procedencia correspondía con los grupos funcionales siguientes: -C-O-H (hidroxilo), -C-O (éter), -C-O (alcohol), -C-H (hidrato de carbono).

TABLA 4. Coeficientes de funciones discriminantes canónica estandarizados de las tres primeras funciones. La función 1 representa el 64,6% de la variabilidad, la función 2 el 84,5% y la función 3 94,6%.

	f1	f2	f3
V9/V20	7,201	0,652	-1,027
V9/V22	-2,566	-4,082	1,840
V10/V18	-3,211	2,367	0,511
V12/V14	2,958	2,049	0,481
V14/V19	-1,674	0,086	-0,231
V17/V26	-0,251	0,453	-0,303
V21/V29	0,017	3,627	-1,140
V23/V28	3,841	-3,350	2,766

La Figura 8 muestra la distribución espacial de las muestras de miel en las tres primeras funciones discriminantes obtenidas del análisis. Esta representación global evidencia claras diferencias entre muestras de origen chino (acacia y milflores) y español. Se observa que la acacia es la que mejor se diferencia del resto de muestras, mientras que también hay una clara diferenciación entre las milflores chinas de las milflores españolas. Por el contrario, no existe una separación tan clara entre la monofloralidad de mieles españolas como son azahar, romero y tomillo.

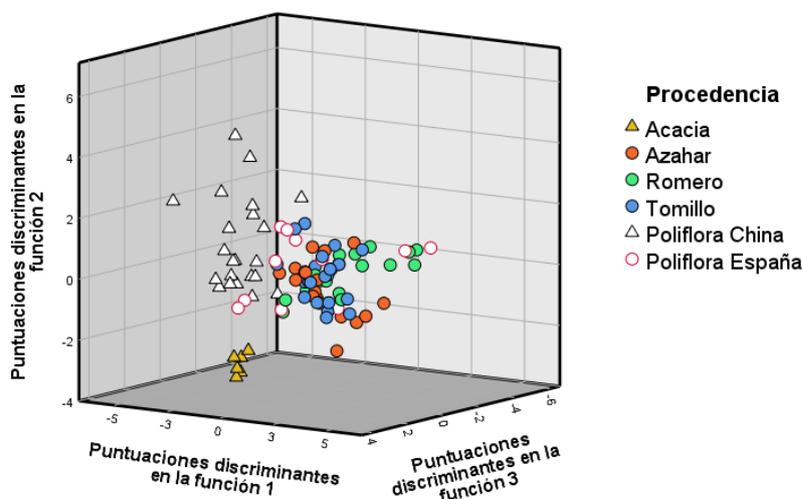


FIGURA 8. Gráfico de puntuaciones en el plano de las funciones discriminantes del modelo LDA construido para clasificar las diferentes mieles en función de su origen geográfico y botánico.

La Figura 9a presenta las puntuaciones discriminantes de las muestras en las dos primeras funciones. Esta figura confirma y presenta con mayor claridad la diferenciación entre países. Las muestras de acacia y milflores chinas se posicionan a la izquierda del plano, mientras que el azahar, romero, tomillo y milflores españolas se sitúan a la derecha, solapadas entre ellas.

Por otra parte, la Figura 9b muestra las puntuaciones discriminantes de la primera y tercera función y permite evaluar la pertinencia de incluir esta tercera función. Esta figura confirma la buena resolución del modelo en la clasificación entre mieles chinas y españolas, es decir, según la procedencia por países. Sin embargo, no resuelve el solapamiento entre la monofloralidad de mieles españolas.

