



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

Aplicación de la espectroscopia infrarroja en la
diferenciación de mieles según origen geográfico

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR/A: Segura Melchor, Clara

Tutor/a: Escriche Roberto, M^a Isabel

Cotutor/a externo: CARRASCO CORREA, ENRIQUE JAVIER

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

TÍTULO: APLICACIÓN DE LA ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA EN LA DIFERENCIACIÓN DE MIELES SEGÚN ORIGEN GEOGRÁFICO

RESUMEN:

El desarrollo de herramientas analíticas sencillas que permitan autentificar el origen geográfico de las mieles, actualmente, es una necesidad para el sector agroalimentario. En concreto, para las mieles españolas, esto podría repercutir muy positivamente, ya que podrían diferenciarse fácilmente de las de otros países, lo que les otorgaría un importante valor añadido. Entre las diferentes metodologías disponibles para dicho fin, destacan los métodos basados en la espectroscopía infrarroja debido a su rapidez, simplicidad, sensibilidad y a que no requieren de acondicionamiento previo de la muestra. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es valorar la efectividad de la espectroscopía infrarroja de reflectancia total atenuada con transformada de Fourier (ATR-FTIR) en la discriminación de mieles de distintos países: España, República Dominicana, México, Mozambique e Italia. En total se analizaron 211 muestras de miel y se trabajó con el área de las bandas seleccionadas de los espectros IR obtenidos de cada una de ellas. Las variables utilizadas para la construcción de los modelos discriminantes lineales (LDA) se obtuvieron tras un proceso de normalización por cocientes de los valores de dichas áreas con el objetivo de minimizar los errores asociados a ciertos factores como la cantidad de muestra utilizada. A través de dichos modelos se pretendió determinar la diferenciación entre las mieles en función de su origen geográfico, considerando la distribución territorial de las mieles por continentes, países y regiones. Se logró una clasificación satisfactoria de las mieles en base al criterio continental, con un valor del 88,6% de pertenencia al grupo pronosticado. En el estudio de la división por países se consiguió un 90,5% de casos agrupados correctamente, con una clara diferenciación entre ellos. Las muestras de México fueron las que mejor se adaptaron al modelo, seguido de Italia y Mozambique; mientras que las de República Dominicana mostraron un peor comportamiento. Cuando se consideraron las regiones de cada país, se observó que los modelos obtenidos clasificaban especialmente bien las mieles de las distintas zonas de México, cuyo valor de pertenencia a grupos pronosticada fue del 100%; por el contrario, la peor clasificación se observó para las regiones de la República Dominicana. De esta manera, los resultados han indicado que las mieles analizadas de estos países presentan unas características distintivas en su composición química que pueden ser fácilmente detectables mediante el uso de la herramienta analítica ATR-FTIR. Sin embargo, es necesario aumentar el número de países de distintos continentes, además de la variabilidad botánica para conseguir un método universal que pueda aplicarse de manera continua en la industria como alternativa a los costosos métodos habituales.

PALABRAS CLAVE:

Miel, espectroscopía infrarroja, ATR-FTIR, autenticación, análisis discriminante lineal, LDA

Autora: Clara Segura Melchor

Valencia, septiembre 2023

TUTORA: Dña. M^a Isabel Escriche Roberto

COTUTOR EXTERNO: D. Enrique Javier Carrasco Correa

TITLE: Application of the infrared spectroscopy in the differentiation of honeys according to geographical origin

ABSTRACT:

The development of simple analytical tools to authenticate the geographical origin of honeys is currently a necessity for the agri-food sector. Specifically, for Spanish honeys, this could have a very positive impact, since they could be easily differentiated from those of other countries, which would give them an important added value. Among the different methodologies available for this purpose, methods based on infrared spectroscopy stand out due to their speed, simplicity, sensitivity and the fact that they do not require prior conditioning of the sample. Therefore, the objective of the present paper is to evaluate the effectiveness of attenuated total reflectance infrared spectroscopy with Fourier transform (ATR-FTIR) in the discrimination of honeys from different countries: Spain, Dominican Republic, Mexico, Mozambique and Italy. A total of 211 honey samples were analyzed and the area of the selected bands of the IR spectra obtained from each of them was used. The variables used for the construction of the Linear Discriminant Analysis (LDA) were obtained after a normalization process by quotients of the values of these areas in order to minimize the errors associated with certain factors such as the amount of sample used. These models were used to determine the differentiation between honeys according to their geographical origin, considering the territorial distribution of honeys by continents, countries and regions. A satisfactory classification of the honeys was achieved based on the continental criterion, with a value of 88.6% belonging to the predicted group. In the study of the division by countries, 90.5% of cases were correctly grouped, with a clear differentiation between them. The samples from Mexico were the best adapted to the model, followed by Italy and Mozambique, while those from the Dominican Republic showed the worst performance. When the regions of each country were considered, it was observed that the models obtained classified particularly well the honeys from the different areas of Mexico, whose predicted group membership value was 100%; on the contrary, the worst classification was observed for the regions of the Dominican Republic. Thus, the results have indicated that the honeys analyzed from these countries present distinctive characteristics in their chemical composition that can be easily detected by using the ATR-FTIR analytical tool. However, it is necessary to increase the number of countries from different continents, in addition to the botanical variability, in order to achieve a universal method that can be applied continuously in the industry as an alternative to the usual costly methods.

KEYWORDS:

Honey, infrared spectroscopy, ATR-FTIR, authentication, linear discriminant analysis, LDA

Author: Clara Segura Melchor

Valencia, September 2023

TUTOR: M^a Isabel Escriche Roberto

EXTERNAL COTUTOR: Enrique Javier Carrasco Correa

TÍTOL: Aplicació de l'espectroscòpia infraroja a la diferenciació de mels segons origen geogràfic.

RESUM: El desenvolupament d'eines analítiques senzilles que permeten autenticar l'origen geogràfic de les mels, actualment, és una necessitat per al sector agroalimentari. En concret, per a les mels espanyoles, això podria repercutir molt positivament, ja que podrien diferenciar-se fàcilment de les d'altres països, la qual cosa els atorgaria un important valor afegit. Entre les diferents metodologies disponibles per a aquesta fi, destaquen els mètodes basats en la espectroscòpia infraroja a causa de la seua rapidesa, simplicitat, sensibilitat i al fet que no requereixen de condicionament previ de la mostra. Per tant, l'objectiu del present treball és valorar l'efectivitat de la espectroscòpia infraroja de reflectància total atenuada amb transformada de Fourier (ATR-FTIR) en la discriminació de mels de diferents països: Espanya, República Dominicana, Mèxic, Moçambic i Itàlia. En total es van analitzar 211 mostres de mel i es va treballar amb l'àrea de les bandes seleccionades dels espectres IR obtinguts de cadascuna d'elles. Les variables utilitzades per a la construcció dels models discriminants lineals (LDA) es van obtenir després d'un procés de normalització per quocients dels valors d'aquestes àrees amb l'objectiu de minimitzar els errors associats a uns certs factors com la quantitat de mostra utilitzada. A través d'aquests models es va pretendre determinar la diferenciació entre les mels en funció del seu origen geogràfic, considerant la distribució territorial de les mels per continents, països i regions. Es va aconseguir una classificació satisfactòria de les mels sobre la base del criteri continental, amb un valor del 88,6% de pertinença al grup pronosticat. En l'estudi de la divisió per països es va aconseguir un 90,5% de casos agrupats correctament, amb una clara diferenciació entre ells. Les mostres de Mèxic van ser les que millor es van adaptar al model, seguit d'Itàlia i Moçambic; mentre que les de República Dominicana van mostrar un pitjor comportament. Quan es van considerar les regions de cada país, es va observar que els models obtinguts classificaven especialment bé les mels de les diferents zones de Mèxic, el valor de pertinença de les quals a grups pronosticada va ser del 100%; per contra, la pitjor classificació es va observar per a les regions de la República Dominicana. D'aquesta manera, els resultats han indicat que les mels analitzades d'aquests països presenten unes característiques distintives en la seua composició química que poden ser fàcilment detectables mitjançant l'ús de l'eina analítica ATR-FTIR. No obstant això, és necessari augmentar el nombre de països de diferents continents, a més de la variabilitat botànica per a aconseguir un mètode universal que pugui aplicar-se de manera contínua en la indústria com a alternativa als costosos mètodes habituals.

PARAULES CLAU:

Mel, espectroscòpia infraroja, ATR-FTIR, autenticació, origen geogràfic, anàlisi discriminant lineal, LDA

Autora: Clara Segura Melchor

València, setembre 2023

TUTORA: Dña. M^a Isabel Escriche Roberto

COTUTOR EXTERN: D. Enrique Javier Carrasco Correa

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del proyecto 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 Union y Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia del Gobierno de España. El trabajo también forma parte del proyecto Ruralfruit-AgroEco (Transición al modelo agroecológico y adaptación al cambio climático de la citricultura convencional en cooperativas valencianas) subvencionado por las ayudas de cooperación del PDR-CV 2014-2020.

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
ÍNDICE DE TABLAS	II
ÍNDICE DE ECUACIONES	II
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 LA MIEL	1
1.2 COMPOSICIÓN DE LA MIEL	1
1.2.1 Componentes mayoritarios	1
1.2.2 Componentes minoritarios	2
1.3 IMPORTANCIA DE AUTENTIFICAR EL ORIGEN DE LA MIEL	3
1.4 TÉCNICAS EMPLEADAS PARA LA CLASIFICACIÓN DE LA MIEL	4
1.4.1 Métodos clásicos	4
1.4.2 Otros métodos	5
1.5 OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE	8
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	9
2.1 OBJETIVOS	9
2.2 PLAN DE TRABAJO	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1 MUESTRAS DE MIEL	9
3.2 OBTENCIÓN DE LOS ESPECTROS ATR-FTIR	10
3.3 OBTENCIÓN DE LA MATRIZ DE DATOS	10
3.4 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	11
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
4.1 ANÁLISIS DE LOS ESPECTROS IR	11
4.2 CLASIFICACIÓN DE MIELES EN FUNCIÓN DEL ORIGEN GEOGRÁFICO	14
4.2.1 Clasificación continental	14
4.2.2 Clasificación en función de países	18
4.2.3 Clasificación en función de las regiones de cada país	21
5. CONCLUSIÓN	33
6. BIBLIOGRAFÍA	34

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Esquema del fenómeno de absorción infrarrojo en un análisis FTIR-ATR.

FIGURA 2. Equipo FTIR Agilent Cary 630 utilizado en el estudio.

FIGURA 3. Espectros FTIR representativos de cada una de las mieles de los países estudiados.

FIGURA 4: Gráfico de puntuaciones de las funciones discriminantes del modelo de LDA construido para clasificar las diferentes mieles en función del continente de origen

FIGURA 5. Gráfico de puntuaciones en el plano de las funciones discriminantes del modelo de LDA construido para clasificar las diferentes mieles en función del país de origen

FIGURA 6: Gráfico de puntuaciones de las funciones discriminantes del modelo de LDA construido para clasificar las diferentes mieles españolas en función de la zona.

FIGURA 7. Representación de las zonas políticas de México.

FIGURA 8: Gráfico de puntuaciones sobre el plano de las funciones discriminantes del modelo de LDA construido para clasificar las diferentes mieles de México en función de la zona

FIGURA 9. Representación de las zonas políticas de Mozambique.

FIGURA 10. Gráfico de puntuaciones sobre el plano de las funciones discriminantes del modelo de LDA construido para clasificar las diferentes mieles de Mozambique en función de la zona

FIGURA 11. Representación de las zonas políticas de República Dominicana.

FIGURA 12: Gráfico de puntuaciones de las funciones discriminantes del modelo de LDA construido para clasificar las diferentes mieles de República Dominicana en función de la zona.

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 Regiones espectrales FTIR seleccionadas para la obtención de las variables predictoras.

TABLA 2. Resultados de clasificación en función de los continentes que incluye información sobre la pertenencia a los grupos pronosticada, así como los datos del estudio de validación cruzada.

TABLA 3. Coeficientes de función discriminante canónica estandarizados de las dos funciones discriminantes del modelo obtenido en función del origen continental.

TABLA 4. Resultados de pertenencia al grupo y de validación cruzada de las muestras estudiadas siguiendo el modelo de clasificación por países.

TABLA 5. Coeficientes de función discriminante canónica estandarizados de las cuatro funciones para el modelo obtenido para la clasificación por países.

TABLA 6. Resultados de clasificación en función de las zonas de España que incluye información sobre la pertenencia a los grupos pronosticado, así como los datos del estudio de validación cruzada.

TABLA 7. Coeficientes de función discriminante canónica estandarizados de las dos funciones para el modelo obtenido para la clasificación por zonas en España.

TABLA 8. Resultados de clasificación en función de las zonas de México que incluye información sobre la pertenencia a los grupos pronosticado, así como los datos del estudio de validación cruzada.

TABLA 9. Coeficientes de función discriminante canónica estandarizados de las dos funciones para el modelo obtenido para la clasificación por zonas en México.

TABLA 10. Resultados de clasificación en función de las zonas de Mozambique que incluye información sobre la pertenencia a los grupos pronosticado, así como los datos del estudio de validación cruzada.

TABLA 11. Coeficientes de función discriminante canónica estandarizados de las dos funciones para el modelo obtenido para la clasificación por zonas en Mozambique.

TABLA 12. Resultados de clasificación en función de las zonas de República Dominicana que incluye información sobre la pertenencia a los grupos pronosticado, así como los datos del estudio de validación cruzada.

TABLA 13. Coeficientes de función discriminante canónica estandarizados de las dos funciones para el modelo obtenido para la clasificación por zonas en República Dominicana.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA MIEL

La miel, tal y como se expone en el Real Decreto 1049/2003 por el que se aprueba la Norma de calidad relativa a la miel, se define como “sustancia natural dulce producida por la abeja *Apis mellifera* a partir del néctar de 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”.

