

**CARACTERIZACIÓN Y DISCRIMINACIÓN DE MIELES DE ABEJAS SIN AGUIJÓN  
COLOMBIANAS POR ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL**

**MARIO ELÍAS MOLINA RIVERA**



**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PAMPLONA, COLOMBIA**

**2022**

# **CARACTERIZACIÓN Y DISCRIMINACIÓN DE MIELES DE ABEJAS SIN AGUIJÓN COLOMBIANAS POR ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL**

**MARIO ELÍAS MOLINA RIVERA**

Trabajo de Investigación presentado como requisito para optar al título de Magister en Química

## **Tutores**

**DIANA ALEXANDRA TORRES SÁNCHEZ**

Química, Doctora en Química.  
UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

**AMANDA LUCIA CHAPARRO GARCÍA**

Química, M.Sc., Ph.D.  
UNIVERSIDAD DE PAMPLONA



**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PAMPLONA, COLOMBIA**

**2022**

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

---

---

---

---

---

---

**Firma del Jurado**

---

**Firma del Jurado**

## Dedicatoria

Quiero agradecer a DIOS por la oportunidad que me dio de cursar y culminar de forma satisfactoria este proyecto, por iluminar mis días oscuros y permitirme cumplir mis anhelos de formación profesional.

A mis padres, MARIO MOLINA y BLANCA RIVERA por su ejemplo de entrega, porque gracias a ellos soy lo que soy y a mi hermana por sus palabras de aliento.

A mi esposa, CAROLINA ORDOÑEZ CLARO, quien se ha convertido en mi fortaleza y mi refugio, por su apoyo incondicional y su voz de aliento cuando más lo necesitaba y a mi hijo MARIO ANDRÉS MOLINA ORDOÑEZ, quien nació en medio de esta aventura, quien me recarga a diario de energía con su presencia, su sonrisa y su amor.

A CARLOS JULIO PEÑALOZA GARCÍA, rector de la I.E El Diamante, del municipio de Pamplonita, por brindarme los espacios para poder asistir a las clases presenciales y mis compañeros de trabajo por estar siempre prestos a colaborarme, a todos muchas gracias.

## Agradecimientos

El autor expresa sus más sinceros agradecimientos a:

La Universidad de Pamplona por su programa académico de MAESTRÍA EN QUÍMICA y a los Docentes que participaron en mi formación durante el desarrollo del programa académico, de los cuales guardo los mejores recuerdos

A mis tutoras Dra. Diana Alexandra Torres Sánchez y Dra. Amanda Lucía Chaparro García, por su entrega, compromiso, acompañamiento y paciencia en el desarrollo del proyecto.

Al laboratorio de Biocalorimetría y al laboratorio de Alimentos de la Universidad de Pamplona por prestarnos sus servicios de manera amable y siempre con la mejor disposición para el desarrollo de la parte experimental del proyecto.

## Contenido

DEDICATORIA .....	4
AGRADECIMIENTOS .....	5
CONTENIDO.....	6
LISTA DE FIGURAS .....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
RESUMEN .....	13
ABSTRACT.....	14
INTRODUCCIÓN.....	15
MARCO REFERENCIAL .....	21
MIEL DE ABEJAS .....	21
TIPOS DE MIEL DE ABEJAS .....	22
LAS ABEJAS SIN AGUIJÓN .....	23
COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA MIEL.....	24
<i>La cristalización</i> .....	28
<i>Humedad</i> .....	28
TÉCNICAS ANALÍTICAS INSTRUMENTALES .....	29
ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	30
QUIMIOMETRÍA.....	30
ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA).....	31
OBJETIVOS.....	33
OBJETIVO GENERAL .....	33
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
METODOLOGÍA .....	34

MUESTREO.....	34
REACTIVOS.....	34
ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO.....	36
<i>Preparación de los espectros en el programa OriginPro 2019.....</i>	<i>37</i>
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	38
DETERMINACIÓN DEL PERFIL QUÍMICO POR ATR-FTIR.....	38
ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE MIELES DE LOS MUNICIPIOS DE BOCHALEMA Y LOS PATIOS POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA.....	40
ANÁLISIS MUESTRAS DE MIELES LIOFILIZADAS.....	40
ESPECTROSCOPIA INFRARROJA .....	42
ESPECTROS COMPARATIVOS ENTRE MIELES DE LA ESPECIE <i>APIS MELLIFERA</i> Y <i>TRIGONA ANGUSTULA</i> RECOLECTADAS EN LOS MUNICIPIOS DE LOS PATIOS Y BOCHALEMA .....	48
LA REGIÓN DE 4000-2500 $\text{cm}^{-1}$ .....	50
LA REGIÓN DE HUELLA DIGITAL (1800-600 $\text{cm}^{-1}$ ) .....	51
PRIMERA DERIVADA EN LAS MUESTRAS DE MIELES DEL MUNICIPIO DE BOCHALEMA Y LOS PATIOS.....	53
SEGUNDA DERIVADA EN LAS MUESTRAS DE MIELES DE LOS MUNICIPIOS DE BOCHALEMA Y LOS PATIOS .....	62
PCA Y EL ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS .....	69
VERIFICACIÓN DEL MÉTODO.....	76
CONCLUSIONES.....	79
RECOMENDACIONES.....	80
BIBLIOGRAFÍA.....	81
ANEXOS .....	93

**Lista de Tablas**

Tabla 1 Requisitos físicoquímicos de la miel de abejas .....	21
Tabla 2 Legislación para el control de calidad de <i>Apis mellifera</i> .....	26
Tabla 3 Composición de la miel de <i>T. angustula</i> y <i>Apis mellifera</i> .....	27
Tabla 4 Lugares de muestreo .....	34
Tabla 5 Rampas de enfriamiento .....	36
Tabla 6 Asignación general de bandas del espectro ATR-FTIR de miel.....	43
Tabla 7 Ubicación máximos de bandas de absorción FTIR de las muestras de mieles - Bochalema.....	45
Tabla 8 Ubicación máximos de bandas de absorción FTIR de las muestras de mieles - Los Patios.....	47
Tabla 9 Ubicación máximos de bandas de absorción FTIR - <i>Apis mellifera</i> y <i>Trigona angustula</i> .....	49
Tabla 10 Rasgos espectrales característicos de las mieles de <i>Apis mellifera</i> - Bochalema y Los Patios.....	57
Tabla 11 Ubicación máximos de bandas de absorción FTIR - región de carbohidratos .....	67
Tabla 12 Longitudes de onda para diferenciación de especies .....	78

## Lista de Figuras

Figura 1 Taxonomía de especies estudiadas.....	38
Figura 2 Muestras de mieles recolectadas.....	40
Figura 3 Muestras de mieles liofilizadas .....	41
Figura 4 Resta del espectro de agua .....	41
Figura 5 Espectro ATR-FTIR representativo de la miel en la región espectral de 4000–600 $\text{cm}^{-1}$ .....	42
Figura 6 Espectros ATR-FTIR comparativos de todas las muestras de mieles - Bochalema. En la región espectral de 4000–600 $\text{cm}^{-1}$ .....	45
Figura 7 Espectros ATR-FTIR comparativos de todas las muestras de mieles - Los Patios. En la región espectral de 4000–600 $\text{cm}^{-1}$ .....	47
Figura 8 Muestras de mieles de <i>Apis mellifera</i> de los municipios de Bochalema y Los Patios, en la región espectral de 4000–600 $\text{cm}^{-1}$ .....	48
Figura 9 Muestras de mieles de <i>Trigona angustula</i> de los municipios de Bochalema y Los Patios, en la región espectral de 4000-600 $\text{cm}^{-1}$ .....	49
Figura 10 PRIMERA DERIVADA. Espectros ATR-FTIR comparativos de todas las muestras de mieles del municipio de Bochalema, en la región espectral de 1800-600 $\text{cm}^{-1}$ .....	54
Figura 11 PRIMERA DERIVADA. Espectros ATR-FTIR comparativos de todas las muestras de mieles del municipio de Los Patios, en la región espectral de 1800–600 $\text{cm}^{-1}$ .....	54
Figura 12 Comparativo de PRIMERA DERIVADA entre mieles de <i>Apis mellifera</i> de los municipios de Bochalema y Los Patios en la región espectral de 1800-600 $\text{cm}^{-1}$ .....	55
Figura 13 <i>Apis mellifera</i> de los municipios de Bochalema y Los Patios en la región espectral de 1500 a 1300 $\text{cm}^{-1}$ .....	56
Figura 14 <i>Apis mellifera</i> de los municipios de Bochalema y Los Patios en la región espectral de 1100 a 900 $\text{cm}^{-1}$ .....	57

Figura 15 Comparativo de PRIMERA DERIVADA entre mieles de <i>Trigona angustula</i> de los municipios de Bochalema y Los Patios en la región espectral de 1800-600 $\text{cm}^{-1}$ .....	58
Figura 16 <i>Trigona angustula</i> de los municipios de Bochalema y Los Patios en la región espectral de 1500 a 1000 $\text{cm}^{-1}$ .....	59
Figura 17 <i>Trigona angustula</i> de los municipios de Bochalema y Los Patios en la región espectral de 1100 a 900 $\text{cm}^{-1}$ .....	60
Figura 18 <i>Trigona angustula</i> de los municipios de Bochalema y Los Patios en la región espectral de 1000 a 600 $\text{cm}^{-1}$ .....	61
Figura 19 SEGUNDA DERIVADA. Espectros ATR-FTIR comparativos de muestras de mieles del municipio de Bochalema .....	63
Figura 20 SEGUNDA DERIVADA. Espectros ATR-FTIR de muestras de mieles del municipio de Los Patios	64
Figura 21 Comparativo entre <i>Apis mellifera</i> de los municipios de Bochalema y Los Patios en la región espectral de 1800 a 600 $\text{cm}^{-1}$ .....	65
Figura 22 Comparativo de las muestras de mieles <i>Trigona angustula</i> de los municipios de Bochalema y Los Patios, en la región espectral de 1800 a 600 $\text{cm}^{-1}$ .....	65
Figura 23 Espectros de FTIR-ATR de estándares de diferentes tipos de azúcares disueltos en agua entre el intervalo de 1800 y 800 $\text{cm}^{-1}$ después de la sustracción del espectro de agua.....	67
Figura 24 PCA, utilizando la primera derivada de las muestras de mieles del municipio de Bochalema...	71
Figura 25 Dendrograma, utilizando la primera derivada de las muestras de mieles del municipio de Bochalema .....	71
Figura 26 Árbol de decisión, utilizando la primera derivada de las muestras de mieles del municipio de Bochalema .....	72
Figura 27 PCA, utilizando la primera derivada de las muestras de mieles del municipio de Los Patios .....	72

Figura 28 Dendrograma, utilizando la primera derivada de las muestras de mieles del municipio de Los Patios.....	73
Figura 29 Árbol de decisión, utilizando la primera derivada de las muestras de mieles del municipio de Los Patios.....	73
Figura 30 PCA, utilizando la primera derivada de las muestras de mieles de los municipio de Bochalema y Los Patios .....	74
Figura 31 Dendrograma, utilizando la primera derivada de las muestras de mieles de los municipios Bochalema y Los Patios.....	75
Figura 32 Árbol de decisión, utilizando la primera derivada de las muestras de mieles de los municipios Bochalema y Los Patios.....	75
Figura 33 PCA verificación del método. <i>M fuscipes</i> (a) y <i>Apis mellifera</i> (b) .....	77
Figura 34 PCA muestras de Bochalema. Orden Cero.....	93
Figura 35 PCA muestras de Bochalema. Segunda derivada.....	93
Figura 36 PCA muestras de Los Patios. Orden Cero.....	94
Figura 37 PCA muestras de Los Patios. Segunda derivada .....	94
Figura 38 PCA muestras comunes municipios de Bochalema y Los Patios. Orden Cero. ....	95
Figura 39 PCA muestras comunes municipios de Bochalema y Los Patios. Segunda derivada.....	95
Figura 40 Diagrama de barras para las mieles de las especies comunes de los municipios de Bochalema y Los Patios .....	96
Figura 41 Diagrama de barras para las mieles de las especies del municipio de Los Patios .....	96
Figura 42 Diagrama de barras para las mieles de las especies del municipio de Bochalema .....	97

**Lista de Abreviaturas**

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
PCA	Principal component analysis
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy
ATR	Attenuated total reflectance
IHC	International Honey Commission
MADR	Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural

## Resumen

En este proyecto se desarrolló un modelo predictivo para discriminar muestras de mieles de abejas sin aguijón colombianas de las especies, *Melipona compressipes*, *Melipona fuscipes*, *Trigona angustula*, *Frieseomelitta nigra*, *Nannotrigona* sp., *Plebeia* sp., que se compararon con *Apis mellifera* (africanizada) utilizando espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier y quimiometría. El modelo se desarrolló con el análisis de muestras de mieles de dos municipios del departamento de Norte de Santander: Bochalema y Los Patios.

Con el desarrollo de este trabajo, se planteó una metodología alterna para el análisis de mieles que permitió disminuir los tiempos de análisis, reducir costos, disminuir el uso de solventes, reduciendo los residuos tóxicos y la contaminación del medio ambiente. Además, ATR-FTIR es una técnica con buena resolución y tiempo de escaneo rápido, que puede evaluar varios componentes en una sola medición. Finalmente, este trabajo permitió obtener información técnica de estas mieles y en un futuro podría contribuir al ajuste de la legislación vigente en nuestro país, en la que no se establecen parámetros específicos para la miel de estas especies.

**Palabras Claves:** Abejas sin aguijón, espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier, quimiometría.

### Abstract

In this project, a predictive model was developed to discriminate honey samples from Colombian stingless bees of the species, *Melipona compressipes*, *Melipona fuscipes*, *Trigona angustula*, *Frieseomelitta nigra*, *Nannotrigona* sp., *Plebeia* sp., which were compared with *Apis mellifera* (Africanized) using Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. The model was developed with the analysis of honey samples from two municipalities in the department of Norte de Santander: Bochalema and Los Patios.

With the development of this work, an alternative methodology was proposed for the analysis of honey that allowed to reduce analysis times, reduce costs, reduce the use of solvents, reducing toxic waste and environmental pollution. Furthermore, ATR-FTIR is a technique with good resolution and fast scan time, that can evaluate multiple components in a single measurement. Finally, this work allowed to obtain technical information on these honeys and in the future could contribute to the adjustment of the current legislation in our country, in which specific parameters are not established for the honey of these species.

**Keywords:** Stingless bees, Fourier transform infrared spectroscopy, chemometrics.

## Introducción

Las abejas silvestres no-*Apis* conforman aproximadamente el 90% del total de las abejas del mundo, son muy variadas y su biología y sus relaciones con el ser humano son poco conocidas. Los hábitats naturales en las zonas en las que habitan están desapareciendo rápidamente debido al crecimiento poblacional y al uso de la tierra en agricultura y ganadería, principalmente. Dado que las abejas son los polinizadores más importantes de las plantas en los ecosistemas, estudios sobre su ecología en estos frágiles hábitats, son muy importantes para entender su diversidad y promover su conservación. La alta diversidad y rareza de la fauna de abejas contrasta enormemente con lo poco que sabemos sobre ellas.

En Colombia, se registran al menos unas 550 especies de abejas, cifra que se considera subestimada, pues se calcula que el número podría ascender a 1445 especies, situando al país entre los primeros lugares en número de especies en Latinoamérica, junto con México y Brasil, así lo indica el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2020)

El inventario de especies de abejas está aún en proceso, y se calcula que falta por conocer un 60 % de las especies del país. (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2020)

A pesar de la importancia de estas abejas en el país, no solo por la producción de miel sino también por las propiedades terapéuticas que estas puedan tener, no existe una norma actualizada que regule los parámetros de calidad. La norma de la miel en Colombia fue revisada en el año 2006, cuando se incluyó un anexo para las mieles producidas por abejas nativas (Icontec, 2007) y Brasil es el único país que cuenta con una norma estatal para miel producida por abejas del género *Melipona*, en el estado de Bahía (Adab, 2014). Debido a que la composición química de la miel depende de muchos factores, entre ellos, la especie de abeja que lo produce, la región geográfica, la vegetación circundante, el clima y la época del año, el establecimiento de parámetros de calidad de las mieles sin aguijón representa un verdadero reto debido a la diversidad de géneros existentes en el continente. Sin embargo, la IHC

(International Honey Commission) ha planteado la necesidad de establecer los parámetros fisicoquímicos indicadores de calidad utilizados en la miel de *A. mellifera* en las mieles de abejas sin aguijón (Vit, 2008).

Adicionalmente, a los parámetros de calidad, el origen botánico y geográfico de la miel, sigue siendo difícil de determinar, por ello se hace cada vez más necesario tener una base de datos con suficiente información, que permita establecer perfiles químicos, parámetros de calidad, diferenciación entre especies y estandarizar protocolos de análisis, que permitan el establecimiento de una norma que incluya la mayor cantidad de especies en las diferentes regiones del país.

La determinación de una norma de calidad facilitaría la inclusión de estas mieles en diferentes mercados verdes, y le permitiría al consumidor tener un espectro de sabores más amplio para los diferentes usos que le quiera dar a la miel. Según la literatura, experiencias de otros países han demostrado que la diferenciación de los productos y el cumplimiento de los estándares de calidad internacionales generan valor agregado a los productos de las abejas y facilitan su posicionamiento comercial.

Con relación al consumo interno de miel y demás productos de la colmena, no constituyen una práctica que se desarrolle de manera reiterada en Colombia. Entre los factores más importantes que explican esta situación están la falta de seguridad que el consumidor tiene sobre la autenticidad de los productos y el poco conocimiento sobre los beneficios y bondades de los derivados de la apicultura (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2010). Además, los patrones alimenticios provenientes de hábitos de consumo tradicionales no tienen en cuenta a la miel como un elemento de uso amplio en la dieta de los colombianos; por lo cual, podría afirmarse que este alimento permanece significativamente subutilizado desde su producción hasta su comercialización, desde el punto de vista del consumo nacional. De esta manera, aun cuando en Colombia existe demanda de miel de abejas para consumo directo y en mayor medida como medicamento para enfermedades respiratorias y gripales (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2010); se hace necesario evaluar e incentivar la aplicación de características mejoradas

o diferenciadoras en la miel de abejas, de tal forma que puedan transformarse los insumos en productos de alto valor agregado.

La caracterización de los productos de las abejas, que consiste en la diferenciación, identificación y análisis de los productos de las abejas que se obtengan en los apiarios, sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, así como características organolépticas y su origen geográfico y botánico, se presenta en el eslabón de agroindustriales de manera apropiada, debido a las exigencias del INVIMA para comercialización de productos para consumo humano. La comunidad investigadora en el tema hace lo propio con los proyectos. Sin embargo, esta cultura no se ha extendido a los demás eslabones de la cadena productiva. (Agenda Prospectiva de Investigación y Desarrollo Tecnológico para la Cadena Productiva de las Abejas y la Apicultura con Énfasis en Miel de Abejas, 2010)

Los estudios sobre calidad y diversidad aún son preliminares, a nivel nacional es la norma técnica Colombiana NTC 1273 la que regula los parámetros de todos los tipos de formas de presentación de la miel que se ofrecen para el consumo directo en nuestro país, entre los parámetros fisicoquímicos contemplados, se encuentra la medición de humedad, cenizas, contenido de hidroximetilfurfural, azúcares totales, pH y acidez, entre otros.

La Norma Técnica Colombiana 1273 (Icontec, 2007) incluye en la definición de miel a otras especies, no se han estipulado valores reglamentarios como tal, para las diferentes propiedades de dichas mieles, solo se exponen en un apartado adicional los valores que han arrojado los estudios relacionados con ellas; sin embargo, son insuficientes para establecer parámetros en mieles de abejas sin aguijón colombianas, por lo cual es necesario recolectar una extensa base de información referente a las propiedades de las mieles de nuestras abejas nativas (Cardona-Rodríguez, 2015)

En cuanto a protección del sector apícola actualmente existe la Resolución 1057 de 2010 del Ministerio de Protección Social que indica el Reglamento Técnico para miel de abejas, clave para afrontar la situación de falsificación de miel de abejas que actualmente representa un problema altamente

significativo para el crecimiento del sector apícola colombiano, sin embargo, el cumplimiento de esta norma genera gastos para los productores en cuanto a la actualización e implementación de instalaciones y equipos que garanticen la calidad e inocuidad de miel de abejas. (MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL CADENA PRODUCTIVA DE LAS ABEJAS Y LA APICULTURA, 2015)

La miel comercializada mundialmente casi en su totalidad hace referencia a la producida por la especie *A. mellifera*; por lo cual, la mayoría de las investigaciones están enfocadas a la caracterización y estudio de las propiedades de la miel de esta especie. Los estudios relacionados con la caracterización de mieles producidas por Meliponinos en Colombia son pocos y los desarrollados en mieles producidas en Norte de Santander son escasos, existiendo estudios realizados por el grupo de investigación Biocalorimetría de la Universidad de Pamplona.

En un estudio previo realizado en el grupo de investigación biocalorimetría, se determinó que las transiciones térmicas (entalpía y temperatura de aparición) pueden ser utilizadas junto con otros análisis como cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), espectrometría de absorción atómica (AA), y análisis polínico; para establecer diferencias en cuanto al origen botánico de las mieles y la calorimetría diferencial de barrido (DSC) podría utilizarse para determinar la procedencia (huella dactilar) de la miel de *T. angustula*. (Cardona-Rodríguez, Torres-Sánchez, & Hoffmann, 2015).

En otra investigación de la miel producida por *M. fuscipes*, *M. favosa favosa*, *M. compressipes* y *Apis mellifera* se determinó que cada una exhibe un comportamiento térmico diferente; por lo tanto, DSC es una técnica adecuada para caracterizar muestras de miel para la autenticación de especies y detección de adulteraciones. (Cardona-Rodríguez, Torres-Sánchez, Lamprecht, & Hoffmann, 2018).

Un estudio de las propiedades fisicoquímicas realizado por primera vez en mieles de abejas del departamento de Norte de Santander indicó que el contenido de agua, índice de refracción, azúcares totales, acidez total, diastasa, pH y HMF tienen poder discriminante ( $p < 0,05$ ) y las muestras se clasificaron correctamente en un 97,2 %. En este estudio se reportó por primera vez los valores de diastasa y HMF

para mieles producidas por *M. fuscipes*, pH y acidez láctica para mieles producidas por *T. nigra*, *M. compresipes* y *Nannotrigona* sp.; y acidez libre en las muestras de miel producidas por *Scaptotrigona* sp., *T. nigra*, *M. fuscipes* y *Nannotrigona* sp. Adicionalmente, este estudio reveló que las propiedades fisicoquímicas dependen de la especie de abeja y no de la época del año, y que son diferentes para la miel de *Apis mellifera* en comparación con la miel de abejas sin aguijón. El análisis estadístico mostró que la acidez es el principal factor para diferenciar entre la miel producida por *Apis mellifera* y las abejas sin aguijón (Cardona-Rodríguez, Torres-Sánchez, & Hoffmann, 2019).

Para establecer el comportamiento térmico de mieles de las especies *T. nigra* y *T. angustula* de abejas del género *Trigona*, se realizó un estudio mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) que evidenció que las mieles producidas por *T. nigra*, *T. angustula*, *Scaptotrigona* sp. y *Nannotrigona* sp. tienen diferencias significativas en la entalpía de todas las transiciones comunes (trs1, trs2, trs3, trs4a) mostrando que estas diferencias pueden ser utilizadas eficazmente para distinguir las mieles de varias especies de abejas y posiblemente prevenir su adulteración. (Cardona-Rodríguez, Torres-Sánchez, & Hoffmann, 2020).

Teniendo en cuenta lo anterior, se requiere realizar estudios de mieles de otras especies, utilizando diferentes técnicas de análisis que sean rápidas, requieran poca cantidad de muestra, permitan diferenciarlas y un menor costo para los productores.

La espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier y quimiometría es una excelente alternativa para este fin. La toma del espectro infrarrojo se puede desarrollar in situ con la adquisición de equipos portátiles, además de ser una técnica que requiere muy poca muestra, con buena resolución y tiempo de escaneo rápido, incluso puede evaluar varios componentes en una sola medición instrumental sin necesidad de una separación física con la ayuda de herramientas quimiométricas, con mínima o ninguna preparación de muestra, solo utilizando solvente (etanol absoluto) para la limpieza del cristal del ATR, disminuyendo la generación de desechos tóxicos y la contaminación del medio ambiente, además

que permite establecer un modelo de calibración multivariante con datos recolectados con espectroscopía ATR-FTIR para evaluar el contenido de azúcar de la miel y tener una metodología rápida que permita establecer diferencias en las muestras de mieles de abejas y posteriormente evaluar si existe correlación entre las mieles provenientes de diferentes especies y regiones geográficas utilizando análisis de componentes principales (PCA).

La caracterización fisicoquímica y las propiedades térmicas de las mieles producidas por abejas sin aguijón son poco conocidas, principalmente debido a la alta diversidad de flora melífera y a la baja producción inherente a estas especies.

## Marco Referencial

### Miel de Abejas

La miel de abejas se define como una sustancia natural azucarada producida por abejas obreras de diferentes especies, a partir del néctar de las plantas o de secreciones de partes vivas de plantas o excreciones de insectos chupadores sobre partes vivas, recolectadas por las abejas, transformada por combinación con sustancias específicas propias de las abejas depositada, deshidratada, almacenada y colocada dentro de las celdillas del panal para su madurez (Ministerio de la Protección Social, 2010).

La miel, constituye uno de los alimentos más primitivos que el hombre ha aprovechado para nutrirse, sin embargo, su composición es compleja y los carbohidratos representan la mayor proporción dentro de los que destacan la fructosa y glucosa, también se encuentran en ella otras sustancias como ácidos orgánicos, enzimas, aminoácidos, antioxidantes, vitaminas, minerales y partículas sólidas derivadas de su recolección. El color de la miel es variante y puede presentarse como incoloro o hasta pardo oscuro. Su consistencia puede ser fluida, viscosa, total o parcialmente cristalizada. El sabor y aroma también son variantes, pero en general se encuentran relacionados con el origen floral del cual provienen (Alimentarius, C. d. C., 2001). Los requisitos físicoquímicos para este alimento, establecidos por la resolución 1057 de 2010 del Ministerio de la Protección Social se presentan en la Tabla 1.

**Tabla 1** Requisitos físicoquímicos de la miel de abejas

Requisitos	Valores permisibles
Sólidos insolubles en agua (%)	≤ 0,1 para miel diferente a la prensada ≤ 0,5 para miel prensada
Contenido de humedad (5 m/m)	≤ 20 ≤ 21 para mieles de origen vegetal
Contenido aparente de azúcar redactor, calculado como azúcar invertido (% m/m)	≥ 45 (miel de mielato) ≥ 60 (miel floral)
Contenido aparente de sacarosa (% m/m)	≤ 5 ≤ 10 para mieles de origen tropical
Contenido de sustancias minerales (ceniza % m/m)	≤ 0,6
Conductividad eléctrica (mS/cm)	≤ 0,8
Acidez libre (Meq. ácido/1000 g)	≤ 50
Índice de diastasa (escala Shade)	≥ 8
Contenido de hidroximetilfurfural (g/Kg)	≤ 40

	≤ 60 para mieles de origen tropical
Determinación de metales pesados (Cu, Cr, Cd, Pb,Hg)	Los límites máximos permitidos serán los establecidos por el Ministerio de la Protección Social

*Nota:* Tomado de Resolución 1057 del 23 de marzo del 2010, Artículo 6. Ministerio de la Protección Social.