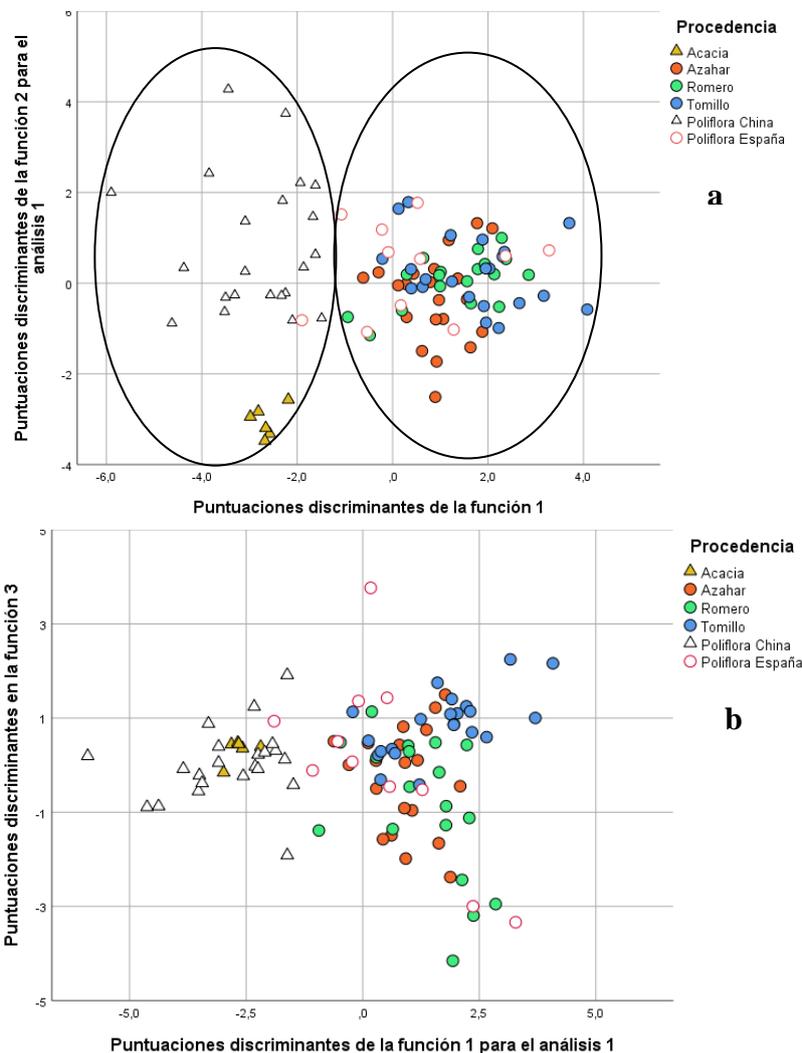


FIGURA 9. Gráfico de puntuaciones de las funciones discriminantes del modelo LDA construido para clasificar los 6 grupos de mieles según procedencia, representada la función 1 frente la función 2 (a) y la función 1 frente la función 3 (b).

La Tabla 5 muestra el porcentaje de acierto/error en la clasificación de los diferentes grupos. En ella, cada valor representa el porcentaje correspondiente a la clasificación de una miel específica (grupo pronosticado) en comparación con su clasificación real. El 63,0% de las muestras resultaron correctamente clasificadas con este modelo. Este porcentaje apenas disminuye aplicando el procedimiento de validación cruzada dejando uno fuera (59,0%). Las muestras de procedencia china presentan los mejores porcentajes de clasificación (100% en acacia y 81.8% en milflores). Por el contrario, las muestras españolas presentan porcentajes de clasificación inferiores, obteniendo los mejores resultados las mieles de milflores (72.7%) y tomillo (77.3%).

TABLA 5. Clasificación según la pertenencia pronosticada a grupos (Original y Validación cruzada) en función de la procedencia.

