



UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA



INSTITUTO DE INGENIERIA DE  
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

# ESTUDIO DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL DE LA MIEL DE CITRUS COMERCIALIZADA EN LA COMUNIDAD VALENCIANA

**MASTER EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS**

Nombre alumno: Ángela Periche Santamaría

Directores: Isabel Escriche Roberto

José Miguel Carot Sierra

Centro: IU-IIAD

# ESTUDIO DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL DE LA MIEL DE CITRUS COMERCIALIZADA EN LA COMUNIDAD VALENCIANA

Periche Ángela, Juan-Borrás Marisol, Carot José Miguel, Escriche Isabel<sup>1</sup>

## RESUMEN

En este trabajo se ha evaluado la fracción volátil de miel de azahar (género "Citrus") comercializada en la Comunidad Valenciana y la relación de esta fracción con la procedencia geográfica y botánica. Miel de azahar cruda procedente de las Comunidades de Valencia y Murcia ha sido utilizada en este estudio. Todas las muestras fueron melisopalínológicamente caracterizadas para garantizar su pertenencia al género citrus y poder ser clasificadas como de naranjo (*Citrus sp.*) o de limonero (*Citrus limon*). Un total de 38 compuestos volátiles (ácidos, alcoholes, aldehídos, hidrocarburos, cetonas, ésteres, furanos, compuestos sulfurados y terpenos) han sido analizados por purga y trampa GC-MS con desorción térmica. Un análisis quimiométrico llevado a cabo sobre la totalidad de los compuestos: (1) Mostró que las mieles de naranjo y limón tenían un perfil volátil característico, diferente entre sí y del procedente de la mezcla de ambas; siendo las primeras ricas en aldehídos especialmente los lilac A, B, C y D, bencenacetaldéhidó y nonanal y las segundas en 2-metil-3-buten-2-ol, etanol y acetaldéhidó; (2) permitió diferenciar las mieles de citrus atendiendo a sus especies botánicas. Esta distinción, entre mieles de naranjo o limonero, puede ser utilizada por el sector como herramienta de marketing para la promoción de La Marca de Calidad de la Comunidad Valenciana para la miel de azahar.

**PALABRAS CLAVE:** Miel de azahar, miel de citrus, compuestos volátiles, polen, PCA, análisis discriminante.

## RESUM

En este treball s'ha avaluat la fracció volàtil de mel de tarongina (gènere "Citrus") comercialitzada a la Comunitat Valenciana i la relació d'esta fracció amb la procedència geogràfica i botànica. Mel de tarongina crua procedent de les comunitats de València i Múrcia ha sigut utilitzada en este estudi. Totes les mostres van ser melisopalínológicament caracteritzades per a garantir la seua pertinença al gènere citrus i poder ser classificades com de taronger (*Citrus sp.*) o de llimera (*Citrus limon*). Un total de 38 compostos volàtils (àcids, alcohols, aldehids, hidrocarburs, zetasses, esters, furans, compostos sulfurats i terpens) han sigut analitzats per porga i trampa GC-MS amb desorció tèrmica. Una anàlisi quimiomètric dut a terme sobre la totalitat dels compostos: (1) Va mostrar que les mels de taronger i llima tenien un perfil volàtil característic, diferent entre si i del procedent de la mescla

<sup>1</sup> Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IUIAD), Departamento de Tecnología de Alimentos (DTAL), Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera 14, 46022 Valencia, España.

d'ambdós; sent les primeres riques en aldehids especialment els lilac A, B, C i D, bencenacetaldehid i nonanal i les segones en 2-metil-3-buten-2-ol, etanol i acetaldehid; (2) va permetre diferenciar les mels de citrus atenent a les seues espècies botàniques. Esta distinció, entre mels de taronger o llimera, pot ser utilitzada pel sector com a ferramenta de màrqueting per a la promoció de La Marca de Qualitat de la Comunitat Valenciana per a la mel de tarongina.