La composición de la miel depende de diversos factores tales como la especie de la planta (s), características del suelo, clima y condiciones ambientales, principalmente. También se ha asociado a la miel otras funciones además de la alimenticia, sobre todo algunas relacionadas para el tratamiento de afecciones de la salud. Aunque la apicultura es una actividad muy antigua, en la actualidad representa una actividad económica importante en muchos países (La miel de abeja y su importancia, 2010).

### **Tipos de miel de abejas**

La composición y las propiedades de la miel dependen del origen botánico de la fuente de néctares o secreciones (Bertelli, y otros, 2010), donde los carbohidratos son los principales componentes de la miel. La miel al ser una sustancia azucarada y natural resultante de la producción de las abejas obreras, que, a partir del néctar de las flores de las plantas, secreciones de partes vivas de las plantas o de insectos; es depositado en las celullillas del panal, deshidratado y almacenado para su maduración (Icontec, 2007).

Del proceso anterior se derivan diferentes tipos de miel como son: la miel de abeja monofloral, que, en su totalidad, proviene de una sola especie de planta, por lo que adquiere las características organolépticas, fisicoquímicas y macroscópicas de las mieles de dicha plantas; las mieles de abeja multifloral, proviene de la mezcla del néctar de varias especies botánicas y la miel de abejas nativas es aquella que ha sido producida por especies de abejas propias del territorio colombiano, que no han sido introducidas ni naturalizadas, por lo que sus características fisicoquímicas y sensoriales son propias de las mieles de cada especie. (Urrego, John 2017). La miel de flores o néctar proviene del néctar de las plantas producido por nectarios florales y/o extraflorales. La miel de mielada o mielato, es la que se produce

principalmente de las excreciones de los insectos succionadores de néctar de plantas o de las secreciones de las partes vivas de éstas (Icontec, 2007).

### **Las abejas sin aguijón**

“Las abejas sin aguijón (familia: Meliponinae), como las abejas melíferas (familia: Apinae), son insectos eusociales. Construyen pequeños nidos en cavidades de árboles o en ramas, en nidos de termitas y hormigas, bajo tierra o en cavidades artificiales, como paredes y tumbas en cementerios” (Wille & Michener, 1973).

Las abejas sin aguijón viven en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo, entre aproximadamente 30° de latitud norte y sur, y poseen un aguijón reducido, por lo cual no tienen como mecanismo de defensa el introducir el aguijón (picadura) cuando se sienten atacadas (Camargo & Moure, 1983). La abeja *Apis mellifera* pertenece a la subfamilia Apis, mientras que, las abejas sin aguijón pertenecen a la subfamilia Meliponinae. Ambas abejas producen miel y otros subproductos de la abeja, como polen, cera de abejas, propóleos y jalea real (Rasmussen & Cameron, 2010). La miel más comúnmente conocida en el mundo proviene de la especie *Apis mellifera*. Las abejas sin aguijón almacenan su miel en “potes” hechos de cerumen y separados de la cría, es por ello que la miel de estas abejas se conoce como “pot honey” (Abd Jalil , Kasmuri , & Haid , 2017); (Vit, Medina, & Eunice , 2004).

Las abejas son consideradas el insecto más importante del mundo, pues además de producir la dulce miel, realizan uno de los procesos más valiosos para la supervivencia de todas las formas de vida: la polinización, que consiste en desplazar el polen que produce una flor a otra de su misma especie que lo recibe, contribuyendo así a la producción y reproducción de una gran variedad de cultivos y plantas silvestres. De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas – ONU, cerca del 90% de las plantas con flor dependen de la polinización, y el 75% de los cultivos alimentarios dependen de las abejas confirmando el papel fundamental de las abejas en la conservación de la vida. (Aroca Gaona, 2022). En el mundo se encuentran más de 20.000 especies de abejas diferentes, la gran mayoría de ellas son solitarias o viven

en pequeños grupos de menos de 5 individuos y no construyen grades estructuras. Por otro lado, las abejas que sí son sociables son un poco más de 1.250 especies. Colombia, posee más de 120 especies de abejas sin aguijón o meliponinos. (Universidad EAFIT, 2022)

### **Composición Química de la Miel**

Según Bogdanov S., 2009 cap. 4, la miel se compone principalmente de carbohidratos, que comprenden aproximadamente el 95% del peso seco de la miel, cantidades más bajas de agua y una gran cantidad de componentes menores. La fructosa está presente en una concentración más alta que la glucosa y proporciona a la miel su extrema dulzura. Además, se han detectado unos 25 oligosacáridos diferentes en la composición de la miel (Doner, 1977). La composición de los carbohidratos en la miel depende del néctar recogido de las flores por las abejas y las condiciones climáticas regionales (Ouchemoukh, S., Schweitzer, P., Bey, M. B., Djoudad-Kadji, H., & Louaileche, H., 2010).

Dos azúcares, dextrosa y levulosa, son los principales ingredientes de la miel, con cantidades más pequeñas de otros 22 azúcares más complejos, incluidos los disacáridos maltosa, sacarosa, turanosa, isomaltosa, laminaribiosa, nigerosa, kojibiosa, gentiobiosa y  $\beta$ trealosa. Los trisacáridos encontrados incluyen maltotriosa, erlosa, melezitosa, 1-cestosa, isopanososa, isomaltotriosa, panosa y theanderosa. Las diferentes plantas contienen cantidades menores de todos estos azúcares (Bogdanov S. , 2004).

Muchos ácidos orgánicos también están presentes en la miel. Estos son láctico, fórmico, butírico, tartárico, pirúvico, acético, cítrico, oxálico, succínico, málico, maleico,  $\alpha$ -cetoglutárico, glucosa-6-fosfato, piroglutámico y ácido glicólico. Entre estos ácidos, el ácido glucónico es el más común, y se produce a partir de la dextrosa por la acción de la enzima glucosa oxidasa.

Esta característica única de la miel, que es la presencia de enzimas, la hace diferente de otros agentes edulcorantes. Estas enzimas se derivan de las levaduras, el néctar, el polen, la abeja y los microorganismos. Algunas de las enzimas de miel más importantes son la glucosa oxidasa, la catalasa, la fosfatasa ácida, la invertasa y la diastasa. El calentamiento de la miel puede desestabilizar o destruir estas

enzimas (Hebbar, H. U., Nandini, K. E., Lakshmi, M. C. & Subramanian, R., 2003). Aparentemente, los ácidos y enzimas orgánicos juegan un papel importante en la definición de las propiedades físicas y biológicas de varias mieles.

El contenido mineral o porcentaje de cenizas en la miel floral varía de 0.02 a 0.1%. Debido a su contenido mineral más rico, la miel es menos adecuada para el almacenamiento a bajas temperaturas. Otras características como el contenido de humedad, azúcares reductores, conductividad eléctrica, ácidos libres, contenido de sacarosa e hidroximetilfurfural (HMF) también pueden influir en la calidad nutricional, granulación, sabor y textura de la miel. El valor medicinal de la miel también se debe a estos componentes.

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se utilizó para analizar la mayoría de los parámetros fisicoquímicos y para determinar el origen botánico de una muestra de miel. Los modelos empleados de clasificación se lograron mediante calibración PCA y se verificaron con muestras de diversos orígenes botánicos, encontrando que la mayoría de las muestras de miel de colza, falsa acacia, brezo y melaza pueden ser clasificadas correctamente por esta técnica (Etzold y Lichtenberg-Kraag, 2008). Normalmente, el pH de la miel está entre 3.5 y 5.5 debido a la presencia de ácidos orgánicos que le dan sabor a la miel evitan la proliferación microbiana. Además de esto, los valores de pH también ayudan en la identificación del origen botánico de la miel como lo reportado por Sanz, M. L., Gonzalez, M., De Lorenzo, C., Sanz, J., & Martinez-Castro, I. (2005) y Von Der Ohe, W., Oddo, L. P., Piana, M. L., Morlot, M., & Martin, P. (2004).

La estimación quimiométrica de los parámetros fisicoquímicos (azúcares, rotación óptica, contenido de nitrógeno, conductividad eléctrica, etc.) permitió realizar una buena segregación de algunas mieles uniflorales (Terrab, González, Díez, & Heredia, 2003), sin embargo, no se pudo distinguir entre mieles uniflorales y poliflorales. Bogdanov S., 2004, realizó la cuantificación mediante el análisis quimiométrico de los componentes volátiles

Los métodos actuales que usan extracción con solvente analizan el espacio de cabeza (estático y dinámico) han mostrado una buena aproximación. Sin embargo, estos métodos son complejos y requieren instrumentación costosa. Entre ellos, la micro extracción en fase sólida (SPME) es una técnica de extracción flexible, simple y relativamente económica. Los resultados dependen tanto de las características de la fibra como de las condiciones de extracción utilizadas para el análisis. Sin embargo, se requieren más estudios antes de que sea aceptado como una técnica auténtica para la extracción del aroma de la miel y la determinación floral (Cuevas-Glory, Pino, & Santiago, 2007).

En Brasil, la miel es considerada un alimento que aporta energía, siendo elaborado a partir de la deshidratación y transformación del néctar floral. Para el consumo humano, la miel debe cumplir con los requisitos mínimos de identidad y calidad exigidos por una regulación adecuada (Sousa, 2008). Para *A. mellifera*, la estandarización brasileña de la miel emplea la Instrucción Normativa del 11 de octubre de 2000 (Ministério da Agricultura, 2000). Esta regulación se basó en la legislación europea de la miel de *A. mellifera*, pero no, de la miel de abejas nativas, que presenta diferencias en algunos parámetros fisicoquímicos (Azeredo, Azeredo, & Beser, 2000); (Sousa, 2008). Sin embargo, algunos trabajos habían sugerido estándares de calidad para la regulación de las mieles de abejas sin aguijón. Algunos investigadores sugirieron valores máximos y mínimos para cada parámetro de calidad para la miel de abeja sin aguijón. Vit, Medina, & Eunice, 2004 propusieron estándares de calidad para la miel de abejas sin aguijón de Venezuela, dividiendo las especies en tres grupos: *Melipona*, *Scaptotrigona* sp. y *Trigona*. Villas-Bôas & Malaspina, (2004) sugirieron parámetros para la miel de abejas sin aguijón brasileña. Los valores definidos para la legislación brasileña de control de calidad de *A. mellifera* y valores sugeridos para la miel de abejas sin aguijón, por Villas-Bôas & Malaspina, (2004) se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2** Legislación para el control de calidad de *Apis mellifera*

<b>Parámetros Fisicoquímicos</b>	<b>Miel de <i>Apis mellifera</i></b> (Ministério da Agricultura, 2000)	<b>Miel de <i>Melipona</i></b> (Villas-Bôas & Malaspina, 2004)
Reducción de azúcares (%)	Mín. 65.0	Mín. 50.0
Humedad (%)	Máx. 20.0	Máx. 35.0

Sacarosa aparente (%)	Máx. 6.0	Máx. 6.0
Sólidos insolubles (%)	Máx. 0.1	Máx. 0.4
Minerales (%)	Máx. 0.6	Máx. 0.6
Acidez (mEq/Kg)	Máx. 50.0	Máx. 85.0
Actividad de Diastasa (DN)	Mín. 8.0	Mín. 3.0
Hidroximetilfurfural (mg/Kg)	Max. 60.0	Máx. 40.0

*Nota:* Valores sugeridos para miel de *Meliponini* y *Tetragonisca angustula* en Brasil.

La legislación brasileña estandariza la calidad de las mieles evaluando los parámetros que indican las características fisicoquímicas de madurez (azúcares reductores, sacarosa aparente y humedad) de autenticidad (sólidos insolubles en agua y minerales) y de deterioro (acidez, actividad diastasa e hidroximetilfurfural). Se puede ver la composición de los dos tipos de mieles: *A. mellifera* y *T. angustula*) de Brasil obtenida por Sousa (2008), así como los valores utilizados para el control de calidad de la miel requerido por la regulación brasileña para *A. mellifera* (Ministério da Agricultura, 2000) en la Tabla 3.

**Tabla 3** Composición de la miel de *T. angustula* y *Apis mellifera*

Parámetros	<i>Miel Tetragonisca angustula</i> <sup>a</sup> n = 6	<i>Miel de Apis mellifera</i> <sup>a</sup> n = 6	<i>Regulación brasileña para la miel de A. mellifera</i> <sup>b</sup>
	Media ± SD (Min – Max)	Media ± SD (Min – Max)	Estándar
Reducción de azúcares (g/100 g miel)	57.09 ± 7.83 (44.78–67.54)	71.50 ± 10.45 (52.98–84.24)	Min. 65.0
Moisture (g/100 g miel)	24.37 ± 0.77 (23.4–25.6)	17.29 ± 1.23 (15.40–19.00)	Max. 20.0
Sacarosa aparente (g/100 g miel)	2.14 ± 1.80 (0.43–4.46)	2.99 ± 2.60 (0.56–7.64)	Max. 6.0
Sólidos insolubles (g/100 g miel)	0.06 ± 0.03 (0.02–0.10)	0.04 ± 0.03 (0.01–0.08)	Max. 0.1
Minerales/ Cenizas (g/100 g miel)	0.28 ± 0.11 (0.17–0.42)	0.20 ± 0.06 (0.11–0.26)	Max. 0.6
Acidez libre (mEq/kg)	37.34 ± 16.74 (21.65–63.85)	25.48 ± 5.66 (16.82–32.47)	Max. 50.0
Actividad de Diastasa (DN)	16.93 ± 3.94 (11.01–22.45)	7.32 ± 3.50 (2.20–11.49)	Min. 8.0
Hidroximetilfurfural (mg/kg) (HMF)	0.65 ± 0.25 (0.30–0.93)	11.37 ± 7.78 (2.0–21.0)	Max. 60.0

<sup>a</sup> (Sousa, 2008)

<sup>b</sup>Brasil (2000)

*Nota:* En comparación con los parámetros de la legislación brasileña.

### ***La cristalización***

Según Visquert 2015 desde el punto de vista de la frescura de la miel, su manipulación conlleva una serie de inconvenientes; tanto el paso del tiempo como la temperatura son factores que afectan decisivamente en el deterioro de las propiedades beneficiosas de la miel. Los dos factores para considerar en el almacenamiento son la humedad relativa y la temperatura. Es aconsejable mantener la miel en ambiente fresco ya que los procesos enzimáticos se reducen al mínimo y se retrasa la cristalización.

La cristalización de la miel es un fenómeno natural de gran importancia, en el momento de su extracción todas las mieles son fluidas, sin embargo, con el paso del tiempo tienden a solidificarse. El fenómeno de cristalización sucede cuando la glucosa precipita en forma de cristal. La tendencia de la miel a cristalizar depende fundamentalmente del contenido de glucosa, del nivel de humedad y de la temperatura. No todas las mieles cristalizan con igual rapidez, algunas lo hacen a los pocos días de su recolección (girasol) y otras, incluso al cabo de años (anís). Adicionalmente, la cristalización puede ser estimulada por cualquier partícula pequeña de polvo, polen, pedacitos de cera o propóleo, burbujas de aire, que están presentes en la miel. (Visquert 2015).

El proceso de cristalización puede ser retrasado, con un apropiado almacenamiento, manteniendo la miel a una temperatura de almacenamiento controlada. Temperaturas por debajo de 10°C previenen la cristalización, temperaturas entre 10 y 21°C generalmente la promueven, temperaturas entre 21 y 27°C disminuyen el riesgo de cristalización, pero degradan la miel y temperaturas superiores a los 27°C evitan la cristalización, pero aceleran su degradación. (Visquert 2015).

### ***Humedad***

La miel es un alimento de humedad intermedia. Su contenido en agua puede oscilar entre un 13 y un 25% dependiendo de las condiciones climáticas, estación del año, humedad original del néctar y grado de maduración alcanzado en la colmena, aunque es recomendable que no supere el 18%. El contenido en agua de la miel es, sin duda, una de sus características más importantes, ya que influye de

manera decisiva en parámetros como el peso específico, la viscosidad, el sabor, la palatabilidad o la solubilidad. Por ello, la cantidad de agua en la miel condiciona de manera decisiva su conservación, ya que es en la fase acuosa de la misma donde se llevan a cabo la mayoría de las reacciones de transformación y alteración.

La disponibilidad del agua en la miel puede variar como consecuencia de los fenómenos de cristalización. Cuando la miel cristaliza se origina una separación de fases, provocando un aumento de la actividad de agua en la capa superior. Cuando el contenido en agua supera el 18%, pueden aparecer los primeros problemas de fermentación, si bien ésta dependerá también de otros factores como la carga microbiana inicial, el tiempo y la temperatura de almacenamiento. La humedad es un parámetro muy importante en la calidad de la miel, ya que algunas de las causas de su alteración, como la cristalización o la fermentación, están directamente relacionados con él.

### **Técnicas Analíticas Instrumentales**

En la última década ha habido una demanda de métodos analíticos nuevos y rápidos para evaluar diferentes parámetros en la industria alimentaria. La espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) es un método bien aceptado para evaluar diferentes constituyentes de los alimentos, en particular cuando se usa en combinación con análisis de datos multivariados y quimiometría, lo que mejora la velocidad del análisis y no necesita la preparación de muestras que requieren mucho tiempo o reactivos costosos. La región del infrarrojo medio ubicada entre  $4000$  y  $450\text{ cm}^{-1}$  contiene información proveniente de vibraciones moleculares y es sensible a los estados químicos y físicos de la muestra que permiten discriminar diferentes muestras con diferente concentración y composición. Esta técnica asociada con quimiometría, es una poderosa herramienta en el control de calidad y en la rápida determinación analítica de diferentes atributos en numerosas muestras de alimentos tales como: análisis de jugos (Jha & Gunasekaran, 2010); bebidas alcohólicas (Cocciardi, Ismail y Sedman, 2005; Lachenmeier, 2007; Moreira, Marcos, y Barros, 2002); análisis de mosto y vino (Fernandez & Agosin, 2007; (de Villiers,

Alberts, Tredoux, & Nieuwoudt, 2012); algas marrones y rojas comestibles (Gómez-Ordóñez & Rupérez, 2011); flavona polimetoxilada de residuos de aceite de naranja (Manthey, 2006), vitamina C en una mezcla en polvo y líquido (Yang & Irudayaraj, 2002); determinación de ácidos orgánicos y carbohidratos en frutos (Bureau, y otros, 2009) y caracterización de aceite de oliva y pulpa de oliva (Iñón, Garrigues, Garrigues, Molina, & Guardiola, 2003; de la Mata, P., Dominguez-Vidal, A., Bosque-Sendra, J. M., Ruiz-Medina, A., Cuadros-Rodríguez, L., & Ayora-Cañada, M. J., 2012). Además, para los análisis de miel se desarrollaron algunas investigaciones con esta técnica: Gallardo-Velázquez, T., Osorio-Revilla, G., Zuñiga-de Loa, M., & Rivera-Espinoza, Y. (2009) utilizaron espectroscopia FTIR-ATR y análisis multivariante para la cuantificación de muestras de adulterantes en mieles.

### **Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)**

Para mejorar los métodos analíticos rápidos para el control de calidad de la miel, fue necesario desarrollar métodos simples y precisos para el análisis de rutina de la miel. En la última década, ha habido una demanda de métodos analíticos nuevos y rápidos para evaluar diferentes parámetros en la industria alimentaria. La espectroscopía infrarroja es una técnica rápida, que no necesita reactivos químicos y no contamina el medio ambiente y que presenta un alto grado de automatización y bajos costes de funcionamiento y mantenimiento, a la vez que ofrece un perfil general de la composición química de la muestra (huella dactilar) con elevada precisión y una detección fiable de los datos reduciendo el tiempo y la complejidad de la medición. (Edelmann et.al, 2001). Adicionalmente, es un método bien aceptado para evaluar diferentes componentes de los alimentos, en particular cuando se usa en combinación con análisis de datos multivariados y quimiometría, mejorando la velocidad de análisis y sin la necesidad de una preparación de muestra que consume mucho tiempo o reactivos costosos.

### **Quimiometría**

La quimiometría trata, específicamente, de todos aquellos procesos que transforman señales analíticas y datos más o menos complejos en información. La quimiometría utiliza métodos de origen

matemático, estadístico y otros procedentes del campo de la lógica formal para conseguir sus fines. Los métodos quimiométricos están extendidos en aplicaciones químicas y más concretamente en la química analítica, sin embargo, es aplicada para la resolución de problemas en diferentes ámbitos como por ejemplo el procesado de señales, diseño experimental, reducción de variables, exploración de datos, análisis cuantitativo multivariante y reconocimiento de patrones. Estas técnicas son útiles para la cuantificación de compuestos en mezclas complejas, cuando, dadas las características espectrales que poseen, no se pueden resolver por los métodos de espectroscopía tradicionales. Uno de los mayores éxitos de los métodos quimiométricos es el análisis de reconocimiento de patrones para la realización de estudios de tipo cualitativo.

La quimiometría abarca diversos objetivos como la aplicación de pretratamientos a los datos experimentales para mejorar la calidad de la señal, la construcción de modelos para el reconocimiento de pautas y la determinación cuantitativa.

Se pueden usar diferentes rangos de absorciones infrarrojas para la estimación del origen botánico. La espectroscopía de infrarrojo cercano se ha utilizado para la autenticación de ocho tipos de miel unifloral y polifloral (Ruoff, K., Luginbühl, W., Bogdanov, S., Bosset, J. O., Estermann, B., Ziolk, T., & Amadò, R., 2006). Del mismo modo, en 2006 se realizó un análisis cuantitativo de veinte parámetros físicos y químicos diferentes en la miel por espectrometría de infrarrojo medio Ruoff, K., Luginbühl, W., Künzli, R., Iglesias, M. T., Bogdanov, S., Bosset, J. O., ... & Amadò, R. (2006). La quimiometría y la espectroscopía FTIR se emplearon con éxito en los estudios de origen botánico (Kelly, J. D., Downey, G., & Fouratier, V., 2004; Sivakesava e Irudayaraj, 2001).

### **Análisis de Componentes Principales (PCA)**

La técnica del análisis de componentes principales consiste en analizar un conjunto de datos de entrada, el cual contiene diferentes observaciones descritas por múltiples variables independientes o dependientes y cuyas relaciones entre sí no tienen por qué conocerse; el objetivo principal es reducir la

dimensión del conjunto de datos de entrada intentado mantener la mayor cantidad de información posible para poder analizarlos de forma más fácil y que en etapas posteriores, como clasificadores o regresores, se puedan simplificar los criterios de decisión.

El PCA realiza en primer lugar una transformación lineal de los datos en un nuevo sistema de coordenadas ortogonales. Los vectores de proyección de los datos en el nuevo espacio son las direcciones de máxima varianza de los datos de entrada. Mientras que, las nuevas variables resultantes de proyectar los datos de entrada sobre los vectores de proyección se llamarán componentes principales ("Principal Component", PC). En este nuevo sistema de coordenadas las componentes principales están ordenados automáticamente según la varianza de la proyección de datos, es decir, según la cantidad de información que contengan. Finalmente, se puede reducir la dimensión de los datos resultantes en el nuevo espacio eliminando las componentes principales que presenten una menor varianza, es decir, que aporten menos información.

El PCA tiene dos propiedades muy importantes que hacen de este método de reducción de la dimensionalidad tan popular; la primera: los componentes principales obtienen secuencialmente la máxima variabilidad o varianza de  $X$ , por lo que se garantiza la mínima pérdida de información (en el sentido de error de reconstrucción). La segunda: los componentes principales obtenidos son ortogonales entre sí, facilitando su posterior procesado, ya que pueden tratarse independientemente.

## Objetivos

### Objetivo General

Caracterizar y discriminar mieles de abejas sin aguijón colombianas por espectroscopia vibracional (ATR-FTIR).

### Objetivos Específicos

- Establecer el perfil químico por ATR-FTIR de muestras de mieles de abejas sin aguijón colombianas de las especies *Melipona compressipes*, *Melipona fuscipes*, *Trigona angustula*, *Frieseomelitta nigra*, *Nannotrigona sp.*, *Plebeia sp.*, *Scaptotrigona sp.*, y compararlo con el de *Apis mellifera* (africanizada).
- Evaluar si existe correlación entre las mieles provenientes de diferentes especies utilizando análisis de componentes principales (PCA).
- Determinar si existe correlación entre las mieles de las especies que se encuentran en diferentes sitios geográficos mediante análisis de componentes principales (PCA).

## Metodología

### Muestreo

Las muestras de miel producidas por las especies *Melipona compressipes*, *Trigona angustula*, *Frieseomelitta nigra* y *Apis mellifera* (africanizada) se recolectaron en Los Patios y, las muestra de *Melipona fuscipes*, *Trigona angustula*, *Nannotrigona* sp., *Plebeia* sp., *Scaptotrigona* sp., y *Apis mellifera* (africanizada) en Bochalema. Se realizó un solo muestreo en el mes de septiembre. En la Tabla 4, se incluye el lugar de muestreo, altitud y coordenadas geográficas de las colmenas de las diferentes especies.

**Tabla 4** Lugares de muestreo

Especie	Lugar de muestreo	Altitud (msnm)	Coordenadas
<i>Melipona compressipes</i>	Los Patios	386	7°50'35.85"N 72°30'29.91"W
<i>Frieseomelitta nigra</i>			
<i>Trigona angustula</i>	Los Patios y Bochalema	386	7°50'35.85"N 72°30'29.91"W
<i>Apis mellifera</i>		1026	7°34'43.67"N 72°38'17.00"W
<i>Melipona fuscipes</i>	Bochalema	1026	7°34'43.67"N 72°38'17.00"W
<i>Nannotrigona</i> sp.			
<i>Plebeia</i> sp.			
<i>Scaptotrigona</i> sp.			

Las muestras se tomaron manualmente directamente de los potes de almacenamiento de miel, utilizando jeringas de plástico (1mL-5mL). Las muestras se almacenaron en recipientes de vidrio y se mantuvieron protegidas de la luz, luego se trasladaron al laboratorio de Biocalorimetría de la Universidad de Pamplona, en donde se guardaron a temperatura ambiente hasta su análisis Pasini, F., Gardini, S., Marcazzan, G. L., & Caboni, M. F., 2013; Terrab, Díez, & Heredia, 2002 y Karabagias, I. K., Badeka, A., Kontakos, S., Karabournioti, S., & Kontominas, M. G., 2014.

### Reactivos

Etanol RA al 96%.