El conocimiento por parte del ser humano de esta sustancia semilíquida se remonta a tiempos primitivos, donde se utilizaba principalmente como alimento calórico y edulcorante por su elevado contenido en hidratos de carbono simples. Aunque ésta no es su única utilidad, ya que se le atribuyen grandes propiedades medicinales como antiinflamatoria, antioxidante o antibacteriana (Schencke, et al., 2016). Por lo tanto, su uso en las sociedades actuales es muy habitual habiéndose construido toda una estructura industrial alrededor de este producto. En este sentido, nació la apicultura, que puede definirse como “el conjunto de técnicas y conocimientos relativos a la cría de abejas” (Real Academia Española), cuyo objetivo es la obtención de miel.

1.2 COMPOSICIÓN DE LA MIEL

La miel tiene características muy variables en cuanto a sabor, consistencia (fluida, viscosa o total/parcialmente cristalizada) y color (que puede variar en una gama de incoloro a pardo oscuro) que dependen principalmente de factores como la/s planta/s de origen, el clima del lugar o la especie de la abeja productora (Da Silva, et al., 2016). De esta manera, la miel depende mucho de sus componentes y forma un sistema muy complejo cuya base es el agua y los hidratos de carbono simples (predominantemente fructosa y glucosa) acompañados de otras sustancias como ácidos orgánicos, proteínas y enzimas, vitaminas, minerales y partículas sólidas derivadas de la recolección (Codex Alimentarius, 2001), entre otros. Estos componentes varían en función de la fuente del néctar, las prácticas de apicultura, el clima y las condiciones ambientales, entre otros factores (Ulloa, et al., 2010).

1.2.1 Componentes mayoritarios

En relación con los **componentes mayoritarios** de la miel destacan:

→ **Azúcares:** Son el componente principal y comprenden alrededor del 80% de su contenido (Gotor Ramos, 2022). Tienen una gran importancia, ya que prácticamente definen parámetros como el valor energético, la viscosidad, la higroscopicidad y la textura de la miel (Kamal & Klein, 2011).

Los azúcares predominantes son la glucosa y la fructosa, de manera que tanto su valor de forma independiente como el cociente entre ambos monosacáridos se pueden utilizar como indicador de calidad o incluso para la clasificación de mieles (Kaskoniene, et al., 2010). Tal y como se describe en la Norma para la Miel del Códex Alimentarius, la suma de ambos azúcares debe superar el 60% en peso.

El perfil de azúcares de la miel ha sido altamente estudiado, determinando que, además de glucosa y fructosa, también contiene, en menor proporción, otros hidratos de carbono como la sacarosa, la ramnosa, la isomaltosa, la maltosa, la maltulosa, la melibiosa y la rafinosa, entre otros (Da Silva, et al., 2016). De esta manera, el Códex Alimentarius establece un límite del 5% en peso de sacarosa en la

miel, pudiendo utilizarse éste como indicador de calidad para evitar, principalmente, adulteraciones.

- Agua: Es el segundo componente principal. El contenido en agua de la miel condiciona tanto sus propiedades organolépticas como su conservación, ya que influye directamente en parámetros como el peso específico, la viscosidad o el color. Se considera que la miel madura, aquella que está lista para ser consumida, debe tener una humedad inferior al 18,5% (aunque se aceptan contenidos mayores en mieles tropicales). Esto implica que su almacenaje tras extraerla de la colmena debe realizarse con sumo cuidado, ya que tras su extracción este valor puede variar en función de las condiciones de almacenamiento (Ulloa, et al., 2011).

1.2.2 Componentes minoritarios

En relación con los **componentes minoritarios** se describen:

- Proteínas: Suponen el 0,2-1,6 % del contenido total (Won, 2008) y provienen principalmente del polen, aunque también se acumulan algunas trazas por fluidos y secreciones de néctar a través de las glándulas salivales de las abejas. En cuanto a aminoácidos, la prolina es el más abundante (entorno al 50-85%) y proviene, en su gran mayoría, de secreciones salivares de la propia abeja durante la transformación del néctar en miel (Da Silva, et al., 2016).

Por otro lado, la miel cuenta con distintas enzimas tales como la invertasa, la glucosidasa, la catalasa y la glucosa-oxidasa (Sak-Bosnar & Sakac, et al., 2012); aunque destacan las diastasas, unas enzimas con actividad amilolítica que son capaces de hidrolizar el almidón dando lugar a dextrinas y maltosa. La actividad diastásica es una forma de establecer la frescura de la miel, ya que una baja actividad diastásica está relacionada con el sobrecalentamiento del producto y/o su mal almacenamiento (Burguillo Carbó, 2019). De esta manera, el Real Decreto 2049/2003 por el que se aprueba la Norma de Calidad relativa a la miel establece que el índice diastásico en la escala de Schade no debe ser inferior a 8.

- Ácidos orgánicos: Suponen aproximadamente el 0,6% del contenido de la miel en peso y están presentes por la acción de algunas enzimas que secretan las abejas sobre los azúcares de la miel (Da Silva, et al., 2016).

El ácido orgánico predominante en la miel es el ácido glucónico, que proviene del proceso de maduración de la miel por la actuación de la glucosa oxidasa (Won, 2008).

- Minerales: Son un porcentaje mínimo en la composición de la miel, de 0,02% a 1% (Alqarni, et al., 2012). Su contenido es muy variado en macroelementos como el sodio y el calcio, pero también en microelementos como cobre, zinc o hierro y depende, principalmente, del suelo en el que crezca la planta de la que coge el néctar la abeja. Por ello, el contenido mineral de la miel se utiliza en muchos casos para conocer su origen botánico (Escuredo, et al., 2013); destaca el contenido en potasio, que supone un tercio del contenido total mineral (Alqarni, et al., 2012).

- Vitaminas: La miel tiene una baja concentración vitamínica reduciéndose, principalmente, al contenido en vitaminas del grupo B (tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantoténico, piridoxina, biotina y ácido fólico) proveniente, fundamentalmente, de los granos de polen. También se encuentran trazas de ácido ascórbico, cuyo contenido puede variar por su alta sensibilidad a la degradación por

oxidaciones. Todas estas vitaminas se conservan por el pH ácido del alimento, que oscila entre 3,5 y 5,5 (Bonté & Desmoulière, 2013).

- **Compuestos volátiles:** Son aquellos que le confieren algunas de las propiedades organolépticas más importantes a la miel como el sabor y el aroma. La mezcla de componentes químicos como ésteres, aldehídos o cetonas que forman el conjunto de los compuestos volátiles depende de distintos factores como el origen botánico, el néctar, el procesado de la miel o su almacenamiento; aunque, la mayoría de ellos provienen de las propias plantas o de la producción/transformación por parte de las abejas (Gianelli Barra, et al., 2010; Escriche et al., 2017). Algunos de estos compuestos volátiles pueden servir como marcadores de distintas mieles comerciales, por lo que su identificación es interesante en temas de trazabilidad, seguridad y fraude alimentarios (Escriche et al., 2023a).

1.3 IMPORTANCIA DE AUTENTIFICAR EL ORIGEN DE LA MIEL

En la actualidad, el sector apícola en España sufre una crisis relacionada con los efectos de las sequías, los incrementos de costes y la masiva importación de miel de otros países a precios, en ocasiones, inferiores a los costes de producción españoles (Maté, 2023). Por ello, los apicultores españoles demandan la obligatoriedad de reflejar en el etiquetado el origen geográfico de la miel (Robles, 2017). El artículo 2 de la Directiva 2001/110/CE (donde se resume a nivel europeo la Norma de Calidad de la Miel) recoge que “deberán mencionarse en la etiqueta el país o los países de origen en que la miel haya sido recolectada”; aunque, si la miel procede de más de un Estado miembro o de un tercer país, dicha mención podrá sustituirse por una de las siguientes: «Mezcla de mieles de la CE», «Mezcla de mieles no procedentes de la CE» o «Mezcla de mieles procedentes de la CE y de mieles no procedentes de la CE». Además, el **Reglamento 1169/2011** sobre la información alimentaria con el etiquetado, impone que se debe indicar el país de origen del alimento “cuando su omisión pudiera inducir a error al consumidor en cuanto al país de origen o el lugar de procedencia real del alimento”. Sin embargo, esta normativa resulta insuficiente por la ambigüedad respecto a la información del origen geográfico de procedencia de una miel. Esto ha motivado el descontento del sector apícola y entidades como la Coordinadora de Organizaciones de Agricultores y Ganaderos (COAG) y la Organización de Consumidores y Usuarios (OCU). Por ello, en España se aprueba en diciembre de 2020 una norma nacional que establece la obligatoriedad de indicar los países concretos de origen de la miel en todas las mieles que se envasan en España, aunque, legalmente, los productos pueden indicar como país de origen aquel en el que han sufrido su última transformación.

Ante este escenario, es importante desarrollar herramientas analíticas sencillas que permitan autentificar el origen geográfico de las mieles españolas frente a las de otros orígenes.

1.4 TÉCNICAS EMPLEADAS PARA LA CLASIFICACIÓN DE LA MIEL

La tipificación o clasificación de la miel permite al consumidor conocer no sólo su origen geográfico, sino también sus características y calidad. En la actualidad, además de la necesidad de mantener un buen nivel de trazabilidad, seguridad alimentaria, cumplimiento de la normativa y detección de fraude alimentario relacionados con la miel, la tipificación de este alimento es interesante para el propio productor por el valor añadido que supone (Bazurro & Sánchez, 2005). Entre las técnicas que se conocen de clasificación de mieles destacan las que seguidamente se relacionan.

1.4.1 Métodos clásicos

La **melisopalinología** permite caracterizar la miel de acuerdo con su origen botánico y geográfico, ya que los pólenes presentes en ella proceden de las plantas próximas a la colmena a las que acuden las abejas para libar el néctar de las flores o las secreciones azucaradas. Se basa en observar la morfología y la cantidad de los granos de polen que hay en la miel mediante microscopía óptica. Es un método complejo que requiere de analistas muy expertos, presentando el inconveniente de que no existe un método oficial (Gotor Ramos, 2022). Además, la intervención humana en el análisis repercute en gran medida en la discrepancia de resultados entre laboratorios, incluso si están acreditados (Escriche et al., 2023b).

Análisis fisicoquímicos. Se analizan de manera rutinaria para determinar la calidad de la miel, ya que los niveles de muchos de ellos están legislados, como es el caso del contenido en hidroximetil furfural (HMF) y la humedad (Real Decreto 1049/2003). Otros de estos parámetros también pueden ser útiles para aportar información sobre la procedencia floral; entre ellos cabe mencionar:

- **HMF:** La presencia de HMF es poco común en la miel fresca porque indica un mal tratamiento y almacenamiento, así como el envejecimiento. Por lo tanto, para garantizar la frescura de la miel, es fundamental cuantificar este parámetro (Sobrino, 2020). De acuerdo con la legislación actual, el HMF no puede exceder los 40 mg/kg en mieles en general, excepto las destinadas a uso industrial. Se permiten hasta 80 mg/kg de mieles y mezclas provenientes de regiones de clima tropical (Real Decreto 1049/2003).
- **Humedad:** El nivel óptimo de humedad de la miel está alrededor del 20%, un parámetro que influye directamente en la seguridad alimentaria, ya que el aumento de éste podría suponer problemas de fermentación o de deterioro por crecimiento microbiológico (Reina, 2023).
- **Color:** Varía desde el blanco hasta el pardo oscuro casi negro, pasando por tonalidades amarillas, ámbar, rojizas, verdosas y marrones. Esta variación del color está relacionada con la presencia de distintos pigmentos como los carotenos o las xantofilas provenientes del néctar de las flores, lo que permite relacionar el parámetro de las mieles frescas con el origen botánico de la miel (Díaz-Moreno, et al., 2009).
- **pH:** La miel es un alimento con un rango de pH de 3,5 a 5,5, dependiendo principalmente de la cantidad de ácidos orgánicos que contengan; a su vez, son éstos los responsables de su excelente estabilidad (Ulloa, et al., 20110).
- **Azúcares:** Los azúcares predominantes son la glucosa y la fructosa (85% de los sólidos totales), de manera que tanto su valor de forma independiente como el cociente entre ambos monosacáridos se puede utilizar como indicador de calidad o de clasificación de mieles (Kaskoniene, et al., 2010).
- **Conductividad eléctrica:** Está relacionada directamente con el contenido de sales minerales, ácidos orgánicos, iones inorgánicos, macromoléculas de proteínas y granos de polen y esporas (Díaz-Moreno, et al., 2009). Es un parámetro interesante para diferenciar el origen floral de la miel. El Real Decreto 1049/2003 establece que la conductividad de la miel de mielada (procedente de las secreciones de las plantas) debe ser superior a 0,8 mS/cm.

El **análisis sensorial** es una técnica que utiliza los cinco sentidos para evaluar las propiedades organolépticas de un alimento. Este análisis es muy útil para ayudar en la diferenciación botánica de las mieles, además de ser la forma más cercana a la evaluación que puede realizar un consumidor a la hora de comprar el producto (Rojas Vélez, 2020). Por lo general, es realizado por catadores profesionales y bajo unas condiciones ambientales altamente controladas.

1.4.2 Otros métodos

La **resonancia magnética molecular** o RMN es una técnica analítica rápida, no destructiva, sensible y fácil de usar, aunque muy costosa, que se basa en la espectroscopía de absorción, permitiendo caracterizar estructuras moleculares. En este caso, al aplicar un campo magnético externo, algunos núcleos atómicos son capaces de absorber energía, traduciéndose en un espectro. Por tanto, es un método tanto cualitativo y multiparamétrico porque permite identificar una gran cantidad de compuestos, como cuantitativo, ya que el área de los distintos picos del espectro se relaciona con la concentración de la sustancia que representan. En el campo de la miel permite, entre otras cosas, determinar el origen botánico (Lozano-Torres, et al., 2022).