PARAULES CLAU: Mel de tarongina, mel de citrus, compostos volàtils, pol·len, PCA, anàlisi discriminant.

## ABSTRACT

The volatile fraction of citrus honey commercialized in the Valencian Community and the relationship between this fraction and the geographical and botanical origin has been evaluated. Raw citrus honey from the Valencian and Murcian Communities was used in this study. All the samples analyzed were characterized to determine their melissopalynological profile in order to guarantee that they belonged to the citrus genus, and to be able to classify them as coming from orange (*Citrus sp.*) or lemon (*Citrus limon*) trees. A total of 38 compounds (acids, alcohols, aldehydes, hydrocarbons, ketones, esters, furanes, sulphur compounds and terpenes) were analysed by GC-MS purge and trap thermal desorption. A chemometrical analysis carried out with the overall volatile compounds: (1) showed that honeys from orange and lemon trees each have a characteristic volatile profile both individually and when blended. The first one being rich in aldehydes, particularly lilacs A, B, C and D, bencenacetaldehyde and nonanal, and the second in 2-methyl-3-buten-2-ol, ethanol and acetaldehyde; (2) permitted the differentiation between citrus honeys bearing in mind their botanical species. This discrimination of citrus honey, between orange and lemon could be useful in the sector as a marketing tool to promote the citrus honey Valencian Community Quality Mark.

KEY WORDS: Orange blossom honey, citrus honey, volatile compounds, pollen, PCA, discriminating analysis.

## 1. INTRODUCCIÓN

La importancia del conocimiento del aroma/flavor de la miel, a través del estudio de la composición en compuestos volátiles de la misma, se refleja en los numerosos estudios que se han realizado en las 3 últimas décadas, en mieles de diferentes procedencias botánicas y geográficas (Cuevas-Glory et al., 2007). Todas las mieles tienen un flavor/aroma base, característico de este alimento, que depende en gran medida de la composición de su fracción volátil. Como parte de dicha fracción algunas mieles poseen ciertos componentes específicos, que algunos autores consideran como verdaderas “huellas dactilares (fingerprints)” de las mismas. Estos compuestos volátiles pueden ser característicos del origen botánico de las mieles, tanto si éstas son el resultado de que las abejas liben el néctar de las flores como los mielatos de las secreciones de las plantas (Serra, 1988; Radovic, 2001; Alissandrakis, 2003; Serra y Ventura, 2003).

Puesto que las mieles monoflorales o las de bosque procedentes de determinadas plantas suelen tener un alto valor comercial, por lo tanto la caracterización de origen botánico de las mismas juega un importante papel en el control de calidad (Cuevas-Glory, et al., 2007). Para determinar el origen botánico de la miel, muchos analistas han evaluado las características sensoriales y las propiedades físicoquímicas pero especialmente los resultados obtenidos en el estudio del polen (análisis melisopolinológico). Este último procedimiento es el más adecuado, sin embargo tiene el inconveniente de que se requiere mano de obra muy especializada y en ocasiones los resultados no son concluyentes. Muchos autores proponen como más apropiado para conocer el origen botánico, la caracterización de la fracción volátil de las mieles por GC-MS (Verzera et al., 2001; Escriche et al., 2008).

Se conocen algunas sustancias aromáticas características de ciertas mieles como: el caso del antranilato de metilo (o metilantranilato) en las de azahar (citrus) (Serra, 1988; Ferreres et al., 1994), el formaldehído y acetaldehído en las de colza y trébol, el deshidrovomifoliol en la de brezo y las dicetonas en la miel de eucalipto (Bouseta y Collin, 1995).

Por otra parte, ciertos compuestos volátiles como los derivados del furano (furfural, metilfurfural y furfural alcohol) son buenos indicadores del tratamiento térmico y de las condiciones de almacenamiento de la miel (Wootton et al., 1978; Castro-Vazquez et al., 2006).

