

**Efecto del tiempo de descristalizado en las
características fisicoquímicas de la miel
Zamorano**

Luis Eduardo Tuyuc Chex

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Noviembre, 2013

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Efecto del tiempo de descristalizado en las características fisicoquímicas de la miel Zamorano

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Luis Eduardo Tuyuc Chex

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2013

Efecto del tiempo de descristalizado en las características fisicoquímicas de la miel Zamorano

Presentado por:

Luis Eduardo Tuyuc Chex

Aprobado:

Francisco Javier Bueso, Ph.D.
Asesor Principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Departamento de Agroindustria
Alimentaria.

Blanca Carolina Valladares M.Sc.
Asesora

Raúl Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Efecto del tiempo de descrystalizado en las características fisicoquímicas de la miel Zamorano

Luis Eduardo Tuyuc Chex

Resumen: Para alargar la vida de anaquel de la miel se sometió al proceso de descrystalizado, el cual modificó las características fisicoquímicas afectando su calidad. Para Honduras los criterios de calidad de la miel son especificados por el Codex *Alimentarius*. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de dos tiempos de descrystalizado (20 y 40 min) a 50 °C en las características fisicoquímicas de la miel Zamorano. Se evaluó las mieles provenientes de las comunidades Bejucales y Dificultades del departamento El Paraíso. Se determinaron los parámetros de humedad, a_w , pH, °Brix, azúcares totales, perfil de azúcares, HMF y color. Se empleó un diseño completamente al azar con arreglo factorial de parcelas divididas donde las comunidades fueron las parcelas principales y los tiempos de descrystalizado fueron las subparcelas. Los resultados se analizaron en el paquete estadístico SAS 9.3[®] mediante un ANDEVA y separación de medias LSMeans “stderr pdiff adjust tukey” ($P < 0.05$). Entre comunidades no se encontraron diferencias significativas en a_w , °Brix, azúcares totales, sacarosa + maltosa, glucosa, fructosa y color; las mieles de ambas comunidades sí cumplieron con los estándares de calidad del Codex *Alimentarius* y la Unión Europea. El descrystalizado de 20 minutos fue el que mejor conservó las características físico químicas de la miel.

Palabras clave: color, estándares de identidad, HMF, perfil de azúcares.

Abstract: To extend the shelflife of the honey, a descrySTALLIZATION process was used to modify physicochemical traits. In Honduras the honey standards of quality are specified by the Codex *Alimentarius*. The objective of the study was to evaluate the effect of two descrySTALLIZATION times (20 and 40 minutes) at 50 °C to identify changes in the physicochemical characteristics of Zamorano’s honey. Honeys were evaluated in the communities of Bejucales and Dificultades from the department of El Paraíso. Humidity, a_w ; pH, °Brix, total sugars, sugar profile, HMF and color were determined. The experimental design was a split plot where the communities were the main plots and the descrySTALLIZATION times were the subplots. The results were analyzed in the statistical package SAS 9.3[®] by ANOVA and media separation LSMeans adjust pdiff stderr tukey ($P < 0.05$). Among communities no significant difference was found for a_w , °Brix, total sugars, sucrose, maltose, glucose, fructose and color. Honeys from both communities did match the quality standards of the Codex *Alimentarius* and EU. The descrySTALLIZATION process of 20 minutes best conserved the physicochemical characteristics of the honey.

Keywords: Color, HMF, identity standards, sugars profile

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de cuadros y anexos	v
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	2
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
4 CONCLUSIONES	13
5 RECOMENDACIONES	14
6 LITERATURA CITADA.....	15
7 ANEXOS	19

ÍNDICE DE CUADROS Y ANEXOS

Cuadro		Página
1.	Caracterización de la miel de las comunidades y estándares del Codex y la Unión Europea.	6
2.	Efecto del tiempo de descrystalizado en la humedad y HMF en la miel.....	8
3.	Efecto del tiempo de descrystalizado en el color de la miel.....	9
4.	Efecto del tiempo de descrystalizado en el pH de la miel.	10
5.	Efecto del tiempo de descrystalizado en °Brix y azúcares totales.....	10
6.	Efecto del tiempo de descrystalizado en la fructosa y glucosa de la miel.....	11

Anexo		Página
1.	ANDEVA de los factores de variación sobre la humedad y HMF en el descrystalizado de la miel.....	19
2.	ANDEVA de los factores de variación sobre el color en el descrystalizado de la miel.	19
3.	ANDEVA de los factores de variación sobre los °Brix, azúcares totales y relación fructosa/glucosa en el descrystalizado de la miel.....	20
4.	ANDEVA de los factores de variación sobre la sacarosa + maltosa, glucosa y fructosa en el descrystalizado de la miel.....	20
5.	ANDEVA de los factores de variación sobre el pH y a_w en el descrystalizado de la miel.....	20
6.	Resumen del ANDEVA de las variables evaluadas.....	21
7.	Efecto del tiempo de descrystalizado en la a_w , y sacarosa + maltosa de la miel.	21
8.	Composición química de la miel de abeja.....	22
9.	Caracterización de las mieles de las comunidades Dificultades y Selvas del municipio El Paraíso.....	22
10.	Otros azúcares presentes en la miel de abeja.....	23
11.	Estándares del Codex <i>Alimentarius</i> y Unión Europea.	23
12.	Correlación entre color y HMF.....	24
13.	Floración de especies predominantes del departamento de El Paraíso.	24
14.	Mapa del municipio de El Paraíso.....	25
15.	Mapa del municipio El Paraíso con sus localidades.....	25

16.	Condiciones de la columna Hi-plex Ca 7.7 × 300 mm, 8 μm	26
17.	Flujo de proceso	27
18.	Muestras de mieles de la comunidad Bejucales.	27
19.	Muestras de mieles de la comunidad Dificultades	28
20.	Cromatograma del descristalizado de miel de la comunidad Bejucales.....	28
21.	Cromatograma del descristalizado de miel de la comunidad Dificultades....	29
22.	Cromatograma de HMF de miel de la comunidad Bejucales.....	29
23.	Cromatograma de HMF de miel de la comunidad Dificultades.....	30
24.	Cromatograma de los estándares de azúcares	30
25.	Materiales, equipo, reactivos y estándares.	31

1. INTRODUCCIÓN

La miel es un producto natural producida por abejas *Apis mellifera* o por diferentes sub-especies, a partir del néctar de las flores o de secreciones de partes vivas extraflorales, que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, depositan, deshidratan, almacenan en panales (Codex 2001).

La composición físicoquímica de las mieles varía ampliamente y depende predominantemente de la composición del néctar, las condiciones climáticas y origen floral (Zandamela Mungói 2008 y Salamanca Grosso *et al.* 2001), estas varían dependiendo de las condiciones del almacenamiento y procesamiento que se le dé a la miel (Bulut y Kilic 2008). Durante el procesamiento la miel se calienta por lo general con el fin de reducir su viscosidad y evitar la cristalización o fermentación (Rizelio *et al.* 2012 y Hebbar 2003). El mantenimiento de la composición físicoquímica original es importante desde el punto de vista comercial debido a que determina la aceptación y el precio (Delmoro *et al.* 2010 y Salamanca Grosso *et al.* 2001).

La combinación de tiempo y temperatura en el proceso de descristalizado son uno de los factores más influyentes en las características físicoquímicas de la miel. La temperatura juega un papel importante en el proceso de pérdida y retención de agua que inducen cambios en actividad de agua (a_w), (Salamanca Grosso *et al.* 2001), degradación de azúcares (Subovsky *et al.* 2004) principalmente de fructosa y glucosa (Bogdanov 2011, Fallico *et al.* 2008, Zappala *et al.* 2005) dando como resultado un aumento de la concentración de 5- hidroximetil-2-furfural (HMF) produciendo cambios indeseables en el color (Fallico *et al.* 2009, Bulut y Kilic 2008, Terrab *et al.* 2004, Subovsky *et al.* 2003).

Este estudio consistió en evaluar cómo cambian siete componentes de la miel (Humedad, a_w , pH, color, perfil de azúcares, HMF y °Brix) al realizar el proceso de descristalizado a 20 y 40 minutos a una temperatura de $50\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$, procedentes de dos localidades del municipio El Paraíso. En este contexto se plantearon los siguientes objetivos.

- Determinar características físico químicas de la miel entre comunidades.
- Determinar el mejor tiempo de descristalizado que conserve las características físico químicas de la miel Zamorano.
- Comparar los resultados con los parámetros legales permisibles establecidos por el Codex *Alimentarius* y la Unión Europea.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio: El muestreo se realizó en la Planta de Miel y Derivados (PMD), el descristalizado y los análisis fisicoquímicos de la miel en el Laboratorio de Análisis de Alimentos (LAAZ) de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, localizada en el departamento de Francisco Morazán, a 32 Km al Este de Tegucigalpa, Honduras.

Materia prima. Las muestras fueron extraídas de los toneles de miel de la bodega de la Planta de Miel y Derivados, provenientes del departamento El Paraíso, municipio El Paraíso de las localidades: **Bejucales** ubicada a $13^{\circ}49'0.12''N$ y $86^{\circ}28'59.88''W$ con una zona de vida Bosque muy húmedo sub-tropical, precipitación media anual de 1800 mm, elevación de 1082 m.s.n.m, **Dificultades** ubicada a $14^{\circ}02'15''N$ y $85^{\circ}59'30''W$ con una zona de vida Bosque húmedo sub-tropical (Bhs), precipitación media anual de 980 mm, elevación de 776 m.s.n.m. (Mapas Honduras 2013, ERSAPS 2010, Méndez 2006, Maradiaga Pineda 2005).

Diseño experimental. Para este estudio se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) un arreglo factorial de parcelas divididas, donde las parcelas principales fueron las comunidades (Bejucales y Dificultades), y como subparcelas el tiempo de descristalizado (0 minutos, 20 y 40 minutos a $50^{\circ}C$). Se realizaron tres repeticiones para un total de 18 unidades experimentales.

Muestreo. La extracción de las muestras se realizó en la bodega de la PMD siguiendo la metodología de la norma chilena NCh617-2007, de la siguiente manera: las fechas de los lotes de cosechas muestreados para bejucales fueron el 13, 27 y 30 de mayo del 2013, para Dificultades fueron el 9, 9 y 23 de mayo del 2013.