El **análisis de la relación de isótopos de carbono estables** o SCIRA es, actualmente, el método oficial para detectar la adición de jarabes de azúcar a la miel provenientes de plantas tipo C4 como el maíz o la caña de azúcar. El análisis se basa en la medición del cociente de la abundancia de los isótopos de carbono $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ (Sobrinio Gregorio, 2020; Gotor Ramos 2022),

El **análisis de la actividad enzimática** puede tener distintos objetivos como la evaluación de la frescura de la miel, ya que la concentración de diastasa en el alimento disminuye con el calor y el tiempo de almacenamiento; el origen botánico, ya que el contenido diastásico es distinto en función de ello o las adulteraciones de la miel por adición de jarabes de azúcares invertidos obtenidos mediante enzimas (Sobrinio Gregorio, 2020).

La **espectroscopía Raman** es una técnica simple, rápida y no destructiva que ofrece información química y estructural de los compuestos orgánicos presentes en la muestra (Sobrinio Gregorio, 2020). Las aplicaciones destacadas con relación a la miel son la diferenciación botánica y la detección de adulteraciones (Paradakar & Irudayaraj, 2002).

La **cromatografía de gases para el análisis de compuestos volátiles**, basada en la volatilidad de algunos compuestos y su polaridad, es interesante para garantizar la procedencia de las especies vegetales de las que proceden las mieles (Sobrinio Gregorio, 2020).

La **calorimetría diferencial de barrido** o DSC es sensible, rápida, sencilla y con necesidad de una cantidad pequeña de muestra y se basa en las propiedades térmicas de la sustancia a analizar. Se trata de aportar calor de forma controlada para observar, mediante curvas de temperatura versus tiempo, los cambios físicos de la muestra. Está enfocada a la detección de fraudes alimentarios, aunque no se utiliza demasiado en el campo de la miel (Sobrinio Gregorio, et al., 2017)

La **reacción en cadena de la polimerasa** o PCR es una técnica que permite la amplificación *in vitro* de un segmento de ADN mediante una reacción enzimática. El objetivo es obtener, a partir de una muestra pequeña, un gran número de copias del segmento de ADN interesado para poder facilitar la obtención de información sobre la muestra. En los últimos años ha tenido un gran papel en el sector alimentario (Cicaglion, 2002; Pegels Rojas, 2015); en el

caso de la miel se ha utilizado para identificar el origen botánico (Laube, 2010; Sobrino Gregorio, et al., 2019).

La **lengua electrónica** es un instrumento analítico compuesto por distintos sensores químicos que, con ayuda de un tratamiento estadístico de los resultados, permite aplicaciones como la determinación del origen y la calidad de distintas materias primas o el análisis cuantitativo de distintos compuestos presentes en una muestra (Escriche et al., 2011, Vivancos Bonos, 2019). En el caso de la miel se han estudiado distintas aplicaciones como el origen geográfico y botánico o la discriminación de mieles adulteradas (Lozano-Torres, 2022)

La **espectroscopía** estudia la interacción entre la radiación electromagnética y la materia. La radiación infrarroja fue descubierta por William Herschel en 1840 al observar que, haciendo pasar luz policromática a través de un prisma, la superficie de detrás aumentaba su temperatura. La radiación infrarroja comprende longitudes de onda entre 800 y 200000 nm, quedando dividida comúnmente en tres zonas: el infrarrojo cercano ($12500-4000\text{ cm}^{-1}$), el infrarrojo medio ($4000-660\text{ cm}^{-1}$) y el infrarrojo lejano ($660-50\text{ cm}^{-1}$). De estas tres zonas, la región media o MIR es la que ofrece mayor información estructural.

Cuando se utiliza la espectroscopía de IR medio para analizar una muestra se busca obtener un espectro a través de fenómenos de absorción, reflexión o emisión que se dan cuando la radiación electromagnética interacciona con el objeto de estudio.

Los espectrofotómetros FTIR son una clase de espectrofotómetro de IR medio que, en vez de realizar un barrido de frecuencias para obtener el espectro, llevan a cabo un barrido interferométrico sometiendo a la muestra a radiación infrarroja policromática. El FTIR es una técnica muy sencilla y rápida, de forma que permite hacer múltiples barridos espectrales para una misma muestra, mejorando la relación señal/ruido. Además, al tratarse de un equipo con menos elementos a través de los cuales pasa la radiación, se pierde menor intensidad, lo que permite detectar absorciones de energía más débiles y, en consecuencia, ser un método más sensible (Torres Mesa, 2016).

Una variante del FTIR es el ATR-FTIR, conocido como Reflectancia Total Atenuada. Un accesorio ATR mide los cambios en un haz de infrarrojos reflejado internamente cuando entra en contacto con una muestra. En un ángulo específico, el haz infrarrojo se dirige a un cristal denso ópticamente con un alto índice de refracción. La onda evanescente generada por esta reflectancia interna se extiende desde la superficie del cristal hasta la muestra que toca al cristal. La onda evanescente disminuye en las áreas del espectro de infrarrojos donde la muestra absorbe energía. El detector registra el haz de infrarrojos atenuado como una señal de interferograma, la cual se puede utilizar para generar un espectro de infrarrojos (Cortés, et al., 2018)

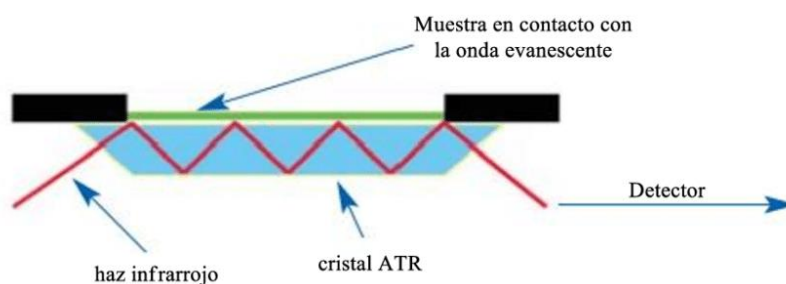


FIGURA 1. Esquema del fenómeno de absorción infrarrojo en un análisis FTIR-ATR.
Fuente: Estudio Espectroscópico y Morfológico en el Grafeno Químicamente Modificado (2017)

El ATR-FTIR estudia la vibración de los enlaces de los compuestos químicos, permitiendo identificar enlaces químicos en diferentes regiones del espectro infrarrojo. De esta forma, tiene tanto aplicaciones cualitativas como cuantitativas. En el caso de análisis cualitativos, el ATR-FTIR permite la identificación de un compuesto mediante dos etapas: la determinación de grupos funcionales que parece más probable que estén presentes a través el examen de la región de frecuencias del grupo y la comparación detallada del espectro desconocido con los espectros de compuestos puros que contienen los grupos funcionales encontrados en la primera etapa (). Cuando se quiere realizar análisis cuantitativos, una vez identificada la sustancia de estudio, la concentración de ésta en la muestra se relaciona con el área del pico bajo la curva. De esta manera, el FTIR destaca en el campo de la alimentación como método de detección de fraudes, de mejora de la seguridad alimentaria y la trazabilidad y de determinación de distintos parámetros de calidad (Téllez Mesa, 2019). Además, suele combinarse con métodos quimiométricos o análisis estadísticos multivariantes que permiten establecer modelos predictivos

Uno de los alimentos más afectados por el fraude es la miel, seguida de los productos cárnicos, el pescado y los productos pesqueros, las grasas y los aceites. Los informes anuales del Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos reflejan esta situación, donde la mayoría de las notificaciones sobre la miel se deben a un etiquetado incorrecto (European Union Commission, 2022). Por lo tanto, establecer una tipificación adecuada y confiable es crucial para garantizar la seguridad del etiquetado y la protección del consumidor durante la comercialización del producto (Annapurna et al., 2023). Por lo tanto, la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (ATR-FTIR) se está proponiendo recientemente como una herramienta analítica de elección. Se ha demostrado que esta metodología se ha implementado con éxito en una variedad de industrias alimentarias. Por ejemplo, se ha demostrado que es útil para clasificar varios aceites vegetales según su origen botánico, así como para identificar mezclas de aceite de oliva virgen extra con otros de bajo costo (Concha- Herrera et al., 2009; Lerma-García et al., 2010). Además, ha demostrado ser efectivo para diferenciar de manera confiable las almendras según sus variedades o la concentración de amigdalina (Cortés et al., 2018).

1.5 OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE

En el año 2022 la cosecha de miel española disminuyó prácticamente un 50% (UPA, 2022) debido a distintos factores, tales como: la crisis climática, que ha supuesto grandes sequías o aumentos de plagas como la *Varroa* en las colmenas; la crisis económica, traducida en un aumento de los costes de producción o la subida del precio de los carburantes y la paralización del mercado interior a causa del aumento de comercialización de mieles de fuera del territorio nacional (procedentes principalmente de países como China, Turquía o Uruguay) a un precio altamente competitivo que el mercado español no puede igualar. Además, el panorama legislativo, que facilita la entrada al territorio de miel exterior por el etiquetado poco claro en relación con el origen geográfico del alimento, supone un factor adicional y determinante en la crisis actual del sector apícola español.

Ante ello, se plantean diferentes vías para el impulso del sector de la miel en España, entre ellas, la búsqueda de técnicas analíticas sencillas que faciliten la autenticación del origen geográfico de las mieles. Esta característica está altamente relacionada con la calidad de la miel y con su valor añadido, ayudando a “reconstruir” el sector. Por tanto, estudiar e implementar una forma fácil de diferenciar las mieles españolas de aquellas importadas podría relacionarse con los siguientes Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Agenda 2030:

- ODS 1: Poner fin a la pobreza en todas sus formas en todo el mundo. La apicultura, según la FAO, es una actividad con capacidad de crear sistemas de vida sostenibles,

es decir, implementarla e impulsarla en distintas zonas puede contribuir a disminuir la vulnerabilidad frente a la pobreza (Bradbear, 2004)

- ODS 2: Poner fin al hambre, lograr la seguridad alimentaria y la mejora de la nutrición y promover la agricultura sostenible. La apicultura se puede desarrollar incluso en zonas áridas, siempre y cuando las abejas no hayan sido contaminadas, dañadas o perjudicadas. Además, garantiza la continuidad en el tiempo de la naturaleza a través de la polinización de las plantas silvestres y cultivadas (Bradbear, 2004). De esta forma, proteger a los apicultores españoles podría traducirse en un impulso hacia el sector y, por tanto, una contribución hacia el cuidado de la naturaleza. Por otro lado, promover miel de calidad proveniente del país mejoraría el perfil de mieles actuales del mercado, lo que contribuiría a la mejora de la nutrición y la seguridad alimentaria de los consumidores españoles.
- ODS 3. Garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades. Tal y como se detalla en el punto anterior y en el apartado 1.3., el origen geográfico de la miel está estrechamente relacionado con su calidad, según los apicultores españoles. De esta forma se entiende que facilitar dicha información al consumidor permite que éste pueda elegir con un criterio más objetivo y datos más claros a la hora de comprar, lo que se traduce, por lo general, en una promoción del bienestar y la vida sana.
- ODS 8. Promover el crecimiento económico sostenido, inclusivo y sostenible, el empleo pleno y productivo y el trabajo decente para todos. A causa de la crisis del sector apícola, tal y como se remarcaba al inicio del apartado 1.5, la producción cayó el ejercicio anterior en un 50%. Según MAPA, “el grado de profesionalización de la apicultura en España supera la media de la UE, con alrededor de un 22% de apicultores españoles”. Por tanto, promover la protección del sector en el territorio nacional y del producto español se traduciría en la promoción del crecimiento económico, el empleo pleno y productivo y trabajo decente para ellos.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1 OBJETIVOS

Garantizar el origen geográfico de la miel en el etiquetado es una necesidad para el consumidor, la administración y el sector apícola. La búsqueda de métodos rápidos, sencillos y eficaces que permitan poder diferenciar el lugar de procedencia de la miel es una prioridad. Por ello, el objetivo principal de este estudio es valorar la efectividad de la espectroscopía infrarroja ATR-FTIR en la discriminación de mieles de distintos países.

Por otro lado, es interesante destacar objetivos específicos como la búsqueda de diferencias a nivel químico-estructural entre mieles españolas y de fuera del país a través de la técnica de análisis ATR-FTIR y, en caso de encontrarlas, establecer técnicas multivariantes que permitan observarlas y justificarlas.

2.2 PLAN DE TRABAJO

La realización del estudio se plantea en tres etapas:

- Análisis de las muestras con el equipo FTIR

- Obtención del área de las distintas regiones espectrales de estudio definidas y normalización de los datos para su tratamiento estadístico
- Tratamiento estadístico de los datos para observar si hay diferencias significativas entre mieles de España y mieles provenientes de otros países

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MUESTRAS DE MIEL

En el presente estudio se han analizado 211 muestras de miel procedentes de 5 países, de tres continentes distintos.

1. Europa

- 73 de España, de las cuales 28 se recolectaron a lo largo de todo el territorio nacional y 45 en la Comunidad Valenciana.
- 8 de Italia compradas en el comercio.

2. América:

- 35 de la República Dominicana, obtenidas directamente en distintos apiarios del país distribuidos por las regiones del Norte, Sur y Este.
- 32 de México, compradas en el comercio como mieles monoflorales de diferentes orígenes botánicos autóctonos del país.

3. África:

- 63 de Mozambique procedentes de apicultores de las regiones de Nampula, Manica, Sofala y Zambezia.

Todas las muestras se recibieron en LABMIEL en la Universitat Politècnica de València y se clasificaron, etiquetaron (Anexo 1) y almacenaron en refrigeración hasta su análisis.

3.2 OBTENCIÓN DE ESPECTROS ATR-FTIR

La obtención de los espectros infrarrojos se llevó a cabo con un equipo FTIR Agilent Cary 630 (Figura 2), que disponía del Software MicroLab FTIR para la adquisición de la información. El análisis se realizó a temperatura ambiente, sin requerir tratamiento previo de la muestra. Se colocaba una gota de miel sobre el cristal de reflexión de diamante/ZnSe (1 en la Figura 2). Para cada muestra se realizaba un promedio de 32 barridos a una resolución de 2 cm^{-1} . Las absorbancias de los espectros se consideraron desde 4000 a 500 cm^{-1} , medidas respecto a un blanco que se obtenía con la celda vacía sin muestra. Todas las muestras se analizaban por triplicado. Se prestaba especial importancia a la limpieza (con un papel de celulosa sin fibras empapado en agua) y secado (con un nuevo papel de celulosa) del cristal cada vez que se analizaba una muestra distinta.