En definitiva, la determinación de los componentes volátiles de las mieles está permitiendo llevar a cabo una caracterización relacionable de las mismas atendiendo a su origen floral y condiciones de procesado (Soria et al., 2002), (Escriche, et al., 2008).

El objetivo de este trabajo ha sido conocer la composición de la fracción volátil, de la miel del género “Citrus” comercializada en la Comunidad Valenciana y evaluar la relación de dicha composición con su procedencia botánica (*Citrus limon* y *Citrus sp.*) y geográfica (Valencia y Murcia).

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 Materia prima

La miel de citrus utilizada en este estudio procedía de dos comarcas de la Comunidad de Valencia (36 lotes) y de dos comarcas de Murcia (23 lotes). Las muestras fueron recogidas en el año 2007 y conservadas a 4°C hasta el momento de la realización del análisis. Todas las muestras fueron melisopalinológicamente caracterizadas (Louveau et al., 1978), en el laboratorio de Control de Calidad de la miel del IUIAD, para garantizar su pertenencia al género citrus y poder ser clasificadas como de naranjo (*Citrus sp.*) o de limonero (*Citrus limon*). Atendiendo al análisis polínico, las muestras se clasificaron como: limonero (l); naranjo (o); mezcla de naranjo y limonero (lo).

### 2.2. Análisis de los compuestos volátiles

La extracción de la fracción volátil de las muestras de miel, se llevó a cabo mediante el método conocido como “purga y trampa” (Overton y Manura, 1994; Escriche et al., 2008).

Se pesaron 20 g de miel en el tubo de vidrio con cuello esmerilado y se añadieron 200µL de patrón interno (2-pentanol de 10 ppm). Para conseguir la total homogeneización de la miel con el patrón interno se introducía el tubo en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos.

Para la extracción de la fracción volátil de la miel se sumergía el tubo con la miel en un baño termostataado a 45°C hasta la altura de la muestra. El gas de arrastre, en nuestro caso nitrógeno, circulaba a través de la muestra con un caudal constante de 100mL/min, caudal que se verificaba con un caudalímetro. El burbujeo del gas sobre la muestra facilitaba la liberación de los compuestos volátiles. En el extremo del montaje se colocaba el tubo en el que se atrapaba la fracción volátil liberada (relleno con 100 mg del material de adsorción, Tenax TA 20-35 mesh). Transcurridos 20 minutos se procedía a la desorción de los compuestos retenidos en la matriz de Tenax utilizando un desorbedor térmico Turbomatrix TD (Perkin Elmer, Wellesley, USA). La desorción fue realizada bajo un flujo de helio a 220°C durante 10 minutos. Los compuestos volátiles retenidos en la trampa fría a -30°C se transfieren directamente a la cabeza de la columna por calentamiento de la trampa fría hasta los 250°C (rampa de temperatura 99°C/s).

La separación se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases (Trace GC 2000), equipado con una columna capilar DBWax (SGE) de 60 m longitud, 0,35 mm diámetro interno y 1 µm espesor de fase estacionaria. Los compuestos son arrastrados por el gas portador (helio a 1mL min<sup>-1</sup>), a la vez que se realiza una rampa de temperatura entre 40 °C y 240 °C. Una vez separados los compuestos volátiles, éstos pasan al espectrómetro de masas (Finnigan TRACE MS, software Xcalibur). El impacto electrónico se realizó a 70 eV con un rango de masas de m/z 33-433. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Se han identificado 38 compuestos comparando los espectros de GC-MS obtenidos de cada compuesto, con los pertenecientes a la base de datos del equipo (librería NIST, National Institute of Standards and Technology, 2002). Se calcularon las áreas relativas de cada uno de ellos (áreas de los picos de cada compuesto y el área del pico del patrón interno) en todas las muestras analizadas.