Pertenencia pronosticada a grupos									
			Acacia	Azahar	Romero	Tomillo	Milflores China	Milflores España	Total
Original	Recuento	Acacia	6	0	0	0	0	0	6
		Azahar	0	8	6	7	0	0	21
		Romero	0	5	6	6	1	0	18
		Tomillo	0	3	1	17	0	1	22
		Milflores China	1	1	0	0	18	2	22
		Milflores España	0	0	3	0	0	8	11
		%	Acacia	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Azahar	0,0	38,1	28,6	33,3	0,0	0,0	100,0	
	Romero	0,0	27,8	33,3	33,3	5,6	0,0	100,0	
	Tomillo	0,0	13,6	4,5	77,3	0,0	4,5	100,0	
	Milflores China	4,5	4,5	0,0	0,0	81,8	9,1	100,0	
	Milflores España	0,0	0,0	27,3	0,0	0,0	72,7	100,0	
	Validación cruzada ^b	Recuento	Acacia	6	0	0	0	0	0
Azahar			0	7	7	7	0	0	21
Romero			0	5	6	6	1	0	18
Tomillo			0	5	1	15	0	1	22
Milflores China			2	1	0	0	17	2	22
Milflores España			0	0	3	0	0	8	11
%			Acacia	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Azahar		0,0	33,3	33,3	33,3	0,0	0,0	100,0	
Romero		0,0	27,8	33,3	33,3	5,6	0,0	100,0	
Tomillo		0,0	22,7	4,5	68,2	0,0	4,5	100,0	
Milflores China		9,1	4,5	0,0	0,0	77,3	9,1	100,0	
Milflores España		0,0	0,0	27,3	0,0	0,0	72,7	100,0	

- 63,0% de casos agrupados originales clasificados correctamente.
- La validación cruzada se ha realizado sólo para aquellos casos del análisis. En la validación cruzada, cada caso se clasifica mediante las funciones derivadas de todos los casos distintos a dicho caso.
- 59,0% de casos agrupados validados de forma cruzada clasificados correctamente.

Una vez finalizada la cuarta y última etapa de trabajo correspondiente a la estimación de un modelo de clasificación basado en el análisis lineal discriminante, se puede afirmar que la información contenida en los espectros infrarrojos permite predecir la procedencia de las muestras de miel. Principalmente en función de su origen geográfico y, en menor medida, de su origen botánico. Por ello, se puede afirmar que el modelo tiene una buena resolución en la clasificación entre mieles chinas y españolas y, una menor en cuanto a la monofloralidad de mieles españolas. Destacando mayormente la acacia que es la que mejor se diferencia del resto de mieles.

5. CONCLUSIÓN

Los parámetros fisicoquímicos evaluados muestran una clara diferenciación según el origen geográfico. El color y conductividad, relacionados entre sí, se ajustan a los esperados para las mieles monoflorales analizadas. La humedad presenta diferencias significativas según origen geográfico, influenciado posiblemente por las prácticas de recolección apícolas. El espectro infrarrojo mediante FTIR aporta valor para la diferenciación de mieles según su procedencia geográfica, ya que clasifica de forma precisa las mieles chinas y españolas. La capacidad predictiva del modelo para diferenciar mieles según su origen geográfico es tan alta, que reduce la resolución de la clasificación de mieles españolas según su monofloralidad. Este resultado tiene importantes implicaciones prácticas para el conocimiento dada la repercusión económica de las importaciones de este país en el mercado español. Sin embargo, el uso del FTIR para la diferenciación de mieles debe acompañarse de técnicas estadísticas multivariantes que permitan la identificación de patrones en la información contenida en los espectros infrarrojos. Una limitación del trabajo es el reducido número de muestras en determinadas categorías de monofloralidad, como la acacia. Por ello, cabría ampliar este trabajo con un mayor número de muestras y procedencias.

6. BIBLIOGRAFÍA

AESAN. Agencia Española Seguridad Alimentaria y Nutrición. (2022). Memoria del Sistema Coordinado de Intercambio Rápido de Información. (SCIRI). Publicación del Informe anual de 2022 de la Red de Alerta y Cooperación. https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/alertas/sciri/Memoria_SCIRI_2022.pdf (Consultado: 5 junio de 2024).

Alberto. (2014). Miel y abejas en el Corán. Cata Mieladictos. Cultura Miel. <https://mieladictos.com/2014/04/15/la-miel-y-el-sura-de-la-abeja-en-el-coran/> (Consultado: 30 junio de 2024).

Annapurna, S. M., Rajora, S., Kumar, Y., Sai Krishna, V., & Kumar, N. (2023). FTIR -Based Characterization and Classification of Various Indian Monofloral Honey Samples. *Proceedings or 3rd International conference on Artificial Intelligence: Advances and Applications*, Springer (pp 315-322).