FIGURA 2. Equipo FTIR Agilent Cary 630 utilizado en el estudio. Fuente: Agilent Technologies (2012)

3.3 OBTENCIÓN DE LA MATRIZ DE DATOS

El Software MicroLab FTIR permitía obtener un espectro para cada muestra, que se guardaba en un archivo de tipo CSV donde se almacenan los datos del número de onda y la intensidad asociada a ésta. De esta forma, trabajando con el programa Spectragryph 2.1, dichos archivos CSV se tradujeron en el espectro infrarrojo de la muestra analizada. Todos ellos se dividieron en diferentes regiones de longitud de onda correspondientes a un pico, que se relacionó con un grupo estructural o funcional presente en los diversos compuestos formadores de las muestras de miel (Kasprzyk et al., 2018). El programa de análisis de espectros utilizado permite realizar la medición del área de cada región estudiada, de modo que dichos valores, tras realizar una normalización por cocientes para aumentar diferencias entre variables involucradas, se utilizaron como posibles variables predictoras.

3.4 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Se aplicó un análisis discriminante lineal (LDA) utilizando el software IBM SPSS Statistics (versión 26 Statistical Package for the Social Science, Chicago, EUA) a las variables predictoras para obtener vectores que permitan la máxima resolución las categorías previamente definidas. Se utilizó el algoritmo paso a paso para introducir todas las variables para que el software seleccionase aquellas que aportaban más al modelo. El software proporcionaba tanto el modelo más adecuado con aquellas variables que aportaban más información al sistema para clasificar, así como un estudio por casos llamado leave-one-out (LOO) que permite evaluar la capacidad del modelo de predecir la pertenencia de una muestra a un grupo en concreto. Este proceso se realiza mediante la eliminación de una de las muestras en la construcción del modelo, para su posterior clasificación con el modelo generado sin la propia muestra. Un resultado adecuado indica que la muestra, pese a no formar parte del modelo, es clasificada adecuadamente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ANÁLISIS DE LOS ESPECTROS IR

El estudio se ha centrado en la búsqueda de diferencias espectrales de las regiones comprendidas entre 4000 y 500 cm^{-1} . La Figura 3, a modo de ejemplo, muestra la superposición de un espectro representativo de cada una de las mieles procedentes de un país.

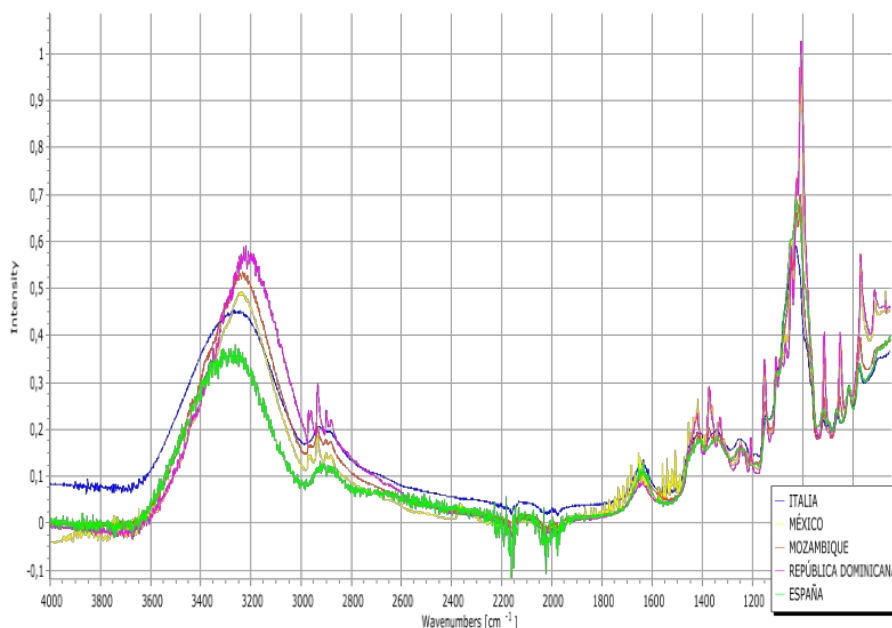


FIGURA 3. Espectros FTIR representativos de cada una de las mieles de los países estudiados. El color azul representa a Italia, el amarillo a México, el naranja a Mozambique, el rosa a República Dominicana y el verde a España.

En las muestras de miel analizadas, se han determinado 34 regiones espectrales que se dividen en los grupos químicos funcionales básicos y en la huella dactilar del alimento (Tabla 1). La huella dactilar o perfil químico de una sustancia química es una región espectral única de dicha sustancia, de manera que permite su diferenciación. En seguridad alimentaria, esta huella dactilar es cada vez más utilizada a la hora de combatir el fraude alimentario, ya que proporciona información de la autenticidad de los alimentos (denominación de origen, especie de la que proviene, componentes característicos, presencia de adulterantes, método de procesado, etc.) (Valverde Som, et al., 2018; Ortega Gavilán, et al., 2022).

TABLA 1 Regiones espectrales FTIR seleccionadas para la obtención de las variables predictoras.

N.º	Regiones (cm⁻¹)	Grupo funcional
1	3672-2981	-NH ₃ (Aminoácido) -O-H (Agua) -O-H (Ácido)
2	2981-2949	-C-H (CH ₃)
3	2949-299	-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	1120-1095	-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	939-922	-C-H (Carbohidrato)
28	922-902	-C-H (Carbohidrato)
29	902-883	-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 valor del área de debajo de la curva de cada una de las regiones estudiadas para todas las muestras se obtuvo con el programa SpectraGryph 2.1. Con todas las áreas obtenidas, se construyó una tabla en la que se recogían todos los datos clasificados en 34 variables, una por cada región del espectro estudiada. Posteriormente se normalizaron estos valores con el objetivo de usar una escala común, sin distorsionar las diferencias en los intervalos de valores ni perder información. Se aplicó el método de normalización por cocientes, es decir, dividir la primera variable por todas las demás, y así sucesivamente. Por ejemplo, la región 1 (V1) se convertiría en 33 variables tales que: $V1/V2$, $V1/V3$, $V1/V4...V1/V34$, y lo mismo para las regiones V2-V34. En todos los casos se evitó repetir información obviando los cocientes inversos, es decir, $V1/V2$ y $V2/V1$ muestran la misma información, solo que invertida, por lo tanto, una de las dos variables no es necesaria y se eliminó de la matriz de datos. De esta forma, de 34 variables (n) se obtuvieron 561 (Ecuación 1). Finalmente, quedó una matriz con 561 variables predictoras, producto de la normalización por cocientes, que contenía 633 objetos (correspondientes a 211 muestras x 3 repeticiones).

Este método de normalización permitió magnificar las diferencias pudiendo observar la posible variabilidad entre muestras con mayor facilidad.

$$N^{\circ} \text{ variables} = n \cdot \frac{(n-1)}{2} \quad (\text{Ec. 1})$$

4.2 CLASIFICACIÓN DE MIELES EN FUNCIÓN DEL ORIGEN GEOGRÁFICO

En este trabajo se planteó la posibilidad de usar el perfil obtenido mediante ATR-FTIR de mieles procedentes de distintos países para obtener un modelo basado en LDA que permitiese clasificarlas y poder, así, detectar fraudes de una manera, rápida, sencilla y económica. Sin embargo, clasificar en función del origen geográfico puede plantearse desde muchos puntos de vista y, por tanto, se propuso obtener distintos modelos en función de cómo se organiza el origen geográfico. En este sentido, se expusieron tres aproximaciones: (i) división continental, (ii) división por países y (iii) clasificación regional. En el primer caso, se dividieron las muestras en función del continente de pertenencia. En el segundo caso, las muestras se dividieron por países y en el tercero, se dividieron por regiones de cada país. En el último caso, se realizó un modelo para cada país, aunque no se efectuó ningún modelo para Italia, ya que de este país solo se obtuvieron muestras de una única región. Se debe considerar que en este trabajo no se tuvo en cuenta la clasificación botánica de las mieles, conociéndose que en cada continente, país y región hay mieles de distintos tipos. Esta última aproximación ofreció un agregado muy interesante al modelo, ya que permitió añadir dispersión al modelo favoreciendo la posibilidad de clasificar el origen geográfico independientemente de otras características de la miel.

4.2.1 Clasificación continental

En este primer estudio se intentó clasificar las mieles en función del continente de origen. Con este fin, las muestras se dividieron en tres grupos: Europa (España e Italia), África (mozambique) y América (México y República Dominicana). En la Figura 4 queda representada la distribución de las muestras en función de las dos funciones discriminantes obtenidas por el modelo de LDA, realizado como se ha descrito en la sección 3.4. Como puede observarse, las muestras no se separan en tres grupos perfectamente diferenciados como se esperaba en un principio, sino que se observan dos grupos muy diferenciados: el primero, en la parte superior, se corresponde con los continentes de África y América y el segundo, en la parte inferior, incluye las muestras procedentes del continente europeo (España e Italia). Este comportamiento puede ser debido a las técnicas apícolas, ya que, en

las regiones europeas, estos procedimientos están más estandarizados y se llevan de unas maneras específicas siguiendo las normativas vigentes, mientras que, en los otros tres países usados para generar el modelo, estas prácticas están menos desarrolladas, incluso, en algunos de ellos, la industria apícola no está desarrollada. Por lo tanto, parece que las dos regiones que se observan en el modelo muestran una separación en función de cómo de desarrollada se encuentra la industria apícola en el continente en el que se fabrica la miel. Otro aspecto importante que se puede observar es que, en el continente europeo, con este modelo, las muestras de España e Italia se mezclan en la región, mientras que sí que se observa una distribución por países dentro de la región que está constituido por las muestras de la República Dominicana, Mozambique y México. Los resultados en el grupo europeo aún están más en consonancia con la idea de que la separación se ha producido por la forma de fabricación más que por el origen geográfico basado en continentes. Esto es debido a que no es posible diferenciar, con este tipo de clasificación, entre las muestras de España e Italia, probablemente, debido a su forma más similar de fabricación de la miel, causada por el mayor desarrollo de la industria apícola en estos países.

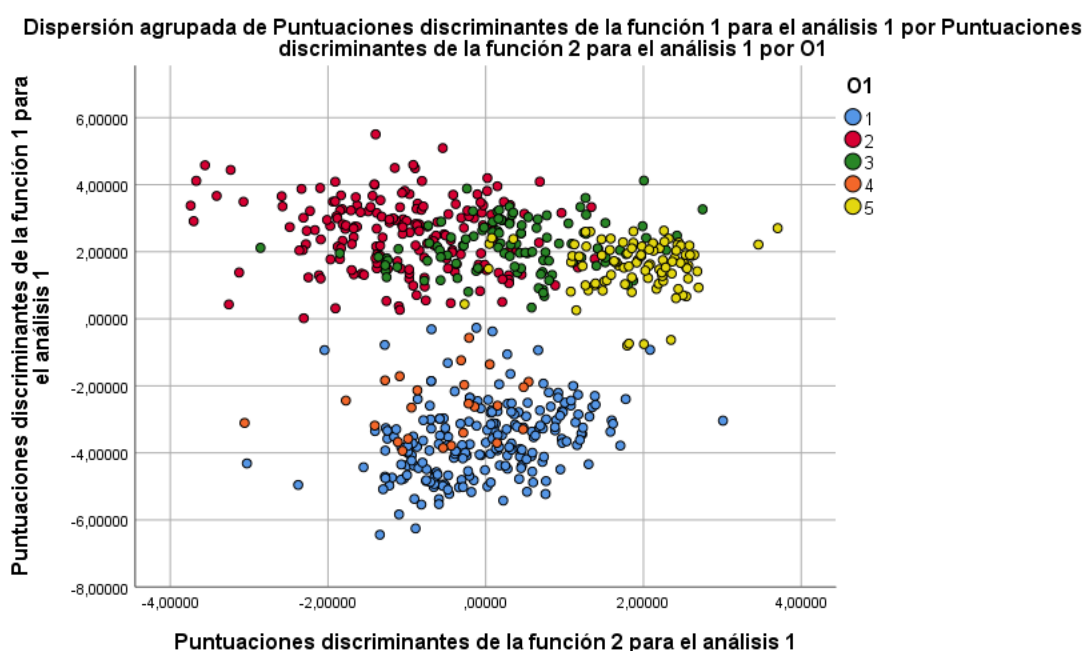


FIGURA 4. Gráfico de puntuaciones de las funciones discriminantes del modelo de LDA construido para clasificar las diferentes mieles en función del continente de origen. Siendo 1: España, 2: Mozambique, 3: República Dominicana, 4: Italia y 5: México.

En cuanto a la capacidad de predicción del modelo, los resultados se muestran en la Tabla 2. Los resultados de la clasificación corroboraron la validez del modelo establecido por el elevado valor de pertenencia a grupos, en base a los continentes de los que proviene la miel, pronosticado en comparación con el total de muestras que se consideraba en un inicio. Se observó que el 88,6% de las muestras se adaptaba correctamente al modelo, es decir, las muestras se encontraban en las regiones correspondientes a los continentes en los que se había indicado que estaban (1: Europa, 2: África, 3: América). Además, tras realizar una validación cruzada, se cumplió que el 86,6% de las muestras seguía adaptándose correctamente al modelo. Esa pequeña diferencia entre los porcentajes de grupos clasificados correctamente antes y después de la validación cruzada señalaron la robustez del modelo para clasificar las muestras de miel en función de los continentes, independientemente de si se había introducido dicha muestra en el modelo o no. Pese a los excelentes resultados obtenidos con el modelo, es cierto que se observó una peor capacidad

predictora del modelo en las muestras procedentes de los continentes africano y americano a comparación con las muestras del continente europeo, lo cual corresponde con lo observado en la gráfica de la Figura 4. En este caso, las muestras africanas y americanas solo se clasificaron bien en alrededor del 80-88% de los casos, y en la validación cruzada bajó del 85 al 75% de los casos. No obstante, este modelo pareció que sería perfecto para clasificar muestras que proceden de países donde la industria apícola está muy desarrollada (España e Italia), donde más del 97% de los casos se clasificaron perfectamente, tanto de manera directa como en la validación cruzada.