De los 38 compuestos identificados, ha sido posible realizar la cuantificación de 10 de ellos (octane, hexanal, 2-methyl-1propanol, d-limonene, 3-methyl-3-buten-1-ol, nonanal, furfural,  $\beta$ -linalool, benzaldehyde, antranilic acid methyl ester), ya que únicamente fue posible conseguir de ellos los patrones puros (Sigma Aldrich; Fluka). Esta cuantificación se ha realizado construyendo rectas de calibrado para cada uno de estos compuestos.

En los análisis estadísticos se ha considerado la información derivada de la relación de áreas (38 compuestos), de modo que así se asegura la mayor comparabilidad en los valores obtenidos y se incrementa la información obtenida para cada muestra, dado que se trabaja con un mayor número de datos.

Para comentar los resultados y con la finalidad de no crear confusión con la terminología utilizada, en este estudio se ha utilizado el nombre en inglés de los compuestos tal y como aparecen en la librería NIST.

### **2.3. Análisis estadístico**

El tratamiento de los datos se llevó a cabo utilizando los programas Unscrambler version 9.6 (CAMO A/S, Oslo, Norway) para realizar el análisis de Componentes Principales (PCA) con los valores medios de los compuestos volátiles identificados en las muestras procedentes de las 4 comarcas estudiadas y Statgraphics Plus versión 5.1 para realizar el análisis discriminante considerando el origen floral y el origen geográfico.

## **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.1. Composición de la fracción volátil de la miel de citrus**

En la fracción volátil de la miel de citrus procedente de las 4 diferentes comarcas (2 de Valencia y 2 de Murcia), se identificaron 38 compuestos. La tabla 1 muestra las medias de las áreas relativas (con respecto al patrón interno) y la desviación estándar de cada componente identificado. En la Tabla 2 se muestra los valores de los 10 compuestos que pudieron ser cuantificados (expresados  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Destaca por su importancia el grupo de los aldehídos, especialmente los lilac (A, B, C y D). Otros autores como Alissandrakis et al., 2007, encontraron en este tipo de miel importantes cantidades de estos cuatro compuestos (aproximadamente el 20% de los compuestos volátiles aislados). Los lilac han llegado a ser considerados por algunos autores como posibles “marcadores” de la miel de citrus, al ser su

presencia muy importante en la misma (Piasenzotto et al., 2003; Soria et al., 2003; Alissandrakis et al., 2005; De la Fuente et al., 2005; Escriche et al., 2008). Otro aldehído asociado al aroma de cítrico es el benzaldehído, ya que ha sido aislado en muchas ocasiones en esta variedad de miel (Fisher y Scout, 1997; Alissandrakis et al., 2007). En este estudio se ha cuantificado en un rango que ha oscilado entre 11 y 115 µg/kg

El antranílico acid methyl ester, es un compuesto muy importante en la miel de citrus por considerarse esencial en el aroma frutal de este tipo de miel. Al estar presente únicamente en esta variedad de miel, algunos autores también lo consideran apropiado para ser "indicador" de la misma (Serra 1988; Ferreres et al., 1994). Su concentración puede variar considerablemente, ya que en algunos trabajos no se ha encontrado este compuesto (Overton y Manura, 1994; Pérez et al., 2002), sin embargo, en otros estudios ha sido identificado en cantidades importantes 500-3000 µg/kg (Ferreres et al., 1994; Castro et al., 2006). Concretamente en este estudio ha podido ser cuantificado y sus valores han oscilado entre 200 y 3000 µg/kg, con niveles superiores en la miel de limón.

En este trabajo, han sido identificados 3 terpenos: D-limonene, 8-hidroxi-linalool y el β-linalool, componentes importantes de los aceites esenciales de la flor y los frutos de género citrus (Fisher y Scout, 1997). La concentración del D-limonene ha oscilado entre 0.2 y 19 µg/kg. Mientras que en otros trabajos este compuesto se ha encontrado en cantidades algo menores (Alissandrakis, 2003). El β-linalool se ha encontrado entre 13.9 y 128.6 µg/kg, rango similar al obtenido por otros autores (Castro et al., 2006).