- a) Identificación y cuantificación de los toneles de miel de tres lotes por comunidad a muestrear.
- b) Se muestreó todos los toneles de miel correspondientes a cada lote, haciendo uso de una paleta y un embudo para trasvasarla a botellas PET.
- c) Se trató que el volumen de la muestra extraída por tonel fuera equivalente a la cantidad de toneles del lote correspondiente.
- d) Se obtuvo tres botellas de miel de 660 g por cada lote (Coll Cárdenas *et al.* 2008).
- e) Se etiquetó e identificó cada uno de los frascos de miel con: lote, fecha de cosecha, fecha de muestreo, código del tratamiento de descristalizado a realizarse.

- f) El almacenamiento de las muestras de miel se realizó a una temperatura de $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. con una humedad relativa de 49% (Norma chilena 2007).

Descristalizado de las muestras. Las botellas de miel se vaciaron en un recipiente de polipropileno con capacidad de 3 L para su homogenización. Las botellas de miel identificadas como control únicamente se decantaron para eliminar restos de insectos, granos de arena, trozos de panal, restos de cera, polvo y otros sólidos insolubles (Codex 1999).

Luego del homogenizado y decantado se realizó el descristalizado en baño de maría, se esperó que la miel llegara a una temperatura de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, después se comenzó a contar los 20 o 40 minutos que duró el tratamiento térmico correspondiente a cada unidad experimental. Se utilizó un termómetro para asegurar que la temperatura del tratamiento durante los 20 y 40 minutos fuera $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$. La miel se agitó por intervalos de 5 minutos durante 30 segundos sin sacarlo del baño de maría para lograr un calentamiento más uniforme.

Terminado el descristalizado para cada una de las unidades experimentales, se dejó enfriar a temperatura ambiente luego se procedió a realizar los análisis físicos y químicos en el siguiente orden.

Medición de humedad. La medición de humedad se realizó por duplicado para cada unidad experimental, basándose en el procedimiento operativo estandarizado (POE) de la PMD y el método oficial de la AOAC 969.38 utilizando el refractómetro Pocket PAL 22S (ATAGO), reportando las unidades en % (g de agua/100g de miel).

Actividad de agua. Se realizó por duplicado para cada unidad experimental, basándose en POE del LAAZ y el método oficial de la AOAC 978.18 utilizando el AquaLab 3TE 0102875, reportando la medición de 0 a 1 equivalente a la humedad relativa de equilibrio que va de 0 a 100% de humedad relativa.

Medición de pH. Se realizó por duplicado para cada unidad experimental basándose en el POE del LAAZ y el método oficial de la AOAC 973.41 utilizando el potenciómetro Thermo Scientific Orion Star.

Medición de color. La medición de color se hizo por triplicado para cada unidad experimental, se basó en el POE del LAAZ utilizando el colorímetro Colorflex Hunter Lab 45/0. Dónde: L = 0 es negro y 100 es blanco, a = negativo es verde y positivo rojo, b = negativo es azul y positivo amarillo. (Kasperová *et al.* 2012, Terrab *et al.* 2003) Los valores fueron reportados como L,a,b.

Perfil de azúcares. Se pesó 100 mg de cada uno de los estándares de sacarosa, maltosa, glucosa y fructosa, se disolvieron en una solución de agua desionizada (H₂O DI) y alcohol relación 1:1 se aforó en un matraz volumétrico de 50 mL. La solución del estándar se colocó en el sonificador por media hora, se trasvasó 1.5 mL en viales ámbar haciendo uso de una jeringa de 3 mL con econofiltro de 0.45 µm PTFE.

Para la cuantificación de fructosa, glucosa, sacarosa + maltosa se basó en el método oficial de la AOAC 982-14 y POE correspondiente del LAAZ. Se pesó 3 gramos de miel por duplicado de cada unidad experimental en tubos de centrifuga de 100 mL, se añadió 50 mL de solución alcohol-H₂O DI relación 1:1, se tapó con papel aluminio y se agitó en el vortex por 1 minuto, se colocó en un baño de maría a 80 °C ± 5 °C por 25 minutos durante dicho lapso de tiempo se agitó nuevamente en el vortex por 10 segundos, se trasvasó 1.5 mL de la solución en viales ámbar haciendo uso de jeringas de 3 mL con econofiltro de 0.45 µm, se inyectaron con el automuestreador del HPLC. Las condiciones cromatográficas fueron: inyección de 5 µL, temperatura de la columna 85 °C (baño maría a 88 °C), columna Hi-plex Ca 300×7.7 mm fase móvil H₂O DI, velocidad de flujo 0.6 ml/min, tiempo de corrida 30 min detector IR. (Contreras Gutiérrez 2011).

La cuantificación de los azúcares se hizo con base en el área y concentración promedio de cada uno de los estándares por el área del cromatograma del azúcar identificado luego se multiplicó por el factor de dilución reportando los datos como gramos de azúcar en 100 gramos de miel.

Cuantificación de HMF. Se usó el plan de calibración y validación interna para la determinación de 5-Hidroximetilfurfural por HPLC según el método empleado por Windsor *et al.* (2012), Xu Quing *et al.* (2007), Li y Xiu-yang (2005) y Rufian *et al.* (2001). Se pesó 5 gramos de miel por duplicado de cada unidad experimental en tubos de centrifuga de 100 mL se añadió 25 mL de H₂O DI, se tapó con papel aluminio y se agito en el vortex por 1 minuto, se aforó con H₂O DI en un matraz volumétrico de 50 mL. se agitó manualmente por espacio de 30 segundos (Alabdeen Makawi *et al.* 2009, Fallico *et al.* 2009, Norma Chilena 2006).

Se trasvasó 1.5 mL de la solución en viales ámbar haciendo uso de jeringas de 3 mL con econofiltro de 0.45 µm, las condiciones cromatográficas fueron: volumen de inyección de 20 µL, fase móvil 95% H₂O DI y 5% acetonitrilo, velocidad de flujo 0.7 ml/min, tiempo de corrida 10 min y detector DAD, columna LC ZORBAX Eclipse XDB-C 18, 4.6 × 150 mm, 5 µm, *guard cartridge column* empacado con *analytical guard column* Eclipse XDB-C 18, 4.6 × 12.5 mm, 5 µm; *capilar Peek* 0.007'' id (Ixcotoyac Cabrera y Tuyuc Chex 2013)

La cuantificación del HMF se hizo con base en el área bajo la curva (y) en la ecuación de la calibración correspondiente al HMF se sustituyen el área obtenido en el cromatograma para obtener la concentración (x) en mg/ml de solución para multiplicarlo por el volumen de dilución, luego se multiplica por 100 y se divide entre el peso de la muestra para obtener y reportar mg de HMF/ kg de miel.

Medición de °Brix. La medición de los sólidos disueltos se realizó por duplicado para cada unidad experimental, se basó en el método oficial de la AOAC 932.14 utilizando un refractómetro - Pocket PAL -3 (ATAGO).

Análisis estadístico. Se llevó a cabo con el programa estadístico “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.3[®]). Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para determinar diferencias entre los tratamientos, para evaluar la interacción de los factores se realizó una separación de medias con LSMMeans, en caso de no haber interacción entre los factores se utilizó Tukey ajustado con un nivel de significancias ($P < 0.05$). Niveles de significancia menor a 0.05 indicaron diferencia significativa entre los resultados y niveles de significancia mayores a 0.05 indicaron no diferencia significativa entre los resultados.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de la miel. Los análisis de humedad, a_w , pH, °Brix, azúcares totales, sacarosa + maltosa, glucosa, fructosa, HMF y color determinaron que la miel de Bejucales y Dificultades tuvieron composición y color similares (Cuadro1), a los reportados en otro estudio por Maradiaga Pineda (2005), en las mismas comunidades y en fechas similares de cosecha.

El análisis de varianza determinó que no hubo diferencias significativas ($F= 0.64, 0.09, 2.18, 0.03, 0.72, 3.35, 0.13, 0.20, P = 0.45, 0.09, 0.18, 0.87, 0.42, 0.11, 0.73, 0.66$) en a_w , °Brix, azúcares totales, sacarosa + maltosa, glucosa, fructosa, relación fructosa/glucosa y color entre las comunidades Bejucales y Dificultades, sin embargo para: humedad, pH y HMF el análisis de varianza no determinó diferencias significativas ($F= 29.12, 99.19, 281, P = <0.01, <0.01, <0.01$) concordando con los datos obtenidos por (Maradiaga Pineda 2005). Las mieles de Bejucales y Dificultades cumplieron con los parámetros legales de humedad, HMF, sumatoria de azúcares reductores establecidos por el Codex y la Unión Europea.

Cuadro 1. Caracterización de la miel de las comunidades y estándares del Codex y la Unión Europea.

Factores	Comunidad		Codex	Unión Europea
	Bejucales	Dificultades		
Humedad (g de agua/100g)	15.93 ^b	16.30 ^a	≤ 20 g/100g	≤ 20 g/100g
a_w	0.57 ^a	0.57 ^a		
Ph	3.74 ^b	3.82 ^a		
°Brix	81.70 ^a	80.90 ^a		
Azúcares totales (g/100g)	75.34 ^a	75.06 ^a		
Sacarosa + maltosa (g/100g)	5.86 ^a	5.98 ^a		
Glucosa (g/100g)	32.02 ^a	32.72 ^a	≥ 60 g/100 g	≥ 60 g /100 g
Fructosa (g/100g)	37.45 ^a	36.37 ^a	(Sumatoria de azúcares reductores).	(Sumatoria de azúcares reductores).
Relación g fructosa/g glucosa	1.17 ^a	1.11 ^a		
HMF (mg/kg)	8.78 ^b	10.07 ^a	≤ 40 mg/kg	≤ 40 mg/kg
L	43.26 ^a	41.81 ^a		
A	7.05 ^a	5.96 ^a		
B	22.68 ^a	21.89 ^a		

^{a-b} Tratamientos seguidos de diferente letra en la misma fila son diferentes ($P<0.05$)

Efecto del tiempo de descristalizado. El análisis de varianza determinó diferencias significativas ($F= 40.30, 162.30, 32.03, 5.50, 5.11, 3.58, 3.68, P = <0.01, <0.01, <0.01, 0.03, 0.02, 0.04, 0.04$) entre los tratamientos con respecto a humedad, HFM, color, °Brix, azúcares totales, glucosa y fructosa; mientras que para las variables de a_w , pH, sacarosa + maltosa no se encontraron diferencias significativas ($F= 1.82, 15.13, 1.29, P = 0.21, <0.01, 0.36$).

Efecto del tiempo de descristalizado en la humedad y la producción de HMF en la miel. El análisis de varianza determinó que el tiempo descristalizado afectó significativamente ($P<0.05$) el contenido inicial de humedad y HMF. Aunque los factores influyeron significativamente, la interacción lote de cosecha \times comunidad ejercieron un efecto superior ($F=127.1, 479.6, P = <0.01, <0.01$).