### Equipos, Instrumentos y Métodos

Las mediciones por espectroscopia ATR-FTIR se realizaron por triplicado en un espectrofotómetro

FTIR marca SHIMADZU modelo IR Prestige–21, provisto de un detector DLATGS (Deuterated L- Alanine Doped Triglycene Sulphate) y equipado con un accesorio ATR modelo MIRacle, marca Pike Technologies, con cristal de diamante. Los espectros se obtuvieron en la región del infrarrojo medio, con un barrido de 4000  $\text{cm}^{-1}$  hasta 600  $\text{cm}^{-1}$ , a una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  y 48 scans. Se tomaron seis muestras de cada especie, se analizaron de manera independiente y por triplicado de acuerdo de la disponibilidad de muestra, para cada ensayo se limpió el ATR con etanol RA al 96%, se tomó una alícuota de la muestra y se midió de nuevo.

La adquisición de los datos se realizó utilizando el software del equipo, IR Solution 2002. Los espectros se sometieron a suavizado, corrección de línea base, normalizado y se calculó la primera y segunda derivada de cada uno de ellos para determinar la longitud de onda característica de cada una de las especies. (Mondragón, 2020)

a) Espectro del Background. Se obtuvo el espectro del background del IR sin muestra en el equipo siguiendo las instrucciones.

b) Calibración del Espectrofotómetro: Espectro del Poliestireno.

Se realizó seguimiento a la posición de la banda de la película de poliestireno de espesor conocido y se hizo seguimiento del espectro. Antes de realizar una asignación cualitativa de bandas en los espectros, se necesitó realizar un calibrado de frecuencias del espectrofotómetro.

1) Se colocó la película de poliestireno en el soporte de la muestra del espectrofotómetro y se registra el espectro a la máxima resolución posible y a la resolución de 16  $\text{cm}^{-1}$  y 2  $\text{cm}^{-1}$ .

2) Se identificaron las bandas principales del espectro obtenido con las frecuencias numeradas y tabuladas.

3) A la vista de la estructura del poliestireno, se utilizó la información incluida en el apéndice para interpretar las bandas observadas. Se asignaron, por ejemplo, las bandas del espectro asociadas con los modos vibracionales de estiramiento de los enlaces C-H y C-C del anillo bencénico.

### Proceso de liofilización

Teniendo en cuenta que las mieles tienen naturalmente un alto contenido de humedad (20 a 35%) que puede interferir específicamente en la interpretación correcta de la banda de tensión O-H (banda ancha desde 3500 a 3200  $\text{cm}^{-1}$ ), se realizó un proceso de liofilización a algunas de las muestras de mieles, específicamente de la especie *M. fuscipes*, para comparar el espectro obtenido mediante esta metodología con el obtenido cuando se resta el espectro del agua al espectro de una miel sin liofilizar, para establecer cual metodología era la más adecuada (Mondragón, 2020).

Las muestras de mieles fueron liofilizadas (liofilizador LABCONCO modelo 74000, disponible en el laboratorio de maestría en ciencia y tecnología de alimentos de la Universidad de Pamplona) al vacío durante 24 h y 48 h, pero como no se secaron, se procedió a diluir con agua destilada la miel a un 50% y se realizó el proceso de liofilización por 72 h, sin cambio alguno en la disminución de la humedad de la muestra. La información detallada de las rampas de enfriamiento (24, 48 y 72 h) se muestra a continuación:

**Tabla 5** Rampas de enfriamiento

Segmento	Pre-Freeze 4 h	Pre-Freeze 8 h	Pre-Freeze 12 h
1	2°C/min hasta -30°C por 4 h	2°C/min hasta -40°C por 8 h	2°C/min hasta -40°C por 12 h
2	2°C/min hasta -20°C por 4 h	2°C/min hasta -35°C por 8 h	2°C/min hasta -35°C por 12 h
3	2°C/min hasta -10°C por 4 h	2°C/min hasta -30°C por 8 h	2°C/min hasta -30°C por 12 h
4	2°C/min hasta 0°C por 4 h	2°C/min hasta -25°C por 8 h	2°C/min hasta -25°C por 12 h
5	2°C/min hasta 10°C por 4 h	2°C/min hasta -10°C por 8 h	2°C/min hasta -10°C por 12 h

### Análisis Quimiométrico

Para la obtención de los espectros infrarrojos se utilizó el equipo de ATR-FTIR. Una vez tomados todos los espectros, utilizando el software del equipo se aplicó inicialmente un tratamiento de suavizado, corrección de línea base y se normalizó por la banda de 1650  $\text{cm}^{-1}$  (Mondragón, 2020), utilizando el software Origin lab. Posteriormente, se procedió a sustraer el agua a los espectros. En el rango de huellas

dactilares se ven muchas diferencias, una oportunidad para visualizar estas diferencias es la espectroscopia. La sustracción de agua es una posibilidad de obtener más información sobre el contenido de la muestra de miel, para tal fin se tuvo en cuenta la nota de aplicación de SHIMADZU. (Shimadzu, 2006).

Se realizaron la primera y segunda derivada de estos. Después, que los espectros fueron tratados y se calcularon la primera y segunda derivada, estos datos se utilizaron para alimentar la matriz de datos y aplicación del método multivariado de PCA ( $\alpha = 0,05$ ), mediante el programa BioVinci 3.0.9, se realizó el análisis de conglomerados, utilizando MINITAB, con el fin de buscar relaciones entre la composición, las especies, sitios de muestreo y definir cuál es el mejor rango y tipo de tratamiento matemático para poderlas discriminarlas.

#### ***Preparación de los espectros en el programa OriginPro 2019***

1. Importar los archivos en extensión txt de las muestras seleccionadas que fueron tomadas de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$  para realizar el análisis junto con el archivo del espectro del agua destilada.

2. Para retirar el ruido de la gráfica se realiza un suavizado de 5 puntos, se hace suavizado a todos los espectros.

3. Luego del suavizado se hace corrección de la línea base, se resta a todos los espectros la línea base.

4. Se normalizan todos los datos con el pico de 1642,42242  $\text{cm}^{-1}$ , se toma este valor porque es el que coincide con la resta del agua.

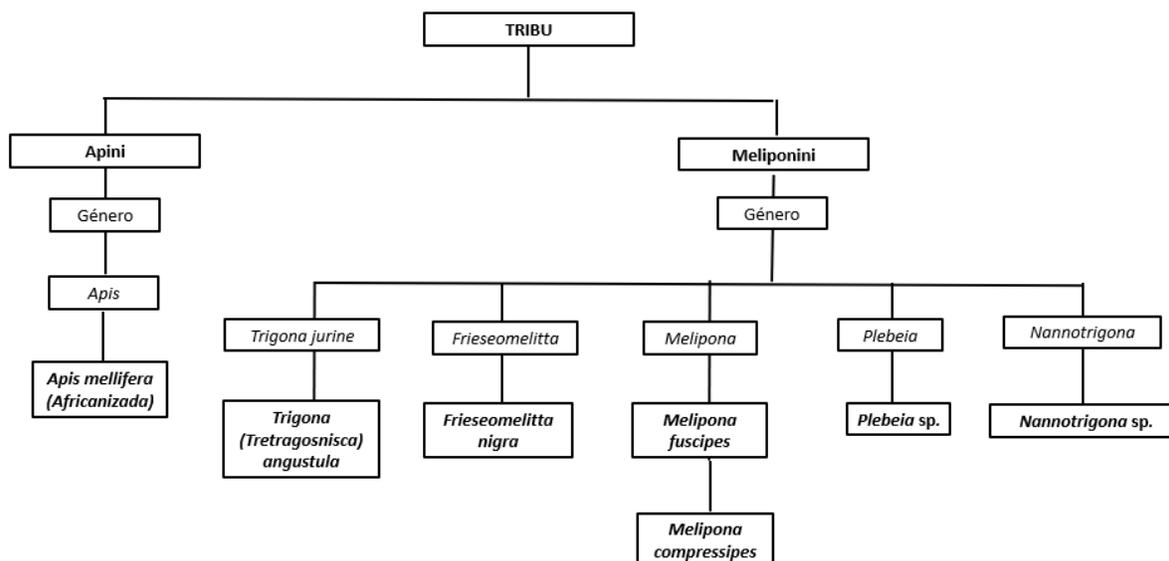
5. Se resta el valor del espectro del agua destilada.

## Resultados y Discusión

### Determinación del Perfil Químico por ATR-FTIR

Para este estudio las muestras de miel se recolectaron a una altura de 386 msnm en el municipio de Los Patios y 1026 msnm en el municipio de Bochalema. En la Figura 1 se muestra la taxonomía para estas especies.

**Figura 1** Taxonomía de especies estudiadas



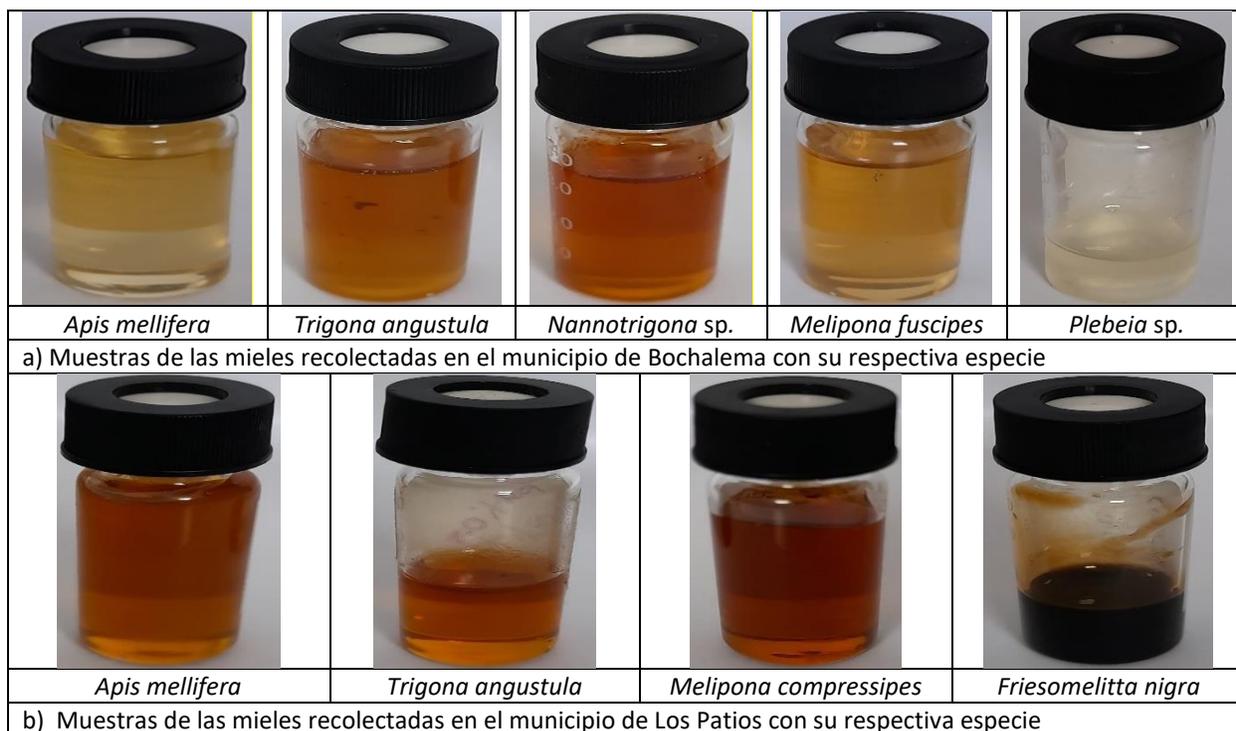
La composición y las propiedades de la miel dependen del origen botánico de la fuente de néctar y secreciones que las abejas introducen al néctar para convertirlo en miel (Bertelli, y otros, 2010). Con base en las muestras estudiadas, las mieles podrían diferenciarse según su color y asociarse con una especie de abeja de acuerdo con la región geográfica donde se tomaron las muestras, sin embargo, no es un criterio de discriminación de las mieles, ya que como se muestran en la Figura 2, las muestras de miel de especie *Apis mellifera* que se tomaron en dos municipios muestran un color que a pesar de ser de la misma especie corresponde a zonas geográficas diferentes. Determinar el origen de la miel no hace parte de los objetivos de este proyecto.

La tribu *Meliponini* pertenece al grupo de abejas corbiculadas de la subfamilia *Apinae* y agrupa

todas aquellas abejas conocidas como “abejas sin aguijón” encontradas en las áreas tropicales y subtropicales del mundo (Roubik 1989). Junto con las abejas de miel (*Apis mellifera*), son las únicas que poseen comportamiento altamente social (eusocialidad). (Nates-Parra, 2001).

En Colombia se reconocen 13 géneros y 10 subgéneros de *Meliponini* con aproximadamente 105 especies identificadas hasta ahora y conocidas con los nombres comunes: angelitas, perreras, candela, guare, y otros que varían según la región del país (Nates-Parra, 2001, Nates-Parra 1983, 1990; Parra 1984). Se han encontrado desde el nivel del mar hasta los 3400 m de altitud, notándose su preferencia por los bosques secos y húmedos tropicales y bosques muy húmedos premontanos (Nates-Parra, 2001, Nates-Parra 1985). Un porcentaje pequeño (6.9%) de abejas sin aguijón pertenece a la fauna de abejas altoandinas, representada por nueve especies que habitan por encima de los 2000 metros y llegan hasta los 3400 m (Nates-Parra, 2001, Nates-Parra & González 1998). El resto de las especies están distribuidas a menores alturas, con el máximo número de especies entre los 500 y 1500 metros sobre el nivel del mar. (Nates-Parra, 2001).

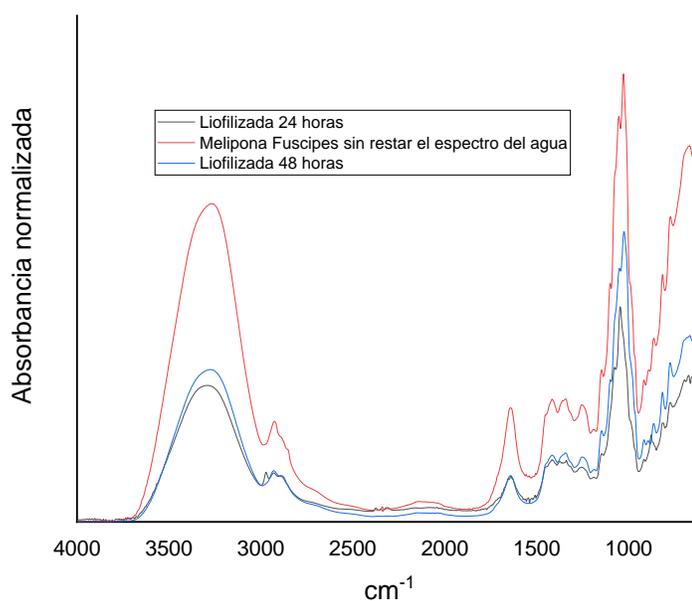
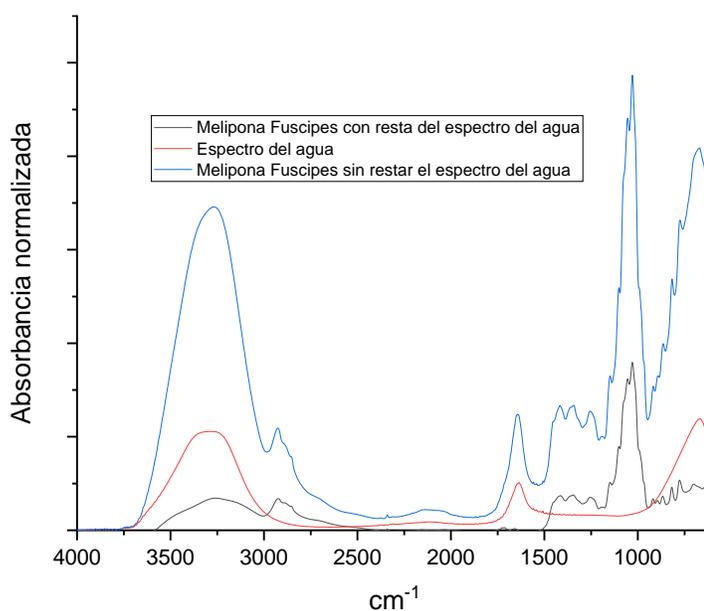
**Figura 2** Muestras de mieles recolectadas



### **Análisis de las muestras de mieles de los municipios de Bochalema y Los Patios por espectroscopia infrarroja**

#### **Análisis muestras de mieles liofilizadas**

Las mieles tienen un contenido de agua apreciable que puede interferir en el análisis infrarrojo, se liofilizaron muestras de todas las especies durante 24 y 48 horas sin observar cambios apreciables de sequedad. Posteriormente, se decidió diluirlas al 50% y realizar el secado en frío durante 72 horas, pero nuevamente no fue posible realizar la remoción del agua. En la Figura 3 se observan los espectros de mieles liofilizadas a 24 y 48 horas junto con el espectro de la miel de la especie *Melipona Fuscipes* a la cual no se le ha restado el agua. En la Figura 4 se tiene el espectro de la miel de la misma especie con el tratamiento de la sustracción del espectro del agua.

**Figura 3** Muestras de mieles liofilizadas**Figura 4** Resta del espectro de agua

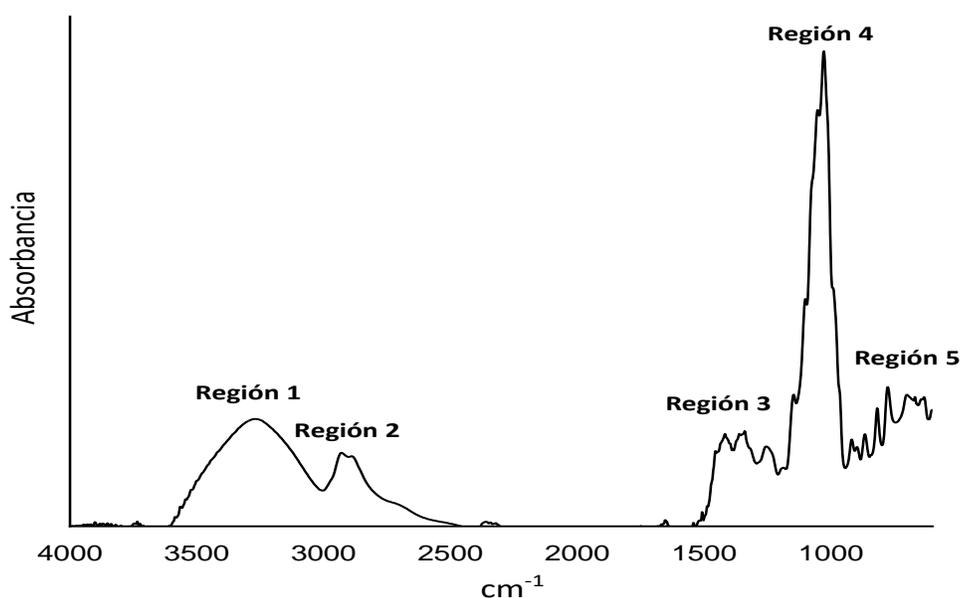
Teniendo en cuenta estos resultados se decidió utilizar la metodología de sustracción de espectros de acuerdo con Mondragón (2020). Este método consiste en extraer del espectro original de la muestra, la cual está formada por multi-componentes, el espectro de uno de los componentes individuales presentes en la muestra, y cuya señal a menudo puede obstruir bandas relacionadas con los otros componentes, el resultado de la sustracción es un espectro de FTIR sin la señal del componente

sustraído. En la investigación de alimentos uno de los componentes que con frecuencia se extrae del espectro de FTIR obtenido es el agua, de esta manera se obtiene un espectro construido solamente por los componentes restantes de la muestra, además, se tuvo en cuenta una nota de aplicación por parte de SHIMADZU donde se implementa esta metodología.

### Espectroscopia infrarroja

El potencial que presenta la técnica de espectroscopia FTIR en combinación con métodos estadísticos multivariados se utiliza para discriminar los tipos de mieles provenientes de diferentes especies y lugares. En el actual estudio, se utilizó espectroscopia ATR-FTIR para comparar muestras de mieles en función de sus diferencias espectrales ubicadas en la región de  $4000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ . En la Figura 5 se muestra un espectro ATR-FTIR representativo de las mieles estudiadas.

**Figura 5** Espectro ATR-FTIR representativo de la miel en la región espectral de  $4000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$



La Tabla 6 presenta las asignaciones de banda junto con los correspondientes modos de vibración en el espectro ATR-FTIR de la miel, con base en la literatura (Gallardo-Velázquez, T., Osorio-Revilla, G.,

Zuñiga-de Loa, M., & Rivera-Espinoza, Y., 2009; Kelly, Downey, & Fouratier, 2004; Movasaghi, Z., Rehman, S., & ur Rehman, D. I., 2008; Sivakesava & Irudayaraj, 2001; Subari, N., Saleh, J. M., Shakaff, A. Y. M., & Zakaria, A., 2012; (Tewari & Irudayaraj, 2004, 2005), Kędzierska-Matysek, 2018).

**Tabla 6** Asignación general de bandas del espectro ATR-FTIR de miel

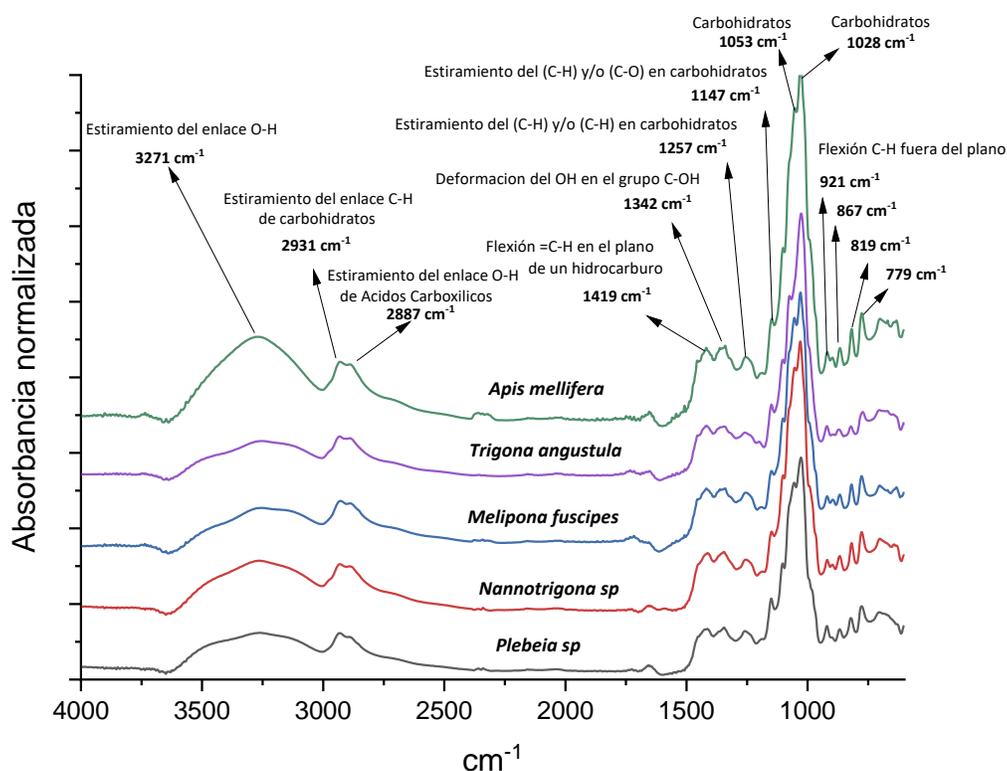
Región 1	4000–3000 $\text{cm}^{-1}$	- Estiramiento (O-H) de ácidos carboxílicos - Estiramiento C-H de aromáticos y C-C (Anjos O. , Campos, Ruiz, & Antunes, 2014) Kędzierska-Matysek , 2018)
Región 2	3000–2800 $\text{cm}^{-1}$	-Estiramiento C–H (carbohidratos) (Gallardo-Velázquez, T., Osorio-Revilla, G., Zuñiga-de Loa, M., & Rivera-Espinoza, Y., 2009) -Estiramiento O–H (ácidos carboxílicos) (Movasaghi, Z., Rehman, S., & ur Rehman, D. I., 2008) -Estiramiento de $\text{NH}_3$ (aminoácidos libres) (Gallardo-Velázquez, T., Osorio-Revilla, G., Zuñiga-de Loa, M., & Rivera-Espinoza, Y., 2009; Sivakesava & Irudayaraj, 2001, Kędzierska-Matysek, 2018)
Región 3	1540–1175 $\text{cm}^{-1}$	-Estiramiento/flexión O–H (Gallardo-Velázquez, T., Osorio-Revilla, G., Zuñiga-de Loa, M., & Rivera-Espinoza, Y., 2009; (Tewari & Irudayaraj, 2004) -Estiramiento C–O (carbohidratos) (Tewari & Irudayaraj, 2004), Kędzierska-Matysek , 2018) -Estiramiento C–H (carbohidratos) (Tewari & Irudayaraj, Floral classification of honey using midinfrared spectroscopy and surface acoustic wave based z-Nose sensor, 2005) -Estiramiento C=O de cetonas (Tewari & Irudayaraj, 2004) -Deformación O-H en el grupo C-OH (Kędzierska-Matysek, 2018) -Deformación C-H en alcanos (Kędzierska-Matysek, 2018)
Región 4	1175–940 $\text{cm}^{-1}$	-Estiramiento C–O y C–C (carbohidratos) (Subari, N., Saleh, J. M., Shakaff, A. Y. M., & Zakaria, A., 2012; Tewari & Irudayaraj, 2005 -Vibraciones anulares (principalmente de carbohidratos) (Gallardo-Velázquez, T., Osorio-Revilla, G., Zuñiga-de Loa, M., & Rivera-Espinoza, Y., 2009; (Tewari & Irudayaraj, 2004) -Estiramiento C-H en carbohidratos (Kędzierska-Matysek, 2018) -Estiramiento C-O en el grupo C-OH o deformación C-C en la estructura del carbohidrato (Kędzierska-Matysek , 2018)
Región 5	940–600 $\text{cm}^{-1}$	-Región anomérica de carbohidratos (Mathlouthi & Koenig, 1986; Subari, N., Saleh, J. M., Shakaff, A. Y. M., & Zakaria, A., 2012, Kędzierska-Matysek, 2018) -Flexión C–H (principalmente de carbohidratos) (Gallardo-Velázquez, T., Osorio-Revilla, G., Zuñiga-de Loa, M., & Rivera-Espinoza, Y., 2009; Kelly, J. D., Downey, G., & Fouratier, V., 2004; (Tewari & Irudayaraj, 2004) -Vibraciones anulares (principalmente de carbohidratos) (Tewari & Irudayaraj, 2004)

*Nota:* Las referencias relacionadas se indican entre paréntesis.