Los alcoholes metílicos de 5 átomos de carbono como son el 3-metil-1-butanol, 3-metil-3-buten-1-ol (20-250 µg/kg) y 2-metil-2buten-1-ol, se han identificado en la miel de limón en niveles algo superiores a las de naranjo. Estos compuestos contribuyen al frescor del aroma "fresh notes" pero no son exclusivos de la miel de citrus (Bouseta et al., 1992).

Los derivados del furano como el furfural y el 2-furanmetanol son normalmente indicadores del tratamiento térmico o de las condiciones de almacenamiento y no pueden ser considerados buenos indicadores florales (Wootton et al., 1978; Visser et al., 1988; D'Arcy et al., 1997). En este estudio los valores más altos de estos compuestos se han presentado en las muestras de la Comunidad de Murcia.

**TABLA 1.** Valores medios de las áreas relativas (con respecto al patrón interno) de los compuestos volátiles identificados en la miel de citrus, atendiendo al origen geográfico (Comarcas de Valencia: V1 y V2; Comarcas de Murcia: M1 y M2) y botánico (o: naranja; l: limón y lo: mezcla de naranja y limón).

Compuesto	Procedencia								O.floral					
	V1		V2		M1		M2		O		L		O/L	
	X	desv.	X	desv.	X	desv.	X	desv.	X	desv.	X	desv.	X	desv.
<b>Ácidos</b>														
acetic acid	0,123	0,102	0,142	0,066	0,158	0,083	0,189	0,160	0,132	0,080	0,194	0,145	0,121	0,043
<b>Alcoholes</b>														
1-butanol	0,001	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000
2-propanol (isopropyl alcohol)	0,050	0,023	0,041	0,028	0,070	0,031	0,094	0,072	0,046	0,029	0,085	0,065	0,070	0,028
Etanol	1,100	1,040	1,336	1,134	1,499	0,535	2,219	1,195	1,286	1,094	1,924	1,183	1,682	0,376
2-methyl-3-buten-2-ol	0,201	0,190	0,177	0,050	0,229	0,048	0,305	0,137	0,185	0,114	0,276	0,130	0,278	0,039
2-methyl-1-propanol	0,206	0,282	0,171	0,146	0,202	0,133	0,513	0,415	0,192	0,204	0,423	0,398	0,192	0,152
2-methyl-1-butanol	0,200	0,213	0,214	0,155	0,227	0,084	0,778	0,628	0,213	0,173	0,640	0,609	0,229	0,149
3-methyl-3-buten-1-ol	0,264	0,233	0,309	0,085	0,213	0,052	0,335	0,150	0,289	0,151	0,306	0,144	0,226	0,028
3-methyl-2-buten-1-ol	0,106	0,135	0,162	0,061	0,087	0,039	0,108	0,102	0,140	0,095	0,109	0,091	0,072	0,018
2,6-dimethyl- 2,7-octadiene-1,6-diol	0,061	0,033	0,061	0,032	0,051	0,036	0,070	0,016	0,061	0,031	0,071	0,021	0,035	0,028
<b>Aldehídos</b>														
benzaldehyde	0,174	0,084	0,104	0,052	0,224	0,118	0,190	0,112	0,127	0,071	0,192	0,101	0,264	0,139
lilac aldehyde A	0,458	0,166	0,464	0,206	0,268	0,148	0,206	0,091	0,453	0,196	0,249	0,127	0,182	0,024
lilac aldehyde B	0,468	0,158	0,520	0,217	0,291	0,152	0,213	0,099	0,492	0,204	0,260	0,137	0,206	0,031