Según la prueba “LSMeans adjust tukey” ($P<0.05$), el descristalizado (50 °C por 20 minutos y 50 °C por 40 minutos) no influyó en la pérdida de humedad de la miel de Bejucales, pero sí para un descristalizado a 50 °C por 40 minutos para la miel de Dificultades (Cuadro 2).

La formación de HMF no fue significativa al realizar el descristalizado (50 °C por 20 minutos y 50 °C por 40 minutos) para ambas comunidades, las diferencias en formación de HMF entre comunidades se debe al contenido inicial de cada una de las mieles, la comunidad Dificultades presentó el mayor contenido de humedad y HMF comparada a la miel proveniente de Bejucales a esto se puede atribuir la diferencia entre tratamientos (Cuadro 2).

Como consecuencia del aumento del tiempo de descristalizado de la miel, se incrementó la formación de HMF en la miel (Ribeiro *et al.* 2012, Bogdanov 2011, Ajlouni *et al.* 2010 Subovsky *et al.* 2004). La cantidad máxima de HMF que se formó realizando un descristalizado a 50 °C por 40 minutos fue menor a 1 mg/kg de miel para ambas comunidades (Cuadro 2), el cual está por debajo del límite establecido por el Codex Alimentarius y Unión Europea (para ambos ≤ 40 mg HMF/kg de miel), lo que nos permite poder exportar a Europa si en algún determinado momento se quisiera exportar.

Cuadro 2. Efecto del tiempo de descristalizado en la humedad y HMF en la miel.

Comunidad	Tratamiento	Humedad (%) Media \pm DE [‡]	HMF (mg/kg) Media \pm DE [‡]
Bejucales	Control	15.93 \pm 0.44 ^{bc}	8.79 \pm 1.25 ^b
	D 50 °C 20 min ^β	15.83 \pm 0.35 ^{bc}	8.88 \pm 1.28 ^b
	D 50 °C 40 min ^γ	15.75 \pm 0.30 ^c	9.07 \pm 1.26 ^b
Dificultades	Control	16.30 \pm 0.56 ^a	10.07 \pm 2.04 ^a
	D 50 °C 20 min ^β	16.10 \pm 0.58 ^{ab}	10.36 \pm 2.26 ^a
	D 50 °C 40 min ^γ	15.83 \pm 0.51 ^{bc}	10.59 \pm 2.27 ^a

^{a-c} Tratamientos seguidos de diferente letra en la misma columna son diferentes (P<0.05)

[‡]DE Desviación Estándar.

^βDescristalizado 50 °C 20 minutos

^γ Descristalizado 50 °C 40 minutos

Efecto del tiempo de descristalizado en el color de la miel. El análisis de varianza determinó que el tiempo de descristalizado afectó significativamente (P<0.05) el color inicial de la miel. Todos los factores contribuyeron significativamente (P<0.05). Aunque los factores influyeron significativamente, la interacción del lote de cosecha \times comunidad ejercieron un efecto superior (F=120.6, 44.88, 16.80 P = <0.01, <0.01, <0.01).

Según la prueba “LSMeans adjust tukey” (P<0.05), el descristalizado a 50 °C por 20 minutos no influyó en el color de la miel para ambas comunidades no así con el descristalizado a 50 °C por 40 minutos que influyo en el color de la miel haciéndola más oscura y rojiza para ambas comunidades (Cuadro 3).

A pesar de que el análisis de varianza determinó que por lo menos existe un tratamiento diferente para b (amarillo) (F= 7.63, P = <0.01), la prueba de separación de medias no encontró diferencias entre los tratamientos. Esto se puede atribuir a que la opción adjust = tukey, incrementó la rigurosidad entre las medias de los tratamientos para declarar significancia estadística, por lo tanto no se encontraron diferencias. El descristalizado (50 °C 20 por minutos y 50 °C por 40 minutos) no causó cambios significativos en color amarillo (Cuadro 3).

Existe una correlación (P = <0.01, <0.01, <0.01) entre los valores L, a, b (0.77, -0.73, 0.70) con respecto a la cantidad de HMF que se forman en la miel; existe una correlación positiva entre los valores L, b con respecto a la formación de HMF y una correlación inversa entre a y la formación HMF. Indicando que a medida que se incrementa la cantidad de HMF se vuelve más oscura, ligeramente amarillenta y menos rojiza.

La variabilidad de color en la miel es debido a la naturaleza del néctar en el momento de la cosecha, la acumulación de polifenoles, aminoácidos libres y el tiempo de almacenamiento (Salamanca Grosso y Serra Belenguer 2002).

La degradación de los compuestos fenólicos genera como respuesta una tasa de empardeamiento de la miel debido a la interacción de varios factores como lo son: la baja actividad de agua y pH que ayudan a la reacción de maillard, formación de HMF y la combinación de tiempo temperatura en el descristalizado. (Bulut y Kilic 2008, Fallico *et al.* 2004, Salamanca Grosso y Serra Belenguer 2002).

El Codex *Alimentarius* y Unión Europea no establecen parámetros de color, lo que nos permite comercializar la miel de ambas comunidades con los dos tiempos de descristalizado.

Cuadro 3. Efecto del tiempo de descristalizado en el color de la miel.

Comunidad	Tratamiento	L	a	b
		Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE
Bejucales	Control	43.26 ± 6.35 ^a	7.04 ± 3.85 ^{ab}	21.48 ± 0.94 ^a
	D 50 °C 20 min ^β	40.34 ± 5.50 ^{ab}	7.50 ± 2.96 ^{ab}	22.68 ± 0.40 ^a
	D 50 °C 40 min ^γ	39.47 ± 4.74 ^b	9.08 ± 3.21 ^a	22.71 ± 1.34 ^a
Dificultades	Control	41.81 ± 7.03 ^{ab}	5.96 ± 2.21 ^b	21.22 ± 2.73 ^a
	D 50 °C 20 min ^β	41.40 ± 4.63 ^{ab}	6.61 ± 2.04 ^{ab}	21.89 ± 1.21 ^a
	D 50 °C 40 min ^γ	39.08 ± 6.29 ^b	6.70 ± 0.47 ^{ab}	22.44 ± 2.14 ^a

^{a-e} Tratamientos seguidos de diferente letra en la misma columna son diferentes (P<0.05)

^fDE Desviación Estándar.p

^β Descristalizado 50 °C 20 minutos

^γ Descristalizado 50 °C 40 minutos

Efecto del tiempo de descristalizado en el pH de la miel. El análisis de varianza determinó que los factores que contribuyeron significativamente (P<0.05) fueron lote de cosecha y la comunidad siendo la comunidad el factor de mayor peso (F= 99.19 P = <0.01). Según la prueba de Tukey ajustado (P<0.05) el descristalizado (50 °C 20 minutos y 40 minutos) no ocasionó cambios significativos en pH inicial de la miel para ambas comunidades (Cuadro 4).

El Codex *Alimentarius* y Unión Europea no establecen parámetros de pH, lo que nos permite comercializar la miel de ambas comunidades con los dos tiempos de descristalizado.

Cuadro 4. Efecto del tiempo de descristalizado en el pH de la miel.

Comunidad	Tratamiento	pH
		Media \pm DE [‡]
Bejucales	Control	3.74 \pm 0.03 ^b
	Descristalizado 50 °C 20 minutos	3.74 \pm 0.02 ^b
	Descristalizado 50 °C 40 minutos	3.74 \pm 0.02 ^b
Dificultades	Control	3.83 \pm 0.05 ^a
	Descristalizado 50 °C 20 minutos	3.81 \pm 0.04 ^a
	Descristalizado 50 °C 40 minutos	3.81 \pm 0.02 ^a

^{a-b} Tratamientos seguidos de diferente letra son diferentes (P<0.05)

[‡]DE Desviación Estándar.

Efecto del tiempo de descristalizado en la degradación de azúcares. El análisis de varianza determinó que el factor que contribuyó significativamente (P<0.05) a la diferencia entre el tiempo de descristalizado para °Brix y Azúcares totales fue tiempo del descristalizado (F= 8.68, 18.74, P = 0.03, <0.01). Según la prueba de Tukey (P<0.05) para un tiempo de descristalizado de 20 y 40 minutos no hubieron diferencias significativas en °Brix para ambas comunidades; el tiempo de descristalizado de 20 y 40 minutos no influyó en la pérdida de azúcares totales para la comunidad Bejucales, pero sí un tiempo de 40 minutos para miel de Dificultades (Cuadro 5).

La cantidad de °Brix y azúcares totales en las muestras concuerdan con (Maradiaga Pineda 2005, Bogdanov 2011), los °Brix representan el 95% al 99% de los sólidos solubles totales lo que constituyen del 78% al 82% de la composición total de la miel (Subovsky *et al.* 2003).

El Codex *Alimentarius* y Unión Europea no establecen parámetros de °Brix y azúcares totales para la miel, lo que nos permite comercializar la miel de ambas comunidades con los dos tiempos de descristalizado.

Cuadro 5. Efecto del tiempo de descristalizado en °Brix y azúcares totales

Comunidad	Tratamiento	°Brix	Azúcares totales
		Media \pm DE [‡]	(g/100 g) Media \pm DE [‡]
Bejucales	Control	81.07 \pm 0.40 ^a	75.34 \pm 0.59 ^a
	D 50 °C 20 min ^β	80.85 \pm 0.26 ^{ab}	72.22 \pm 1.86 ^{ab}
	D 50 °C 40 min ^γ	80.68 \pm 0.08 ^{ab}	69.17 \pm 2.14 ^{ab}
Dificultades	Control	80.87 \pm 0.19 ^{ab}	75.06 \pm 3.23 ^a
	D 50 °C 20 min ^β	80.77 \pm 0.14 ^{ab}	71.13 \pm 2.94 ^{ab}
	D 50 °C 40 min ^γ	80.60 \pm 0.17 ^b	66.05 \pm 1.59 ^b

^{a-b} Tratamientos seguidos de diferente letra en la misma columna son diferentes (P<0.05)

[‡]DE Desviación Estándar.

^β Descristalizado 50 °C 20 minutos

^γ Descristalizado 50 °C 40 minutos

El análisis de varianza determinó que el tiempo de descristalizado fue el factor que contribuyó significativamente ($F= 13.62, 11.31, P = 0.04, 0.04$) a la pérdida de fructosa y glucosa. Según la prueba de Tukey ($P<0.05$) para un tiempo de descristalizado de 20 y 40 minutos, no hubieron diferencias significativas en fructosa para ambas comunidades, pero para el tiempo de descristalizado de 40 minutos la cantidad de glucosa de la miel se redujo significativamente (Cuadro 6).