TABLA 2. Resultados de clasificación en función de los continentes que incluye información sobre la pertenencia a los grupos pronosticada, así como los datos del estudio de validación cruzada. Los grupos son: Europa (1), África (2) y América (3),

		Pertenencia a grupos pronosticada				Total
		03	1	2	3	
Original	Recuento	1	238	0	5	243
		2	0	163	26	189
		3	0	41	160	201
	%	1	97,9	,0	2,1	100,0
		2	,0	86,2	13,8	100,0
		3	,0	20,4	79,6	100,0
Validación cruzada ^b	Recuento	1	236	1	6	243
		2	1	160	28	189
		3	0	49	152	201
	%	1	97,1	,4	2,5	100,0
		2	,5	84,7	14,8	100,0
		3	,0	24,4	75,6	100,0

a. **88.6%** de casos agrupados originales clasificados correctamente.

b. 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.

c. **86.6%** de casos agrupados validados de forma cruzada clasificados correctamente.

En cuanto al modelo obtenido, al tener tres zonas geográficas, el máximo número de funciones discriminantes que pudo obtenerse fue 2, y son las que se muestra en la Tabla 3. Las funciones discriminantes obtenidas están compuestas de 22 variables predictoras que se obtuvieron de las variables normalizadas adquiridas por cocientes. Lo primero que pudo observarse es que la V1 está presente en muchos de los cocientes usados como variables predictoras, dando a entender que los grupos funcionales asociados (NH₃ de aminoácidos y OH del agua y ácidos) son importante a la hora de clasificar las mieles en función del origen continental. De todas las variables seleccionadas en el modelo, en la Tabla 3 se marcaron en rojo, aquellas que tienen más peso.

TABLA 3. Coeficientes de función discriminante canónica estandarizados de las dos funciones discriminantes del modelo obtenido en función del origen continental.

**Coeficientes de función
discriminante canónica
estandarizados**

	Función	
	1	2
V1/V2	,062	2,246
V1/V3	4,668	4,596
V1/V4	-5,694	-6,876
V1/V5	,464	-,021
V1/V6	,177	,186
V1/V7	-1,710	,963
V1/V8	2,863	-3,411
V1/V9	-5,386	-3,120
V1/V10	-4,879	,046
V1/V11	9,078	4,127
V1/V12	8,188	,511
V1/V13	-9,591	-1,544
V1/V14	2,965	3,605
V1/V18	-2,755	1,171
V1/V19	4,484	-4,353
V1/V26	-1,991	-3,151
V1/V27	-1,219	1,714
V1/V28	-,075	-,057
V1/V29	-1,375	1,917
V2/V3	-2,841	-2,822
V2/V4	3,255	4,641
V9/V26	1,772	,416

En el caso de la función discriminante 1, fueron las variables V1/V11, V1/V12 y V1/V13. En todos los casos se corresponden con la banda de los grupos NH₃ y OH (V1), que, en general, en este caso, se puede asociar a aminoácidos presentes en la miel, agua, azúcares y ácidos. Por otro lado, este grupo funcional dividido por los grupos OH, NH y CN de los grupos alcohol presentes (carbohidratos, fenoles, etc.) y los enlaces de los grupos NH y CN de las posibles amidas presentes (V11 y V12) o los enlaces C-C y C-O de los carbohidratos y los fenoles, respectivamente (V13), son los que mostraron más información con relación a la clasificación realizada en función de los continentes. En conclusión, la mayor información se obtuvo a través de compuestos como las proteínas, aminoácidos, azúcares y fenoles. Estos compuestos son muy característicos de las zonas en las que la miel se ha fabricado, como se ha indicado anteriormente. En el caso de la función discriminante 2, las variables con más peso fueron la V1/V3, la V1/V4 y la V2/V4. Nuevamente, la V1 es importante, aunque también mostró peso la V4 que se corresponde con enlaces C-H de los azúcares presentes en la miel. La V3 se corresponde con los grupos C-H de los ácidos, componente muy importante y clasificatorio en la miel. Por otro lado, las funciones discriminantes también

incluyen otros grupos funcionales que, aunque con menor peso, ayudan al modelo a clasificar adecuadamente la pertenencia a un grupo o a otro, por lo que todas las variables que entran tienen importancia. Cabe destacar que la mayoría de estas regiones se encuentran repartidas en la zona 1175-3700 cm^{-1} , lo cual es curioso porque están fuera de la zona de la huella dactilar, que suele ser la más característica de una sustancia.

4.2.2 Clasificación por países

La Figura 5 representa la distribución espacial de las muestras de miel en las tres primeras funciones discriminantes obtenidas del análisis discriminante lineal en función de las mieles obtenidas de los distintos países. Se pudo observar que las mieles de México (color amarillo) eran las que mejor se separaban del resto de grupos, estando ello en consonancia con los resultados obtenidos en la Tabla 4, donde México (5) mostró un 100% de pertenencia a los grupos pronosticados, así como un 100% de acierto en los estudios de validación cruzada. En general, se observó que el resto de grupos quedaban separados en dos zonas: España e Italia por un lado y Mozambique y República Dominicana por otro, mostrando menos separación dentro de estas parejas. En cualquier caso, los porcentajes de pertenencia al grupo pronosticado y de validación cruzada fueron excelentes para el modelo (80-100%). Los peores resultados se obtuvieron para República Dominicana, donde el modelo solo permitió pronosticar el grupo al 83% de las muestras del país. Además, por validación cruzada, solo el 80% de las muestras se clasificaron bien.

Dispersión 3D agrupada de Puntuaciones discriminantes de la función 1 para el análisis 1 por Puntuaciones discriminantes de la función 2 para el análisis 1 por Puntuaciones discriminantes de la función 3 para el análisis 1...

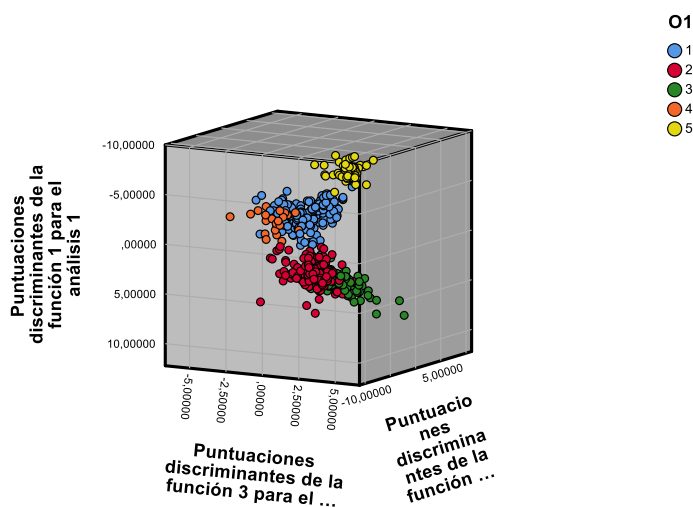


FIGURA 5. Gráfico de puntuaciones en el plano de las funciones discriminantes del modelo de LDA construido para clasificar las diferentes mieles en función del país de origen. Siendo 1: España, 2: Mozambique, 3: República Dominicana, 4: Italia y 5: México.

TABLA 4. Resultados de pertenencia al grupo y de validación cruzada de las muestras estudiadas siguiendo el modelo de clasificación por países. La identificación de las columnas es la siguiente: España (1), Mozambique (2), República Dominicana (3), Italia (4) y México (5)

		Pertenencia a grupos pronosticada					Total	
		01	1	2	3	4		5
Original	Recuento	1	195	1	0	23	0	219
		2	0	171	18	0	0	189
		3	0	17	88	0	0	105
		4	1	0	0	23	0	24
		5	0	0	0	0	96	96
	%	1	89,0	,5	,0	10,5	,0	100,0
		2	,0	90,5	9,5	,0	,0	100,0
		3	,0	16,2	83,8	,0	,0	100,0
		4	4,2	,0	,0	95,8	,0	100,0
		5	,0	,0	,0	,0	100,0	100,0
Validación cruzada ^b	Recuento	1	191	4	0	24	0	219
		2	0	165	24	0	0	189
		3	0	21	84	0	0	105
		4	4	0	0	20	0	24
		5	0	0	0	0	96	96
	%	1	87,2	1,8	,0	11,0	,0	100,0
		2	,0	87,3	12,7	,0	,0	100,0
		3	,0	20,0	80,0	,0	,0	100,0
		4	16,7	,0	,0	83,3	,0	100,0
		5	,0	,0	,0	,0	100,0	100,0

a. **90.5%** de casos agrupados originales clasificados correctamente.

b. 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.

c. **87.8%** de casos agrupados validados de forma cruzada clasificados correctamente.

Igual que en la clasificación continental, se observó que la variable V1, correspondiente a los grupos NH₃ de aminoácidos y OH del agua y ácidos fue la que más se repitió en los distintos cocientes seleccionados para construir las funciones discriminantes. Las funciones discriminantes con más peso en la ecuación fueron las dos primeras, aunque la tercera y la cuarta fueron fundamentales para terminar de afinar el modelo. En este sentido, las variables con más peso en la función discriminante 1 fueron V1/V8, V1/V9 y V7/V27. Las dos primeras, como en el caso anterior, son cocientes de la primera región (NH₃ de aminoácidos y OH del agua y ácidos) con enlaces O-H, C-H y C-O-H de distintas moléculas presentes en las mieles como ácidos, proteínas y fenoles. Por otro lado, cabe destacar la

presencia de un cociente importante que, a través de los grupos funcionales de H-O-H del agua, C=O de los azúcares y N-H de las posibles amidas presentes y los grupos C-H de los alquenos presentes, influyó mucho en la clasificación. En cuanto a la función discriminante 2, las variables importantes fueron V1/V26, V1/V27 y V7/V27. Nuevamente se repitió la V1, aunque también tuvieron importancia, como en la función discriminante 1, las variables V27 y V7. También se incluyó la V26 que se corresponde con los mismos grupos funcionales que la V27. En las funciones discriminantes 3 y 4, el mayor peso siguió estando en variables que contienen la región V1, y otras regiones cercanas a esta, como la V2, V4, V9-V12 que contemplan la mayoría de los grupos funcionales presentes en las mieles

TABLA 5. Coeficientes de función discriminante canónica estandarizados de las cuatro funciones para el modelo obtenido para la clasificación por países.

	Función			
	1	2	3	4
V1/V2	,635	,812	4,548	3,436
V1/V3	2,812	2,390	4,723	,532
V1/V4	-4,452	-3,174	-8,314	-1,875
V1/V5	,342	-,147	-1,491	-1,653
V1/V6	,247	,116	,350	,035
V1/V7	-2,351	,683	,747	2,254
V1/V8	10,055	2,291	-4,335	,754
V1/V9	-11,035	-4,380	4,215	-9,558
V1/V10	-5,687	1,826	,043	4,795
V1/V11	3,898	3,558	6,336	-,761
V1/V12	6,250	-3,012	-6,521	2,435
V1/V13	-2,221	3,741	,434	-2,592
V1/V14	-,966	3,327	,913	1,270
V1/V17	-3,049	-1,135	-,151	1,067
V1/V18	1,140	-1,298	-,160	,368
V1/V24	1,548	-2,440	-3,367	-1,667
V1/V25	-,573	4,382	-,731	,326
V1/V26	1,915	-6,558	-1,001	,429
V1/V27	3,842	-4,807	1,932	,818
V1/V29	-2,014	3,141	-,058	-,222
V2/V3	-2,430	-,841	-3,483	,400
V2/V4	2,715	1,622	5,879	,883
V2/V24	-1,368	2,232	1,768	1,953
V5/V21	1,600	-1,941	-2,045	-,701
V7/V9	5,566	-,678	1,671	-,664
V7/V24	,360	-4,503	1,161	-,346
V7/V27	-7,112	5,923	-3,120	2,224
V8/V26	1,489	1,911	1,220	-1,006

4.2.3 Clasificación en función de las regiones de cada país

Finalmente, tras comprobar que los modelos basados en LDA en relación con las divisiones continental y por países fueron satisfactorias a la hora de clasificar las muestras analizadas, se buscó obtener otros modelos que clasificasen las muestras no sólo por países, sino por las zonas geográficas de los territorios estudiados.

España

En la Figura 6 queda representada la distribución de las muestras en función de las dos funciones discriminantes obtenidas por el modelo LDA. Se pudo observar que las mieles de Barcelona (color azul) eran las que mejor se separaban del resto de grupos, estando ello en consonancia con los resultados obtenidos en la Tabla 6, donde Barcelona (1) mostró el porcentaje más alto de pertenencia a los grupos pronosticados (99% aproximadamente), así como un 96% de acierto en los estudios de validación cruzada. Ocurrió de forma similar con aquellas mieles procedentes de Valencia, agrupadas en un claro núcleo (color rojo). Por otra parte, fueron las mieles de Ciudad Real las que no tuvieron una clara división de grupo, reflejándose esto en los valores de la Tabla 6, donde se puede observar que fue el grupo con menor porcentaje de acierto tanto en la pertenencia a los grupos pronosticados como en los estudios de validación cruzada. Esto también puede ser debido al bajo número de muestras de la zona de Ciudad Real, quizás con un mayor número de muestras distintas podría mejorarse de manera muy aceptable el grupo de los otros dos estudiados. En cualquier caso, esta separación zonal favorable puede estar condicionada por el origen botánico de la miel, ya que, por ejemplo, en el caso de la Comunidad Valenciana, prácticamente la totalidad de las muestras eran de miel de naranjo.