lilac aldehyde C	0,351	0,126	0,347	0,167	0,216	0,114	0,170	0,073	0,342	0,155	0,203	0,100	0,150	0,021
lilac aldehyde D	0,344	0,104	0,394	0,205	0,218	0,122	0,153	0,074	0,370	0,180	0,191	0,108	0,148	0,028
benzenacetaldehyde	0,521	0,285	0,381	0,253	0,215	0,122	0,136	0,116	0,423	0,268	0,181	0,138	0,133	0,032
nonanal	0,141	0,067	0,098	0,030	0,094	0,039	0,087	0,026	0,111	0,050	0,096	0,029	0,074	0,030
decanal	0,050	0,023	0,040	0,022	0,047	0,024	0,053	0,014	0,043	0,022	0,057	0,014	0,033	0,021
hexanal	0,062	0,026	0,036	0,030	0,029	0,026	0,025	0,021	0,044	0,031	0,028	0,024	0,031	0,020
acetaldehyde	0,016	0,036	0,037	0,037	0,021	0,021	0,053	0,041	0,031	0,037	0,045	0,039	0,014	0,019
<b>Hidrocarburos</b>														
pentane	0,163	0,175	0,092	0,288	0,064	0,111	0,010	0,017	0,114	0,251	0,009	0,016	0,103	0,142
octane	0,033	0,056	0,107	0,034	0,076	0,059	0,109	0,043	0,081	0,054	0,101	0,043	0,074	0,080
toluene (methyl benzene)	0,063	0,049	0,057	0,036	0,063	0,042	0,038	0,016	0,059	0,040	0,042	0,020	0,070	0,053
<b>Cetonas</b>														
3-hydroxy-2-butanone	0,253	0,234	0,235	0,074	0,192	0,051	0,218	0,096	0,238	0,146	0,222	0,084	0,163	0,033
1-hydroxy-2-propanone	0,026	0,020	0,024	0,011	0,040	0,021	0,062	0,024	0,026	0,015	0,059	0,025	0,026	0,009
acetone	0,705	0,209	0,558	0,338	0,541	0,341	0,338	0,137	0,612	0,302	0,350	0,142	0,636	0,412
2,3-butanedione	0,213	0,135	0,197	0,088	0,269	0,093	0,276	0,074	0,203	0,103	0,292	0,079	0,213	0,039
4-hydroxy-2-butanone	0,070	0,096	0,049	0,046	0,055	0,032	0,316	0,454	0,057	0,066	0,252	0,416	0,067	0,041
6-methyl-5-hepten-2-one	0,024	0,010	0,031	0,016	0,024	0,014	0,029	0,012	0,028	0,014	0,032	0,013	0,015	0,012
3-hepten-2-one	0,125	0,072	0,138	0,077	0,139	0,037	0,232	0,080	0,133	0,073	0,209	0,084	0,144	0,037
<b>Esteres</b>														
antranilic acid methyl ester	0,030	0,019	0,042	0,035	0,077	0,077	0,051	0,035	0,042	0,039	0,067	0,052	0,025	0,015
<b>Furanos</b>														
1-2(furanyl)-ethanone	0,014	0,017	0,012	0,006	0,018	0,009	0,028	0,009	0,013	0,011	0,028	0,009	0,012	0,003
2-furanmethanol	0,229	0,076	0,243	0,065	0,281	0,117	0,319	0,116	0,235	0,069	0,329	0,117	0,226	0,032
furfural	0,257	0,143	0,191	0,055	0,326	0,156	0,423	0,129	0,215	0,097	0,433	0,127	0,235	0,063
<b>Compuestos azufrados</b>														
dimethylsulphide	0,144	0,129	0,094	0,046	0,113	0,079	0,128	0,051	0,114	0,086	0,133	0,062	0,084	0,049
<b>Terpenos</b>														
b-linalool	0,203	0,083	0,206	0,085	0,121	0,076	0,142	0,081	0,203	0,083	0,150	0,081	0,084	0,043
8-hydroxylinalool	0,125	0,039	0,090	0,060	0,109	0,045	0,092	0,018	0,101	0,056	0,106	0,032	0,076	0,008
d-limonene	0,072	0,042	0,035	0,033	0,064	0,086	0,030	0,025	0,047	0,040	0,039	0,041	0,059	0,103