Parte de la pérdida gradual de azúcares causado por el descristalizado de miel se debe a la deshidratación de la glucosa y fructosa formando HMF, compuestos furanos como el furfural y reacción de maillard (Ribeiro *et al.* 2012, Ajlouni *et al.* 2010, Subovsky *et al.* 2004)

Según el Codex Alimentarius y Unión Europea ($\geq 60\text{g}/100\text{g}$ la sumatoria de azúcares reductores para ambos) la miel descristalizada a $50\text{ }^\circ\text{C}$ con un tiempo de 20 y 40 minutos no sobrepasan los límites de aceptación. Lo que nos permite comercializar la miel de ambas comunidades.

Cuadro 6. Efecto del tiempo de descristalizado en la fructosa y glucosa de la miel.

Comunidad	Tratamiento	Fructosa	Glucosa
		(g/100 g) Media \pm DE [‡]	(g/100 g) Media \pm DE [‡]
Bejucales	Control	37.4 \pm 0.98 ^a	32.03 \pm 0.71 ^a
	D 50 $^\circ\text{C}$ 20 min [‡]	35.1 \pm 0.39 ^{ab}	31.33 \pm 1.44 ^{ab}
	D 50 $^\circ\text{C}$ 40 min [‡]	33.6 \pm 1.90 ^{ab}	28.81 \pm 0.29 ^{ab}
Dificultades	Control	36.4 \pm 0.51 ^{ab}	32.71 \pm 2.76 ^a
	D 50 $^\circ\text{C}$ 20 min [‡]	34.4 \pm 2.17 ^{ab}	30.84 \pm 0.96 ^{ab}
	D 50 $^\circ\text{C}$ 40 min [‡]	32.3 \pm 1.50 ^b	28.10 \pm 0.17 ^b

^{a-b} Tratamientos seguidos de diferente letra en la misma columna son diferentes ($P>0.05$)

[‡]DE Desviación Estándar.

[‡] Descristalizado 50 $^\circ\text{C}$ 20 minutos

[‡] Descristalizado 50 $^\circ\text{C}$ 40 minutos

El análisis de varianza determinó que ningún tiempo de descristalizado fue diferente en a_w ($P<0.05$) indicando que el efecto del tiempo de descristalizado (50 $^\circ\text{C}$ durante 20 y 40 minutos) no ocasionó pérdida significativa de a_w en los tratamientos. Esto concuerda con datos obtenidos por Lazcano Hernández *et al.* (2012) donde la A_w con una temperatura de 50 $^\circ\text{C}$ se mantiene. La a_w promedio entre comunidad y los tratamientos fue 0.56.

El tiempo de descristalizado no ocasionó pérdidas significativas de sacarosa + maltosa en la miel, con un promedio de 5.8 g de sacarosa + maltosa/100 g de miel entre comunidad y los tratamientos.

Los resultados obtenidos del perfil de azúcares por HPLC detectaron el azúcar rafinosa en todas las muestras de mieles, debido a que no se cuenta con estándar este no se pudo cuantificar. La rafinosa se encuentra únicamente en mieles de origen de mieladas (Bogdanov 2011, European 2002). La rafinosa se detectó en un tiempo promedio de retención de 9.57 minutos concordando con las condiciones de la casa comercial Agilent Technologies (Ball *et al.* 2011). Bajo las condiciones cromatográficas y el tipo de columna utilizada no fue posible separar la sacarosa de la maltosa concordando con la casa comercial Agilent Technologies (Ball *et al.* 2011).

Las variaciones encontradas en las características físico químicas de la miel por comunidad se deben en gran parte por la vegetación de la zona, existiendo bastante similitud con los datos obtenidos por Maradiaga Pineda (2005); según los análisis melisopalinológicos de mieles hechos por (Méndez 2006) se encontró predominancia de la familia fabaceae, reportó valores superiores al 50% para el caso de Bejucales y en la comunidad Dificultades reportó mayor representación de Commelinaceae con valores superiores al 57% (Méndez 2006).

A lo anterior se le atribuye que la humedad, pH, color y los azúcares existentes mostrarán diferencias significativas entre los diferentes tiempos de descristalizado concordando con Ajlouni y Sujirapinyokul (2010)

La relación de fructosa/glucosa (g de fructosa/g de glucosa) para la miel de la comunidad Bejucales fue de 1.17 y para la de dificultades 1.12, datos similares reportados por Maradiaga Pineda (2005).

4. CONCLUSIONES

- Todas la muestras de miel Zamorano contenían rafinosa, indicador que las mieles contenían producto de mielada.
- El descristalizado a 50 °C por 20 minutos fue el tratamiento que mejor conservó las características fisicoquímicas de la miel Zamorano.
- Las mieles de ambas comunidades sí cumplieron con los estándares de calidad del *Codex Alimentarius* y la Unión Europea.

5. RECOMENDACIONES

- Evaluar el tiempo de decristalizado con otros parámetros establecidos por el Codex *Alimentarius* y Unión Europea como: acidez libre, actividad de diastasa y conductividad eléctrica.
- Ampliar y mejorar con un muestreo exhaustivo a los proveedores de materia prima en diferentes épocas del año.
- Utilizar una columna cromatográfica en el HPLC que pueda separar la sacarosa y maltosa para verificar si existe adulteración por sacarosa.
- Utilizar el “Thermostatted Column Compartment” G1316B SL en la cuantificación de azúcares evitando variaciones en temperatura de la columna para obtener datos más precisos en el HPLC.
- Realizar la calibración y validación interna del método con estándares de azúcares en HPLC más recientes en el rango de detección de la Columna Hi Plex Ca 300 × 7.7 mm 8 μm.
- Realizar una curva de calibración y validación para furfural.

6. LITERATURA CITADA

Ajlouni, D y P. Sujirapinyokul. 2010. Hydroxymethylfurfuraldehyde and amylase contents in Australian honey. *Food Chemistry* 119(3):1000-1005

Alabdeen Makawi, S. Z., M. Idrees Taha., B. Ahmed Zakaria., B, Siddig., H. Mahmud., A.R. Mohamed Elhussein y E.A. Gad Kariem. 2009. Identification and Quantification of 5-Hydroxymethyl Furfural HMF in Some Sugar-Containing Food Products by HPLC. *Pakistan Journal of Nutrition* 8(9):1391-1396.

AOAC INTERNATIONAL. 2005. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. Howitz, W., G.W. Latimer Jr. (ed.). 18th Edition. Maryland. USA. 51 Chapter.

Ball, S., S. Bullock., L. Lloyd y K. Mapp. 2011. Agilent Hi-Plex Columns. Applications Compendium Agilent Technologies, Inc. 98 p.

Bogdanov, S. 2011. Book of Honey (en línea). Consultado el 3 de noviembre de 2013 disponible en <http://www.bee-hexagon.net/>

Bulut, L y M. Kilic. 2008. Kinetics of hydroxymethylfurfural accumulation and color change in honey during storage in relation to moisture content. *Journal of Food Processing and Preservation* 33(1):22–32.

Codex *Alimentarius*. 2001. FAO/OMS Codex norma para la miel, Codex Stan 12-1981, Rev. 1987 y 2001. 9p.

Coll Cárdenas, F., C. Villat, G. Laporte, M. Noia y N. Mestorino. 2008. Características microbiológicas de la miel. *Revisión bibliográfica. Veterinaria Cuyana* 3 (1):29-3

Comisión de Codex *Alimentarius*. 1999. Programa conjunto FAO/OMS. Sobre normas alimentarias. Comité del Codex sobre los azúcares, séptimo periodo de sesiones, Londres, Reino Unido 9-11 de febrero de 2000, Proyecto de norma revisado del Codex de miel. 38p.

Contreras Gutiérrez, J.C. 2011. Efecto de la temperatura y concentración de ácido sulfúrico en el perfil de azúcares obtenido del pretratamiento de aserrín de *Pinus oocarpa*. Tesis Ing. Agroindustria Alimentaria. Honduras, Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 21 p.

Delmoro, J., D. Muñoz, V. Nadal, A. Clementz y V. Pranzetti. 2010. El color en los alimentos: determinación de color en mieles. 13(25):145-152.

Ente regulador de los servicios de agua potable y saneamiento (ERSAPS). 2010. Información general El Paraíso (en línea). Consultado el 22 de agosto de 2013. Disponible en: <http://www.ersaps.hn/mapas/archivos/0704%20El%20Paraiso>

European Comission Health & Consumer Protection Directorate General. 2002. Opinion of the Scientific Committee on veterinary measures relating to public health on honey and microbiological hazards. Directorate C-Scientific Opinions. Council Directive 2001/110/EC relating to honey. 40p.

Fallico, B., M. Zappala, E. Arena, y A. Verzera A. 2004. Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. Food Chemistry 85(2): 305–313.

Fallico, B., E. Arena y M. Zappala. 2008. Degradation of 5-Hydroxymethylfurfural in Honey. Journal of Food Science 73(9):625-631.

Fallico, B., E. Arena y M. Zappala. 2009. Prediction of Honey Shelf Life, Journal of Food Quality 32 (3) 352–368. USA.

Hebbar, H.U., K.E. Nandini, M.C. Lakshmi y R. Subramanian. 2003. Microwave and Infrared Heat Processing of Honey and Its Quality. Food Science and Technology 9 (1):49–53.

Ixcotoyac Cabrera, E. R., y L.E. Tuyuc Chex. 2013. Plan de calibración y validación preliminar: Determinación de 5- Hidroximetilfurfural por HPLC. LAA –PY-004-B03. 19p.

Kasperová, J., J. Nagy, P. Popelka, Z. Dicáková, A. Nagyová y P. Mala. 2012. Physico-chemical indicators and identification of selected Slovak honeys based on colour measurement. University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Kosice, Slovak Republic 81:057-067.

Lazcano Hernández, M., O. Portillo Moreno, D. Santiago Pereira y A.L. Ronquillo Téllez. 2012. Determinación de propiedades termofísicas en diferentes mieles de abeja recolectadas en el estado de Puebla. Revista Verde de Agroecología y Desarrollo Sustentable 7(5): 8-15.

Li Ying-hua, L. Xiu-yang. 2005. Investigation on the origin of 5-HMF in Shengmai Yin decoction by RP-HPLC method. Journal of Zhejiang University SCIENCE B. 6(10):1015-1021.