Apícola Monte Gayubar. (2022). Historia de la miel. <https://www.apicolamontegayubar.com/blog/historia-miel/> (Consultado: 6 junio de 2024).

Arce, M. (2024). El fraude de la falsa miel china destroza a los apicultores españoles. *Libre Mercado*. <https://www.libremercado.com/2023-02-25/el-fraude-de-la-miel-china-destroza-a-los-apicultores-espanoles-6989314/> (Consultado: 4 julio de 2024).

Blanca, M. J., Alarcón, R., Arnau, J., Bono, R., & Bendayan, R. (2017) Non-normal data: Is ANOVA still a valid option? *Psicothema*, 29(4), 552-557.

Bruker. (2024). Guía sobre espectroscopía FT-IR. <https://www.bruker.com/es/products-and-solutions/infrared-and-raman/ft-ir-routine-spectrometer/what-is-ft-ir-spectroscopy.html> (Consultada: 24 junio de 2024).

Bruselas Efe-Agro. (2024). La UE da luz verde final a las nuevas normas sobre el etiquetado de la miel. *Agrodiario*. <https://www.agrodiario.com/texto-diario/mostrar/4816606/ue-da-luz-verde-final-nuevas-normas-sobre-etiquetado-miel> (Consultado: 6 junio de 2024).

Buvé, C., Saeys, W., Rasmussen, M. A., Neckebroek, B., Hendrickx, M., Grauwet, T., & Van Loey, A. (2022). Application of multivariate data analysis for food quality investigations: An example-based review. *Food Research International*, *151*, 110878.

Ciursă, P., Pauliuc, D., Dranca, F., Ropciuc, S., & Oroian, M. (2021). Detection of honey adulterated with agave, corn, inverted sugar, maple and rice syrups using FTIR analysis. *Food Control*, *130*, 108266.

Concha-Herrera, V., Lerma-García, M. J., Herrero-Martínez, J. M., & Simó-Alfonso, E. F. (2009). Prediction of the Genetic Variety of Extra Virgin Olive Oils Produced at La Comunitat Valenciana, Spain, by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(21), 9985-9989.

Cortés, V., Barat, J. M., Talens, P., Blasco, J., & Lerma-García, M. J. (2018). A comparison between NIR and ATR-FTIR spectroscopy for varietal differentiation of Spanish intact almonds. *Food Control*, *94*, 241-248.

Cortés, V., Talens, P., Barat, J. M., & Lerma-García, M. J. (2019). Discrimination of intact almonds according to their bitterness and prediction of amygdalin concentration by Fourier transform infrared spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology*, *148*, 236-241.

Da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, *196*, 309-323.

Directiva 2001/110/CE. (2001). Del consejo de 20 de diciembre de 2001, relativa a la miel. *EUR-Lex* L10, 47-52.

Escriche, I., Kadar, M., Domenech, E., & Gil-Sanchez, L. (2012). A potentiometric electronic tongue for the discrimination of honey according to the botanical origin. Comparison with traditional methodologies: Physicochemical parameters and volatile profile. *Journal of Food Engineering*, *109*(3), 449-456.

Escriche, I., Sobrino-Gregorio, L., Conchado, A., & Juan-Borrás, M. (2017a). Volatile profile in the accurate labelling of monofloral honey. The case of lavender and thyme honey. *Food Chemistry*, *226*, 61-68.

Escriche, I., Tanleque-Alberto, F., Visquert, M., & Oroian, M. (2017b). Physicochemical and rheological characterization of honey from Mozambique. *Food Science & Technology*, *86*, 108-115.

Escriche, I., & Juan-Borrás, M. (2018). Standardizing the analysis of phenolic profile in propolis. *Food Research International*, 106, 834-841.

Escriche, I., Juan-Borrás, M., Blanco Pérez, M., (2020a). Departamento de Tecnología de Alimentos. Escola Tècnica Superior D'Enginyeria Agronòmica I del Medi Natural. Universitat Politècnica de València. Parámetros fisicoquímicos en mieles monoflorales españolas de la campaña 2020.