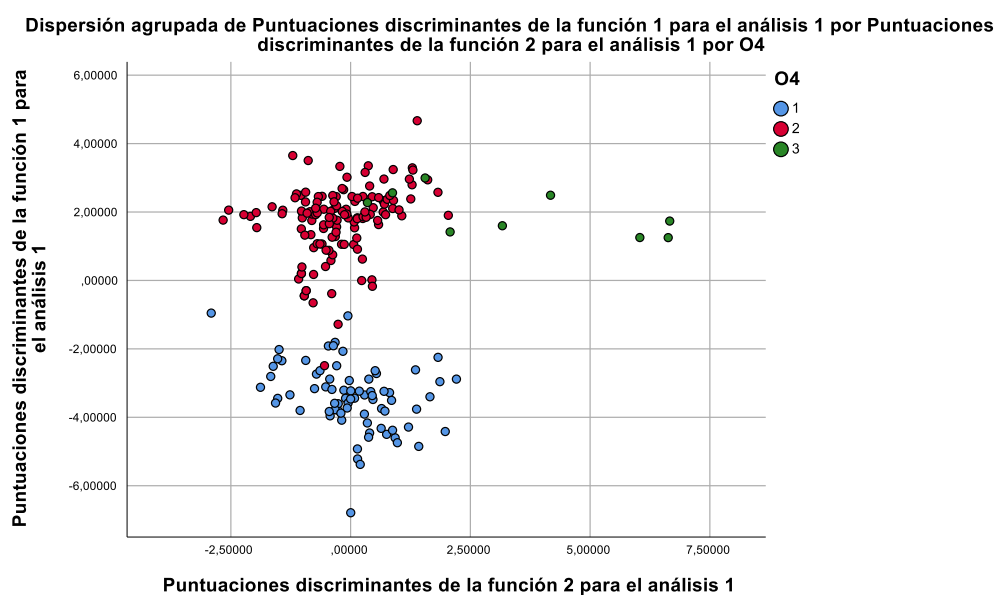


FIGURA 6: Gráfico de puntuaciones de las funciones discriminantes del modelo de LDA construido para clasificar las diferentes mieles españolas en función de la zona. Siendo 1: Barcelona, 2: Comunidad Valenciana y 3: Ciudad Real

TABLA 6. Resultados de clasificación en función de las zonas de España que incluye información sobre la pertenencia a los grupos pronosticado, así como los datos del estudio de validación cruzada

		Pertenencia a grupos pronosticada				Total
		04	1	2	3	
Original	Recuento	1	74	1	0	75
		2	2	130	3	135
		3	0	3	6	9
	%	1	98,7	1,3	,0	100,0
		2	1,5	96,3	2,2	100,0
		3	,0	33,3	66,7	100,0
Validación cruzada ^b	Recuento	1	72	3	0	75
		2	3	127	5	135
		3	0	4	5	9
	%	1	96,0	4,0	,0	100,0
		2	2,2	94,1	3,7	100,0
		3	,0	44,4	55,6	100,0

a. **95.9%** de casos agrupados originales clasificados correctamente.

b. 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.

c. **93.2%** de casos agrupados validados de forma cruzada clasificados correctamente.

Igual que en la clasificación continental y la clasificación por países, se observó que la variable V1, correspondiente a los grupos NH₃ de aminoácidos y OH del agua y los ácidos, fue la que más se repitió en los distintos cocientes seleccionados para construir las funciones discriminantes. Tal y como queda reflejado en la Tabla 7, las variables con más peso en la función discriminante 1 fueron V1/V15, V2/V19 y V5/V20. La primera, como en el caso anterior, son cocientes de la primera región con enlaces C-C y C-O de distintas moléculas presentes en las mieles como los carbohidratos o los compuestos volátiles (fenoles). Cabe destacar la aportación de los enlaces C-O, presentes en componentes como los fenoles, los azúcares o las proteínas, que influyeron bastante en la clasificación. En cuanto a la función discriminante 2, las variables importantes fueron V1/V8, V1/V11 y V7/V17. De nuevo, se atendió a la presencia de V1, aunque también tuvieron importancia V7 y V8, que se relacionan con bandas asociadas al agua, compuesto mayoritario en la miel.

TABLA 7. Coeficientes de función discriminante canónica estandarizados de las dos funciones para el modelo obtenido para la clasificación por zonas en España

	Función	
	1	2
V1/V2	4,724	-2,710
V1/V3	-,529	1,380
V1/V4	-,515	-,979
V1/V5	-5,227	3,335
V1/V6	2,219	-2,919
V1/V7	,088	1,535
V1/V8	-2,428	6,315
V1/V9	-2,295	-1,681
V1/V10	-1,721	-,674
V1/V11	1,954	-4,252
V1/V15	7,524	,281
V1/V18	1,336	,437
V1/V21	-3,386	-2,382
V1/V34	-1,022	3,899
V2/V5	4,899	-1,441
V2/V19	-7,302	-,422
V3/V6	-2,696	3,810
V3/V12	-1,356	-1,297
V5/V20	7,242	2,541
V6/V11	,128	-,481
V7/V17	,567	4,106
V11/V12	,530	1,450
V11/V28	-,315	-,338
V15/V31	,933	-1,322

México:

En el caso de México, la Figura 7 muestra un mapa con las zonas políticas del país, quedando señaladas con una flecha roja aquellas de las que provenían las muestras de miel analizadas en el estudio. Concretamente fueron Yucatán, Veracruz, Puebla y Michoacán.



FIGURA 7. Representación de las zonas políticas de México. Fuente: Biblioteca virtual Miguel de Cervantes (2023)

La Figura 8 representa la distribución espacial de las muestras de miel en las tres primeras funciones discriminantes que se obtuvieron del análisis discriminante lineal en función de las mieles obtenidas de las distintas zonas de México. Se pudo observar una clara separación de las cuatro zonas estudiadas, estando ello alineado con los resultados obtenidos en la Tabla 8, donde todas mostraron un 100% de pertenencia a los grupos pronosticados, así como un 100% de acierto en los estudios de validación cruzada en Yucatán, Veracruz y Michoacán. En conclusión, los porcentajes de pertenencia al grupo pronosticado y de validación cruzada fueron excelentes para el modelo (97-100%).

Dispersión 3D agrupada de Puntuaciones discriminantes de la función 1 para el análisis 1 por Puntuaciones discriminantes de la función 2 para el análisis 1 por Puntuaciones discriminantes de la función 3 para el análisis 1...

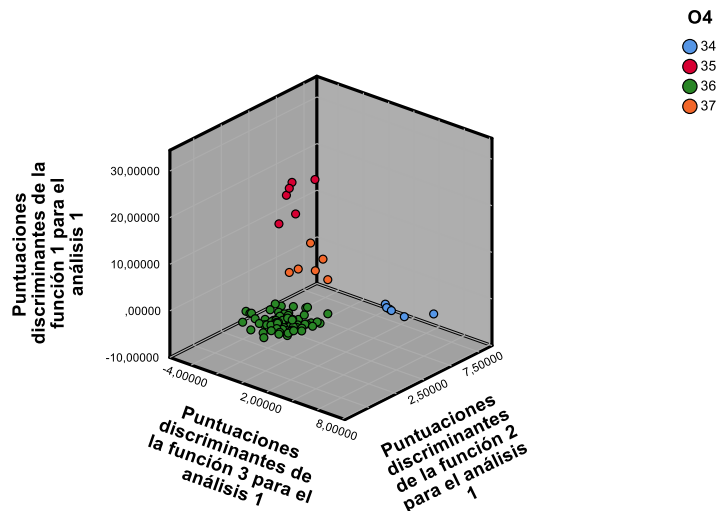


FIGURA 8: Gráfico de puntuaciones sobre el plano de las funciones discriminantes del modelo de LDA construido para clasificar las diferentes mieles de México en función de la zona. Siendo 34: Yucatán, 35: Michoacán, 36: Puebla y 37: Veracruz

TABLA 8. Resultados de clasificación en función de las zonas de México que incluye información sobre la pertenencia a los grupos pronosticado, así como los datos del estudio de validación cruzada

		Pertenencia a grupos pronosticada					Total
		04	34	35	36	37	
Original	Recuento	34	6	0	0	0	6
		35	0	6	0	0	6
		36	0	0	78	0	78
		37	0	0	0	6	6
	%	34	100,0	,0	,0	,0	100,0
		35	,0	100,0	,0	,0	100,0
		36	,0	,0	100,0	,0	100,0
		37	,0	,0	,0	100,0	100,0
Validación cruzada ^b	Recuento	34	6	0	0	0	6
		35	0	6	0	0	6
		36	1	0	76	1	78
		37	0	0	0	6	6
	%	34	100,0	,0	,0	,0	100,0
		35	,0	100,0	,0	,0	100,0
		36	1,3	,0	97,4	1,3	100,0
		37	,0	,0	,0	100,0	100,0

a. **100.0%** de casos agrupados originales clasificados correctamente.

b. 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.

c. **97.9%** de casos agrupados validados de forma cruzada clasificados correctamente.

En este caso y de forma similar a los casos expuestos anteriormente, pudo observarse que la región V1 está presente en muchos de los cocientes usados como variables predictoras, dando a entender que los grupos funcionales asociados a dicha región (NH₃ de aminoácidos y OH del agua y ácidos) son, de nuevo, importantes a la hora de clasificar las mieles de México en función de la zona geográfica del país. En el caso de la función discriminante 1, fueron las variables V1/V4, V1/V5 y V1/V17 las de mayor peso. En todos los casos se corresponden con la banda de los grupos NH₃ y OH (V1), que, en general, en este caso, se puede asociar a aminoácidos presentes en la miel, agua, azúcares y ácidos. Por otro lado, destacó la aportación de la variable V1/V5, que muestra que el grupo funcional V1 dividido por un enlace C-H procedente de los carbohidratos de la miel son portadores de gran cantidad de información con relación a la clasificación realizada en función de las zonas geográficas de México. En el caso de la función discriminante 2, las variables con más peso fueron V1/V2, V1/V3 y V1/V4, todas ellas asociadas a aminoácidos, agua, ácidos y carbohidratos, componentes principales de la miel. Finalmente, en la función discriminante 3, las variables con más peso fueron V1/V13, V1/V14 y V1/V17, quedando reflejada la contribución de la zona media (V13-V17) del espectro, relacionada con enlaces C-C y C-O pertenecientes a los carbohidratos propios de la miel.

TABLA 9. Coeficientes de función discriminante canónica estandarizados de las dos funciones para el modelo obtenido para la clasificación por zonas en México

	Función		
	1	2	3
V1/V2	-,626	8,928	3,067
V1/V3	-3,593	8,203	-,559
V1/V4	-7,623	-10,933	,887
V1/V5	14,878	1,378	-3,990
V1/V6	-2,063	-2,347	-,427
V1/V7	,827	-,455	-2,854
V1/V8	,486	3,799	1,667
V1/V9	-1,135	-3,416	-3,978
V1/V10	,836	-1,234	5,097
V1/V11	5,094	4,941	-,688
V1/V12	-3,039	,299	7,008
V1/V13	-5,055	,882	8,772
V1/V14	4,700	-6,257	-17,917
V1/V16	-4,571	-,023	,293
V1/V17	9,128	4,617	11,469
V1/V18	-1,305	,888	-,691
V1/V21	-3,782	-4,179	-3,464
V1/V22	-,158	4,940	2,266
V1/V23	,704	,889	,467
V1/V33	-1,435	-2,995	-,207
V2/V31	-,318	1,332	,683
V3/V20	-2,027	3,041	-,504
V6/V31	4,934	1,309	-,227

Mozambique

La Figura 9 muestra un mapa con las zonas políticas del país, quedando señaladas con una flecha roja aquellas de las que provenían las muestras de miel analizadas en el estudio. Concretamente fueron Manica, Zambezia, Sofala y Nampula.



FIGURA 9. Representación de las zonas políticas de Mozambique. Fuente: Netmaps (2023)

La Figura 10 representa la distribución espacial de las muestras de miel en las tres primeras funciones discriminantes que se obtuvieron del análisis discriminante lineal en función de las mieles obtenidas de las distintas zonas de Mozambique.

Dispersión 3D agrupada de Puntuaciones discriminantes de la función 1 para el análisis 1 por Puntuaciones discriminantes de la función 2 para el análisis 1... análisis 1...

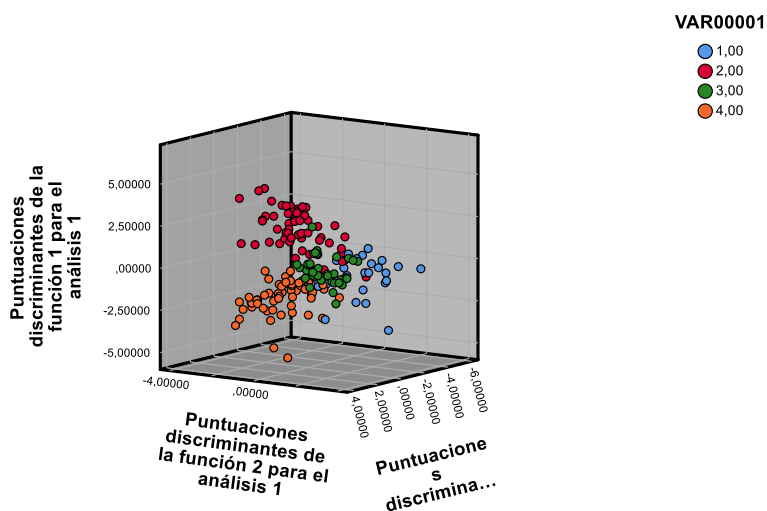


FIGURA 10. Gráfico de puntuaciones sobre el plano de las funciones discriminantes del modelo de LDA construido para clasificar las diferentes mieles de Mozambique en función de la zona. Siendo 1: Manica, 2: Zambezia, 3: Sofala y 4: Nampula.