Mapas Honduras. Net. 2013. El paraíso-Paraíso (en línea). Consultado el 10 de octubre de 2013. Disponible en http://www.mapashonduras.net/el-paraiso_el-paraiso.html#satelital

- Maradiaga Pineda, D.I. 2005. Caracterización físico-química y microbiología de miel de abeja de cinco departamentos de Honduras. Tesis ing. Agroindustria Alimentaria. Honduras, Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 88 p.
- Méndez, K. L. 2006. Análisis melisopalinológico de mieles de cinco departamentos de Honduras. Tesis Ing. en Desarrollo Socioeconómico y Ambiente. Honduras, Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 92 p.
- Norma Chilena. 2006. Miel de abejas-Determinación del contenido de hidroximetilfurfural-Método de espectrofotometría Uv. Nch3046-2006. 8p.
- Norma Chilena. 2007. Miel de abejas – Método de muestreo. NCh617-2007. 8 p.
- Ribeiro, R., da Silva, C. Teixeira, E. Lima, F. Conte y C. Borges. 2012. Influencia hacer Binomio tempo e temperature nos teores de hidroximetilfurfural em Méis florais submetidos ao aquecimento. Ciencia e Agrotecnología 36(2): 04-209.
- Rufian, J., B. Garcia, y E. Guerra. 2001. Determination of furfural compounds in enteral formula. Journal of liquid chromatography. 24(19):3049-3061.
- Rizelio. V.M., L.V. Gonzaga, G. Campelo Borges, G.A. Micke, R. Fett y A.C. Oliveira Costa. 2012. Development of a fast MECK method for determination of 5-HMF in honey samples. Food Chemistry 133(4):1640-1645
- Salamanca Grosso, G., F.C. Pérez y J.A. Serra Belenguer. 2001. Determinación de la actividad de agua en mieles colombianos de las zonas de Bocayá y Tolima
- Salamanca Grosso, G. y J.A. Serra Belenguer. 2002. Estudio analítico comparativo de las propiedades fisicoquímicas de mieles de *Apis mellifera* en algunas zonas apícolas de los departamentos de Bocayá y Tolima
- Subovsky, M.J., A. Sosa López y A. Castillo. 2003. Determinación de algunos parámetros físico químicos en miel de abejas de la provincia de corrientes, Argentina y su relación con la cosecha y procesamiento. Revista Científica Agropecuaria 7(2):61-6
- Subovsky, M.J, A. Sosa López, A. Castillo y N. Cano. 2004. Evaluación del contenido de hidroximetilfurfural en mieles de NEA. Agrotecnia 12: 32-33.
- Terrab, A., M.J. Díez y F.J. Heredia. 2003. Palynological, physico-chemical and colour characterization of Moroccan honeys: I. River red gum (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh) honey. International Journal of Food Science and Technology 38(4):376-386.
- Terrab, A., M.L. Escudero., M.L. González-Miret y F.J. Heredia. 2004. Colour characteristics of honeys as induced by pollen grain content: A multivariate study. Journal of the Science of Food and Agriculture 84(4): 380-396

Windsor, S., K. Kavazos, y P. Brooks. 2013. The quantitation of hydroxymethylfurfural in Australian Leptospermum honeys. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*. 5(1):21-25.

Xu Qing., L. Ying-hua, L. Xiu-yang. 2007. Investigation on influencing factors of 5-HMF content in Schisandra. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 8(6):439-445.

Zandamela Mungói, E.M.F. 2008. Caracterización físico-química y evaluación sanitaria de la miel de Mozambique. Tesis Doctor en Veterinaria. España. Universidad Autónoma de Barcelona 290 p.

Zappala, M., B. Fallico., E. Arena y A. Verzera. 2005. Methods for the determination of HMF in honey: a comparison, *Food Control* 16 (3) 273–277.

7. ANEXOS

Anexo 1. ANDEVA de los factores de variación sobre la humedad y HMF en el descristalizado de la miel.

Factores de variación	Humedad		HMF	
	F	P	F	P
Modelo	40.30	<0.01	162.30	<0.01
Lote de cosecha	18.28	<0.01	102.60	<0.01
Comunidad	29.12	<0.01	281.00	<0.01
Descristalizado	18.00	<0.01	7.27	0.02
Lote × Comunidad	127.10	<0.01	479.60	<0.01
Comunidad × Descristalizado	3.51	0.08	0.69	0.53

Anexo 2. ANDEVA de los factores de variación sobre el color en el descristalizado de la miel.

Fuente de variación	L		a		b	
	F	P	F	P	F	P
Modelo	32.03	<0.01	14.70	0.01	7.63	<0.01
Lote de cosecha	11.21	<0.01	9.55	0.08	11.55	<0.01
Comunidad	0.20	0.66	12.82	0.07	1.76	0.22
Descristalizado	8.61	<0.01	3.97	0.06	0.40	0.68
Lote × Comunidad	120.60	<0.01	44.88	<0.01	16.80	<0.01
Comunidad × Descristalizado	3.59	0.08	1.34	0.31	4.71	0.05

Anexo 3. ANDEVA de los factores de variación sobre los °Brix, azúcares totales y relación fructosa/glucosa en el descristalizado de la miel.

Fuentes de variación	°Brix		AT		RFG	
	F	P	F	P	F	P
Modelo	5.50	0.03	5.11	0.02	0.30	0.95
Lote de cosecha	8.61	0.01	1.14	0.37	0.10	0.90
Comunidad	3.68	0.09	2.18	0.18	0.13	0.73
Descristalizado	8.68	0.01	18.74	<0.01	0.22	0.81
Lote × Comunidad	5.23	0.03	1.34	0.31	0.42	0.67
Comunidad × Descristalizado	0.37	0.70	0.70	0.53	0.56	0.59

AT = Azúcares totales

RFG = Relación fructosa/glucosa

Anexo 4. ANDEVA de los factores de variación sobre la sacarosa + maltosa, glucosa y fructosa en el descristalizado de la miel.

Factores	S + M		Glucosa		Fructosa	
	F	P	F	P	F	P
Modelo	1.29	0.36	3.58	0.04	3.68	0.04
Lote de cosecha	0.22	0.80	0.93	0.43	0.45	0.65
Comunidad	0.03	0.87	0.72	0.42	3.35	0.11
Descristalizado	3.57	0.08	11.31	<0.01	13.62	<0.01
Lote × Comunidad	0.54	0.60	2.18	0.18	0.51	0.62
Comunidad × Descristalizado	1.47	0.29	1.35	0.31	0.30	0.95

S + M = sacarosa + maltosa

Anexo 5. ANDEVA de los factores de variación sobre el pH y a_w en el descristalizado de la miel.

Factores	a_w		pH	
	F	P	F	Pr
Modelo	1.82	0.21	15.13	<0.01
Lote de cosecha	0.50	0.62	15.25	<0.01
Comunidad	0.64	0.45	99.19	<0.01
Descristalizado	3.71	0.07	0.75	0.50
Lote × Comunidad	2.79	0.12	2.25	0.17
Comunidad × Descristalizado	0.86	0.46	0.25	0.75

Anexo 6. Resumen del ANDEVA de las variables evaluadas

Variables	R²	CV%	DE[‡]	Media
Humedad	0.98	0.59	0.09	15.96
a _w	0.67	1.57	0.01	0.56
pH	0.94	0.43	0.02	3.78
L	0.97	2.99	1.22	40.89
a	0.94	12.02	0.86	7.15
b	0.90	3.22	0.71	22.07
Azúcares Totales	0.85	3.01	2.15	71.49
Sacarosa + maltosa	0.59	2.61	0.15	5.81
Glucosa	0.80	4.08	1.26	30.81
Fructosa	0.81	4.09	1.42	34.77
HMF	0.99	1.88	0.18	9.62

[‡]DE Desviación Estándar.

Anexo 7. Efecto del tiempo de descristalizado en la a_w y sacarosa + maltosa de la miel.

Comunidad	Tratamiento	a_w	sacarosa + maltosa
		Media ± DE[‡]	(g/100 g) Media ± DE[‡]
Bejucales	Control	0.57 ± 0.00 ^a	5.86 ± 0.11 ^a
	D 50 °C 20 min ^β	0.56 ± 0.02 ^a	5.76 ± 0.11 ^a
	D 50 °C 40 min ^γ	0.56 ± 0.01 ^a	5.77 ± 0.14 ^a
Dificultades	Control	0.57 ± 0.01 ^a	5.98 ± 0.12 ^a
	D 50 °C 20 min ^β	0.56 ± 0.01 ^a	5.84 ± 0.19 ^a
	D 50 °C 40 min ^γ	0.55 ± 0.01 ^a	5.61 ± 0.13 ^a

^a Tratamientos seguidos con la misma letra en la misma columna son iguales (P>0.05)

[‡]DE Desviación Estándar.

^β Descristalizado 50 °C 20 minutos

^γ Descristalizado 50 °C 40 minutos

Anexo 8. Composición química de la miel de abeja

Composición de la miel	Miel de flores (g/100g)		Mielada (g/100g)	
	Promedio	mim-max	Promedio	mim-max
Contenido de agua	17.20	15 - 20	16.30	15 - 20
Fructosa	38.20	30 - 45	31.80	28 - 40
Glucosa	31.30	24 - 40	26.10	19 - 32
Sacarosa	0.70	0.1- 48	0.50	0.1 - 4.7
Otros disacáridos	5.00	28	4.0	16
Melecitosa	<0.10		4.0	0.3 - 22
Erlosa	0.80	0.56	1.0	0.2
Otros oligosacáridos	3.60	0.5 - 1	13.10	0.1 - 6
Azúcares totales	79.70		80.50	
Minerales	0.20	0.1 - 0.5	0.90	0.6 - 2.0
aminoácidos, Proteínas	0.30	0.2 - 0.4	0.60	0.4 - 0.7
Ácidos	0.50	0.2 - 0.8	1.10	0.8 - 1.5
pH	3.90	3.5 - 4.5	5.20	4.5 - 6.5

min = Mínimo

max = Máximo

Fuente: Bogdanov 2011

Anexo 9. Caracterización de las mieles de las comunidades Dificultades y Selvas del municipio El Paraíso.

Factores	Dificultades		Selvas	
	M 1 ^ñ	M 2 ^l	M 1 ^ñ	M 2 ^l
Humedad	20.20	18.80	18.20	19.80
Aw	0.61	0.59	0.58	0.60
pH	3.70	3.55	3.57	3.54
°Brix	78.70	80.10	80.60	79.10
Sacarosa	0.00	1.30	0.00	0.60
Maltosa	1.60	2.10	1.60	1.80
Glucosa	33.00	31.00	32.00	31.00
Fructosa	37.00	38.00	37.00	37.00
HMF	3.00	1.00	1.00	2.00
Color	44.00	40.00	41.00	51.00

Fuente: Maradiaga 2005.