Escriche, I., Juan Borrás, M., Rojas Vélez, T., (2020b). Departamento de Tecnología de Alimentos. Escola Tècnica Superior D'Enginyeria Agronòmica I del Medi Natural. Universitat Politècnica de València. Revisión bibliográfica del análisis sensorial de mieles monoflorales españolas.

Escriche, I., Juan-Borrás, M., Baleriola Muñoz, L., (2021). Departamento de Tecnología de Alimentos. Escola Tècnica Superior D'Enginyeria Agronòmica I del Medi Natural. Universitat Politècnica de València. Evaluación un método de detección de adulteración de mieles con jarabe de arroz.

Escriche, I., Conchado, A., Peral, A. M., & Juan-Borrás, M. (2023a). Volatile markers as a reliable alternative for the correct classification of citrus monofloral honey. *Food Research International*, (Ottawa, ont.) 168, 112699.

Escriche, I., Juan-Borrás, M., Visquert, M., & Valiente, J. M. (2023b). An overview of the challenges when analysing pollen for monofloral honey classification. *Food Control*, 143, 109305.

FAO. (2022). Codex Alimentarius. Norma para la Miel (CXS 12-1981, Rev. 1). *Food and Agriculture Organization*. https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B12-1981%252Fcx_012s.pdf. (Consultado: 3 junio de 2024).

García-Chaviano, M. E., Armenteros-Rodríguez, E., Del Carmen Escobar-Álvarez, M., García-Chaviano, J. A., Méndez-Martínez, J., & Ramos-Castro, G. (2022). Composición química de la miel de abeja y su relación con los beneficios a la salud. *Revista Médica Electrónica*. <https://revmedicaelectronica.sld.cu/index.php/rme/article/view/4397> (Consultado: 5 junio de 2024).

Gok, S., Severcan, M., Goormaghtigh, E., Kandemir, I., & Severcan, F. (2015). Differentiation of Anatolian honey samples from different botanical origins by ATR-FTIR spectroscopy using multivariate analysis. *Food Chemistry*, 170, 234-240.

Hernandez, G. (2017). Texto guía Producción de Miel de Abeja. FAUTAPO, TUPAC KATARI. https://www.academia.edu/32785904/Texto_guia_Produccion_de_Miel_de_Abeja?email_work_card=view-paper (Consultado: 9 junio de 2024).

International Honey Commission. (1997). Métodos armonizados de la Comisión Europea de la Miel. IHC. <https://ihc-platform.net/> (Consultado: 17 junio de 2024).

Juan-Borrás, M., Soto, J., Gil-Sánchez, L., Pascual-Maté, A., & Escriche, I. (2016). Antioxidant activity and physico-chemical parameters for the differentiation of honey using a potentiometric electronic tongue. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(7), 2215-2222.

Kamal, M. A., & Klein, P. (2011). Determination of sugars in honey by liquid chromatography. *Science Direct*. 18 (1), 17-21.

Lerma-García, M., Simó-Alfonso, E., Bendini, A., & Cerretani, L. (2011). Rapid evaluation of oxidised fatty acid concentration in virgin olive oil using Fourier-transform infrared spectroscopy and multiple linear regression. *Food Chemistry*, 124(2), 679-684.

López-García, F., Valiente-González, J. M., Escriche-Roberto, I., Juan-Borrás, M., Visquert-Fas, M., Atienza-Vanacloig, V., & Agustí-Melchor, M. (2023). Classification of Honey Pollens with ImageNet Neural Networks. En *Lecture notes in computer science* (pp. 192-200).

Lozano-Torres, B.; Martínez-Bisbal, M.; Soto Camino, J.; Juan-Borrás, MDS.; Martínez -Mañez, R.; Escriche Roberto, MI. (2022). Monofloral honey authentication by voltammetric electronic tongue: A comparison with ¹H NMR spectroscopy. *Food Chemistry*. 383 (132460): 1-8.

Maione, C., Barbosa Jr, F., & Barbosa, R. M. (2019). Predicting the botanical and geographical origin of honey with multivariate data analysis and machine learning techniques: A review. *Computers and Electronics in Agriculture*, 157, 436-446.