La espectroscopia infrarroja es una de las técnicas más utilizadas para la determinación de estructuras moleculares y la identificación de compuestos en muestras biológicas (Rana, R., Müller, G., Naumann, A., & Polle, A., 2008; Ona, T., Sonoda, T., Ito, K., Shibata, M., Ootake, Y., Ohshima, J., Yokota, S. & Yoshizawa, N., 1999). La energía absorbida de la radiación infrarroja da como resultado vibraciones de estiramiento y deformación de enlaces moleculares específicos, por ejemplo, C-H, O-H, N-H, C=O, etc., que son característicos de la composición química de la muestra en particular (Rana, R., Müller, G., Naumann, A., & Polle, A., 2008; Gunzler y Gremlich 2002). Como lo muestra Rana en su estudio de tejidos vegetales utilizando FTIR, los espectros de estas muestras representan una huella dactilar de los principales constituyentes orgánicos, como carbohidratos, proteínas, lípidos, ligninas y otros compuestos aromáticos. Para poder clasificar y comparar espectros son necesarios métodos estadísticos multivariados. El poder de la espectroscopia FTIR en combinación con métodos estadísticos multivariados ha sido demostrado en la literatura. (Rana, R., Müller, G., Naumann, A., & Polle, A., 2008).

Las mieles obtenidas en el municipio de Bochalema y que posteriormente fueron estudiados sus espectros la metodología aplicada de la resta del espectro de agua, mostraron picos prominentes en la región de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ . De acuerdo con la literatura publicada, la mayoría de estos picos representan los principales grupos funcionales y estructuras orgánicas presentes en muestras de mieles. Como se presenta en la Figura 6, un espectro ATR-FTIR de mieles de las especies *Plebeia* sp., *Nannotrigona* sp., *Melipona fuscipes* y *Trigona angustula* recolectadas en el municipio de Bochalema y en la Figura 7, un espectro FTIR-ATR de mieles de las especies *Melipona compressipes*, *Friesomelitta nigra*, *Trigona angustula*, recolectadas en el municipio de Los Patios y comparadas con muestras de *Apis mellifera*, ha mostrado algunos rasgos espectrales característicos (bandas de absorción) asignados a vibraciones de grupos funcionales. En la Tabla 7 y 8 se muestran las regiones y sus respectivas bandas.

**Figura 6** Espectros ATR-FTIR comparativos de todas las muestras de mieles - Bochalema. En la región espectral de 4000–600  $\text{cm}^{-1}$ .



A pesar de las similitudes en todos los espectros para las muestras de mieles estudiadas del municipio de Bochalema se observa para el caso de la especie *Apis mellifera* unos picos bastante marcados a lo largo del espectro y en especial en la región de los 1800 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , caso contrario ocurre con la especie *Trigona angustula*, correspondientes a la deformación del (C-H) y la región anomérica de carbohidratos, aspectos que reflejan cambios relativos en la composición química de la miel.

**Tabla 7** Ubicación máximos de bandas de absorción FTIR de las muestras de mieles - Bochalema

FTIR					Tipo y origen de la vibración
Posición de la banda $\text{cm}^{-1}$					
<i>Apis mellifera</i>	<i>Trigona angustula</i>	<i>Melipona fuscipes</i>	<i>Nannotrigona sp.</i>	<i>Plebeia sp.</i>	
3271	3267	3282	3273	3261	v (O-H) de ácidos carboxílicos v C-H de aromáticos y C-C
2931	2937	2929	2933	2935	v (C-H) y/o v $\text{NH}_3$ o aminoácidos libres
2887	2887	2883	2881	2891	

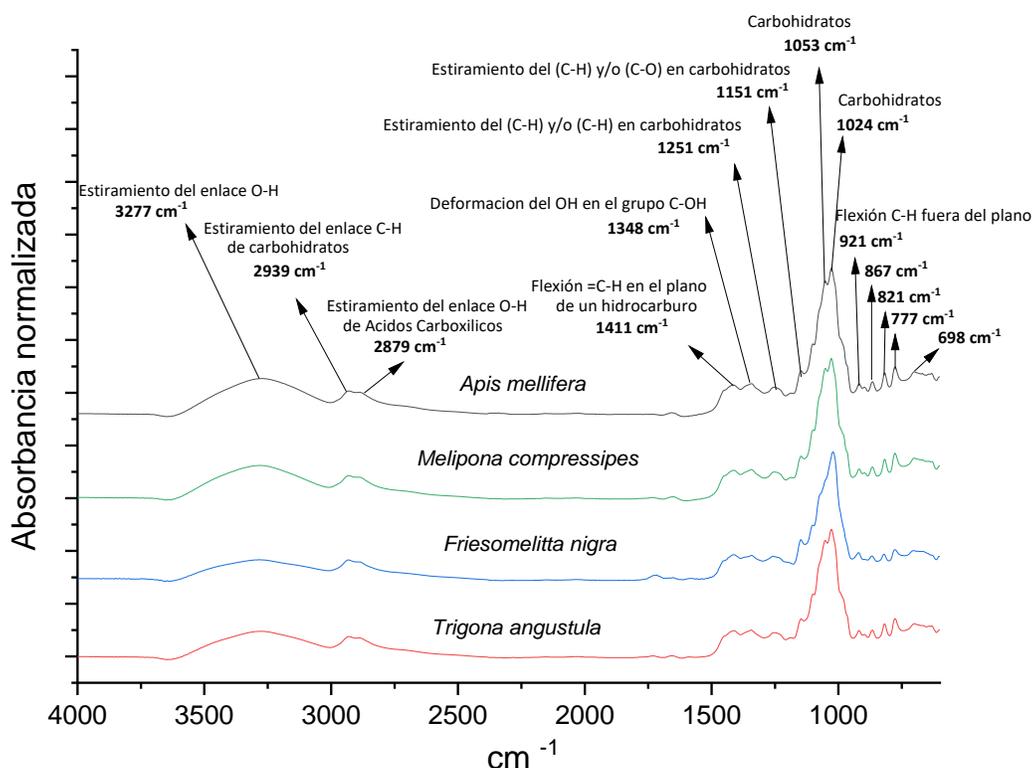
1419	1417	1417	1411	1415	$\delta$ (O-H) grupo C-OH $\delta$ (C-H) en alcanos
1342	1348	1342	1348	1344	$\delta$ (-OH) grupo C-OH
1257	1255	1257	1249	1257	v (C-H) en carbohidratos y/o v (C-O) en carbohidratos
1147	1151	1151	1145	1151	v (C-H) en carbohidratos y/o v (C-O) en carbohidratos
1053	1060	1055	1047	1049	v (C-O) en el grupo C-OH o v (C-C) en la estructura del carbohidrato
1028	1029	1031	1029	1026	
921	921	921	920	920	$\delta$ (C-H)
867	869	869	867	871	Región anomérica de carbohidratos o $\delta$ (C-H)
819	821	815	817	821	
779	775	777	779	771	

v – vibraciones de estiramiento,  $\delta$  – vibraciones de deformación

*Nota:* Ubicación de los máximos de las bandas de absorción FTIR (Gok, S., Severcan, M., Goormaghtigh, E., Kandemir, I., & Severcan, F., 2015, Anjos O., Campos, Ruiz, & Antunes, 2015, Ruoff, K., Luginbühl, W., Künzli, R., Iglesias, M. T., Bogdanov, S., Bosset, J. O., ... & Amadò, R., 2006; Sabri, N.F.M., See, H.H. (2016); Das, C., Chakraborty, S., Acharya, K., Bera, N. K., Chattopadhyay, D., Karmakar, A., & Chattopadhyay, S., 2017; Kędzierska-Matysek et. Al. 2018), de las muestras de mieles de *Apis mellifera*, *Trigona angustula*, *Melipona fuscipes*, *Nannotrigona* sp. y *Plebeia* sp. en el municipio de Bochalema, elaborados en términos de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ .

Las muestras de mieles estudiadas del municipio de Los Patios se observan para el caso de la especie *Friesomelitta nigra* en la región de los 1800 a 600  $\text{cm}^{-1}$  picos correspondientes a la deformación del (C-H) y la región anomérica de carbohidratos, relativos en la composición de la miel.

**Figura 7** Espectros ATR-FTIR comparativos de todas las muestras de mieles - Los Patios. En la región espectral de 4000–600  $\text{cm}^{-1}$



**Tabla 8** Ubicación máximos de bandas de absorción FTIR de las muestras de mieles - Los Patios

FTIR				Tipo y origen de la vibración
Posición de la banda $\text{cm}^{-1}$				
<i>Apis mellifera</i>	<i>Melipona compressipes</i>	<i>Friesomelitta nigra</i>	<i>Trigona angustula</i>	
3277	3300	3294	3278	v (O-H) de ácidos carboxílicos v C-H de aromáticos y C-C
2939	2939	2937	2933	v (C-H) y/o v $\text{NH}_3$ o aminoácidos libres
2879	2883	2887	2897	
1411	1413	1409	1415	$\delta$ (O-H) grupo C-OH $\delta$ (C-H) en alcanos
1348	1344	1342	1348	$\delta$ (-OH) grupo C-OH
1251	1259	1257	1255	v (C-H) en carbohidratos y/o v (C-O) en carbohidratos
1151	1151	1149	1149	v (C-H) en carbohidratos y/o v (C-O) en carbohidratos
1053	1055		1053	v (C-O) en el grupo C-OH o v (C-C) en la estructura del carbohidrato
1024	1024	1022	1029	
921	918	920	918	$\delta$ (C-H)

867	869	866	867	Región anomérica de carbohidratos o $\delta$ (C-H)
821	819	823	819	
777	775	783	775	
698	700	705	700	

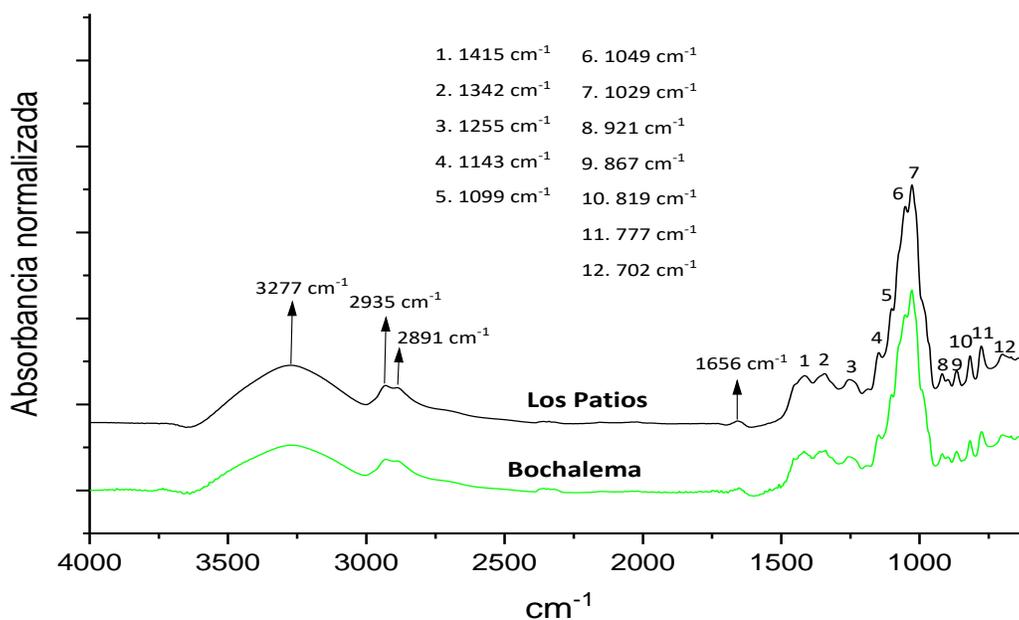
v – vibraciones de estiramiento,  $\delta$  – vibraciones de deformación

*Nota:* Ubicación de los máximos de las bandas de absorción FTIR (Gok, S., Severcan, M., Goormaghtigh, E., Kandemir, I., & Severcan, F., 2015; Anjos O., Campos, Ruiz, & Antunes, 2015; Ruoff, K., Luginbühl, W., Künzli, R., Iglesias, M. T., Bogdanov, S., Bosset, J. O., ... & Amadò, R., 2006; Sabri, N.F.M., See, H.H. (2016); Das, C., Chakraborty, S., Acharya, K., Bera, N. K., Chattopadhyay, D., Karmakar, A., & Chattopadhyay, S., 2017; Kędzierska-Matysek et. Al. 2018), de las muestras de mieles de *Apis mellifera*, *Melipona compressipes*, *Friesomelitta nigra* y *Trigona angustula* del municipio de Los Patios elaborados en términos de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ .

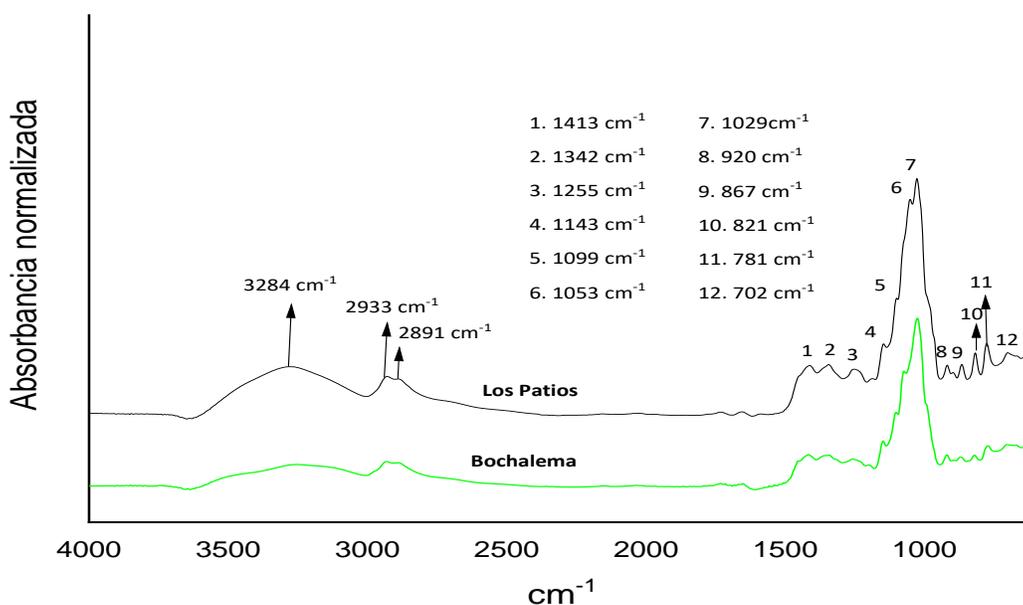
### Espectros comparativos entre mieles de la especie *Apis mellifera* y *Trigona angustula* recolectadas en los municipios de Los Patios y Bochalema

Se tomaron los espectros para las muestras de mieles de *Apis mellifera* y *Trigona angustula* de los municipios de Bochalema y Los Patios en la región espectral de 4000–600  $\text{cm}^{-1}$ , obteniendo las Figuras 8 y 9.

**Figura 8** Muestras de mieles de *Apis mellifera* de los municipios de Bochalema y Los Patios, en la región espectral de 4000–600  $\text{cm}^{-1}$



**Figura 9** Muestras de mieles de *Trigona angustula* de los municipios de Bochalema y Los Patios, en la región espectral de 4000-600  $\text{cm}^{-1}$



Las muestras de mieles estudiadas del municipio de Bochalema y Los Patios se observan en la región de los 1800 a 600  $\text{cm}^{-1}$  espectros correspondientes a la deformación del (O-H), en el grupo C-OH, estiramiento del enlace (C-H) en carbohidratos y/o estiramiento del enlace en (C-O) también en carbohidratos y la región anomérica de carbohidratos, relativos en la composición de la miel.

En la tabla 9, se muestran los picos representativos de las muestras de mieles de las especies *Apis mellifera* y *trigona angustula*, de los municipios de Los Patios y Bochalema, donde se pueden observar las principales vibraciones de enlaces y su relación con compuestos orgánicos, además denota que no existen mayores diferentes entre especies de la misma región geográfica, sin embargo se muestran variaciones en cuanto a la región donde se toma la muestra de miel.

**Tabla 9** Ubicación máximos de bandas de absorción FTIR - *Apis mellifera* y *Trigona angustula*

FTIR				Tipo y origen de la vibración
Posición de la banda $\text{cm}^{-1}$				
<i>Apis mellifera</i>		<i>Trigona angustula</i>		
Los Patios	Bochalema	Los Patios	Bochalema	
3271	3277	3284	3263	v (O-H) de ácidos carboxílicos v C-H de aromáticos y C-C

2939	2935	2933	2937	v (C-H) y/o v NH <sub>3</sub> o aminoácidos libres
2889	2891	2891	2883	
1411	1415	1413	1421	δ (O-H), grupo C-OH δ(C-H) en alcanos
1338	1342	1342	1346	δ (-OH) grupo C-OH
1257	1255	1255	1255	v (C-H) en carbohidratos y/o v (C-O) en carbohidratos
1151	1143	1143	1145	v (C-H) en carbohidratos y/o v (C-O) en carbohidratos
1091	1099	1099	1091	v (C-O) en el grupo C-O-C
1043	1049	1053	1076	v (C-O) en el grupo C-OH o v (C-C) en la estructura del carbohidrato
1028	1029	1029	1028	
918	921	920	925	δ (C-H)
862	867	867	867	Región anomérica de carbohidratos o δ (C-H)
819	819	821	815	
773	777	781	700	
704	702	702		

v – vibraciones de estiramiento, δ – vibraciones de deformación

*Nota:* Ubicación de los máximos de las bandas de absorción FTIR (Kędzierska-Matysek et. Al. 2018), de las muestras de mieles de *Apis mellifera* y *Trigona angustula* elaborados en términos de 4000 espectrales 600 cm<sup>-1</sup>.

#### La región de 4000-2500 cm<sup>-1</sup>

Una banda con un máximo de absorción entre 3282 y un mínimo de 3261 cm<sup>-1</sup> en las muestras de las especies del municipio de Bochalema (*Apis mellifera*, *Trigona angustula*, *Melipona fuscipes*, *Nannotrigona* sp. y *Plebeia* sp.) y un máximo de absorción entre 3300 y un mínimo de 3278 cm<sup>-1</sup> en las muestras de las especies del municipio de Los Patios (*Apis mellifera*, *Melipona compressipes*, *Friesomelitta nigra* y *Trigona angustula*). Dada la alta proporción de componentes basados en proteínas en la miel de la abeja *Apis mellifera*, lo más probable es que esta banda de absorción se superponga con las vibraciones de estiramiento de N-H (amina A) de las proteínas que normalmente absorben en el rango espectral de 3500 a 3300 cm<sup>-1</sup> (Sócrates, 2001; Kong y Yu, 2007; Horvatinec y Svečnjak, 2020).

Esta es la misma área que la región de vibración de estiramiento para los grupos C-H aromáticos y de carbono (Kędzierska-Matysek et. Al. 2018; Svečnjak, L., Prđun, S., Rogina, J., Bubalo, D., & Jerković, I., 2017). Por lo tanto, los ácidos carboxílicos se caracterizan por un carácter irregular de absorción en 3300-2500 cm<sup>-1</sup> con un amplio rango de la banda de vibración de estiramiento O-H para C-H (Kędzierska-

Matysek et. al. 2018; Gok, S., Severcan, M., Goormaghtigh, E., Kandemir, I., & Severcan, F., 2015). Los fuertes enlaces de hidrógeno presentes en los ácidos carboxílicos diméricos son la razón de la extensión significativa de la vibración de estiramiento de la banda del grupo OH (Svečnjak, L., Prđun, S., Rogina, J., Bubalo, D., & Jerković, I., 2017).

Las vibraciones en el intervalo de  $2931\text{ cm}^{-1}$  corresponden al estiramiento C-H de los grupos metilo y metileno de proteínas y lípidos. (Horvatinec y Svečnjak, 2020). Según Anios et.al. (2015) también corresponde al estiramiento C-H de los ácidos carboxílicos y a la banda de estiramiento  $\text{NH}_3$  de los aminoácidos libres.

Las vibraciones alrededor de  $2887\text{ cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento O-H en los ácidos carboxílicos, es muy amplia y ocurre en el campo de  $3300 - 2500\text{ cm}^{-1}$  (Kędzińska-Matysek et. Al. 2018; Gan, Z., Yang, Y., Li, J., Wen, X., Zhu, M., Jiang, Y., & Ni, Y., 2016; Mellado-Mojica, 2016) con el máximo en  $3000\text{ cm}^{-1}$ .

### **La región de huella digital ( $1800\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ )**

La región espectral seleccionada para este estudio fue la región entre  $1800$  y  $600\text{ cm}^{-1}$  y corresponde a la absorción del azúcar mayoritario en la miel, es la región utilizada para desarrollar los modelos de calibración correspondientes para cada uno de los azúcares presentes en la miel.

La región entre  $1500$  y  $600\text{ cm}^{-1}$ , es conocida como la región de huella dactilar, ya que contiene series complicadas de absorciones que proporcionan patrones espectrales únicos, está poblada por una serie de bandas de absorción relacionadas con componentes proteicos y fosfolípidos, así como con absorciones de azúcares superpuestas (Horvatinec y Svečnjak, 2020). La región de absorción más sensible de los componentes principales de la miel, particularmente la región más adecuada para cuantificar el azúcar de la miel (59-75%) y ácidos orgánicos, el aporte de sacarosa, glucosa, fructosa, presentan bandas características en la región entre  $1500$  y  $900\text{ cm}^{-1}$

La región espectral entre  $1470$  y  $1280\text{ cm}^{-1}$  se caracteriza por una serie de señales anchas y débiles

en 1459 y 1407  $\text{cm}^{-1}$  debido a la flexión del  $\text{CH}_2$  y al estiramiento asimétrico  $\text{C}=\text{O}$  ( $\text{COO}^-$ ), y en 1337 debido a la deformación C-H vibración que se superpone con estiramientos C-N (amida III). (Horvatinec y Svečnjak, 2020; Socrates, 2001; Chen, 1985).

La banda C-H puede aparecer en 1320-1210  $\text{cm}^{-1}$ , y la banda de deformación del grupo O-H aprox. en 1440-1395  $\text{cm}^{-1}$  y 950-910  $\text{cm}^{-1}$  (Kędzierska-Matysek et. al. 2018; Li, S., Zhang, X., Shan, Y., Su, D., Ma, Q., Wen, R., & Li, J., 2017). Sin embargo, la banda por debajo de 1440-1395  $\text{cm}^{-1}$  no se puede distinguir de las bandas de flexión C-H, que también se encuentran en la misma región de frecuencia. (Kędzierska-Matysek et. al. 2018)

La banda de aproximadamente 1500-750  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a la región de absorción más sensible de los principales componentes de la miel, particularmente la región más adecuada para cuantificar el azúcar de la miel (alrededor del 60-75%) y los ácidos orgánicos. fructosa, muestran bandas características en la región entre 1500 y 900  $\text{cm}^{-1}$ . (Kędzierska-Matysek et. al. 2018)

La banda de aproximadamente 1500 a 750  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a la región de absorción más sensible de los componentes principales de la miel, particularmente la región más adecuada para cuantificar el azúcar de la miel (59-75%) y los ácidos orgánicos. El aporte de sacarosa, glucosa, fructosa, presentan bandas características en la región entre 1500 y 900  $\text{cm}^{-1}$ . (Anjos O. , Campos, Ruiz, & Antunes, 2014)

Las vibraciones con un ancho de banda máximo de alrededor de 1450  $\text{cm}^{-1}$ , 1418 y 1347  $\text{cm}^{-1}$  son características de la vibración de flexión de O-CH y C-C-H en la estructura del carbohidrato o la vibración de flexión proveniente de OH en el grupo C-OH. (Kędzierska-Matysek et. Al. 2018). El rango de banda de 1250 a 1140  $\text{cm}^{-1}$  es, a su vez, una vibración característica para la vibración de estiramiento del C-H en los carbohidratos o la vibración de estiramiento del C-O en los carbohidratos, las vibraciones con el máximo en aproximadamente 1100 y 1080  $\text{cm}^{-1}$  constituyen una banda que puede originarse en la vibración de C-O en el grupo C-O-C. (Kędzierska-Matysek et. Al. 2018). Entonces, el área de las bandas que se extienden desde 1050 a 970  $\text{cm}^{-1}$  de las vibraciones de estiramiento C-O se puede asignar al grupo C-OH o al

estiramiento en la estructura de carbohidratos de C-C y las bandas con el máximo en aproximadamente  $920\text{ cm}^{-1}$  son bandas de vibraciones de flexión del grupo C-H. (Kędzierska-Matysek et. Al. 2018).

En las muestras de las especies del municipio de Bochalema (*Apis mellifera*, *Trigona angustula*, *Melipona fuscipes*, *Nannotrigona* sp. y *Plebeia* sp.) y las muestras de las especies del municipio de los Patios (*Apis mellifera*, *Melipona compressipes*, *Friesomelitta nigra* y *Trigona angustula*) se obtuvieron en esta región del infrarrojo picos con máximos de absorción entre  $1053$ ,  $1028$  y  $1024\text{ cm}^{-1}$  que pueden estar asociados con carbohidratos (fructosa, glucosa y maltosa). Según Mondragón (2020) el pico más intenso ubicado aproximadamente a  $1024\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración de estiramiento del enlace C-O en el grupo C-OH y al estiramiento del enlace C-C en la estructura de los carbohidratos mayoritarios (fructosa y glucosa), con diferencias en la posición de sus picos más intensos: fructosa ( $1054\text{ cm}^{-1}$ ), glucosa ( $1028\text{ cm}^{-1}$ ), maltosa ( $1024\text{ cm}^{-1}$ ) y sacarosa ( $991\text{ cm}^{-1}$ ).

La fructosa es el azúcar esencial en la miel con un valor promedio de 36% que varía de 30% a 50% en muestras típicas. La glucosa es el segundo monosacárido más representativo de la miel y varía del 16% al 34% con un valor medio del 25%. (Kędzierska-Matysek et. Al. 2018).

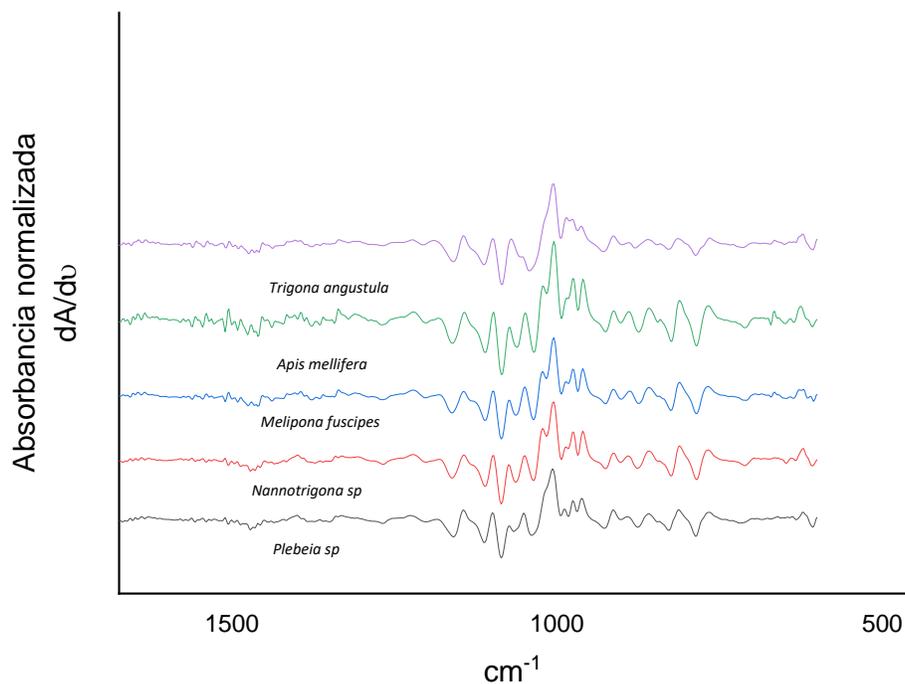
Otra región espectral importante ubicada en  $900\text{-}750\text{ cm}^{-1}$  es característica de la configuración del sacárido. Los autores en muchas publicaciones definen estos picos espectrales como importantes para la caracterización de los azúcares debido a que es la región anomérica de los carbohidratos, lo que produce la vibración o deformación del enlace C-H (Kędzierska-Matysek et. Al. 2018).