^ñ = muestreo 1 del 11 al 23 de marzo

^l = muestreo 2 del 20 al 17 de mayo

Anexo 10. Otros azúcares presentes en la miel de abeja

Azúcares	Mínimo (g/100g)	Máximo(g/100g)
Siempre presentes		
Maltosa	0.5	2.8
Sacarosa	0.8	10
Isomaltosa	0.5	1.5
Turanosa	0.5	1.5
Nigerosa	0.2	1
Ocasionalmente presentes		
Melibiosa		<0.5
Palatinosa		<0.3
Melecitosa ^λ		<0.5
Trehalosa ^λ		<2.5
Rarfinosa ^λ		<1
Erlosa [°]		<3.5

^λAzúcares característicos de mieles de mielada.

[°]Es característico de algunas mieles monoflorales como melón, lavanda, romero y acacia.

Fuente: Bogdanov 2011, European 2002

Anexo 11. Estándares del Codex Alimentarius y Unión Europea.

Parámetro	Codex	EU
Humedad	≤ 20 g/100 g	≤ 20 g/100 g
HMF	≤ 40 mg /kg	≤ 40 mg/kg
Sacarosa	≤ 5 g /100 g	≤ 5 g/100 g
Fructosa		
Glucosa	≥ 60 g/100 g (sumatoria de azúcares reductores)	≥ 60 g/100 g (sumatoria de azúcares reductores)
Maltosa		

Excepciones del codex.

Humedad: Miel de brezo (*Calluna*) no más del 23%, miel de trébol (*Trifolium*) no más del 21%

Sacarosa: Alfalfa (*Medicago sativa*), Citrus spp. Falsa acacia (*Robinia pseudoacacia*), Madreselva francesa (*Hedysarum*), Menzies, Banksia (*Banksia menziesii*), “Red Gum” (*Eucalyptus camaldulensis*), “Leatherwood”(Eucryphia lucida), Eucryphia milligani no más de 10 g/100 g de miel. Espliego (*Lavandula spp.*), borraja (*Borago officinalis*) no más de 15 g/100 g de miel.

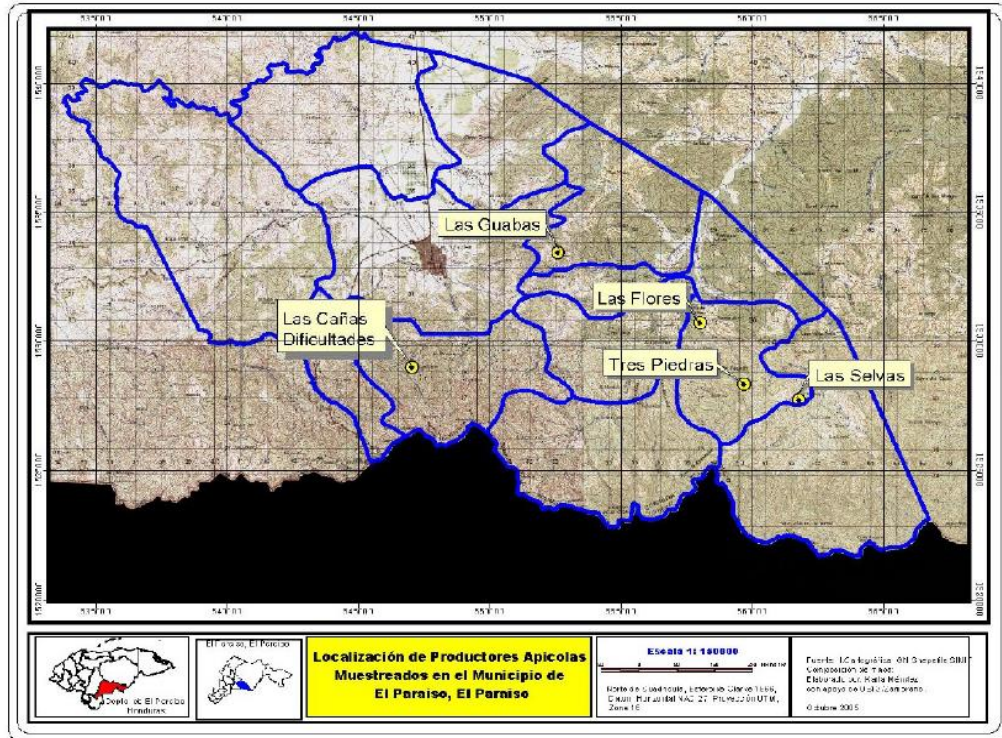
Anexo 12. Correlación entre color y HMF

	L	a	b	HMF
L	1	-0.82 <0.01	0.59 0.01	0.77 <0.01
a	-0.82 <0.01	1	-0.40 0.01	-0.73 <0.01
b	0.59 0.01	-0.40 0.01	1	0.70 <0.01
HMF	0.77 <0.01	-0.73 <0.01	0.70 <0.01	1

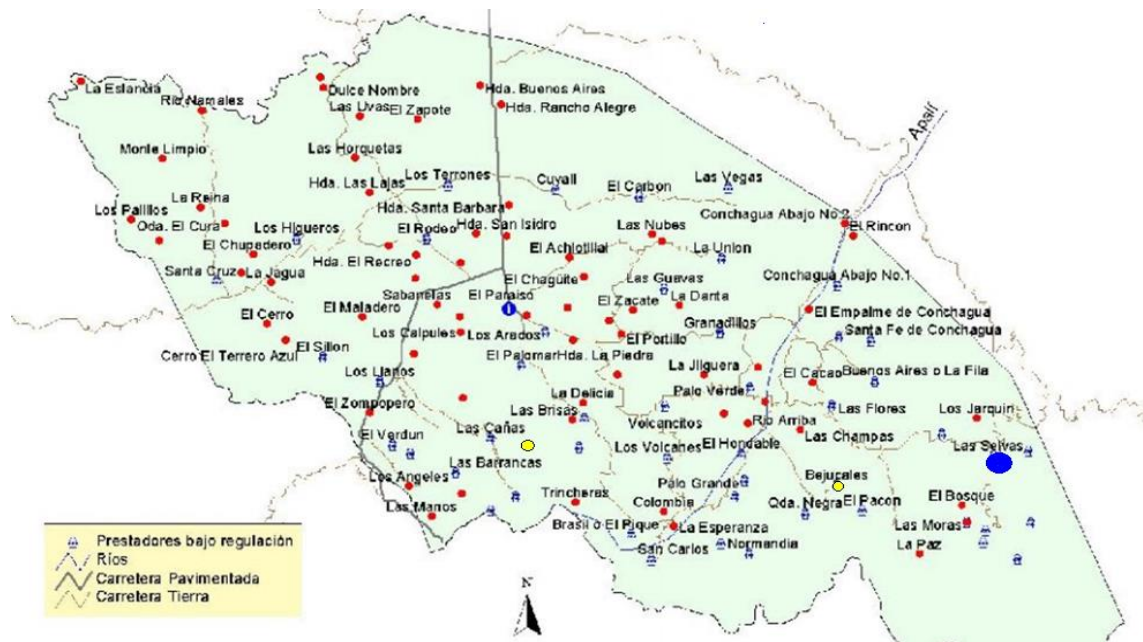
Comunidad	Muestreo	Especie	Ene	feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
El Cantón	1	<i>Mimosa pudica</i>												
	2	<i>Trema micrantha</i>												
El Higuerito	1	<i>Mimosa pudica</i>												
	2	<i>Trema micrantha</i>												
Cebadilla	1	<i>Tabebuia rosea</i>												
	2	<i>Mimosa pigra</i>												
El Pescadero	1	<i>Lantana urticifolia</i>												
	2	<i>Commelina diffusa</i>												
La Redonda	1	<i>Mimosa pudica</i>												
	2	<i>Mimosa pigra</i>												
Las Selvas	1	<i>Syzygium jambos</i>												
	2	<i>Trema micrantha</i>												
Las Flores	1	<i>Syzygium jambos</i>												
	2	<i>B. simaruba</i>												
Las Guabas	1	<i>Mimosa pudica</i>												
	2	<i>Morella cerifera</i>												
Tres Piedra	1	<i>Mimosa pudica</i>												
	2	<i>A. conyzoides</i>												
Dificultades	1 y 2	<i>Commelina diffusa</i>												
Trojes	1	<i>Triumfetta sp</i>												
	2	<i>Commelina diffusa</i>												

Fuente: Maradiaga 2005.

Anexo 13. Floración de especies predominantes del departamento de El Paraíso.



Fuente: Maradiaga 2005
 Anexo 14. Mapa del municipio de El Paraíso.



Fuente: ERSAPS 2010.
 Anexo 15. Mapa del municipio El Paraíso con sus localidades.

Conditions

Sample Sugars and sugar alcohols
 Column Agilent Hi-Plex Ca, 7.7 × 300 mm, 8 μm (p/n PL1170-6810)
 Sample size 10 mg/mL
 Mobile phase 100% DI H₂O
 Flow rate 0.6 mL/min
 Injection volume 10 μL
 Temperature 85 °C
 Detector RI