MAPA. (2020). El sector apícola en cifras. Redacción. *Apigranca*. <https://apigranca.es/el-sector-apicola-en-cifras> (Consultado: 10 de junio 2024).

MAPA. (2022). Últimos datos de consumo alimentario. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. <https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-tendencias/panel-de-consumo-alimentario/ultimos-datos/default.aspx> (Consultado: 4 junio de 2024).

MAPA. (2023). “El Sector Apícola en Cifras : Principales Indicadores Económicos”. Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/apicola/> (Consultado: 20 junio de 2024).

MAPA. (2024). El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación inicia el procedimiento de consulta pública para modificar la norma de calidad de la miel. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. <https://www.mapa.gob.es/es/prensa/ultimas-noticias/el-ministerio-de-agricultura-pesca-y-alimentaci%C3%B3n-inicia-el-procedimiento-de-consulta-p%C3%BAblica-para-modificar-la-norma-de-calidad-de-la-miel/tcm:30-683772> (Consultado: 1 junio de 2024).

Martínez, C., (2024). La recolección de miel en la Prehistoria. *Museo Nacional de Ciencias Naturales*. <https://mncn.csic.es/es/comunicacion/blog/la-recoleccion-de-miel-en-la-prehistoria> (Consultado: 4 junio 2024).

Maté, V., (2023). Los apicultores se manifiestan contra el fraude y la importación de miel china. *El País*. <https://elpais.com/economia/2023-03-09/los-apicultores-se-manifiestan-contr-el-fraude-y-la-importacion-de-miel-china.html> (Consultado: 3 junio de 2024).

Naciones Unidas. (2018). Objetivos de desarrollo sostenible. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (UNDP) . <https://www.undp.org/es/sustainable-development-goals> (Consultado: 24 junio 2024).

Nozal Nalda, M. J., Bernal Yagüe, J. L., Diego Calva, J. C., & Martin Gomez, M. T. (2005). Classifying honeys from the Soria Province of Spain via multivariate analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, 311-319.

Orantes, J., Gonell, F., Torres, C., y Gómez-Pajuelo, A. (2018). Guía de mieles monoflorales ibéricas. 4ª edición. *Apicultura*. https://www.pajueloapicultura.com/wp-content/uploads/2023/06/Guia-de-mieles-monoflorales-Ibericas_2023.pdf (Consultado: 4 julio de 2024).

Parlamento Europeo. (2018). El mercado de la miel en Europa. Infografía. <https://www.europarl.europa.eu/topics/es/article/20180222STO98435/el-mercado-de-la-miel-en-europa-infografia> (Consultado: 5 junio de 2024).

Piana, L., Persano-Oddo, L., Bentabol, A., Bruneau, E., Bogdanov S., & Guyot, S. (2004). Sensory analysis applied to honey: state of the art. *Apidologie*, 35, S-26S37.

Quelal-Vásconez, M. A., Pérez-Esteve, É., Arnau-Bonachera, A., Barat, J. M., & Talens, P. (2018). Rapid fraud detection of cocoa powder with carob flour using near infrared spectroscopy. *Food Control*, 92, 183-189.

QUIORED. (2002). Recursos Educativos de Química Orgánica. Tablas de espectroscopía. https://www.ugr.es/~quiorred/lab/tablas_espec/ir.htm (Consultado: 2 de junio 2024).

Real Decreto 1049/2003. (2003). Norma de calidad relativa a la miel. *Boletín Oficial del Estado*, n. 186 de 5 agosto de 2003. <https://www.boe.es/eli/es/rd/2003/08/01/1049> (Consultado: 9 junio de 2024).

Reglamento (UE) 11169/2011. (2011). Parlamento Europeo y del Consejo de la UE. Sobre la información alimentaria facilitada al consumidor. *EUR-Lex*. L304/18. <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/1169/oj> (Consultado: 16 junio de 2024).