### **Primera derivada en las muestras de mieles del municipio de Bochalema y Los Patios**

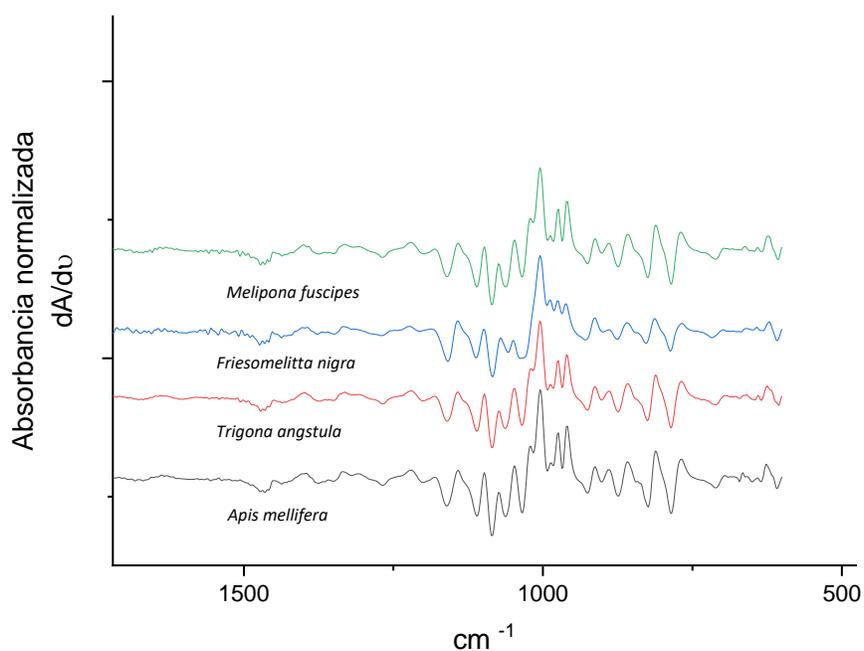
Según Mondragón (2020) este método se utiliza para mejorar la resolución de bandas obtenidas en un espectro de FTIR, primera derivada provoca en una banda un incremento mejorando su observación. En las Figuras 10 y 11 se observan las primeras derivadas de las muestras de las especies del municipio de Bochalema (*Apis mellifera*, *Trigona angustula*, *Melipona fuscipes*, *Nannotrigona* sp. y *Plebeia* sp.) y las muestras de las especies del municipio de Los Patios (*Apis mellifera*, *Melipona compressipes*,

*Friesomelitta nigra* y *Trigona angustula*), en la región de  $1800$  a  $600\text{ cm}^{-1}$  lo que permite evidenciar rasgos distintivos en los espectros de estas mieles.

**Figura 10** PRIMERA DERIVADA. Espectros ATR-FTIR comparativos de todas las muestras de mieles del municipio de Bochalema, en la región espectral de  $1800$ - $600\text{ cm}^{-1}$



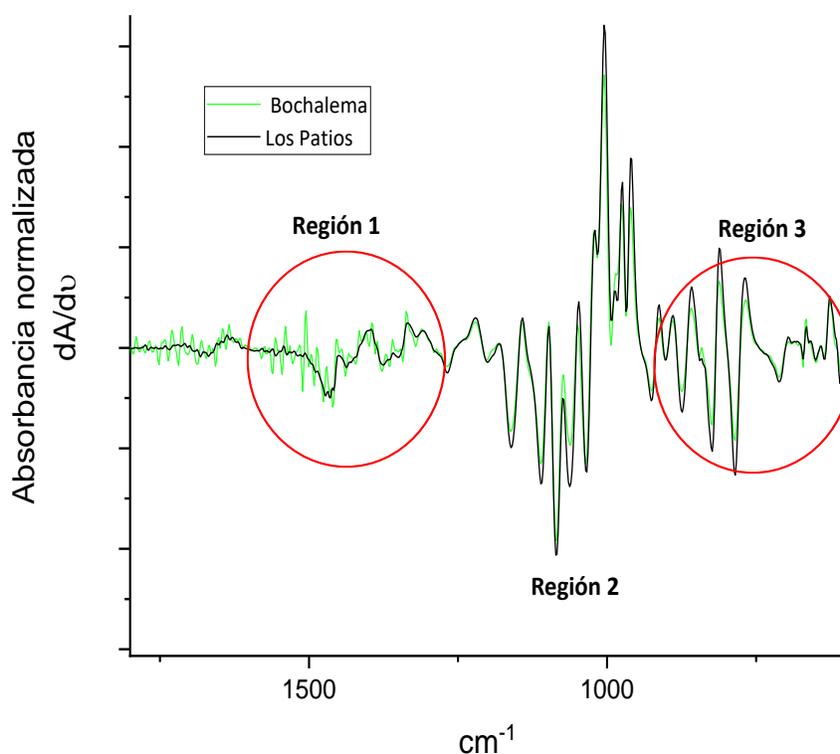
**Figura 11** PRIMERA DERIVADA. Espectros ATR-FTIR comparativos de todas las muestras de mieles del municipio de Los Patios, en la región espectral de  $1800$ - $600\text{ cm}^{-1}$



Con base en los espectros obtenidos para la región de 1800 a 600  $\text{cm}^{-1}$  se identificó y demarcó lo que se denominó Regiones como aquellas zonas del espectro donde se observa mayor absorbancia y unos picos característicos para las especies de miel estudiadas que permiten a su vez diferenciarlas respecto a las diferentes interacciones de los grupos funcionales.

Los resultados obtenidos en la primera derivada, la Figura 12 permite observar espectros diferentes entre ambas especies de manera muy general.

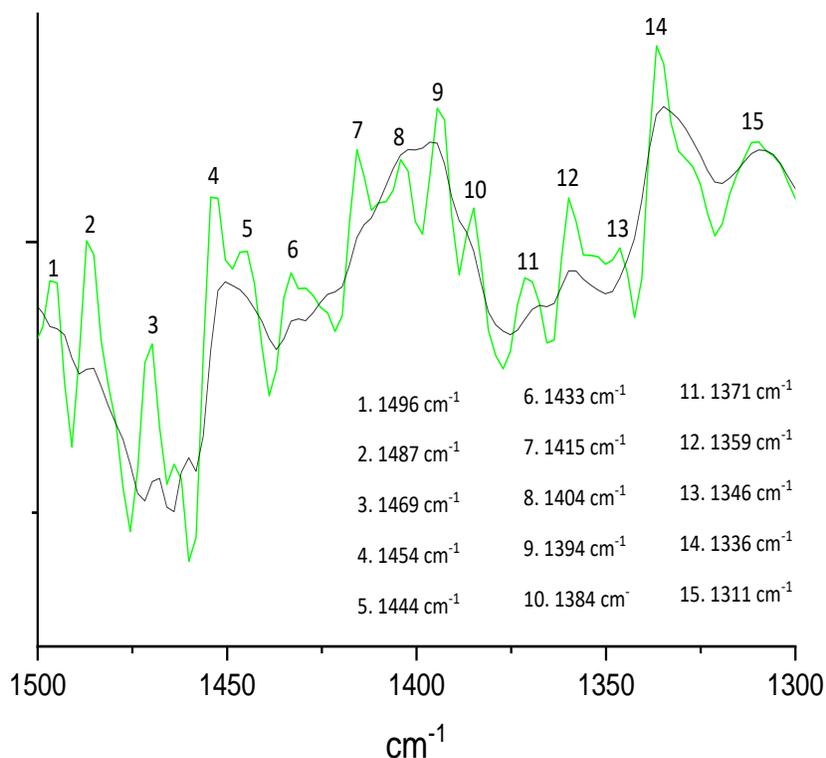
**Figura 12** Comparativo de PRIMERA DERIVADA entre mieles de *Apis mellifera* de los municipios de Bochalema y Los Patios en la región espectral de 1800-600  $\text{cm}^{-1}$



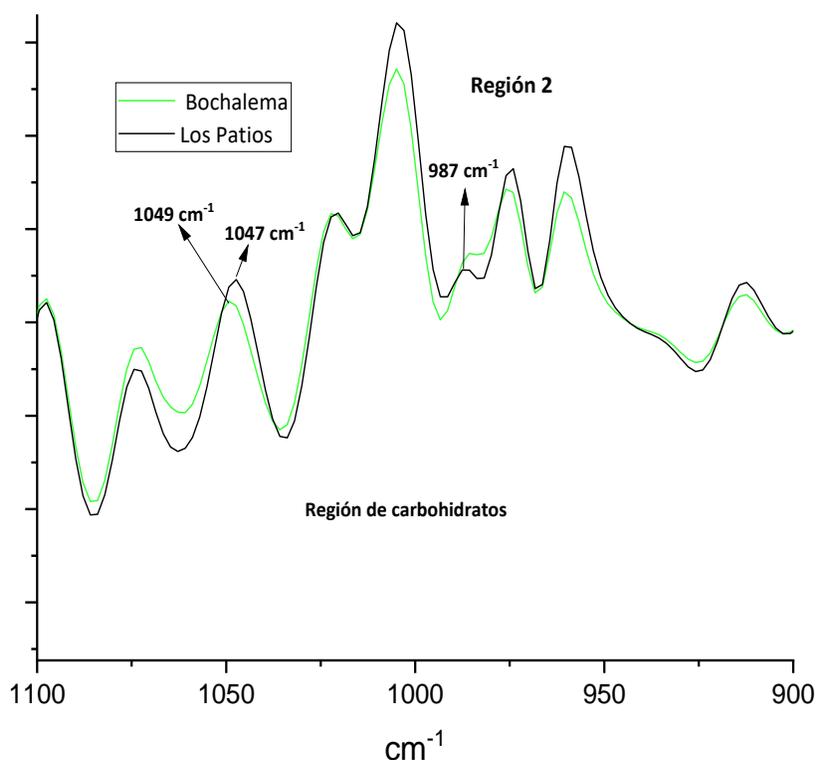
En la Figura 13 denominada Región 1 se pudo observar en los espectros de las mieles de *Apis mellifera* del municipio de Bochalema y Los Patios, una gran variedad de picos desde 1500 a 1300  $\text{cm}^{-1}$ , específicos para la especie del municipio de Bochalema que la diferencian de esta especie de la del municipio de Los Patios.

**Figura 13** *Apis mellifera* de los municipios de Bochalema y Los Patios en la región espectral de 1500 a 1300

cm<sup>-1</sup>



En la Figura 14 denominada Región 2 o de carbohidratos comprendida entre 1100 y 900 cm<sup>-1</sup> se evidenció un solapamiento del pico de la miel de *Apis mellifera* del municipio de Bochalema con un espectro a 1049 cm<sup>-1</sup> y 1047 cm<sup>-1</sup> para la miel de *Apis mellifera* del municipio de Los Patios. Es probable que las absorciones de trehalosa que ocurren a 1146 y 1050 cm<sup>-1</sup> representen efectos superpuestos similares. (Horvatinec y Svečnjak 2020; Kuroiwa, T., Kimura, K., Aoki, Y., Neves, M. A., Sato, S., Mukataka, S., Kanazawa, A., Ichikawa, S., 2015). En 987 cm<sup>-1</sup> se encontró un solapamiento por parte de la miel de la especie *Apis mellifera* del municipio de Bochalema. Esta región espectral también se caracteriza por efectos superpuestos con señales de azúcar que ocurren a 1087 cm<sup>-1</sup> (glucosa y fructosa), 983 cm<sup>-1</sup> y 965 cm<sup>-1</sup> (fructosa) debido a vibraciones de estiramiento C-O (Horvatinec y Svečnjak 2020; Max y Chapados, 2007).

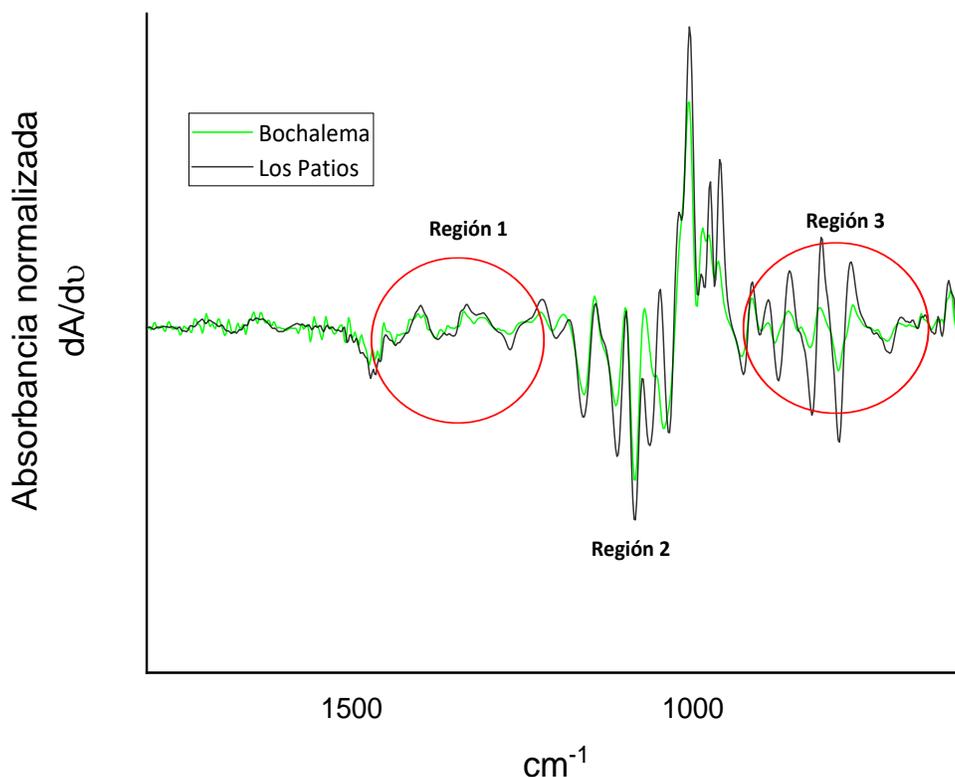
**Figura 14** *Apis mellifera* de los municipios de Bochalema y Los Patios en la región espectral de 1100 a 900cm<sup>-1</sup>

En la Región 3 comprendida entre 950 y 600 cm<sup>-1</sup> se evidencia un solapamiento del pico de la *Apis mellifera* del municipio de Los Patios en 840 cm<sup>-1</sup>. La última región que es muy distintiva en la evaluación y descripción de la miel es la banda de 890 a 810 cm<sup>-1</sup> característica de la región anomérica vibratoria de los carbohidratos o deformación C-H. Kędzińska-Matysek et. al. (2018).

**Tabla 10** Rasgos espectrales característicos de las mieles de *Apis mellifera* - Bochalema y Los Patios.

Posición de la banda cm <sup>-1</sup>	Tipo y origen de la vibración	Referencia
1146 y 1050 cm <sup>-1</sup> (absorciones de trehalosa)	Representan efectos superpuestos	Horvatinec y Svečnjak 2020 Kuroiwa, T., Kimura, K., Aoki, Y., Neves, M. A., Sato, S., Mukataka, S., Kanazawa, A., Ichikawa, S., 2015).
1087 cm <sup>-1</sup> (glucosa y fructosa) 983 cm <sup>-1</sup> y 965 cm <sup>-1</sup> (fructosa)	Representen efectos superpuestos debido a vibraciones de estiramiento C-O	Horvatinec y Svečnjak 2020 Max and Chapados, 2007
890 a 810 cm <sup>-1</sup>	Región anomérica vibratoria de los carbohidratos o deformación C-H.	Kędzińska-Matysek et. al. 2018

**Figura 15** Comparativo de PRIMERA DERIVADA entre mieles de *Trigona angustula* de los municipios de Bochalema y Los Patios en la región espectral de 1800-600  $\text{cm}^{-1}$



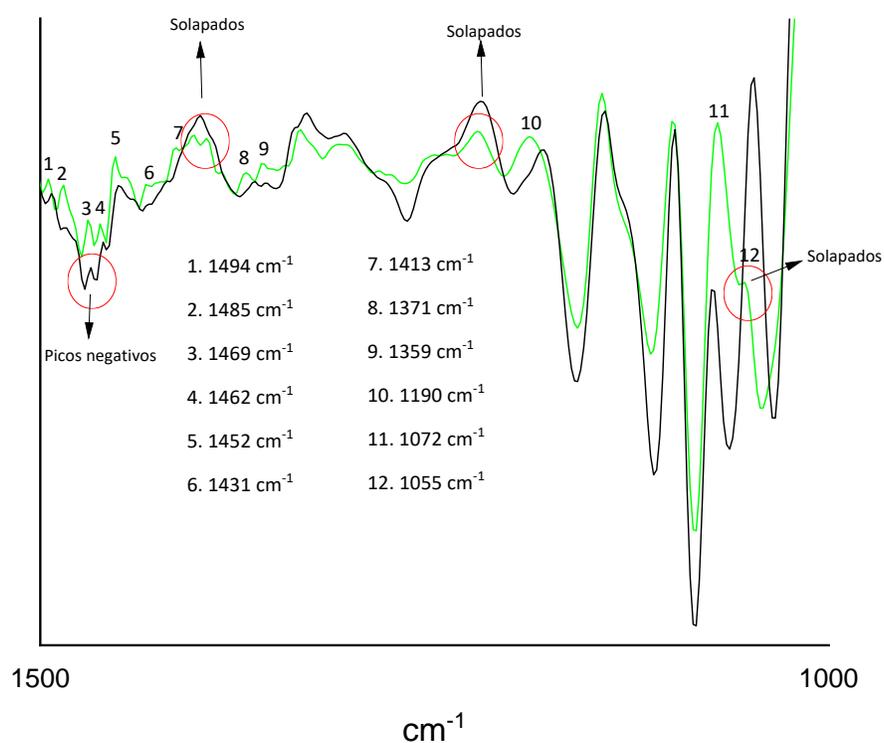
Los resultados obtenidos en la primera derivada, la Figura 15 permite observar espectros diferentes entre ambas especies de manera muy general. En la Figura 16 denominada Región 1 se pudo observar en los espectros de las mieles de *Trigona angustula* del municipio de Bochalema y Los Patios, una gran variedad de picos y solapamientos que no se pueden observar sin realizar la primera derivada, esta región comprende desde 1500 a 1000  $\text{cm}^{-1}$ , específicos para cada especie en diferentes regiones del espectro.

Para la especie *Trigona angustula* del municipio de Bochalema encontramos dos picos a 1494 y 1485  $\text{cm}^{-1}$ , 1469  $\text{cm}^{-1}$ , 1462  $\text{cm}^{-1}$ , 1431  $\text{cm}^{-1}$ , 1413  $\text{cm}^{-1}$ , 1371  $\text{cm}^{-1}$ , 1190  $\text{cm}^{-1}$ , tres picos solapados en 1404  $\text{cm}^{-1}$ , 1394  $\text{cm}^{-1}$  y 1222  $\text{cm}^{-1}$ , un pico bastante marcado en 1072  $\text{cm}^{-1}$  y otro solapado en 1055  $\text{cm}^{-1}$

Para la especie *Trigona angustula* del municipio de Los Patios se observan dos picos negativos en 1471 y 1463  $\text{cm}^{-1}$ , un pico en 1398 y otro bastante marcado en 1049  $\text{cm}^{-1}$ .

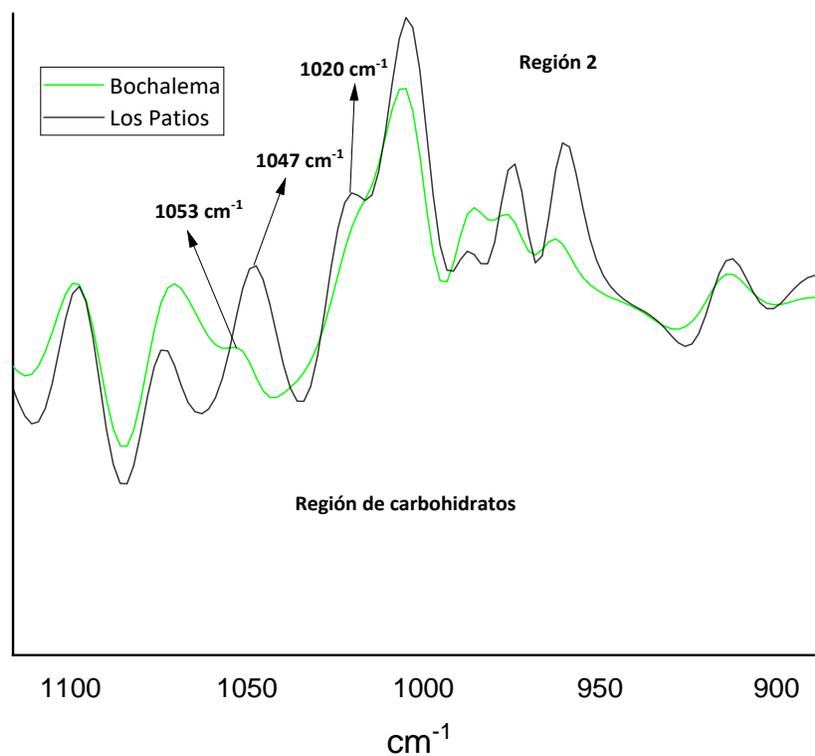
Bandas por debajo de  $1440\text{-}1395\text{ cm}^{-1}$  no se puede distinguir de las bandas de flexión del C-H, que también se encuentran en la misma región de frecuencia. En general, se observa flexión del enlace O–H en  $1440\text{-}1395\text{ cm}^{-1}$ . (Kędzińska-Matysek et. al. 2018). Según Mondragón (2020) corresponde a la glucosa una banda de  $1073\text{ cm}^{-1}$  para los enlaces C-O y C-C, estiramiento, C-O-H, flexión y para la fructosa una banda  $1054\text{ cm}^{-1}$  C-O, para los enlaces flexión, C-O-H, estiramiento.

**Figura 16** *Trigona angustula* de los municipios de Bochalema y Los Patios en la región espectral de  $1500$  a  $1000\text{ cm}^{-1}$



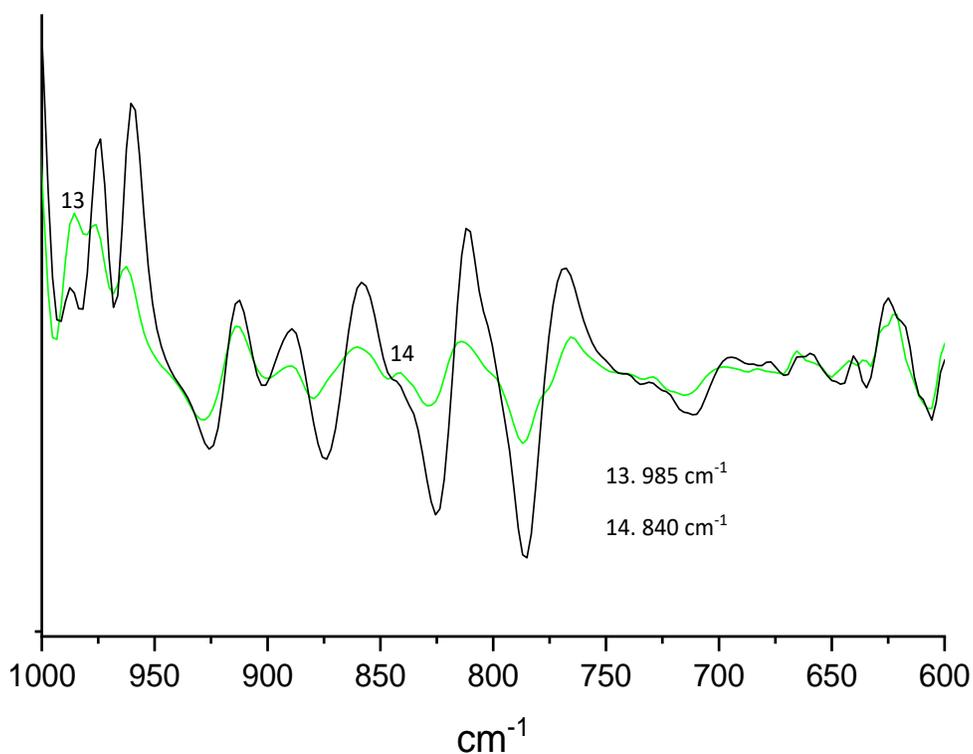
En la Figura 17 denominada Región 2 o de carbohidratos comprendida entre  $1100$  y  $900\text{ cm}^{-1}$  se evidenció un pico solapado en  $1053\text{ cm}^{-1}$  de la especie *Trigona angustula* del municipio de Bochalema y un pico característico a  $1047\text{ cm}^{-1}$  *Trigona angustula* del municipio de Los Patios.

**Figura 17** *Trigona angustula* de los municipios de Bochalema y Los Patios en la región espectral de 1100 a 900  $\text{cm}^{-1}$



En la Figura 18 correspondiente a la región 3 comprendida entre 1000 y 600  $\text{cm}^{-1}$  se evidencian picos bastante marcados de la especie *Trigona angustula* del municipio de Los Patios y un pico en 985  $\text{cm}^{-1}$  de la especie del municipio de Bochalema.

**Figura 18** *Trigona angustula* de los municipios de Bochalema y Los Patios en la región espectral de 1000 a 600  $\text{cm}^{-1}$



Según la literatura el pico ubicado alrededor de 1410  $\text{cm}^{-1}$  se presenta por una combinación de flexión del enlace O-H del grupo C-OH y flexión de la unión C-H de los alquenos. El pico observado a 1320  $\text{cm}^{-1}$  al movimiento de flexión asociado con el enlace O-H del grupo COH. (Mondragón, 2020).

La región espectral entre 1470 y 1280  $\text{cm}^{-1}$  se caracteriza por una serie de señales anchas y débiles en 1459 y 1407  $\text{cm}^{-1}$  debido a la flexión del  $\text{CH}_2$  y al estiramiento asimétrico C=O (COO-), y en 1337 debido a la deformación C-H vibración que se superpone con estiramientos C-N (amida III). (Horvatinec y Svečnjak 2020).