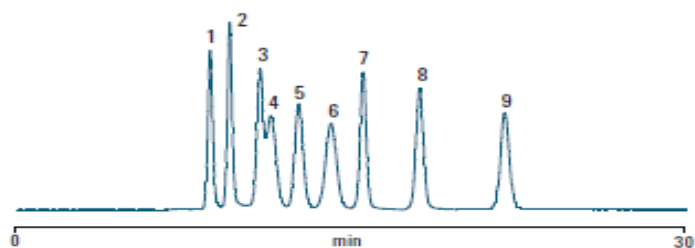
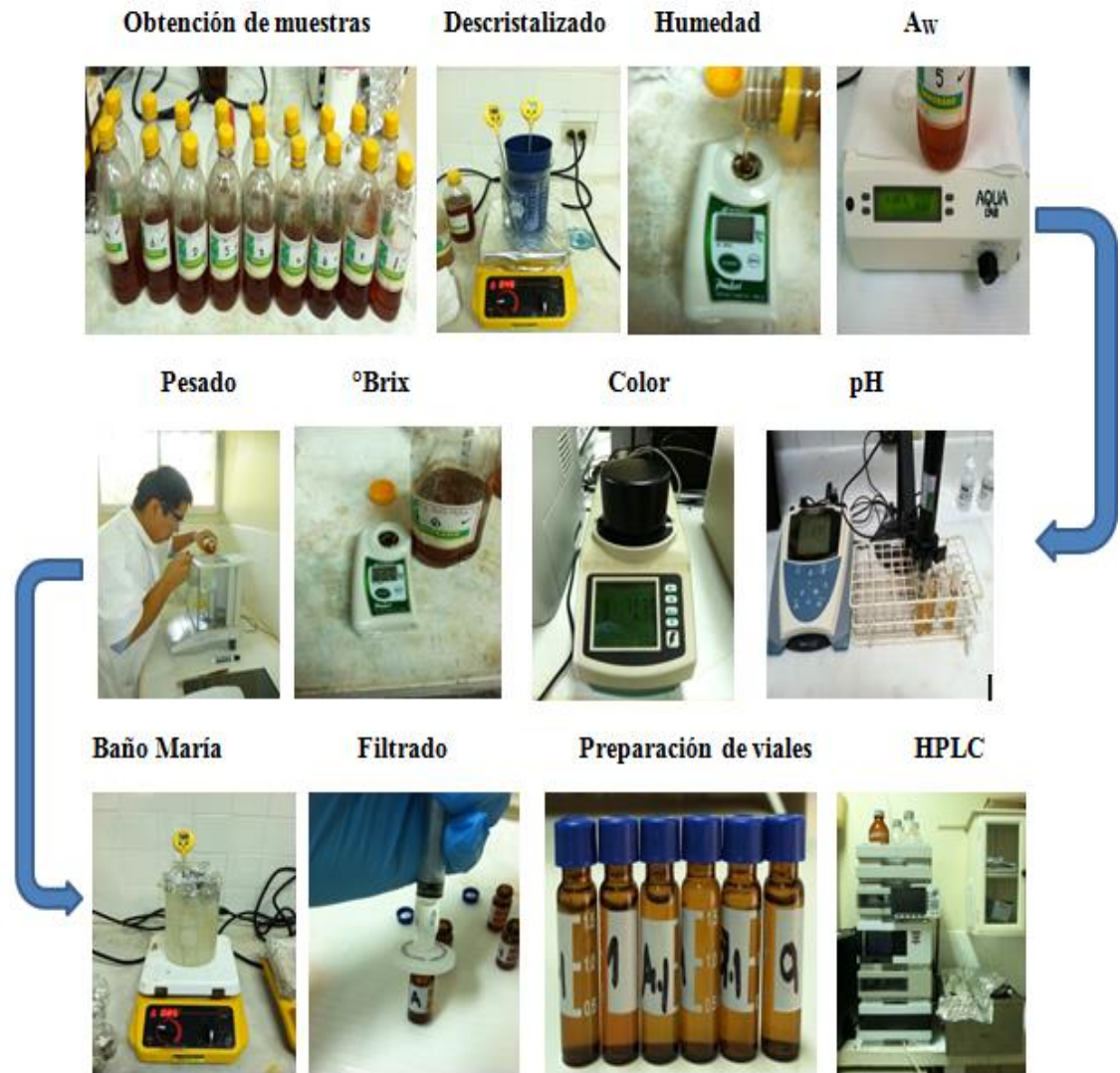


Figure 4. Separation of a mixture of sugars and sugar alcohols on an Agilent Hi-Plex Ca column.

Table 4. Peak Data from the Separation of a Sugars and Sugar Alcohols Mix on an Agilent Hi-Plex Ca Column

Peak number	Analyte	As. USP	10% Asymmetry	Plate count	Plates/m
1	Raffinose	1.12	1.08	7138	23793
2	Sucrose	1.12	1.06	9389	31298
3	Lactulose	0.85	0.92	3858	12861
4	Glucose	1.79	1.59	2986	9955
5	Galactose	1.07	1.07	5008	16694
6	Fructose	1.01	1.01	3727	12423
7	Ribitol	1.00	1.00	14758	49194
8	Mannitol	1.04	1.04	13861	46204
9	Sorbitol	1.04	1.04	14170	47234

Anexo 16. Condiciones de la columna Hi-plex Ca 7.7 × 300 mm, 8 μm



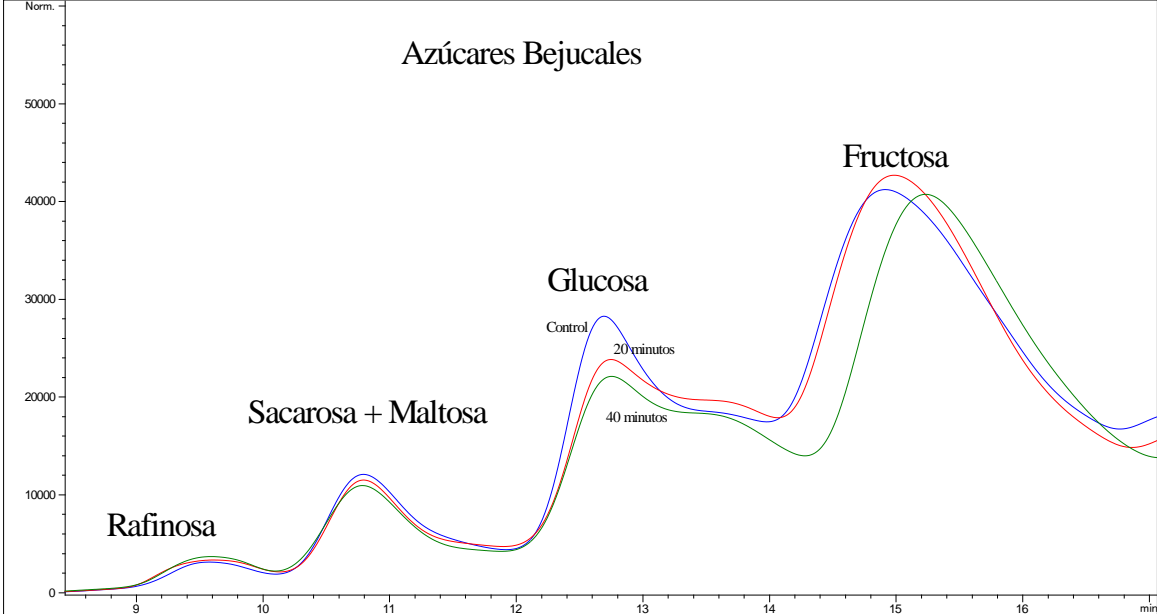
Anexo 17. Flujo de proceso



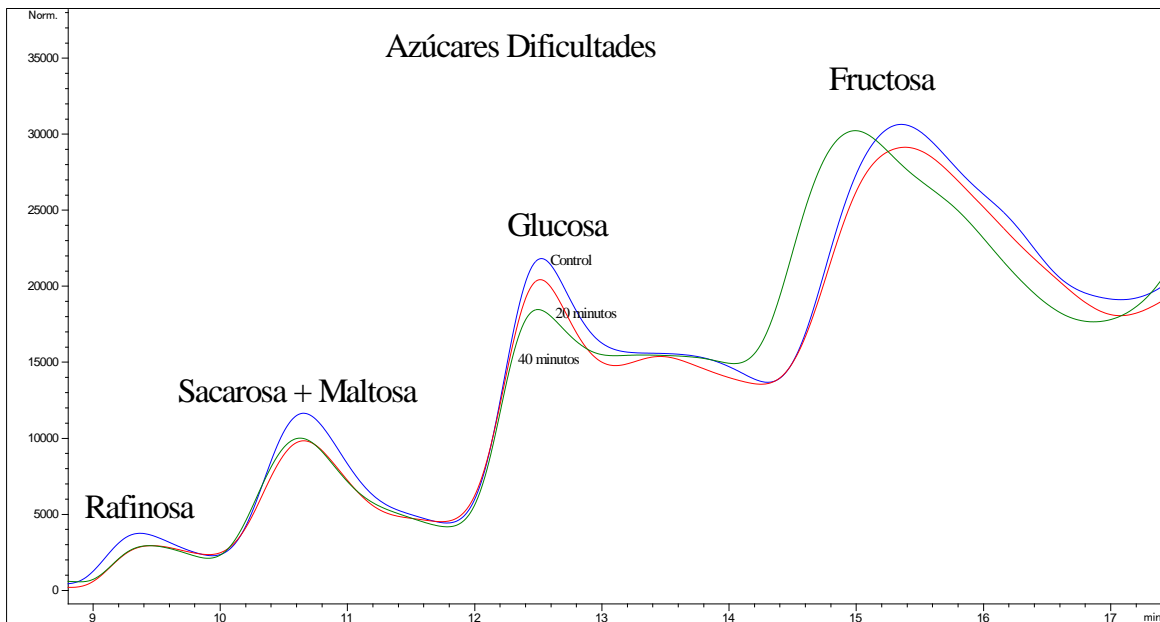
Anexo 18. Muestras de mieles de la comunidad Bejucales. Mieles Controles (1,2,3), descristalizado a 50 °C por 20 minutos (A, B, C), descristalizado a 50 °C por 40 minutos (a,b,c).



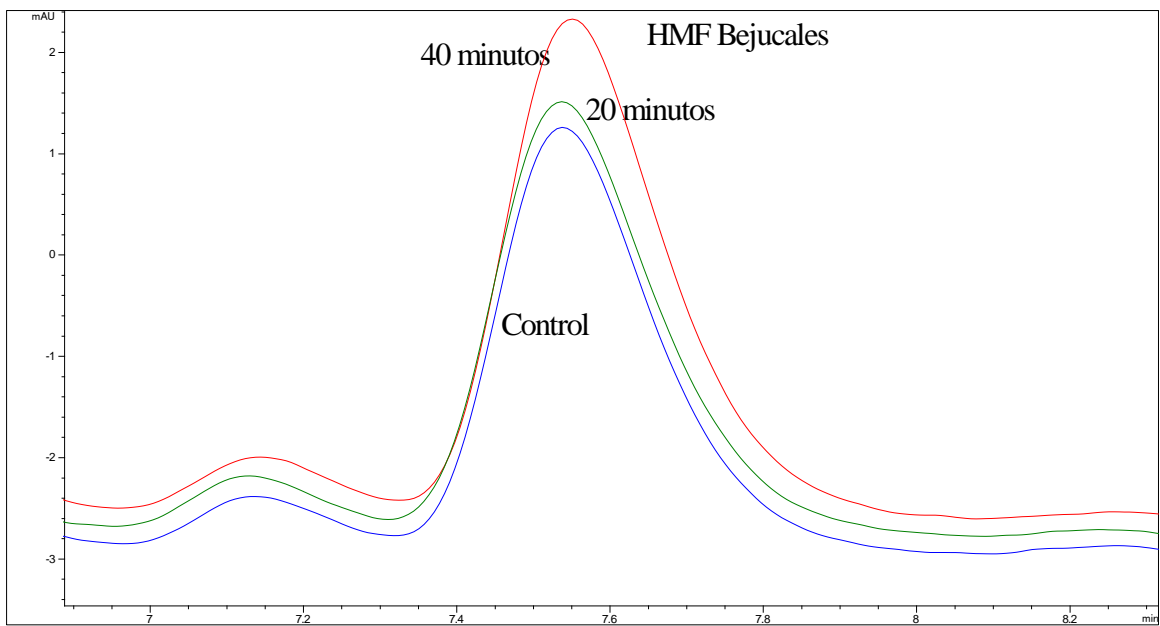
Anexo 19. Muestras de mieles de la comunidad Dificultades
 Mieles Controles (4,5,6), descristalizado a 50 °C por 20 minutos (D,E,F), descristalizado a 50 °C por 40 minutos (d,e,f).