Romero Villafranca, R., Zúñica Ramajo, L. (2013). Métodos estadísticos para ingenieros. Universitat Politècnica de València. https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/71972/TOC_0004_02_01.pdf (Consultado: 6 junio de 2024).

Salazar, C. (2024, 17 junio). El significado de la miel en la biblia. Teología Historia Fe y Pensamiento. <https://csalazar.org/2021/06/03/el-significado-de-la-miel-en-la-biblia/> (Consultado: 30 junio de 2024).

Saucedo-Hernández, Y., Lerma-García, M. J., Herrero-Martínez, J. M., Ramis-Ramos, G., Jorge-Rodríguez, E., & Simó-Alfonso, E. F. (2011). Classification of Pumpkin Seed Oils According to Their Species and Genetic Variety by enuated Total Reflection Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 4125-4129.

Schencke, C., Vásquez, B., Sandoval, C., & del Sol, M. (2016). El rol de la miel en los procesos morfofisiológicos de reparación de heridas. *International Journal of Morphology*, 34(1), 385-395.

Siddiqui, A. J., Musharraf, S. G., & Choudhary, M. I. (2017). Application of analytical methods in authentication and adulteration of honey. *Food chemistry*, 217, 687-698.

Sobrino Gregorio, L., Vargas Colás, M. D., Escriche, I. (2016). Determinación de las propiedades térmicas de miel de girasol y de diferentes jarabes alimentarios. Departamento de Tecnología de Alimentos. Escola Tècnica Superior D'Enginyeria Agronòmica I del Medi Natural, Universitat Politècnica de València.

Sobrino-Gregorio, L., Vargas, M., Chiralt, A., & Escriche, I. (2017). Thermal properties of honey as affected by the addition of sugar syrup. *Journal Of Food Engineering*, 213, 69-75.

Sobrino-Gregorio, L., Bataller, R., Soto, J., & Escriche, I. (2018). Monitoring honey adulteration with sugar syrups using an automatic pulse voltammetric electronic tongue. *Food Control*, 91, 254-260.

Sobrino-Gregorio, L., Tanleque-Alberto, F., Bataller, R., Soto, J., & Escriche, I. (2019a). Using an automatic pulse voltammetric electronic tongue to verify the origin of honey from Spain, Honduras, and Mozambique. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(1), 212-217.

Sobrino-Gregorio, L., Vilanova, S., Prohens, J., & Escriche, I. (2019b). Detection of honey adulteration by conventional and real-time PCR. *Food Control*, 95, 57-62.

Svečnjak, L., Bubalo, D., Baranović, G., & Novosel, H. (2015). Optimization of FTIR-ATR spectroscopy for botanical authentication of unifloral honey types and melissopalynological data prediction. *European Food Research & Technology*, 240(6), 1101-1115.

Tanleque-Alberto, F., Juan-Borrás, M., & Escriche, I. (2019). Quality parameters, pollen and volatile profiles of honey from North and Central Mozambique. *Food Chemistry*, 277, 543-553.

Tanleque-Alberto, F., Juan-Borrás, M., & Escriche, I. (2020). Antioxidant characteristics of honey from Mozambique based on specific flavonoids and phenolic acid compounds. *Journal of Food Composition and Analysis*, 86, 103377.

Tanleque-Alberto, F., Vargas, M., Juan-Borrás, M., & Escriche, I. (2021). Thermal properties and hydrocarbon composition of beeswax from Mozambique and other geographical origins. *Journal Of Apicultural Research*, 62(4), 883-892.

Terrab, A., González, A. G., Díez, M. J., & Heredia, F. J. (2003). Characterisation of Moroccan unifloral honeys using multivariate analysis. *European food research and technology*, 218, 88-95.

Ulloa, J. A., Mondragón Cortez, P. M., Rodríguez Rodríguez R., Reséndiz Vázquez, J. A., & Rosas Ulloa, P. (2010). La miel de abeja y su importancia. CONACYT. <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/01-04/2.pdf> (Consultado: 8 junio de 2024).

Valiente, J. M., Juan-Borrás, M., López-García, F., & Escriche, I. (2023). Automatic pollen recognition using convolutional neural networks: The case of the main pollens presents in Spanish citrus and rosemary honey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 123, 105605.