Aunque no de forma tan clara como el caso de México, sí se pudo observar una separación de las cuatro zonas estudiadas, más debido a que conseguir una orientación adecuada de la figura que muestre la separación de los grupos es compleja. Destacó el porcentaje elevado de pertenencia al grupo pronosticada de Sofala, siendo esta zona la que mejor se ajustó al modelo; en la Figura 10 se observa que es el núcleo con menor dispersión de muestras. Por otro lado, Nampula, Manica y Zambezia, aunque no con porcentajes tan favorables, también mostraron una buena adaptación al modelo con valores por encima del 80% de pertenencia de grupos y no muy diferentes tras la validación cruzada.

TABLA 10. Resultados de clasificación en función de las zonas de Mozambique que incluye información sobre la pertenencia a los grupos pronosticados, así como los datos del estudio de validación cruzada

		Pertenencia a grupos pronosticada					Total
		VAR00001	1,00	2,00	3,00	4,00	
Original	Recuento	1,00	27	0	1	5	33
		2,00	2	51	7	0	60
		3,00	0	1	35	0	36
		4,00	6	0	1	53	60
	%	1,00	81,8	,0	3,0	15,2	100,0
		2,00	3,3	85,0	11,7	,0	100,0
		3,00	,0	2,8	97,2	,0	100,0
		4,00	10,0	,0	1,7	88,3	100,0
Validación cruzada ^b	Recuento	1,00	25	0	1	7	33
		2,00	3	50	7	0	60
		3,00	0	1	35	0	36
		4,00	8	2	2	48	60
	%	1,00	75,8	,0	3,0	21,2	100,0
		2,00	5,0	83,3	11,7	,0	100,0
		3,00	,0	2,8	97,2	,0	100,0
		4,00	13,3	3,3	3,3	80,0	100,0

a. **87.8%** de casos agrupados originales clasificados correctamente.

b. 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.

c. **83.6%** de casos agrupados validados de forma cruzada clasificados correctamente.

De nuevo, se observó que la variable V1, correspondiente a los grupos NH₃ de aminoácidos y OH del agua y ácidos fue la que más se repitió en los distintos cocientes seleccionados para construir las funciones discriminantes. Las variables con más peso en la función discriminante 1 fueron V1/V12, V1/V14 y V1/V17. En el caso de la función discriminante 2 fueron V1/V9, V1/V11 y V1/V12. En la función discriminante 3, las variables con más peso fueron V1/V8, V1/V12 y V1/V13. Cabe destacar que la mayoría de estas regiones se encuentran repartidas en la zona 1175-1318 cm⁻¹, lo cual señala que no sólo la huella dactilar es una zona del espectro interesante para obtener información sobre la miel de Mozambique. En dicha amplitud del espectro infrarrojo se encuentran enlaces químicos

relacionados con grupos funcionales como alcoholes, amidas, carbohidratos y fenoles, determinantes en la composición de la miel.

TABLA 11. Coeficientes de función discriminante canónica estandarizados de las tres primeras funciones para el modelo obtenido para la clasificación por zonas de Mozambique

	Función		
	1	2	3
V1/V2	1,708	,914	-1,271
V1/V3	-3,297	-,438	-,696
V1/V4	1,435	,657	2,395
V1/V5	-,517	-1,930	,548
V1/V6	,348	-,145	-,269
V1/V7	-1,921	,357	1,693
V1/V8	1,889	5,399	-6,234
V1/V9	-1,213	-8,501	4,217
V1/V10	-,587	-2,071	-,862
V1/V11	2,862	-9,718	5,298
V1/V12	5,588	16,007	-8,796
V1/V13	3,141	-7,454	11,102
V1/V14	-8,261	5,749	-3,182
V1/V17	4,933	-2,472	-5,458
V1/V18	-2,658	-3,285	2,375
V1/V20	-,196	5,646	8,314
V1/V21	-2,264	-,101	-3,682
V1/V24	2,240	2,528	-2,726
V1/V31	-1,518	-1,623	-5,280
V2/V11	,121	-1,029	,391
V19/V28	-,101	1,737	4,785

República Dominicana:

La Figura 11 muestra un mapa con las zonas políticas de República Dominicana



FIGURA 11. Representación de las zonas políticas de República Dominicana. Fuente: Embajada de México en República Dominicana (2013)

En la Figura 12 queda representada la distribución de las muestras en función de las dos funciones discriminantes obtenidas por el modelo LDA.

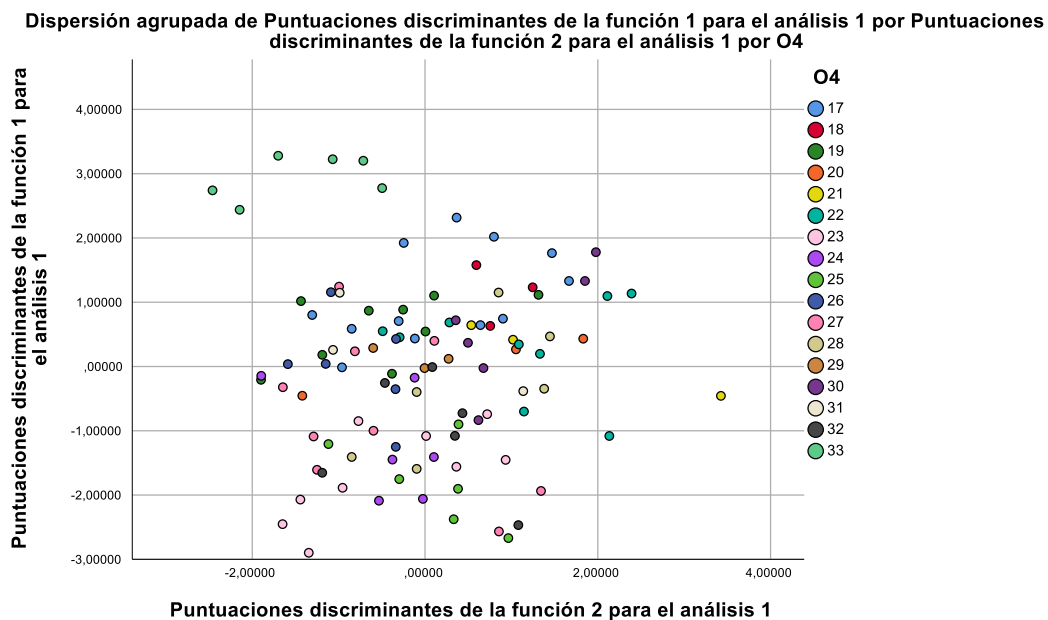


FIGURA 12. Gráfico de puntuaciones de las funciones discriminantes del modelo de LDA construido para clasificar las diferentes mieles de República Dominicana en función de la zona.

Como puede observarse, este fue el único caso en el que no se vieron zonas de agrupación claras de las muestras. Ello está respaldado por los datos que muestra la Tabla 12, donde los

porcentajes de pertenencia a grupos pronosticada es considerablemente más bajo que en los casos anteriores. Además, tras la validación cruzada, tan solo el 52,4% de las muestras de República Dominicana seguía teniendo una buena adaptación al modelo propuesto por el análisis. La principal hipótesis que se planteó para explicar el fenómeno fue que la división zonal de República Dominicana se hizo de forma política, teniendo menor consideración por la separación zonal en base a la geografía del país. Por ello se está estudiando la posibilidad de, para obtener modelos más adecuados, estudiar el terreno de una manera más idónea para clarificar la separación de áreas en función del clima, el tipo de tierra y la vegetación.

TABLA 12. Resultados de clasificación en función de las zonas de República Dominicana que incluye información sobre la pertenencia a los grupos pronosticados, así como los datos del estudio de validación cruzada

		Pertenencia a grupos pronosticada				Total
		VAR00001	1,00	2,00	3,00	
Original	Recuento	1,00	23	6	4	33
		2,00	5	24	4	33
		3,00	6	3	30	39
	%	1,00	69,7	18,2	12,1	100,0
		2,00	15,2	72,7	12,1	100,0
		3,00	15,4	7,7	76,9	100,0
Validación cruzada ^b	Recuento	1,00	13	11	9	33
		2,00	10	16	7	33
		3,00	7	6	26	39
	%	1,00	39,4	33,3	27,3	100,0
		2,00	30,3	48,5	21,2	100,0
		3,00	17,9	15,4	66,7	100,0

a. **73.3%** de casos agrupados originales clasificados correctamente.

b. 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.

c. **52.4%** de casos agrupados validados de forma cruzada clasificados correctamente.

En el caso de República Dominicana, aunque sí se observó una presencia evidente de V1, correspondiente a los grupos NH₃ de aminoácidos y OH del agua y ácidos, hubo mayor variabilidad en los divisores. En este sentido, las variables con más peso en la función discriminante 1 fueron V1/V5, V1/V10 y V1/V16. En la función discriminante 2 fueron V1/V3, V1/V16 y V2/V21. Así se analizó una contribución de la zona izquierda del espectro infrarrojo (2776-3672 cm⁻¹) y, de nuevo, de la zona central (1199-1215 cm⁻¹). De todas formas, tal y como se comentaba anteriormente, las muestras de República Dominicana analizadas no se adaptaron de forma óptima al modelo, impidiendo así que se pudiera utilizar como un sistema de clasificación de mieles por zonas en el territorio.

TABLA 13. Coeficientes de función discriminante canónica estandarizados de las dos funciones para el modelo obtenido para la clasificación por zonas en República Dominicana

	Función	
	1	2
V1/V2	3,110	-,313
V1/V3	-1,442	5,357
V1/V4	-5,705	-,030
V1/V5	8,025	-3,626
V1/V6	-4,270	1,518
V1/V7	,561	,778
V1/V8	,864	1,599
V1/V9	-2,417	3,442
V1/V10	11,282	,147
V1/V11	-1,167	,511
V1/V16	-8,782	-5,734
V1/V17	5,840	-4,522
V1/V19	-3,126	-2,940
V1/V26	,041	-1,625
V1/V27	-1,722	4,349
V2/V3	1,165	-,362
V2/V21	,815	4,572
V15/V30	-,162	-,286

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se han realizado con éxito modelos de clasificación de mieles en función de su origen geográfico basándose en distintas formas de distribuir geográficamente las mieles (continentes, países y regiones). Estos modelos se han obtenido usando análisis discriminante lineal alimentado con los datos obtenidos de los espectros ATR-FTIR que dan información sobre los distintos grupos funcionales de las moléculas presentes en la miel.

En concreto, en este proyecto se logró una clasificación satisfactoria de las mieles en base a un criterio continental, aunque posteriormente parece que se basa más en el desarrollo de la industria apícola, y de países. En cualquier caso, ambos modelos son capaces de clasificar las mieles en los grupos adecuados con un acierto mayor del 85%. En el caso de las zonas de cada país, se ha observado que los modelos obtenidos son capaces de clasificar las mieles en las distintas regiones de cada país con buenos resultados, especialmente en el caso de las mieles de México, pese a tener una variabilidad botánica muy elevada. Sin embargo, las mieles de la República Dominicana no muestran resultados satisfactorios ya que la división regional se ha realizado de manera política. Por lo tanto, sería necesario estudiar el terreno de una manera más adecuada para clarificar la separación de zonas en función del clima, el tipo de tierra y la vegetación para obtener modelos más adecuados. De esta manera, los resultados indican que las mieles analizadas de estos países presentan unas características distintivas en su composición química que puede ser fácilmente detectable mediante el uso de la herramienta analítica ATR-FTIR. Este trabajo, por lo tanto, abre nuevas avenidas en el desarrollo de métodos de clasificación geográfica usando instrumentación y metodologías de bajo coste y que siguen los principios de la Química Analítica Verde, ya que no es necesario el uso de reactivos ni de grandes cantidades de muestra. Sin embargo, es necesario aumentar el número de países de distintos continentes y con mayor variabilidad botánica para conseguir un método universal que pueda aplicarse de manera continua en la industria como alternativa a los costosos métodos habituales. Además, como perspectivas futuras se pretende incluir en el modelo mezclas de países para que puedan clasificarse también y, así, usar estos modelos para ver posibles fraudes.

6. BIBLIOGRAFÍA

Alqarni, A. S., Owayss, A. A., Mahmoud, A. A., & Hannan, M. A. (2014). Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. *Journal of Saudi Chemical Society*, 18(5), 618-625.

Annapurna, S. M., Rajora, S., Kumar, Y., Sai Krishna, V., & Kumar, N. (2023). FTIR-Based Characterization and Classification of Various Indian Monofloral Honey Samples. En G. Mathur, M. Bundele, A. Tripathi, & M. Paprzycki (Eds.), *Proceedings of 3rd International Conference on Artificial Intelligence: Advances and Applications* (pp. 315-322). Springer Nature.

Bazurro, D., Díaz, R., & Sánchez, M. (2005). Tipificación de miel. *Un uso sustentable de la palmera butiá*.

Bogdanov, S., Martin, P., & Lullmann, C. (2002). Harmonised methods of the international honey commission. *Swiss Bee Research Centre, FAM, Liebefeld*, 5, 1-62.

Bonté, F., & Desmoulière, A. (2013). Le miel: origine et composition. *Actualités pharmaceutiques*, 52(531), 18-21.

Bradbear, N. (2004). *La apicultura y los medios de vida sostenibles* (No. 1). Food & Agriculture Org..

Bruker “Guía de espectroscopía infrarroja” <https://www.bruker.com/es/products-and-solutions/infrared-and-raman/ft-ir-routine-spectrometer/what-is-ft-ir-spectroscopy.html> [Consultado: 18 de julio de 2023]

Burguillo Carbó, N. (2019). *Comportamiento del Hidroximetilfurfural y de la actividad diastásica en mieles monoflorales españolas* (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).

Ciccaglioni, G., Rigatelli, L. T., de Medici, D., Delibato, E., di Pasquale, S., & Mejuto, R. G. (2002). Application of quantitative PCR to foodborne pathogenic microorganisms to evaluate preventive measures applied in food safety. *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos*, (336), 11-16.

Codex alimentarius Committee on Sugars (2001). Codex standard 12, revised Codex Standard for Honey. *Standards and Standard Methods*, 11, 1-7.