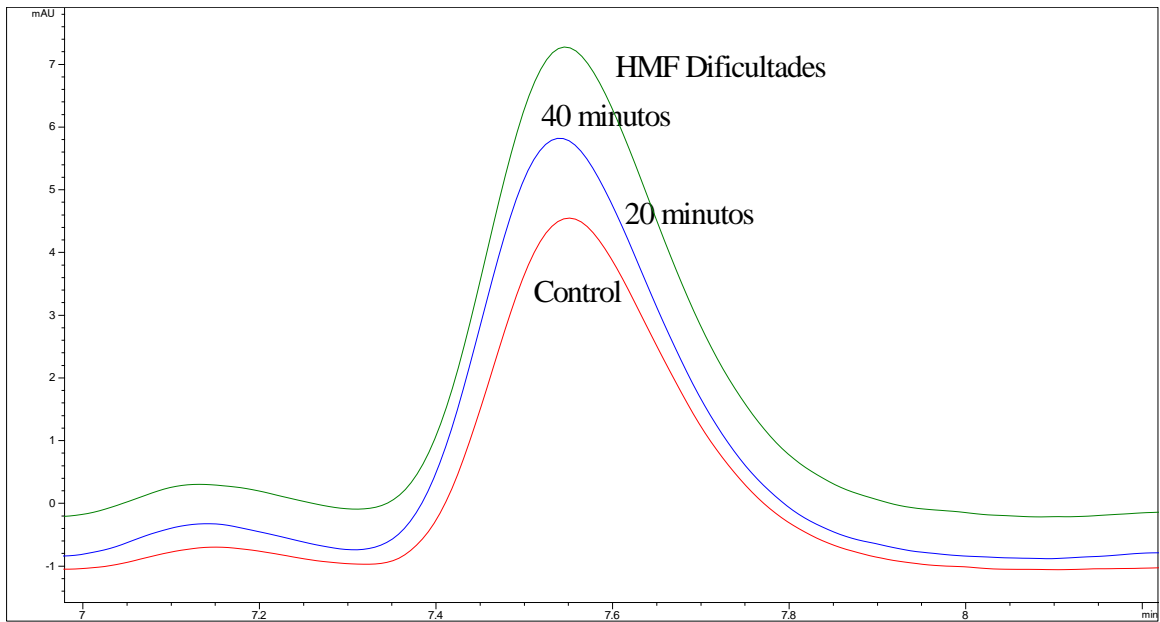
Anexo 20. Cromatograma del descristalizado de miel de la comunidad Bejucales.



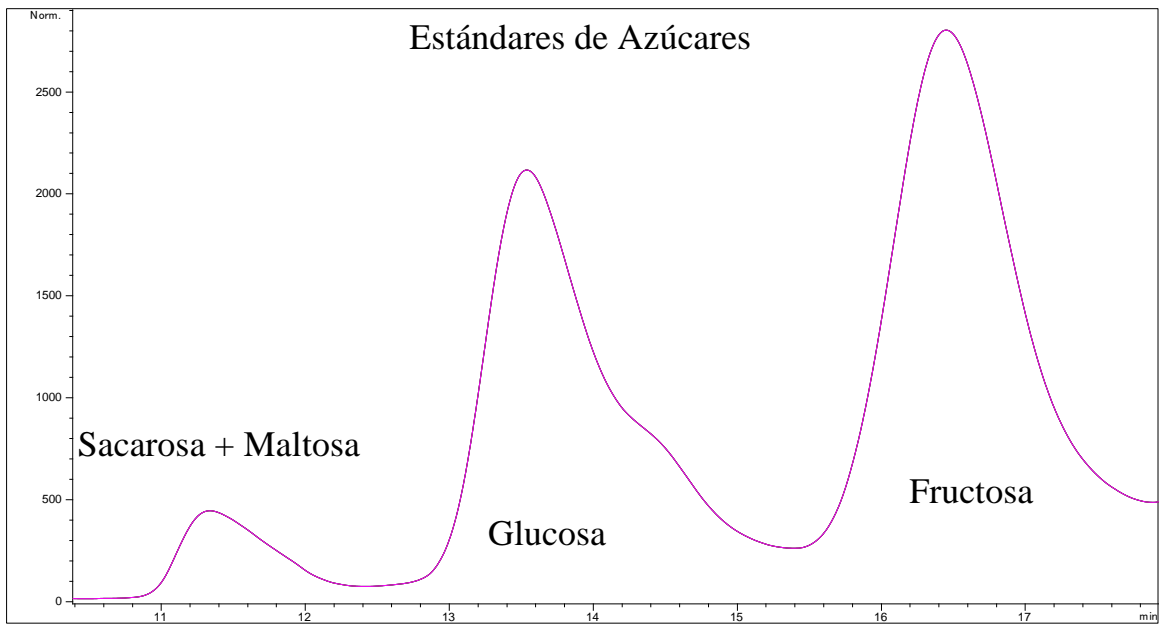
Anexo 21. Cromatograma del descristalizado de miel de la comunidad Dificultades.



Anexo 22. Cromatograma de HMF de miel de la comunidad Bejucales.



Anexo 23. Cromatograma de HMF de miel de la comunidad Dificultades.



Anexo 24. Cromatograma de los estándares de azúcares

Anexo 25 Materiales, equipo, reactivos y estándares.

Materiales

- Botellas de tereftalato de polietileno (PET) de 660 g
- Tapaderas de polietileno de alta densidad (HDPE)
- Pipeta de precisión Wheaton Socorex, 10 -100 μ L.
- Erlenmeyer Pyrex, 1000 mL.
- Matraz volumétrico Kimax, 50 y 100 mL.
- Filtro para jeringa Econofiltro, 0.45 μ m.
- Jeringas BD Syringe, Luer-Lok Tip, 2.5 y 3 mL.
- Guantes de nitrilo Fisher Scientific, sin polvo.
- Beakers de vidrio Kimble, 1000 mL.
- Beakers de plástico Kartell, 3 L.
- Beakers de vidrio Pyrex, 25 mL.
- Papel aluminio Reynolds wrap, 18 pulgadas de ancho.
- Probetas, 25, 50 y 100 mL.
- Papel filtro Whatman, 0.45 μ m.
- Viales ambar 1.5 mL target DTtm, National Scientific, c400-1.
- Goteros.

Equipo

- Balanza analítica Adventurer AR2140, OHAUS.
- Refractómetro digital (12 - 30%) - Pocket PAL 22S (ATAGO).
- Refractómetro digital (0 - 93%) - Pocket PAL -3 (ATAGO).
- Termómetro lollipop Traceable Thomas Scientific.
- AquaLab 3TE 0102875.
- Sonificador Fisher Scientific FS14 222813.
- Calentador y agitador, Fisher Scientific Cimarec 7 \times 7 SP 131325.
- Vortex Fisher Scientific Genie 2 G -560.
- Potenciómetro Thermo Scientific Orion Star B10791.
- Colorímetro Colorflex Hunter Lab 45/0 CX0687
- Desionizador Thermo Scientific Nanopure 7140
- Análisis de Perfil de azúcares: columna Hi-Plex Ca 300 \times 7.7 mm 8 μ m, guard cartridge column 3 \times 0.5 mm, guard column 7.7 \times 50 mm, capilar Peek 0.007'' id obtenidos de Agilent Technologies.
- Análisis de HMF: columna LC ZORBAX Eclipse XDB-C18, 4.6 \times 150 mm, 5 μ m; *guard cartridge column* empacado con *analytical guard column* Eclipse XDB-C 18, 4.6 \times 12.5 mm, 5 μ m; *capilar Peek* 0.007'' id obtenidos de Agilent Technologies.
- Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) Agilent Technologies, con los siguientes módulos: degasificador modelo G1379A 1100 Series; bomba cuaternaria modelo G1311A. 1100 Series; inyector automático modelo G1329A 1100 Series.
- Detector de índice de refracción, modelo G1362A 1100 Series para cuantificar azúcares.

- Detector DAD, columna LC de fase reversa; en un rango de 0 a 5 mg de 5-HMF por mL de muestra diluida.
- Baño maría, Precision 180 GCA Corporation.

Reactivos.

- Alcohol etílico, Labhospy R.L., 99%, clase GR.
- Metanol, Merck, 99.9%, clase HPLC, No. de catálogo 1060351000.
- Acetonitrilo, Sigma-Aldrich, 99.9%, clase HPLC, No. de catálogo 34851.
- Etanol anhidro, Sigma-Aldrich, 99.5 %, clase p.a., No. de catálogo 459836.
- Agua desionizada (H₂O DI) para cromatografía LiChrosolv[®] Merck.

Estándares para determinación de azúcares totales por HPLC

- D-(+)-Glucosa, Sigma-aldrich, 99.5 %, clase A.C.S., No. de catálogo G5400.
- D-(-)-Fructosa, Sigma-aldrich, 99 %, clase A.C.S., No. de catálogo F-0127.
- Sacarosa, Sigma-aldrich, 99.5%, clase A.C.S., No. de catálogo S5016.
- α -D-Lactosa monohidratado, Sigma-aldrich, 99%, Clase A.C.S., No. de catálogo L254.
- D-(+)-Maltosa monohidratado, Sigma-aldrich, 98%, clase A.C.S., No. de catálogo M5885.
- D-(+)-Galactosa, Sigma-aldrich, 99%, clase A.C.S., No. de catálogo G0750.
- D-(+)-Celobiosa, Sigma-aldrich, 98%, clase A.C.S., No. de catálogo C7252.

Estándar para determinación de 5-hidroximetil furfural

- 5-Hidroximetilfurfural, SAFC, 99%, clase GR, No. de catálogo W501808.