Según Kędzierska-Matysek et. al. (2018) las vibraciones con un ancho de banda máximo de alrededor de 1450  $\text{cm}^{-1}$ , 1418  $\text{cm}^{-1}$  y 1347  $\text{cm}^{-1}$  son características de la vibración de flexión de O-CH y C-C-H en la estructura del carbohidrato o la vibración de flexión proveniente de OH en el grupo C-OH.

Según Formosa (2020) los picos dentro de la región de la huella digital (1500-700  $\text{cm}^{-1}$ ) se

atribuyen a varios modos de vibración de carbohidratos y cetonas. El rango de banda de 1250 a 1140  $\text{cm}^{-1}$  es, a su vez, una vibración característica para la vibración de estiramiento del C-H en los carbohidratos o la vibración de estiramiento del C-O en los carbohidratos, las vibraciones con el máximo en aproximadamente 1100 y 1080  $\text{cm}^{-1}$  constituyen una banda que puede originarse en la vibración de C-O en el grupo C-O-C. Kędzierska-Matysek et. al. 2018).

Según Kędzierska-Matysek et. al. (2018) el área de las bandas que se extienden desde 1050 a 970  $\text{cm}^{-1}$  de las vibraciones de estiramiento C-O se puede asignar al grupo C-OH o al estiramiento en la estructura de carbohidratos de C-C. Las bandas con el máximo en aproximadamente 920  $\text{cm}^{-1}$  son bandas de vibraciones de flexión del grupo C-H. La última región que es muy distintiva en la evaluación y descripción de la miel es la banda de 890 a 810  $\text{cm}^{-1}$  característica de la región anomérica vibratoria de los carbohidratos o deformación C-H.

### **Segunda derivada en las muestras de mieles de los municipios de Bochalema y Los Patios**

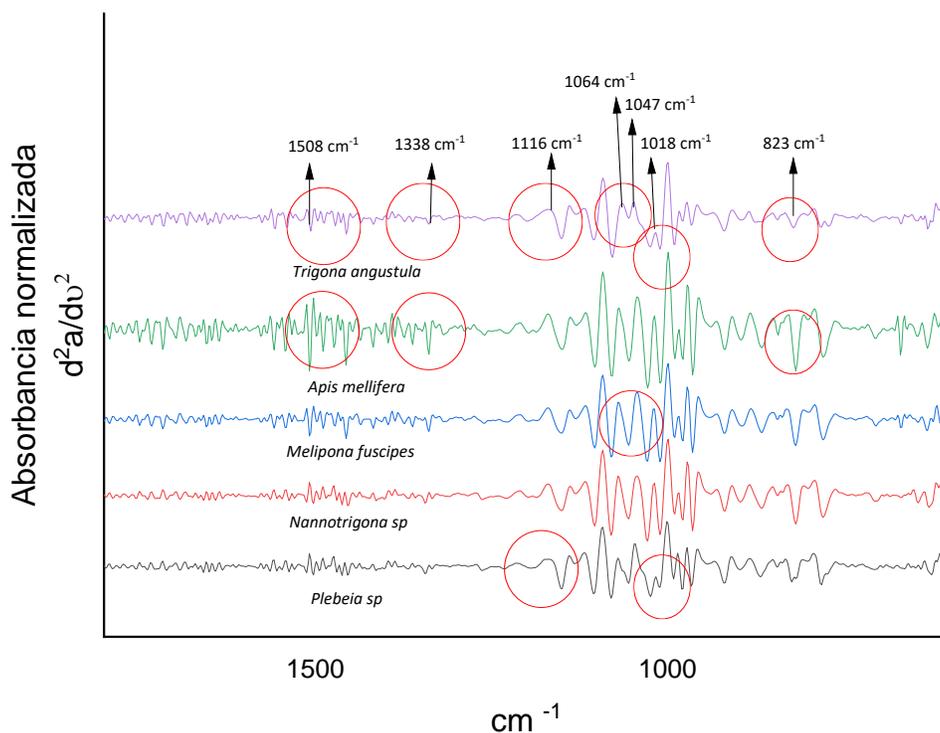
Según Mondragón (2020) la segunda derivada origina, para cada banda u hombro en el espectro de FTIR, bandas negativas, lo que mejora su resolución, la ventaja del ajuste por derivadas se puede apreciar de mejor manera en espectros complejos de FTIR en donde se dificulta su interpretación cualitativa o cuantitativa.

La segunda derivada es una operación matemática la cual constituye uno de los pretratamientos más utilizados en espectroscopia para minimizar desviaciones de línea base causados por efectos de dispersión y para resaltar de manera más importante las diferencias entre cada espectro experimental. En espectroscopia FTIR se utiliza para disminuir los problemas más característicos como el traslape de bandas y variaciones de línea de base. (Ríos 2010). La segunda derivada corrige además las desviaciones causadas por los términos que varían linealmente con la longitud de onda. Generalmente no se utilizan derivadas de orden superior, puesto que la primera y segunda derivada suelen ser suficientes. La aplicación de las derivadas permite un aumento de la resolución de bandas es decir amplifica o resalta los

cambios.

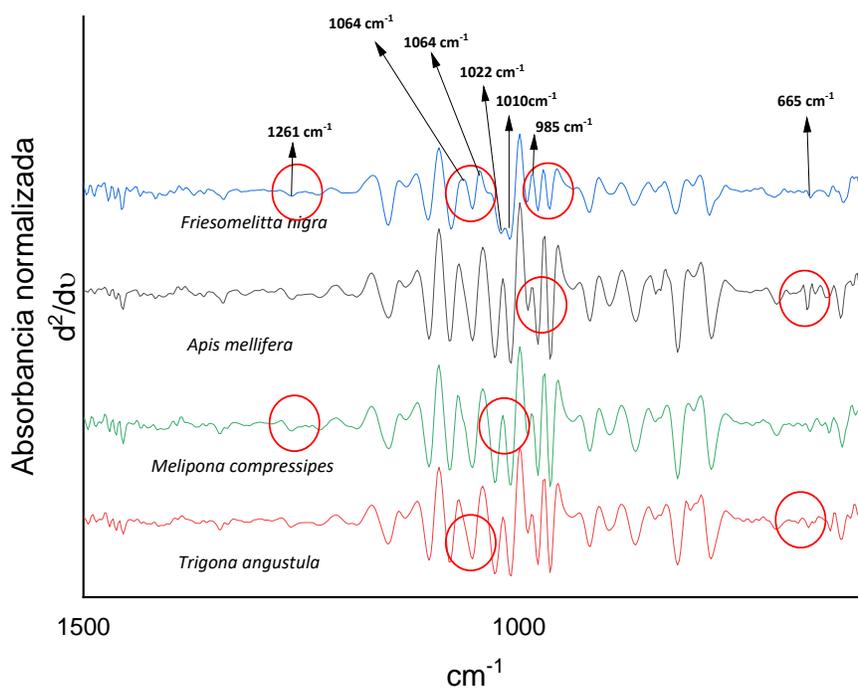
En la Figura 19 se muestra la segunda derivada de los espectros FTIR de muestras de miel de las especies *Apis mellifera*, *Trigona angustula*, *Melipona fuscipes*, *Nannotrigona* sp. y *Plebeia* sp. del municipio de Bochalema, en la región espectral de 1800–600  $\text{cm}^{-1}$ .

**Figura 19** SEGUNDA DERIVADA. Espectros ATR-FTIR comparativos de muestras de mieles del municipio de Bochalema



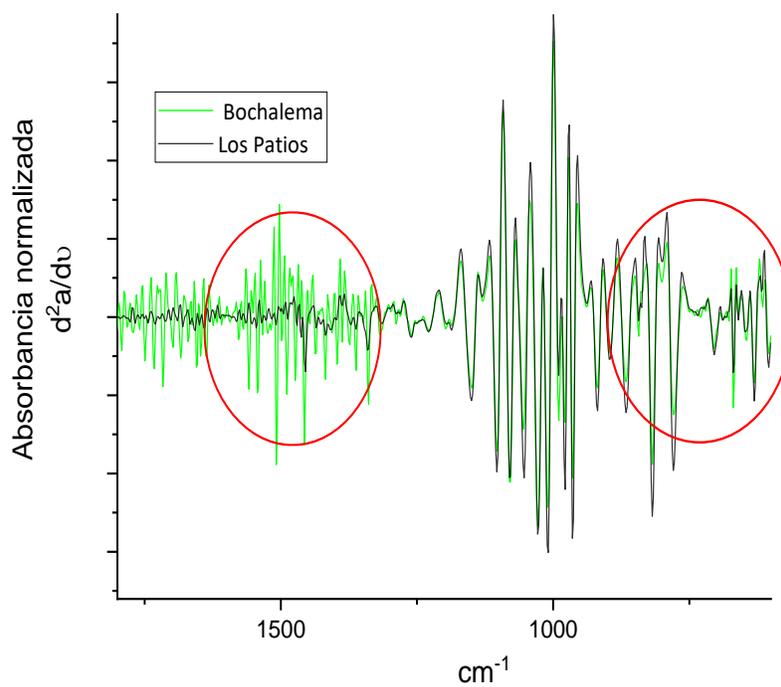
En la Figura 20 se muestra la segunda derivada de los espectros ATR-FTIR comparativos de las muestras de miel de las especies *Apis mellifera*, *Melipona compressipes*, *Friesomelitta nigra* y *Trigona angustula* del municipio de Los Patios, en la región de 1800–600  $\text{cm}^{-1}$ , correspondiente a la región de huella digital.

**Figura 20** SEGUNDA DERIVADA. Espectros ATR-FTIR de muestras de mieles del municipio de Los Patios

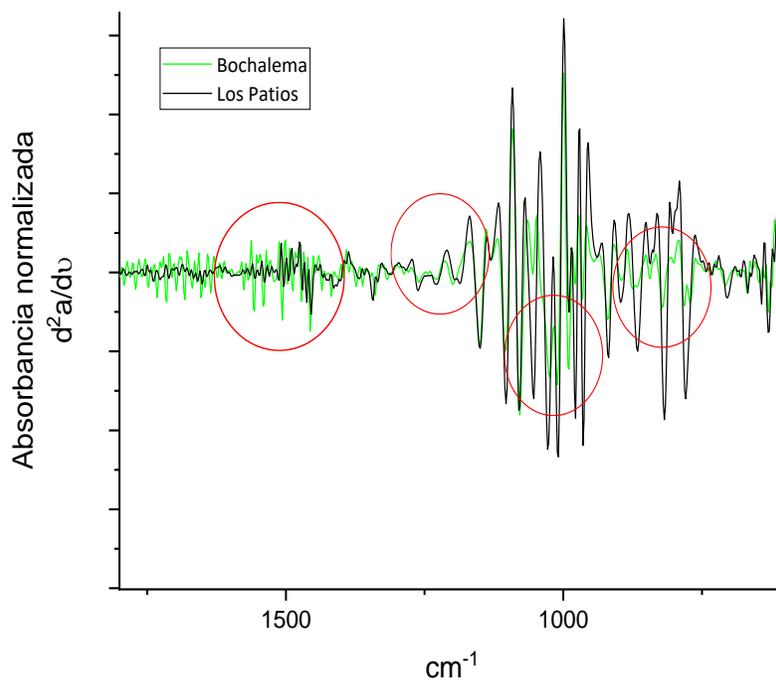


En las Figuras 21 y 22 se observan los espectros de segunda derivada en la región de 1800 a 600 cm<sup>-1</sup> de las especies comunes para ambos municipios. Estos espectros muestran mayores absorbancias, aspecto que puede ser tenido en cuenta de la diferenciación de estas mieles.

**Figura 21** Comparativo entre *Apis mellifera* de los municipios de Bochalema y Los Patios en la región espectral de 1800 a 600  $\text{cm}^{-1}$



**Figura 22** Comparativo de las muestras de mieles *Trigona angustula* de los municipios de Bochalema y Los Patios, en la región espectral de 1800 a 600  $\text{cm}^{-1}$

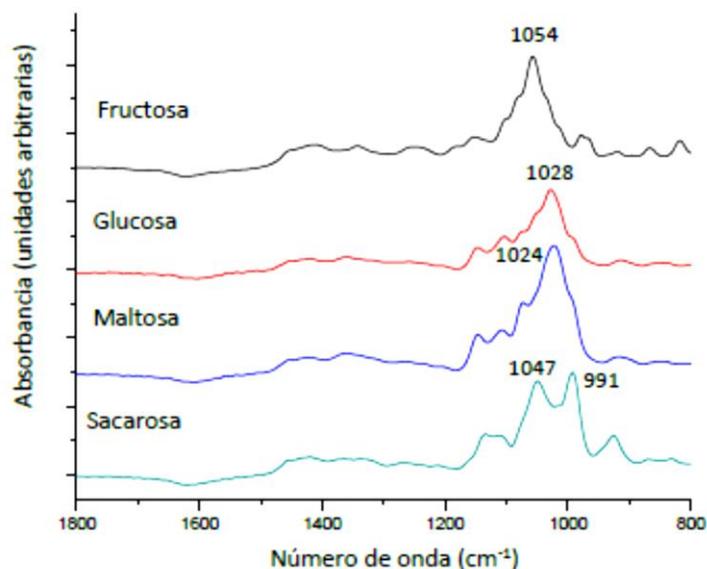


Se utilizó miel obtenida de forma natural para caracterizar las propiedades espectroscópicas obteniéndose diferentes características en cada una de las muestras analizadas por FTIR. Las variaciones en los picos según la literatura indica claramente diferencias en la composición de los azúcares presentes en las muestras analizadas; probablemente relacionado con el contenido de ácidos carboxílicos en diferentes tipos de miel como resultado del origen floral, la ubicación geográfica y la posible contaminación ambiental (Kędzińska-Matysek et. al. 2018; Madupalli, H., Pavan, B., & Tecklenburg, M. M., 2017; Gok, S., Severcan, M., Goormaghtigh, E., Kandemir, I., & Severcan, F., 2015; Martos, I., Ferreres, F., & Tomás-Barberán, F. A., 2000).

De acuerdo con Mondragón (2020), la miel de abeja es un producto constituido en forma mayoritaria por agua, fructosa y glucosa, y en menor proporción por sacarosa y maltosa. La fructosa es el azúcar esencial en la miel con un valor promedio de 36% que varía de 30% a 50% en muestras típicas, la glucosa es el segundo monosacárido más representativo de la miel y varía del 16% al 34% con un valor medio del 25%. (Kędzińska-Matysek et. al. 2018).

Los espectros de los carbohidratos, como se observa en la Figura 23, presentan una característica muy particular y es que, en una muestra de carbohidratos, siempre aparece un pico intenso el cual se encuentra ubicado entre  $1200$  y  $900\text{ cm}^{-1}$ , perfectamente distinguible en comparación con otros espectros. Según Mondragón (2020) es posible observar las diferencias en la posición de los picos más intensos: fructosa ( $1054\text{ cm}^{-1}$ ), glucosa ( $1028\text{ cm}^{-1}$ ), maltosa ( $1024\text{ cm}^{-1}$ ) y sacarosa ( $991\text{ cm}^{-1}$ ) y el pico más intenso ubicado aproximadamente a  $1024\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración de estiramiento del enlace C-O en el grupo C-OH y al estiramiento del enlace C-C en la estructura de los carbohidratos mayoritarios (fructosa y glucosa).

**Figura 23** Espectros de FTIR-ATR de estándares de diferentes tipos de azúcares disueltos en agua entre el intervalo de 1800 y 800  $\text{cm}^{-1}$  después de la sustracción del espectro de agua



*Nota.* Adaptado de (Mondragón, 2020, pág. 91)

La Tabla 11 muestra las frecuencias de las mieles estudiadas en la región de la huella digital que permite identificar los principales carbohidratos presentes en las muestras de mieles estudiadas.

**Tabla 11** Ubicación máximos de bandas de absorción FTIR - región de carbohidratos

FTIR									Tipo y origen de la vibración
Posición de la banda $\text{cm}^{-1}$									
Bochalema					Los Patios				
<i>Apis mellifera</i>	<i>Trigona angustula</i>	<i>Melipona fuscipes</i>	<i>Nannotrigona</i> sp.	<i>Plebeia</i> sp.	<i>Apis mellifera</i>	<i>Melipona compressipes</i>	<i>Friesomelitta nigra</i>	<i>Trigona angustula</i>	
1342	1348	1342	1348	1344	1348	1344	1342	1348	$\delta$ (-OH) grupo C-OH
1257	1255	1257	1249	1257	1251	1259	1257	1255	v (C-H) en carbohidratos y/o v (C-O) en carbohidratos
1147	1151	1151	1145	1151	1151	1151	1149	1149	v (C-O) en el grupo C-OH o v (C-C) en la estructura del carbohidrato
1053	1060	1055	1047	1049	1053	1055		1053	
1028	1029	1031	1029	1026	1024	1024	1022	1029	
921	921	921	920	920	921	918	920	918	$\delta$ (C-H)
867	869	869	867	871	867	869	866	867	Región anomérica de carbohidratos o $\delta$ (C-H)
819	821	815	817	821	821	819	823	819	
779	775	777	779	771	777	775	783	775	

v – vibraciones de estiramiento,  $\delta$  – vibraciones de deformación

La región comprendida entre  $1500\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$  se considera como "la región de simetría local", que incluye principalmente vibraciones de deformación de grupos con simetría local, como  $\text{CH}_2$  y las numerosas deformaciones de C-OH que se encuentran en los carbohidratos. (Wiercigroch, y otros, 2017). Picos alrededor de  $1255\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración de estiramiento del enlace CO en el grupo C-OH y al estiramiento del enlace C-C en la estructura de los carbohidratos mayoritarios (fructosa y glucosa). (Mondragón, 2020).

El rango de banda de  $1250$  a  $1140\text{ cm}^{-1}$  es, a su vez, una vibración característica para la vibración de estiramiento del C-H en los carbohidratos o la vibración de estiramiento del C-O en los carbohidratos. Las vibraciones con el máximo en aproximadamente  $1100$  y  $1080\text{ cm}^{-1}$  constituyen una banda que puede originarse en la vibración de C-O en el grupo C O-C. (Kędzierska-Matysek et. al. 2018)

La región de frecuencias entre  $1200\text{ cm}^{-1}$  y  $800\text{ cm}^{-1}$  puede denominarse región de "huella digital" (Pasandide, Khodaiyan, Mousavi y Hosseini, 2017). En comparación con los monosacáridos, se cree que la aparición de nuevas bandas en la región de  $1175\text{--}1140\text{ cm}^{-1}$  es el resultado de la formación de enlaces glucosídicos en el polisacárido. Diferentes configuraciones de enlaces glucosídicos conducen a diferencias en la región de  $1000$  a  $920\text{ cm}^{-1}$  (Nikonenko, Buslov, Sushko y Zhbankov, 2005).

Ligeras diferencias en la intensidad de los picos, aproximadamente a  $1053$  y  $1024\text{ cm}^{-1}$ , pero todos dentro un mismo patrón de ubicación y forma, lo cual es debido a los cambios composicionales naturales de los azúcares presentes en las mieles de abeja, principalmente por el contenido de una mezcla de fructosa y glucosa. (Mondragón, 2020). El área de las bandas que se extienden desde  $1050$  a  $970\text{ cm}^{-1}$  de las vibraciones de estiramiento C-O se puede asignar al grupo C-OH o al estiramiento en la estructura de carbohidratos de C-C. El área de bandas con el máximo intenso en aproximadamente  $1055\text{ cm}^{-1}$  proveniente de las vibraciones de estiramiento tanto de C-O en C-OH como del grupo C-C en la estructura de carbohidratos. (Kędzierska-Matysek et. al. 2018).

En la región comprendida entre 900 y 750  $\text{cm}^{-1}$  se encuentran pequeños picos de absorción asociados con las vibraciones asociadas con la configuración de la molécula de fructosa (compuesto mayoritario en la miel de abeja). (Mondragón, 2020) Las bandas en la región de 900–800  $\text{cm}^{-1}$ , que se denomina región anomérica, se pueden usar para diferenciar la configuración  $\alpha$  y  $\beta$  del carbono anomérico (Wang, Y. X., Xin, Y., Yin, J. Y., Huang, X. J., Wang, J. Q., Hu, J. L., ... & Nie, S. P., 2022).

Las bandas con el máximo en aproximadamente 920  $\text{cm}^{-1}$  son bandas de vibraciones de flexión del grupo C-H. La última región que es muy distintiva en la evaluación y descripción de la miel es la banda de 890 a 810  $\text{cm}^{-1}$  característica de la región anomérica vibratoria de los carbohidratos o deformación C-H. (Kędzierska-Matysek et. al. 2018).

### **PCA y el análisis de conglomerados**

Se utilizaron los espectros con el tratamiento previo de suavizado, corrección de línea base, normalizados y sustracción del agua, a los que posteriormente se les realizó la primera derivada en la región de la huella dactilar y se usaron para el análisis PCA y el análisis de conglomerados. El análisis de conglomerados se usa para identificar regiones de la muestra que tienen una respuesta espectral similar al agrupar los espectros de tal manera que las diferencias en las respuestas espectrales dentro del conglomerado se minimicen, al mismo tiempo que se maximizan las diferencias entre conglomerados (Salzer, R., Steiner, G., Mantsch, H. H., Mansfield, J., & Lewis, E. N. 2000).

El PCA elimina la redundancia de tener muchos puntos que varían de manera correlacionada al transformar los datos originales en un conjunto de variables nuevas no correlacionadas, el PCA identifica direcciones (PC) a lo largo de las cuales se maximiza la varianza de los datos. (Rana, R., Müller, G., Naumann, A., & Polle, A., 2008), generando información sobre los principales componentes responsables de la variabilidad en ciertas regiones del espectro estudiando, y es un método de reducción de datos en el que cada espectro, que consta de cientos de valores de absorbancia, se representa mediante un punto en un espacio multidimensional mediante una transformación lineal.

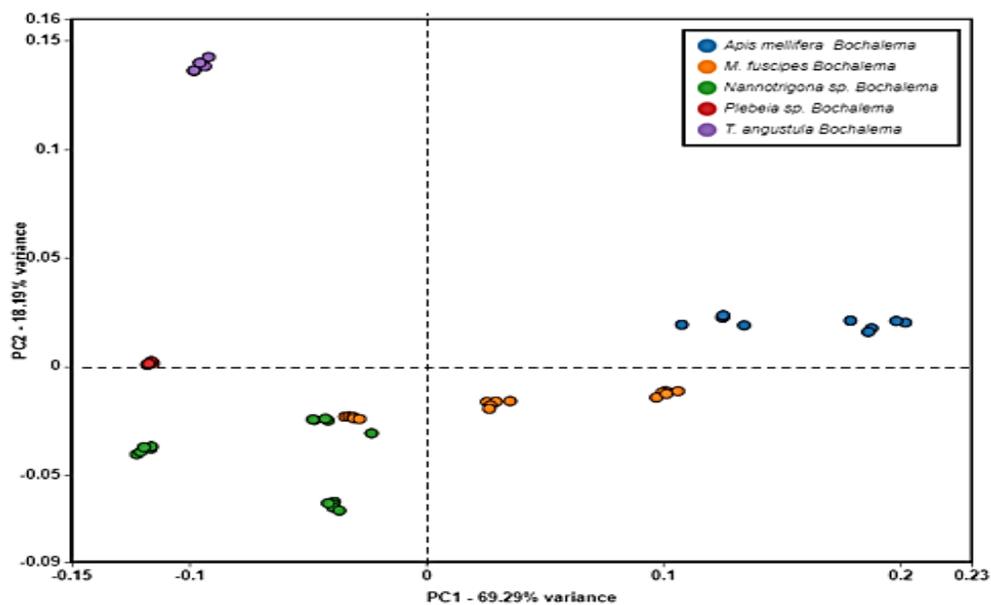
Las coordenadas del punto son las componentes principales (PC) y la gráfica obtenida se denomina gráfica de puntuaciones. La matriz de transformación en PCA consta de los vectores propios de la matriz de covarianza de todo el conjunto de espectros; en PCA, los vectores propios se ordenan de manera que los valores propios correspondientes aparecen en orden decreciente, dado que los valores propios representan la varianza de los vectores propios correspondientes, el primer vector propio describe la mayor parte de la variabilidad; el segundo vector propio describe la segunda mayor fuente de variabilidad, y así sucesivamente. (Gok, S., Severcan, M., Goormaghtigh, E., Kandemir, I., & Severcan, F., 2015).

Por lo tanto, las puntuaciones correspondientes que definen un espectro específico indican la cantidad de contribución de cada vector propio a este espectro. Una propiedad importante de PCA es que ninguna otra transformación ortogonal puede dar un error menor (en sentido cuadrático medio) que el de PCA si el número de coeficientes de transformación se trunca en algún valor. (Gok, S., Severcan, M., Goormaghtigh, E., Kandemir, I., & Severcan, F., 2015. Se aplicó el PCA, obteniendo una discriminación evidente (score plot) de las diferentes muestras de miel con los datos de orden cero, primera derivada y segunda derivada de todas las muestras de mieles del municipio de Bochalema, Los Patios y las muestras de mieles comunes, en los espectros infrarrojos en el rango de  $4000-600\text{ cm}^{-1}$  escogiendo el PCA de primera derivada para el análisis.

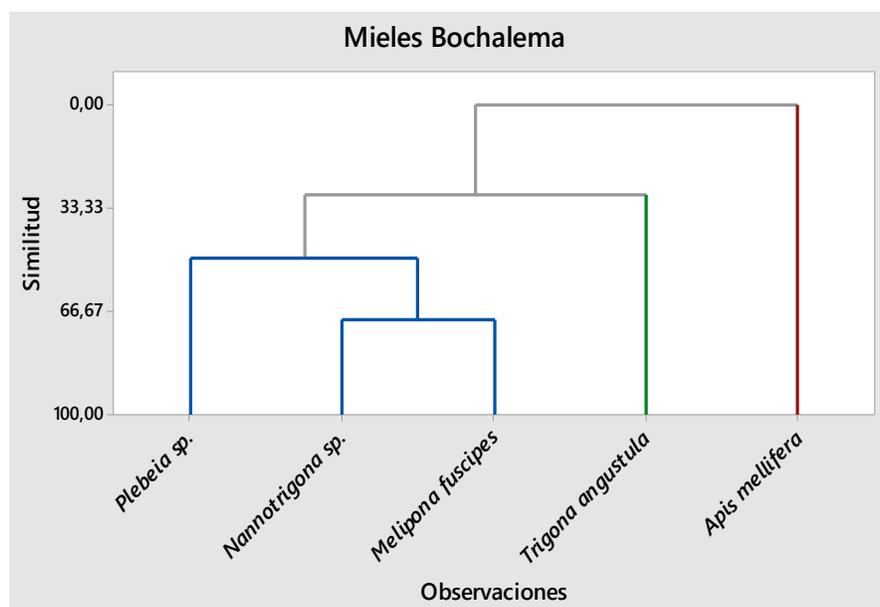
El PCA de primera derivada para las muestras del municipio de Bochalema se encuentra en la Figura 24, el dendrograma en la Figura 25 y, el árbol de decisión en la Figura 26.