Vandeginste, B. G. N.; Massart, D. L.; Buydens, L. M. C.; De Jong, S.; Lewi, P.J; Smayeres-Verbeke, J. (1998) In *Data Handling in Science and Technology Part B*; Elsevier Science B.V.: Amsterdam, The Netherlands; p237 <https://www.sciencedirect.com/bookseries/data-handling-in-science-and-technology/vol/20/part/PA> (Consultado: 8 junio de 2024).

Vázquez, A. M. (1994). *La miel, alimento de eternidad*. Universidad Complutense de Madrid, Madrid. https://www.academia.edu/61028499/La_miel_alimento_de_eternidad (Consultado: 10 junio de 2024).

Vergara-Barberán, M., Lerma-García, M. J., Herrero-Martínez, J. M., & Simó-Alfonso, E. F. (2015). Cultivar discrimination of Spanish olives by using direct FTIR data combined with linear discriminant analysis. *European Journal Of Lipid Science And Technology*, 117(9), 1473-1479.

7. ANEXOS

7. 1. TABLA 1 Relación de códigos de las muestras analizadas en el presente estudio según LABMIEL, así como su origen geográfico y botánico.

CÓDIGO	ORIGEN GEOGRÁFICO	ORIGEN BOTÁNICO
I-24001	China	Milflores
I-24002	China	Milflores
I-24003	China	Milflores
I-24004	China	Milflores
I-24005	China	Milflores
I-24006	China	Milflores
I-24007	China	Acacia
I-24008	China	Milflores
I-24009	China	Acacia
I-24010	China	Milflores
I-24011	China	Milflores
I-24012	China	Acacia
I-24013	China	Acacia
I-24014	China	Milflores
I-24015	China	Acacia
I-24016	China	Milflores
I-24017	China	Milflores
I-24018	China	Milflores
I-24019	China	Acacia
I-24020	China	Milflores
I-24021	China	Milflores
I-24022	China	Milflores
I-24023	China	Milflores
I-24024	China	Milflores
I-24025	China	Milflores
I-24026	China	Milflores
I-24027	China	Milflores
I-24032	China	Milflores
24002	España	Romero
24006	España	Tomillo
24008	España	Milflores
24023	España	Azahar
24040	España	Milflores
24047	España	Tomillo
24053	España	Milflores
24054	España	Milflores
24055	España	Milflores
686	España	Tomillo
690	España	Tomillo
695	España	Tomillo
I-24028	España	Milflores

I-24029	España	Azahar
I-24030	España	Tomillo
I-24032	España	Romero
I-24033	España	Romero
I-24034	España	Romero
I-24035	España	Romero
I-24036	España	Romero
M-10	España	Tomillo
M-17	España	Tomillo
23113	España	Romero
23114	España	Azahar
23116	España	Azahar
23118	España	Romero
23119	España	Romero
23120	España	Romero
23123	España	Azahar
23124	España	Romero
23125	España	Romero
23128	España	Romero
23129	España	Tomillo
23132	España	Azahar
23133	España	Azahar
23155	España	Romero
23156	España	Romero
23157	España	Romero
23159	España	Azahar
23160	España	Tomillo
23161	España	Milflores
23164	España	Azahar
23166	España	Azahar
23176	España	Tomillo
23181	España	Romero
23182	España	Azahar
23195	España	Azahar
23197	España	Romero
23198	España	Azahar
23199	España	Azahar
23200	España	Azahar
23202	España	Azahar
23203	España	Azahar
23205	España	Tomillo
23206	España	Azahar
23210	España	Tomillo
23211	España	Tomillo
23212	España	Azahar
23222	España	Azahar
23223	España	Milflores
23260	España	Tomillo
23263	España	Tomillo
23068	España	Tomillo

23110	España	Tomillo
23150	España	Milflores
23173	España	Azahar
23184	España	Tomillo
23185	España	Tomillo
23186	España	Tomillo
23196	España	Tomillo
I-24041	España	Milflores
I-24042	España	Milflores