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. <https://doi.org/10.1021/jf901730p>

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. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.07.020>

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.

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.

De La Fuente, E., Ruiz-Matute, A. I., Valencia-Barrera, R. M., Sanz, J., & Castro, I. M. (2011). Carbohydrate composition of Spanish unifloral honeys. *Food Chemistry*, 129(4), 1483-1489.

Díaz-Moreno, C., Pérez Arquillué, M. C., & Juan Esteban, T. (2009). Influencia de las condiciones de almacenamiento sobre la calidad físico-química y biológica de la miel. *Universidad de Zaragoza*.

Enghelmayer, M. A., Maldonado, L., Salomón, M. V., Álvarez, A., & Gaggiotti, M. LA DETECCIÓN DE LAS ADULTERACIONES EN LA MIEL. *MANUAL DE BUENAS PRÁCTICAS EN ALIMENTACIÓN DE ABEJAS*, 20.

Escuredo, O., Míguez, M., Fernández-González, M., & Seijo, M. C. (2013). Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. *Food chemistry*, 138(2-3), 851-856.

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. Volatile profile in the accurate labelling of monofloral honey. The case of lavender and thyme honey. *Food Chemistry*, 226 (2017), pp. 61-68, 10.1016/j.foodchem.2017.01.051

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*, 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.

European Union Commission. (2022). Annual Report: Alert and Cooperation Network. Brussels, Belgium: European Union Commission Accessed 4 July 2023. <https://doi.org/10.2875/70506>

Visquert Fas, M. (2016). *Influencia de las condiciones térmicas en la calidad de la miel* (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).

Gianelli Barra, M. P., Ponce-Díaz, M. C., & Venegas-Gallegos, C. (2010). Compuestos Volátiles en Miel Producida en el Valle Central de la Provincia de Ñuble, Chile. *Chilean journal of agricultural research*, 70(1), 75-84.

Gotor Ramos, P. (2022). *Caracterización de mieles de Mozambique en base a compuestos volátiles orgánicos de procedencia botánica* (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).

Insuasty-Santacruz, E., Martínez-Benavides, J., & Jurado-Gámez, H. (2017). Determinación melisopalínológica de miel de abejas *Apis mellifera* producida con flora de clima frío, principalmente *Trifolium repens* L. *Revista Veterinaria y Zootecnia (On Line)*, 11(1), 74-82.

Juan Borrás, M. D. S. (2016). *Herramientas analíticas en la clasificación de mieles en base a criterios de calidad e inocuidad* (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).

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

Karabagias, I. K., Badeka, A., Kontakos, S., Karabournioti, S., & Kontominas, M. G. (2014). Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics. *Food chemistry*, 146, 548-557.

Kaškonienė, V., Venskutonis, P. R., & Čeksterytė, V. (2010). Carbohydrate composition and electrical conductivity of different origin honeys from Lithuania. *LWT-Food Science and Technology*, 43(5), 801-807.

Kasprzyk, I., Depciuch, J., Grabek-Lejko, D., & Parlinska-Wojtan, M. (2018). FTIR-ATR spectroscopy of pollen and honey as a tool for unifloral honey authentication. The case study of rape honey. *Food Control*, 84, 33-40.

Laube, I., Hird, H., Brodmann, P., Ullmann, S., Schöne-Michling, M., Chisholm, J., & Broll, H. (2010). Development of primer and probe sets for the detection of plant species in honey. *Food Chemistry*, 118(4), 979-986.

Lerma-García, M. J., Ramis-Ramos, G., Herrero-Martínez, J. M., & Simó-Alfonso, E. F. (2010a). Authentication of extra virgin olive oils by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 118(1), 78-83. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.092>

Lozano-Torres, B., Martínez-Bisbal, M. C., Soto, J., Borrás, M. J., Martínez-Manez, R., & Escriche, I. (2022). Monofloral honey authentication by voltammetric electronic tongue: A comparison with ¹H NMR spectroscopy. *Food Chemistry*, 383, 132460.

Maté, Vidal (2023) "Los apicultores se manifiestan contra el fraude y la importación de miel china" en *El País*. <https://elpais.com/economia/2023-03-09/los-apicultores-se-manifiestan-contra-el-fraude-y-la-importacion-de-miel-china.html#?prm=copy_link> [Consultado: 14 de julio de 2023]

OCU "El origen de la miel, bajo sospecha" <<https://www.ocu.org/alimentacion/dulces/noticias/origen-miel>> [Consultado: 14 de julio de 2023]

Ortega Gavilán, F. (2022). Uso de huellas dactilares instrumentales para medidas analíticas de similitud. Aplicación en problemas relacionados con la calidad alimentaria.

Paradkar, M. M., & Irudayaraj, J. (2002). Discrimination and classification of beet and cane inverts in honey by FT-Raman spectroscopy. *Food chemistry*, 76(2), 231-239.

Pegels Rojas, N. (2015). Aplicación de técnicas de PCR en tiempo real a la trazabilidad y autenticidad de los piensos.

Real academia española. *Diccionario de la lengua española*, 23^a ed. [versión 23.6 en línea]. <<https://dle.rae.es>> [06/07/2023]

Real decreto 1049/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Norma de calidad relativa a la miel. *Boletín Oficial del Estado*, n. 186 de 5 de agosto de 2003

Reina kilama "La humedad de la miel y su importancia en el control de calidad" <<https://www.reinakilama.com/la-humedad-de-la-miel/>> [Consultado: 14 de julio de 2023]

Ríos Corripio, M. A. (2012). *Quimiometría en miel de abeja para la determinación de azúcares y detección de adulteración utilizando espectroscopia infrarroja* (Doctoral dissertation).

Robles, Beatriz (2017) "Conocer el país de origen de la miel: misión imposible". <<https://beatrizrobles.com/pais-de-origen-miel/>> [Consultado: 14 de julio de 2023]

Rojas Vélez, T. (2020). Revisión bibliográfica del análisis sensorial de mieles monoflorales españolas.

Sak-Bosnar, M., & Sakač, N. (2012). Direct potentiometric determination of diastase activity in honey. *Food chemistry*, 135(2), 827-831.

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.

Sobrino Gregorio, L. (2020). *Avances en el esclarecimiento de la autenticidad de la miel* (Doctoral dissertation, 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., Vilanova, S., Prohens, J., & Escriche, I. (2019). Detection of honey adulteration by conventional and real-time PCR. *Food Control*, 95, 57-62.

Téllez Mesa, C. (2019). Aplicaciones de la espectroscopía infrarroja en el análisis de alimentos.

Torres Mesa, C. (2016). *Uso de espectroscopía FTIR para la determinación de azúcares simples y ácidos en zumos y néctares de fruta* (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).

Ulloa, J. A., MONDRAGON CORTEZ, P. E. D. R. O., Rodríguez Rodríguez, R., Reséndiz Vázquez, J. A., & Rosas Ulloa, P. (2010). La miel de abeja y su importancia. *CONACYT*.

UPA, 2022. *La crisis del sector apícola amenaza el futuro de la miel española en UPA* [en línea]. Disponible en: <https://www.upa.es/upa/noticias-upa/crisis-apicola/2023/4782/> [Consultado: 22 julio de 2023].

Valverde Som, L. (2018). Aplicaciones analíticas de las "huellas dactilares" cromatográficas en ciencias de los alimentos y de la salud.

Won, S. R., Lee, D. C., Ko, S. H., Kim, J. W., & Rhee, H. I. (2008). Honey major protein characterization and its application to adulteration detection. *Food Research International*, 41(10), 952-956.

ANEXOS

ANEXO 1. Muestras analizadas y su procedencia (Código asignado por LABMIEL en Universitat Politècnica de València)

PAÍS	CÓDIGO	PAÍS	CÓDIGO
Italia	I-23001	España (Valencia)	I-23005
Italia	I-23002	España (Valencia)	I-23015
Italia	I-23003	España (Valencia)	I-23016
Italia	I-23006	España (Valencia)	I-23017
Italia	I-23007	España (Valencia)	I-23018
Italia	I-23008	España (Valencia)	I-23019
Italia	I-23009	España (Valencia)	I-23020
Italia	I-23010	España (Valencia)	I-23021
República Dominicana	I-22063	España (Valencia)	I-23022
República Dominicana	I-22064	España (Valencia)	I-23023
República Dominicana	I-22065	España (Valencia)	Mel-1
República Dominicana	I-22066	España (Valencia)	Mel-4
República Dominicana	I-22067	España (Valencia)	Mel-16
República Dominicana	I-22068	España (Valencia)	Mel-29
República Dominicana	I-22069	España (Valencia)	Mel-33
República Dominicana	I-22070	España (Valencia)	Mel-39
República Dominicana	I-22071	España (Valencia)	Mel-47
República Dominicana	I-22072	España (Valencia)	Mel-50
República Dominicana	I-22073	España (Valencia)	Mel-54
República Dominicana	I-22074	España (Valencia)	Mel-61
República Dominicana	I-22075	España (Valencia)	Mel-62
República Dominicana	I-22076	España (Valencia)	Mel-73
República Dominicana	I-22077	España (Valencia)	Mel-84
República Dominicana	I-22078	España (Valencia)	Mel-94
República Dominicana	I-22079	España (Valencia)	Mel-101
República Dominicana	I-22080	España (Valencia)	Mel-105
República Dominicana	I-22081	España (Valencia)	Mel-121
República Dominicana	I-22082	España (Valencia)	Mel-129
República Dominicana	I-22083	España (Valencia)	Mel-130
República Dominicana	I-22084	España (Valencia)	Mel-137
República Dominicana	I-22085	España (Valencia)	Mel-138
República Dominicana	I-22086	España (Valencia)	Mel-139
República Dominicana	I-22087	España (Valencia)	Mel-143
República Dominicana	I-22088	España (Valencia)	Mel-144
República Dominicana	I-22089	España (Valencia)	Mel-M-5
República Dominicana	I-22090	España (Valencia)	Mel-M-6
República Dominicana	I-22091	España (Valencia)	Mel-M-7
República Dominicana	I-22092	España (Valencia)	Mel-153

PAÍS	CÓDIGO	PAÍS	CÓDIGO
República Dominicana	I-22093	España (Valencia)	Mel-154
República Dominicana	I-22094	España (Valencia)	Mel-156
República Dominicana	I-22095	España (Valencia)	Mel-157
República Dominicana	I-22096	España (Valencia)	Mel-171
República Dominicana	I-22097	España (Valencia)	Mel-181
Mozambique	I-21170	España (Valencia)	Mel-196
Mozambique	I-21171	España (Valencia)	Mel-197
Mozambique	I-21172	España (Barcelona)	I-22104
Mozambique	I-21173	España (Barcelona)	I-22105
Mozambique	I-21174	España (Barcelona)	I-22106
Mozambique	I-21175	España (Barcelona)	I-22107
Mozambique	I-21176	España (Barcelona)	I-22108
Mozambique	I-21177	España (Barcelona)	I-22109
Mozambique	I-21178	España (Barcelona)	I-22110
Mozambique	I-21179	España (Barcelona)	I-22111
Mozambique	I-21180	España (Barcelona)	I-22112
Mozambique	I-21181	España (Barcelona)	I-22113
Mozambique	I-21182	España (Barcelona)	I-22114
Mozambique	I-21183	España (Barcelona)	I-22115
Mozambique	I-21184	España (Barcelona)	I-22116
Mozambique	I-21185	España (Barcelona)	I-22117
Mozambique	I-21186	España (Barcelona)	I-22118
Mozambique	I-21187	España (Barcelona)	I-22119
Mozambique	I-21188	España (Barcelona)	I-22120
Mozambique	I-21189	España (Barcelona)	I-22121
Mozambique	I-21190	España (Barcelona)	I-22122
Mozambique	I-21191	España (Barcelona)	I-22123
Mozambique	I-21192	España (Barcelona)	I-22124
Mozambique	I-21193	España (Barcelona)	I-22125
Mozambique	I-21194	España (Barcelona)	I-22126
Mozambique	I-21195	España (Barcelona)	I-22127
Mozambique	I-21196	España (Barcelona)	I-22128
Mozambique	I-21197	España (Ciudad Real)	Mel-57
Mozambique	I-21198	España (Ciudad Real)	Mel-211
Mozambique	I-21199	España (Ciudad Real)	Mel-216
Mozambique	I-21200	México	I-22001-1
Mozambique	I-21201	México	I-22002-1
Mozambique	I-21202	México	I-22003-1
Mozambique	I-21203	México	I-22004-1
Mozambique	I-21204	México	I-22005-1
Mozambique	I-21205	México	I-22006-1
Mozambique	I-21206	México	I-22007-1

PAÍS	CÓDIGO	PAÍS	CÓDIGO
Mozambique	I-21207	México	I-22008-1
Mozambique	I-21208	México	I-22009-1
Mozambique	I-21209	México	I-22010-1
Mozambique	I-21210	México	I-22011-1
Mozambique	I-21211	México	I-22012-1
Mozambique	I-21212	México	I-22013-1
Mozambique	I-21213	México	I-22014-1
Mozambique	I-21214	México	I-22015-1
Mozambique	I-21215	México	I-22016-1
Mozambique	I-21216	México	I-22001-2
Mozambique	I-21217	México	I-22002-2
Mozambique	I-21218	México	I-22003-2
Mozambique	I-21219	México	I-22004-2
Mozambique	I-21220	México	I-22005-2
Mozambique	I-21221	México	I-22006-2
Mozambique	I-21222	México	I-22007-2
Mozambique	I-21223	México	I-22008-2
Mozambique	I-21224	México	I-22009-2
Mozambique	I-21225	México	I-22010-2
Mozambique	I-21226	México	I-22011-2
Mozambique	I-21227	México	I-22012-2
Mozambique	I-21228	México	I-22013-2
Mozambique	I-21229	México	I-22014-2
Mozambique	I-21230	México	I-22015-2
Mozambique	I-21231	México	I-22016-2
Mozambique	I-21232		

ANEXO 2. 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 genero				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 responsables		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 objetivos		X		