Se puede observar una división clara de los datos, esto describe, 87.48% de la varianza total para el PC de las muestras de *Apis mellifera* y *Trigona angustula* del municipio de Bochalema.

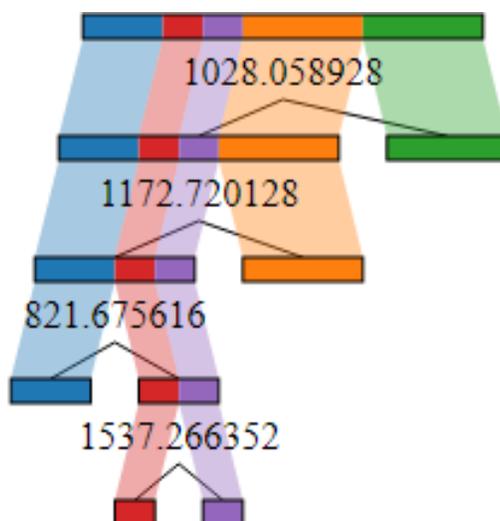
**Figura 24** PCA, utilizando la primera derivada de las muestras de mieles del municipio de Bochalema



**Figura 25** Dendrograma, utilizando la primera derivada de las muestras de mieles del municipio de Bochalema



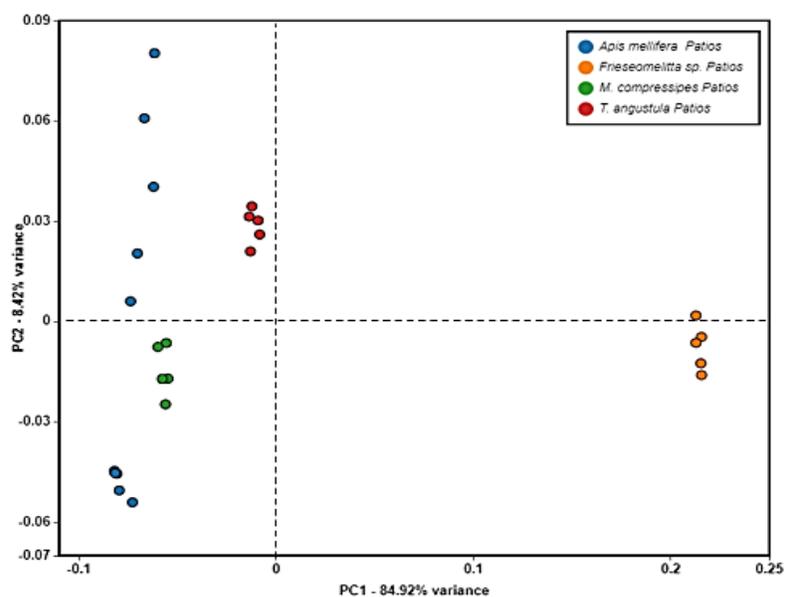
**Figura 26** Árbol de decisión, utilizando la primera derivada de las muestras de mieles del municipio de Bochalema



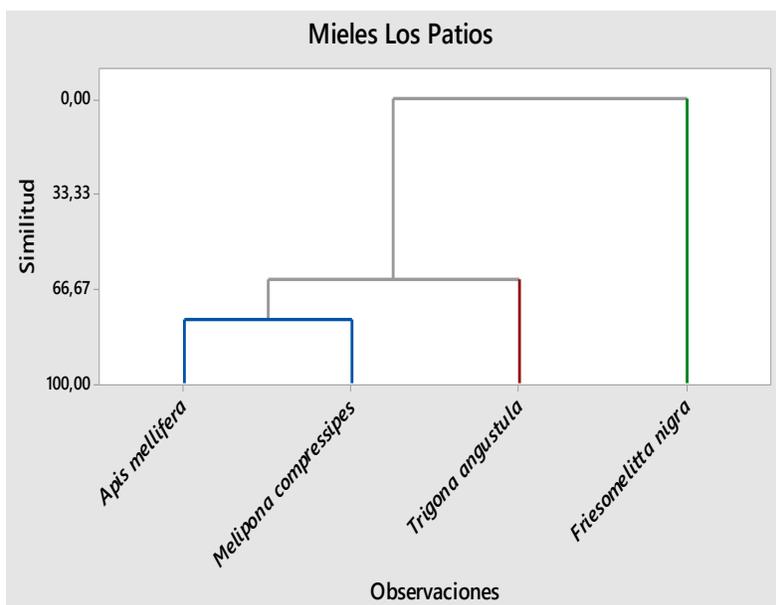
El PCA de primera derivada para las muestras del municipio de Los Patios se encuentra en la Figura 27, el dendrograma en la Figura 28 y, el árbol de decisión en la Figura 29.

Se puede observar una división clara de los datos, esto describe, 93.34% de la varianza total para el PC de las muestras de *Apis mellifera* y *Trigona angustula* del municipio de Los Patios.

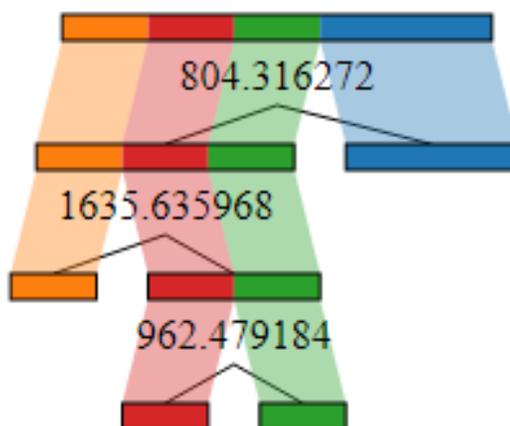
**Figura 27** PCA, utilizando la primera derivada de las muestras de mieles del municipio de Los Patios



**Figura 28** Dendrograma, utilizando la primera derivada de las muestras de mieles del municipio de Los Patios



**Figura 29** Árbol de decisión, utilizando la primera derivada de las muestras de mieles del municipio de Los Patios

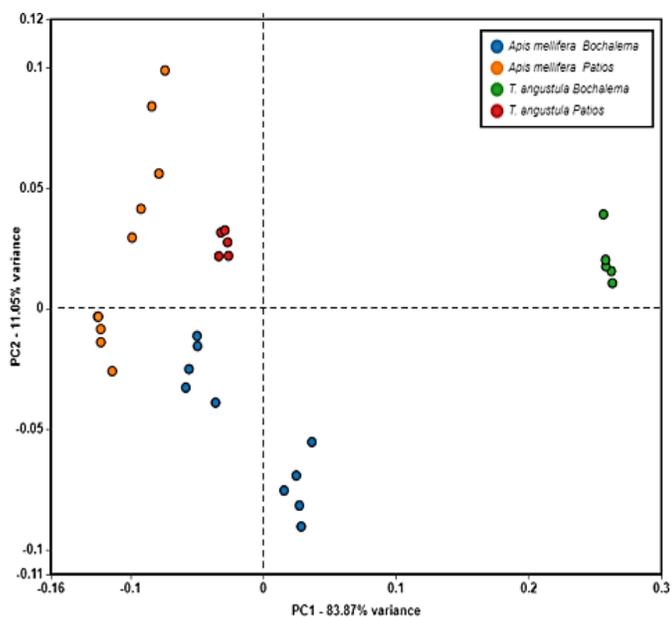


El PCA muestra como las mieles de las especies *Apis mellifera*, *Melipona compressipes*, *Trigona angustula* se agrupan indicando cierta similitud en su composición química, en otro extremo se encuentra

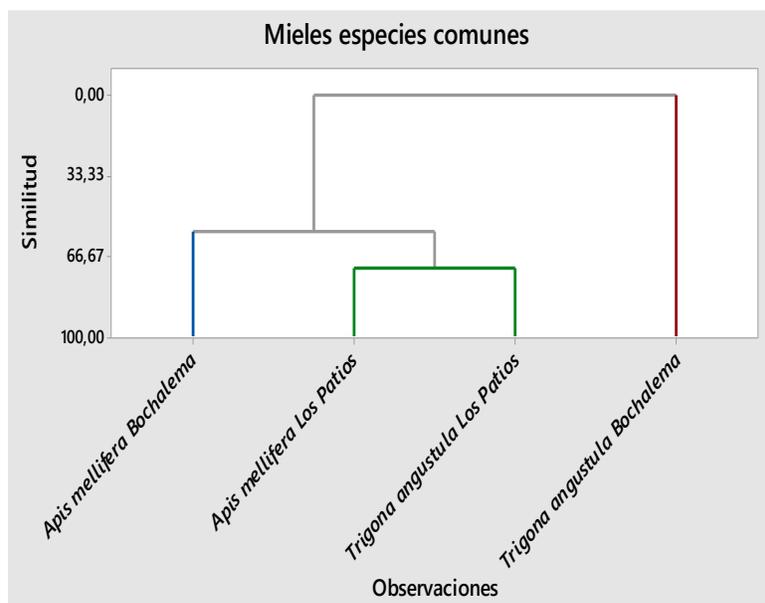
la especie *Friesomelitta nigra* de la cual difieren significativamente. Para las muestras de mieles de este municipio observan en el dendrograma, un brazo compuesto por muestras de miel de *Apis mellifera* y *Melipona compressipes*, se entiende que tiene acceso al mismo recurso floral y estas a su vez están agrupados en el mismo brazo con *Trigona angustula*, mientras en el otro brazo se ubica el tercer grupo que corresponde a *Friesomelitta nigra* debido a que difieren significativamente con las otras especies del mismo municipio.

El PCA de la primera derivada para las muestras comunes (especies que habitan en el mismo lugar) se encuentra en la Figura 30, el dendrograma en la Figura 31 y, el árbol de decisión en la Figura 32.

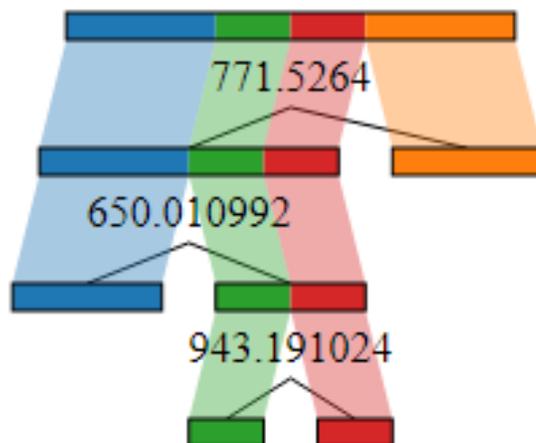
**Figura 30** PCA, utilizando la primera derivada de las muestras de mieles de los municipio de Bochalema y Los Patios



**Figura 31** Dendrograma, utilizando la primera derivada de las muestras de mieles de los municipios Bochalema y Los Patios



**Figura 32** Árbol de decisión, utilizando la primera derivada de las muestras de mieles de los municipios Bochalema y Los Patios



El PCA permite observar que las mieles de las especies *Apis mellifera* y *Trigona angustula* del municipio de Los Patios y *Apis mellifera* de Bochalema se agrupan indicando cierta similitud en su composición química. Para las muestras de mieles comunes de ambos municipios se observan en el

dendrograma, un brazo está compuesto por muestras de miel de *Apis mellifera* del municipio de Los Patios con *Trigona angustula* del mismo municipio, se entiende que tiene acceso al mismo recurso floral y estas están agrupados en el mismo brazo con *Apis mellifera* de Bochalema, mientras que *Trigona angustula* del municipio de Bochalema se ubica en el extremo derecho del tercer grupo porque difieren significativamente con la otra especie del mismo municipio

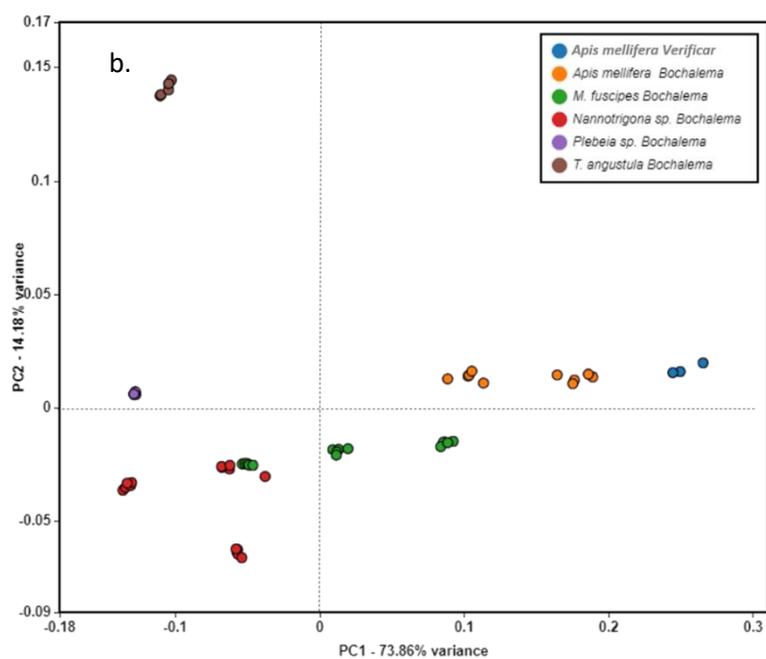
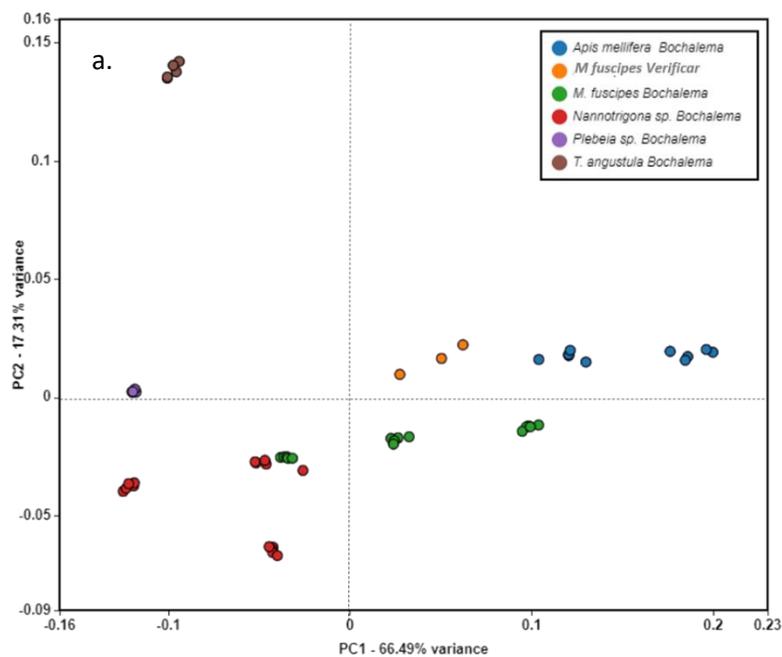
En todas las figuras es evidente una segregación y un agrupamiento distintos entre las muestras. Las muestras se agruparon juntas creando grupos uniformes para cada uno de los tipos de miel analizados en el gráfico de dispersión PCA.

### **Verificación del Método**

Se recolectaron mieles de dos especies (*A. mellifera* y *Nannotrigona* sp.) del municipio de Bochalema (por su disponibilidad), para cada muestra se tomaron espectros por triplicado a los cuales se le hizo el tratamiento previo (suavizado, corrección de línea base, se normalizó el pico y se restó el espectro del agua y primera derivada), los datos obtenidos se incluyeron en la matriz de datos y se aplicó nuevamente el modelo matemático.

Para verificar si el modelo es adecuado para discriminar las mieles, se incluyeron los datos de los espectros de las mieles de las 2 especies en la matriz de datos utilizada y se corrió nuevamente el PCA; como se mencionó anteriormente, los resultados se presentan en la Figura 33. En ella se observa que para las mieles de la especie *A. mellifera* ambas muestras se encuentran en el mismo cuadrante muy cercanas, lo mismo sucede con las mieles de la especie *Nannotrigona* sp., esto puede indicar que el modelo utilizado permite diferenciar las mieles de diferentes especies.

**Figura 33** PCA verificación del método. *M. fuscipes* (a) y *Apis mellifera* (b)



En la Tabla 12 se puede identificar cómo las especies presentan unas longitudes de onda que permiten establecer diferencias y relaciones. Y se muestra la posición de la banda con su respectivo tipo

y origen de vibración teniendo en cuenta el árbol de decisión de las muestras que permitieron verificar el método.

**Tabla 12** Longitudes de onda para diferenciación de especies

Longitudes de onda para diferenciación de especies	Especies	Tipo y origen de la vibración	
1660,71 cm <sup>-1</sup>	<i>Apis mellifera</i> (verificar) y <i>Trigona angustula</i>	Vibraciones de estiramiento C–O y C–H en carbohidratos Vibraciones de estiramiento C=O de cetonas en carbohidratos.	Las vibraciones de estiramiento C=O de los grupos amida y da lugar a bandas infrarrojas en la región entre 1600 y 1700 (Cai & Singh, 2004) Las bandas en la región de 1700–1600 cm <sup>-1</sup> se habían asignado previamente como vibraciones de amida I en las proteínas de la miel (Gok, s 2014; (Philip, 2009)
1458,18 cm <sup>-1</sup>	<i>Plebeia</i> sp y <i>Trigona angustula</i>	- Vibraciones de deformación (O-H) y grupo C-OH. - Vibraciones de deformación (C-H) en alcanos	Señales débiles entre 1459 y 1407 cm <sup>-1</sup> debido a la flexión del CH <sub>2</sub> y al estiramiento asimétrico C=O (COO–). (Horvatinec y Svečnjak, 2020; Socrates, 2001; Chen, 1985).
1423,46 cm <sup>-1</sup>	<i>Apis mellifera</i> y <i>Trigona angustula</i>		
1404,17 cm <sup>-1</sup>	<i>Apis mellifera</i> y <i>Plebeia</i> sp	- Vibraciones de deformación del grupo (O-H).	La banda de deformación del grupo O–H aprox. en 1440-1395 cm <sup>-1</sup> y 950-910 cm <sup>-1</sup> (Kędzierska-Matysek et. al. 2018; Li, S., Zhang, X., Shan, Y., Su, D., Ma, Q., Wen, R., & Li, J., 2017).
1029,98 cm <sup>-1</sup>	<i>Apis mellifera</i> y <i>Nannotrigona</i> sp	- Vibraciones de estiramiento (C-O) en el grupo C-OH. - Vibraciones de estiramiento (C-C) en la estructura del carbohidrato.	Los carbohidratos mayoritarios son (fructosa y glucosa), con diferencias en la posición de sus picos más intensos encontrándose fructosa a 1054 cm <sup>-1</sup> y glucosa 1028 cm <sup>-1</sup> (Mondragón, 2020) El área de las bandas que se extienden desde 1050 a 970 cm <sup>-1</sup> de las vibraciones de estiramiento C-O se puede asignar al grupo C-OH o al estiramiento en la estructura de carbohidratos de C-C y las bandas con el máximo en aproximadamente 920 cm <sup>-1</sup> son bandas de vibraciones de flexión del grupo C-H. (Kędzierska-Matysek et. Al. 2018).
1028,05 cm <sup>-1</sup>	<i>Plebeia</i> sp y <i>Nannotrigona</i> sp	- Vibraciones de deformación del enlace (C-H).	
758,02 cm <sup>-1</sup>	<i>Plebeia</i> sp y <i>Trigona angustula</i>	Región anomérica de carbohidratos o vibraciones de deformación (C-H).	La región anomérica de los carbohidratos produce la vibración o deformación del enlace C-H (Kędzierska-Matysek et. Al. 2018).

### Conclusiones

La espectroscopía infrarroja suministró información del perfil químico de las mieles y permitió establecer las diferencias en la composición de cada una de ellas.

La variación en las intensidades de los picos puede estar ocasionada por la especie de abeja que colecta el néctar y el origen botánico de las plantas.

Las mayores intensidades en las muestras tomadas en el municipio de Bochalema se encontraron para la especie *Apis mellifera*, y las menores en la especie *Nannotrigona* sp., a excepción de la banda correspondiente a la vibración del OH, en la que la especie *Trigona angustula* presentó el menor valor en absorbancia.

Las mayores intensidades en las muestras tomadas en el municipio de Los Patios se encontraron para la especie *Apis mellifera*, y en la región de la huella digital las menores absorbancias en la especie *Frieseomelitta nigra*, en especial en la región correspondiente  $1178\text{ cm}^{-1}$ .

La aplicación del análisis de ATR-FTIR reveló regiones del espectro que sirven tanto para la determinación de la composición de las muestras de miel seleccionadas como para determinar la región de origen de estas muestras.

La espectroscopía FTIR-ATR en combinación con PCA o con análisis de conglomerados es adecuada para discriminar mieles originarias de diferentes regiones geográficas.

### Recomendaciones

- Continuar con estudios de este tipo que permitan identificar las principales bandas o picos que permiten diferenciar las mieles de acuerdo con la especie de la cual provengan.
- Realizar de manera complementaria investigaciones que contribuyan a la caracterización de las mieles de la región y del país que permitan aportar conocimiento para establecer valores adecuados que sirvan de base para una reglamentación ajustada a las mieles colombianas.
- Generar estrategias para el cuidado y preservación de estas especies de abejas sin aguijón propias de la región.
- Se recomienda hacer estudios de liofilización de mieles de diferentes especies para establecer el tiempo que requiere cada una hasta sequedad.

### Bibliografía

- Abd Jalil , M., Kasmuri , A., & Haid , H. (2017). Stingless bee honey, the natural wound healer: a review. *Skin Pharmacol Physiol* , 30:66-75.
- Adab. (21 de Noviembre de 2014). Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel de Abelha social sem ferrão, gênero Melipona. (Portaria Adab Nº 207). (A. E. Bahia, Ed.) Bahia, Brasil.
- Alimentarius, C. d. C. (2001). *Codex standard for honey*.
- Anjos , O., Campos, M. G., Ruiz, P. C., & Antunes, P. (2014). Application of FTIR-ATR spectroscopy to the quantification of sugar in honey. *Food Chemistry*.
- Anjos, O., Campos, M., Ruiz, P., & Antunes, P. (2015). *Food Chem*.
- Aroca Gaona, I. A. (25 de Mayo de 2022). *Agencia Prensa Rural*. Obtenido de <https://prensarural.org/spip/spip.php?article28059>
- Arvanitoyannis, I. S., Chalhoub, C., Gotsiou, P., Lydakis-Simantiris, N., & Kefalas, P. (2005). Novel quality control methods in conjunction with chemometrics (multivariate analysis) for detecting honey authenticity. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(3), 193-203.
- Azeredo, L. C., Azeredo, M. A., & Beser, L. D. (2000). *Características físico-químicas de amostras de méis de melíponas coletadas no estado de Tocantins*. Santa Catarina, Brazil.
- Bertelli, D., Lolli, M., Papotti, G., Bortolotti, L., Serra, G., & Plessi, M. (2010). Detection of honey adulteration by sugar syrups using one-dimensional and two-dimensional high-resolution nuclear magnetic resonance. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(15), 8495-8501.
- Blanco, Lorena. (28 de junio de 2022). Apis mellifera: características, hábitat, reproducción, alimentación. Liferder. Recuperado de <https://www.liferder.com/apis-mellifera/>.
- Bogdanov, S. (2004). Beeswax: quality issues today. *Bee world*, 85(3), 46-50.
- Bogdanov, S. (2009). Physical properties of honey. *Book of honey*, Cap. 4.

- Bogdanov, S., Ruoff, K., & Oddo, L. P. (2004). Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie*, 35(Suppl. 1), S4-S17.
- Bureau, S., Ruiz, D., Reich, M., Gouble, B., Bertrand, D., Audergon, J. M., & Renard, C. M. (2009). Application of ATR-FTIR for a rapid and simultaneous determination of sugars and organic acids in apricot fruit. *Food Chemistry*, 115(3), 1133-1140.
- Cai, S., & Singh, B. R. (2004). A distinct utility of the amide III infrared band for secondary structure estimation of aqueous protein solutions using partial least squares methods. *Biochemistry*, 43, 2541–2549.
- Camargo, J. M., & Moure, J. S. (1983). Trichotrigona, um novo gênero de Meliponinae (Hymenoptera, Apidae). *Acta Amazonica*, 13(2), 421-429.
- Cardona-Rodríguez, Y. (2015). *Contribución al conocimiento de las características fisicoquímicas y térmicas de mieles de siete especies de abejas sin aguijón presentes en Norte de Santander, Colombia, aplicando análisis multivariado*. Pamplona.
- Cardona-Rodríguez, Y., Torres-Sánchez, D. A., & Hoffmann, W. (2015). Análisis térmico de mieles de Trigona (Tetragonisca) angustula de Norte de Santander, Colombia. *Respuestas*, 20(2), 135-144.
- Cardona-Rodríguez, Y., Torres-Sánchez, D. A., & Hoffmann, W. (2019). Colombian stingless bee honeys characterized by multivariate analysis of physicochemical properties. *Apidologie*, 50(6), 881-892.
- Cardona-Rodríguez, Y., Torres-Sánchez, D. A., & Hoffmann, W. (2020). Thermoanalytical investigations of honey produced by Trigona species using differential scanning calorimetry (DSC). *Journal of Apicultural Research*, 1, 1-8.
- Cardona-Rodríguez, Y., Torres-Sánchez, D. A., Lamprecht, I., & Hoffmann, W. (2018). Differentiation of Honey from Melipona Species Using Differential Scanning Calorimetry. *Food Analytical Methods*, 11(4), 1056- 1067.

- Chen, P. S. (1985). Amino acid and protein metabolism. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*; Kerkut, GA, Gilbert, LI, Eds, 177-219.
- Cocciardi, R. A., Ismail, A. A., & Sedman, J. (2005). Investigation of the potential utility of single-bounce attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy in the analysis of distilled liquors and wines. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(8), 2803-2809.
- Cuevas-Glory, L. F., Pino, J. A., & Santiago, L. S. (2007). A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 103(3), 1032-1043.
- Das, C., Chakraborty, S., Acharya, K., Bera, N. K., Chattopadhyay, D., Karmakar, A., & Chattopadhyay, S. (2017). FT-MIR supported Electrical Impedance Spectroscopy based study of sugar adulterated honeys from different floral origin. *Talanta*, 171, 327-334.
- de Villiers, A., Alberts, P., Tredoux, A. G., & Nieuwoudt, H. H. (2012). Analytical techniques for wine analysis: An African perspective; a review. *Analytica Chimica Acta*, 730, 2-23.
- de la Mata, P., Dominguez-Vidal, A., Bosque-Sendra, J. M., Ruiz-Medina, A., Cuadros-Rodríguez, L., & Ayora-Cañada, M. J. (2012). Olive oil assessment in edible oil blends by means of ATR-FTIR and chemometrics. *Food Control*, 23(2), 449-455.
- Doner, L. W. (1977). The sugars of honey: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28(5), 443-456.
- Edelmann, A., Diewok, J., Schuster, K. C., & Lendl, B. (2001). Rapid method for the discrimination of red wine cultivars based on mid-infrared spectroscopy of phenolic wine extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1139-1145.
- Etzold, E., & Lichtenberg-Kraag, B. (2008). Determination of the botanical origin of honey by Fourier-transformed infrared spectroscopy: an approach for routine analysis. *European Food Research and Technology*, 227(2), 579-586.

- Fernández, K., & Agosin, E. (2007). Quantitative analysis of red wine tannins using Fourier-transform mid-infrared spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(18), 7294-7300.
- Formosa, J. P., Lia, F., Mifsud, D., & Farrugia, C. (2020). Application of ATR-FT-MIR for tracing the geographical origin of honey produced in the Maltese islands. *Foods*, 9(6), 710.
- Gallardo-Velázquez, T., Osorio-Revilla, G., Zuñiga-de Loa, M., & Rivera-Espinoza, Y. (2009). Application of FTIR-HATR spectroscopy and multivariate analysis to the quantification of adulterants in Mexican honeys. *Food Research International*, 42(3), 313-318.
- Gan, Z., Yang, Y., Li, J., Wen, X., Zhu, M., Jiang, Y., & Ni, Y. (2016). Using sensor and spectral analysis to classify botanical origin and determine adulteration of raw honey. *Journal of Food Engineering*, 178, 151-158.
- Gok, S., Severcan, M., Goormaghtigh, E., Kandemir, I., & Severcan, F. (2015). Differentiation of Anatolian honey samples from different botanical origins by ATR-FTIR spectroscopy using multivariate analysis. *Food chemistry*, 170, 234-240.
- Gómez-Ordóñez, E., & Rupérez, P. (2011). FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. *Food hydrocolloids*, 25(6), 1514-1520.
- Guler, A., Bakan, A., Nisbet, C., & Yavuz, O. (2007). Determination of important biochemical properties of honey to discriminate pure and adulterated honey with sucrose (*Saccharum officinarum* L.) syrup. *Food chemistry*, 105(3), 1119-1125.
- Hebbar, H. U., Nandini, K. E., Lakshmi, M. C. & Subramanian, R. (2003). Microwave and infrared heat processing of honey and its quality. *Food Science and Technology Research* 9(1), 49-53.
- Icontec. (2007). NTC 1273:2007 Miel de abejas.
- Iñón, F. A., Garrigues, J. M., Garrigues, S., Molina, A., & de la Guardia, M. (2003). Selection of calibration set samples in determination of olive oil acidity by partial least squares–attenuated total reflectance–Fourier transform infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 489(1), 59-75.

- Jha, S. N., & Gunasekaran, S. (2010). Authentications of sweetness of mango juice using Fourier transform infrared-attenuated total reflection spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, *101*(3), 337–342.
- 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.
- Kędzierska-Matysek, M., Matwijczuk, A., Florek, M., Barłowska, J., Wolanciuk, A., Matwijczuk, A., ... & Gładyszewska, B. (2018). Application of FTIR spectroscopy for analysis of the quality of honey. *In BIO Web of Conferences (Vol. 10, p. 02008)*. EDP Sciences.
- Kelly, J. D., Downey, G., & Fouratier, V. (2004). Initial study of honey adulteration by sugar solutions using midinfrared (MIR) spectroscopy and chemometrics. *Journal of agricultural and food chemistry*, *52*(1), 33-39.
- Kelly, J. D., Petisco, C., & Downey, G. (2006). Application of Fourier transform midinfrared spectroscopy to the discrimination between Irish artisanal honey and such honey adulterated with various sugar syrups. *Journal of agricultural and food chemistry*, *54*, 6873–80
- Kerr, W. E., Sakagami, S. F., Zucchi, R., Portugal-Araújo, V. D., & Camargo, J. D. (1967). Camargo, Atlas do simposio sobre a biota Amazonica, 5 (1967) 255–309.
- Krska, R., Becalski, A., Braekevelt, E., Koerner, T., Cao, X. L., Dabeka, R., Godefroy, S., Lau, B., Moisey, J., Rawn, D. F., Scott, P. M., Wang, Z. & Forsyth, D. (2012). Challenges and trends in the determination of selected chemical contaminants and allergens in food. *Anal Bioanal Chem* *402*(1): 139-162.
- Kuroiwa, T., Kimura, K., Aoki, Y., Neves, M. A., Sato, S., Mukataka, S., Kanazawa, A., Ichikawa, S. (2015) Quantitative Evaluation of the Effects of Moisture Distribution on Enzyme-Induced Acylation of the Trehalose in Reduced-Moisture Organic Media. *Journal of Food Research*, *4* (5), 133-142.
- Lachenmeier, D. W. (2007). Rapid quality control of spirit drinks and beer using multivariate data analysis of Fourier transform infrared spectra. *Food Chemistry*, *101*(2), 825–832.

*Las abejas, las reinas de nuestra biodiversidad*, s.f. Recuperado 25 de mayo de 2021 de <https://www.minambiente.gov.co/index.php/noticias-minambiente/4704-las-abejas-las-reinas-de-nuestra-biodiversidad>

Li, S., Zhang, X., Shan, Y., Su, D., Ma, Q., Wen, R., & Li, J. (2017). Qualitative and quantitative detection of honey adulterated with high-fructose corn syrup and maltose syrup by using near-infrared spectroscopy. *Food chemistry*, 218, 231-236.

Madupalli, H., Pavan, B., & Tecklenburg, M. M. (2017). Carbonate substitution in the mineral component of bone: Discriminating the structural changes, simultaneously imposed by carbonate in A and B sites of apatite. *Journal of solid state chemistry*, 255, 27-35.

Manthey, J. A. (2006). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of the polymethoxylated flavone content of orange oil residues. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54, 3215-3218.

Martos, I., Ferreres, F., & Tomás-Barberán, F. A. (2000). Identification of flavonoid markers for the botanical origin of Eucalyptus honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1498-1502.

Mesaik, M. A., Dastagir, N., Uddin, N., Rehman, K., & Azim, M. K. (2015). Characterization of immunomodulatory activities of honey glycoproteins and glycopeptides. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(1), 177-184.

Ministério da Agricultura. (2000). *Instrução Normativa Nº 11, de 20 de Outubro de 2000: Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade do mel*. Brasil.

Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. (20 de Mayo de 2020). *Las abejas, las reinas de nuestra biodiversidad*. Recuperado el 25 de Mayo de 2021

Ministerio de la Protección Social. (25 de Marzo de 2010). Resolución 1057. *Sistema único de información normativa - Diario Oficial*, 47.662, 5.

Molan, P. C. (2006). The evidence supporting the use of honey as a wound dressing. *The international journal of lower extremity wounds* 5(1), 40-54.

- Mondragón, P. (2020). *Principios y aplicaciones de la espectroscopia de infrarrojo en el análisis de alimentos y bebidas*. Zapopan, Jalisco, México: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.
- Moreira, J. L., Marcos, A. M., & Barros, P. (2002). *Analysis of Portuguese wine by Fourier transform infrared spectrometry*. *Ciência e Técnica Vitivinícola/Journal of Viticulture and Enology*, 17, 27–33.
- Movasaghi, Z., Rehman, S., & Rehman, D. I. (2008). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43(2), 134-179.
- Sabri, N.F.M., See, H.H. (2016) *eProceedings Chemistry 1*, 22-26
- Nikonenko, N. A., Buslov, D. K., Sushko, N. I., & Zhabankov, R. G. (2005). Spectroscopic manifestation of stretching vibrations of glycosidic linkage in polysaccharides. *Journal of Molecular Structure*, 752(1-3), 20–24.
- Noor, M. J., Ahmad, M., Ashraf, M. A., Zafar, M., & Sultana, S. (2015). A review of the pollen analysis of South Asian honey to identify the bee floras of the region. *Palynology (ahead-ofprint)*: 1-12.
- Oddo, L. P., Piro, R., Bruneau, É., Guyot-Declerck, C., Ivanov, T., Piskulová, J., ... & Ruoff, K. (2004). Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie*, 35(Suppl. 1), S38-S81.
- Ona, T., Sonoda, T., Ito, K., Shibata, M., Ootake, Y., Ohshima, J., Yokota, S. & Yoshizawa, N. (1999) Quantative FT-Raman spectroscopy to measure wood cell dimensions. *The Analyst* 124:1477–1480.
- Ouchemoukh, S., Schweitzer, P., Bey, M. B., Djoudad-Kadji, H., & Louaileche, H. (2010). HPLC sugar profiles of Algerian honeys. *Food Chemistry*, 121, 561–568.
- Panseri, S., Manzo, A., Chiesa, L. M., & Giorgi, A. (2013). Melissopalynological and volatile compounds analysis of buckwheat honey from different geographical origins and their role in botanical determination. *Journal of Chemistry*, 2013.

- Parra, G. N. (2001). Las abejas sin aguijón (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) de Colombia. *Biota Colombiana*, 2(3), 233-248.
- Pasandide, B., Khodaiyan, F., Mousavi, Z. E., & Hosseini, S. S. (2017). Optimization of aqueous pectin extraction from Citrus medica peel. *Carbohydrate Polymers*, 178, 27–33.
- Pasini, F., Gardini, S., Marcazzan, G. L., & Caboni, M. F. (2013). Buckwheat honeys: screening of composition and properties. *Food Chemistry*, 141(3), 2802-2811.
- Philip, D. (2009). Honey mediated green synthesis of gold nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 73(4), 650-653.
- Piljac-Žegarac, J., Stipčević, T. & Belščak, A. (2009). *Antioxidant properties and phenolic content of different floral origin honeys. Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* 1(2): 43-50.
- Rana, R., Müller, G., Naumann, A., & Polle, A. (2008). FTIR spectroscopy in combination with principal component analysis or cluster analysis as a tool to distinguish beech (*Fagus sylvatica* L.) trees grown at different sites.
- Rasmussen, C., & Cameron, S. A. (2010). Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biological Journal of the Linnean Society*, 99(1), 206-232.
- Ribeiro, R. D. O. R., Mársico, E. T., da Silva Carneiro, C., Monteiro, M. L. G., Júnior, C. A. C., Mano, S., & de Jesus, E. F. O. (2014). Classification of Brazilian honeys by physical and chemical analytical methods and low field nuclear magnetic resonance (LF 1H NMR). *LWT-Food Science and Technology*, 55(1), 90-95.
- Rios-Corripio, M. A., Rojas-López\*, M., & Delgado-Macuil, R. (2012). Analysis of adulteration in honey with standard sugar solutions and syrups using attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate methods. *CyTA-Journal of Food*, 10(2), 119-122.
- Roubik D. W. (1989) *Ecology and Natural History of Tropical Bees* Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K. 514 pp.

- Ruiz-Matute, A. I., Rodriguez-Sanchez, S., Sanz, M. L. & Martinez-Castro, I. (2010). Detection of adulterations of honey with high fructose syrups from inulin by GC analysis. *Journal of Food Composition and Analysis* 23(3): 273-276.
- Ruoff, K., Luginbühl, W., Künzli, R., Bogdanov, S., Bosset, J. O., von der Ohe, K., ... & Amadò, R. (2006). Authentication of the botanical and geographical origin of honey by front-face fluorescence spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(18), 6858-6866.
- Ruoff, K., Luginbühl, W., Bogdanov, S., Bosset, J. O., Estermann, B., Ziolk, T., & Amadò, R. (2006). Authentication of the botanical origin of honey by near-infrared spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(18), 6867-6872
- Ruoff, K., Luginbühl, W., Künzli, R., Iglesias, M. T., Bogdanov, S., Bosset, J. O., ... & Amadò, R. (2006). Authentication of the botanical and geographical origin of honey by mid-infrared spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(18), 6873-6880.
- Ruoff, K., Iglesias, M. T., Luginbühl, W., Bosset, J. O., Bogdanov, S., & Amadò, R. (2006). Quantitative analysis of physical and chemical measurands in honey by mid-infrared spectrometry. *European food research and technology*, 223(1), 22-29.
- Salzer, R., Steiner, G., Mantsch, H. H., Mansfield, J., & Lewis, E. N. (2000). Infrared and Raman imaging of biological and biomimetic samples. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 366(6), 712-726.
- Sanz, M. L., Gonzalez, M., De Lorenzo, C., Sanz, J., & Martinez-Castro, I. (2005). A contribution to the differentiation between nectar honey and honeydew honey. *Food chemistry*, 91(2), 313-317.
- Saxena, S., Gautam, S., & Sharma, A. (2010). Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food chemistry*, 118(2), 391-397.
- Shimadzu. (2006). Application FTIR Sugar Honey [Archivo PDF]. Obtenido de [https://shimadzu.com.au/sites/default/files/Appl\\_FTIR\\_Sugar-Honey\\_06D\\_en.pdf](https://shimadzu.com.au/sites/default/files/Appl_FTIR_Sugar-Honey_06D_en.pdf)

- Sivakesava, S., & Irudayaraj, J. (2001). Prediction of inverted cane sugar adulteration of honey by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of food science*, 66(7), 972-978.
- Socrates, G. (2001) Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies. John Wiley & Sons Ltd. West Sussex, England.
- Sousa, G. (2008). Composição e qualidade de méis de abelhas *Apis mellifera* e méis de abelha jataí (*Tetragonisca angustula*). São Paulo, Brasil: Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo.
- Stanimirova, I., Ustun, B., Cajka, T., Riddelova, K., Hajslova, J., Buydens, L. M. C. & Walczak, B. (2010). Tracing the geographical origin of honeys based on volatile compounds profiles assessment using pattern recognition techniques. *Food Chemistry* 118(1): 171-176.
- Subari, N., Saleh, J. M., Shakaff, A. Y. M., & Zakaria, A. (2012). A hybrid sensing approach for pure and adulterated honey classification. *Sensors*, 12, 14022–14040.
- Sajid, M., & Azim, M. K. (2012). Characterization of the nematocidal activity of natural honey. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(30), 7428-7434.
- Svečnjak, L., Prđun, S., Rogina, J., Bubalo, D., & Jerković, I. (2017). Characterization of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) nectar-to-honey transformation pathway using FTIR-ATR spectroscopy. *Food chemistry*, 232, 286-294.
- Terrab, A., Díez, M. J., & Heredia, F. J. (2002). Characterisation of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. *Food chemistry*, 79(3), 373-379.
- Terrab, A., González, A. G., Díez, M. J., & Heredia, F. J. (2003). Characterisation of Moroccan unifloral honeys using multivariate analysis. *European food research and technology*, 218(1), 88-95.
- Terrab, A., Recamales, A. F., Hernanz, D., & Heredia, F. J. (2004). Characterisation of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents. *Food Chemistry*, 88(4), 537-542.

- Tewari, J. C., & Irudayaraj, J. M. (2004). Quantification of saccharides in multiple floral honeys using Fourier transform infrared microattenuated total reflectance spectroscopy. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52, 3237–3243.
- Tewari, J. C., & Irudayaraj, J. M. (2005). Floral classification of honey using midinfrared spectroscopy and surface acoustic wave based z-Nose sensor. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53, 6955–6966.
- Universidad EAFIT. (06 de Agosto de 2022). *Abejas en EAFIT*. Obtenido de <https://www.eafit.edu.co/institucional/campus-eafit/universidad-parque/especies/Paginas/abejas-en-eafit.aspx>
- Villas-Bôas, J. K., & Malaspina, O. (2004). *Physicalchemical analysis of Melipona compressipes and Melipona seminigra honey of Boa Vista do Ramos*. Amazonas, Brazil.
- Vit, P. (2008). La miel precolombina de abejas sin aguijón (Meliponini) aún no tiene normas de calidad. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 42(3), 415-423.
- Vit, P., Medina, M., & Eunice, M. (2004). Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. *Bee world*, 85(1), 2-5.
- Von Der Ohe, W., Oddo, L. P., Piana, M. L., Morlot, M., & Martin, P. (2004). Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*, 35(Suppl. 1), S18-S25.
- Wang, Y. X., Xin, Y., Yin, J. Y., Huang, X. J., Wang, J. Q., Hu, J. L., ... & Nie, S. P. (2022). Revealing the architecture and solution properties of polysaccharide fractions from *Macrolepiota albuminosa* (Berk.) Pegler. *Food Chemistry*, 368, 130772.
- Wiercigroch, E., Szafraniec, E., Czamara, K., Pacia, M. Z., Majzner, K., Kochan, K., . . . Malek, K. (2017). Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 185, 317-335.

Wille, A., & Michener, C. D. (1973). The nest architecture of stingless bees with special reference to those of Costa Rica. *Revista de biologia tropical*, 21(supplemento 1), 1–279.

Yaghoobi, N., Al-Waili, N., Ghayour-Mobarhan, M., Parizadeh, S. M. R., Abasalti, Z., Yaghoobi, Z., ... & Ferns, G. A. A. (2008). Natural honey and cardiovascular risk factors; effects on blood glucose, cholesterol, triacylglycerole, CRP, and body weight compared with sucrose. *TheScientificWorldJournal*, 8, 463-469.

Yang, H., & Irudayaraj, J. (2002). Rapid determination of vitamine C by NIR, MIR and FT-Raman techniques. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 54(9), 1247–1255.

## Anexos

Figura 34 PCA muestras de Bochalema. Orden Cero

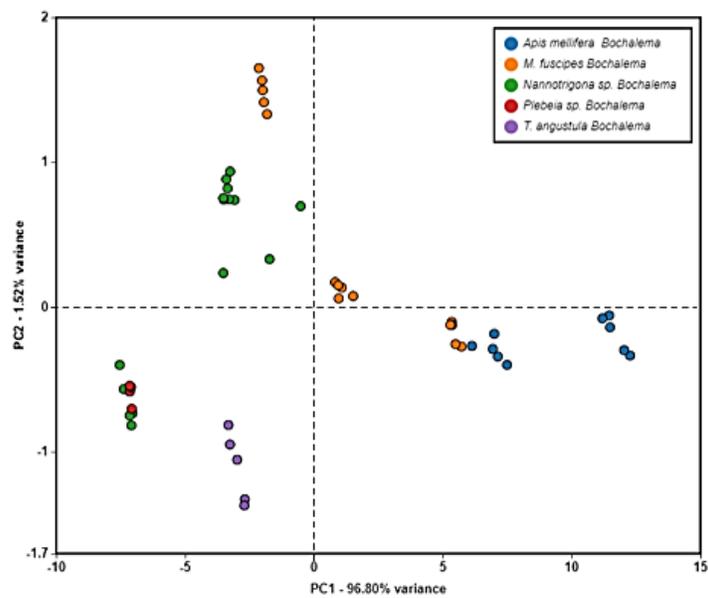
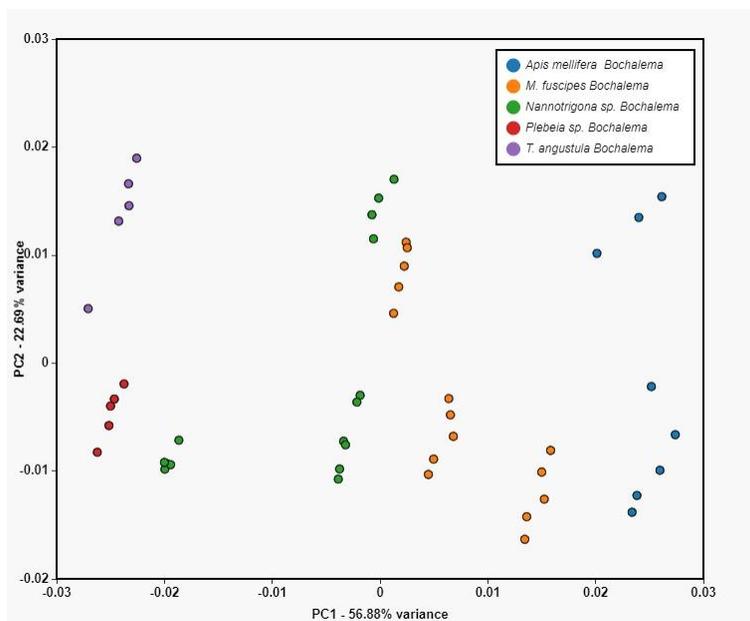
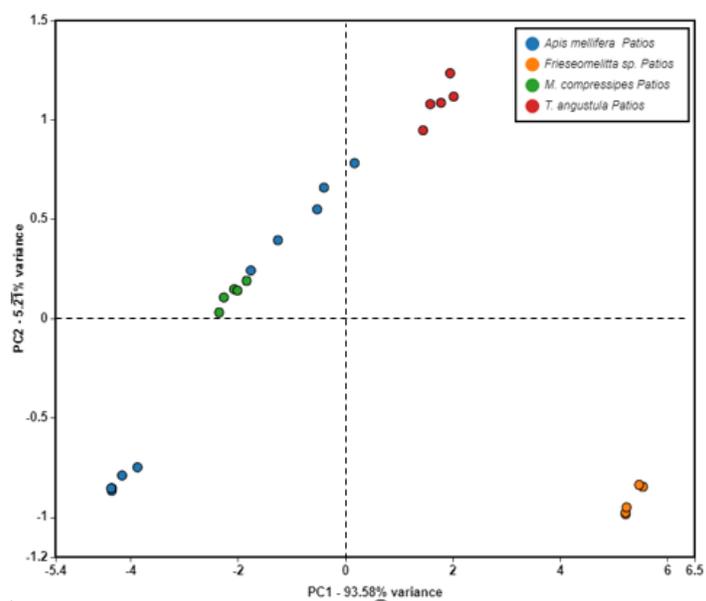
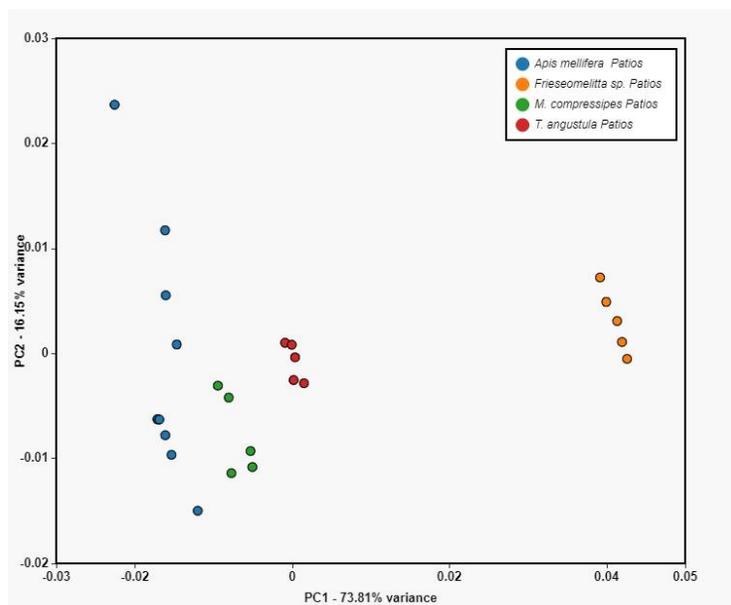
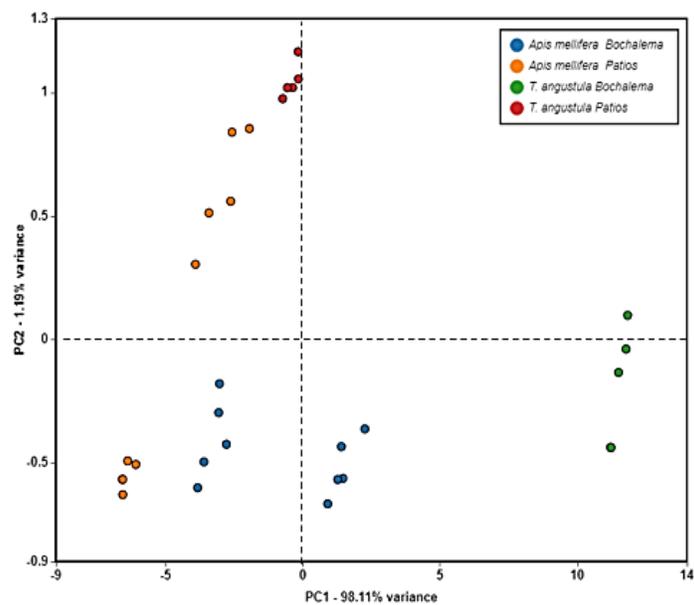


Figura 35 PCA muestras de Bochalema. Segunda derivada

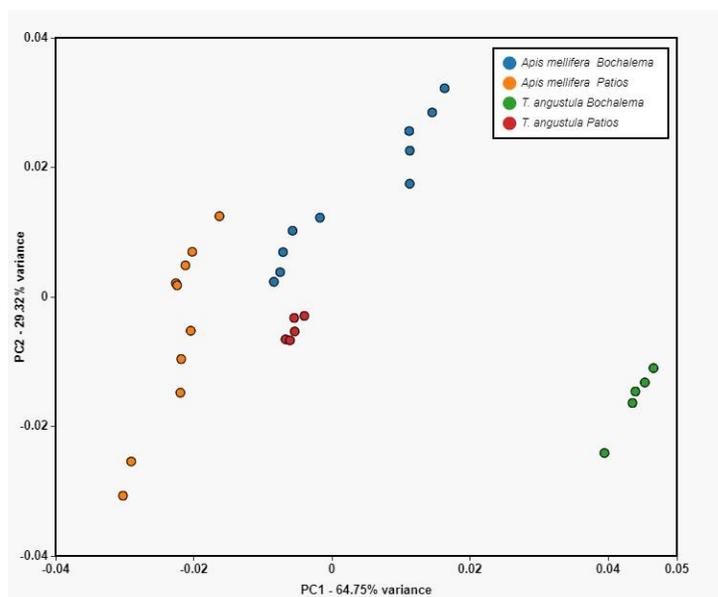


**Figura 36** PCA muestras de Los Patios. Orden Cero**Figura 37** PCA muestras de Los Patios. Segunda derivada

**Figura 38** PCA muestras comunes municipios de Bochalema y Los Patios. Orden Cero.

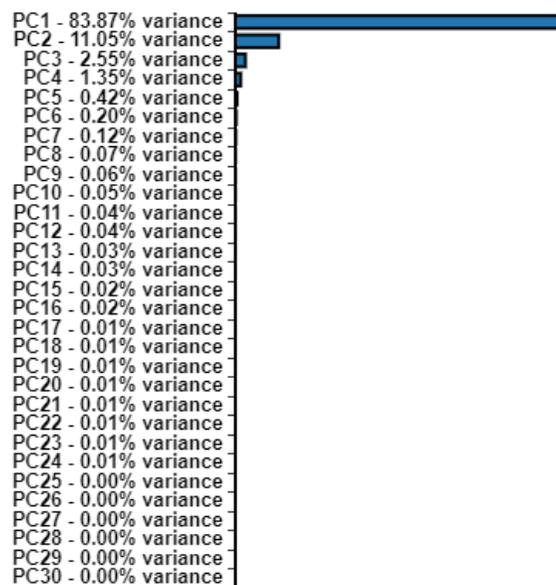


**Figura 39** PCA muestras comunes municipios de Bochalema y Los Patios. Segunda derivada



**Figura 40** Diagrama de barras para las mieles de las especies comunes de los municipios de Bochalema y

Los Patios



**Figura 41** Diagrama de barras para las mieles de las especies del municipio de Los Patios