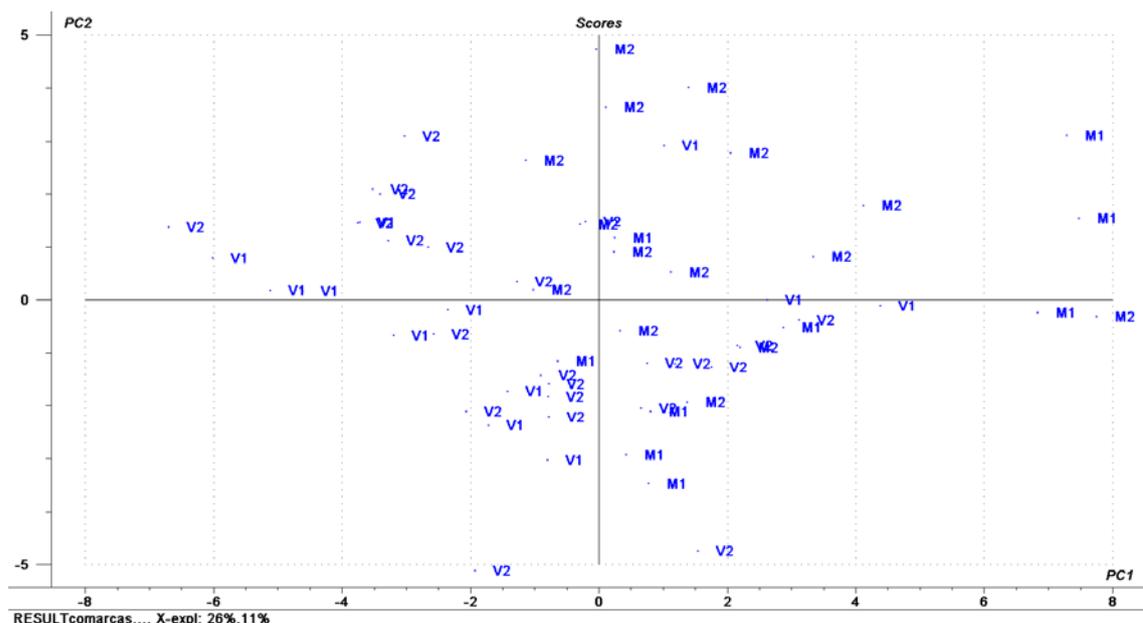
**TABLA 2.** Media, valor mínimo y valor máximo ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de los compuestos cuantificados según el origen floral.

Compuesto	o			l			ol		
	media	mínimo	máximo	media	mínimo	máximo	media	mínimo	máximo
octane	11,73	4,30	27,00	14,66	6,20	27,50	10,77	4,40	29,50
hexanal	6,05	2,90	17,50	3,78	0,80	11,10	4,18	0,80	8,10
2-methyl-1-propanol	73,94	10,00	404,40	162,60	31,20	549,30	73,94	44,20	177,90
d-limonene	3,84	0,40	13,80	3,20	0,20	10,60	4,84	0,70	19,90
3-methyl-3-buten-1-ol	90,18	31,00	234,00	95,76	40,60	217,30	70,69	64,80	85,90
nonanal	42,70	15,00	84,30	37,06	18,10	54,50	28,54	10,40	40,30
furfural	55,12	33,10	162,20	111,10	61,40	182,40	60,14	45,80	86,60
$\beta$ -linalool	59,81	24,80	128,60	44,22	15,50	85,20	24,75	13,90	46,60
benzaldehyde	28,94	11,10	82,00	43,54	17,70	107,20	60,02	39,80	115,30
antranilic acid methyl ester	422,47	152,70	1859,00	665,11	272,80	2242,10	245,41	31,80	413,00

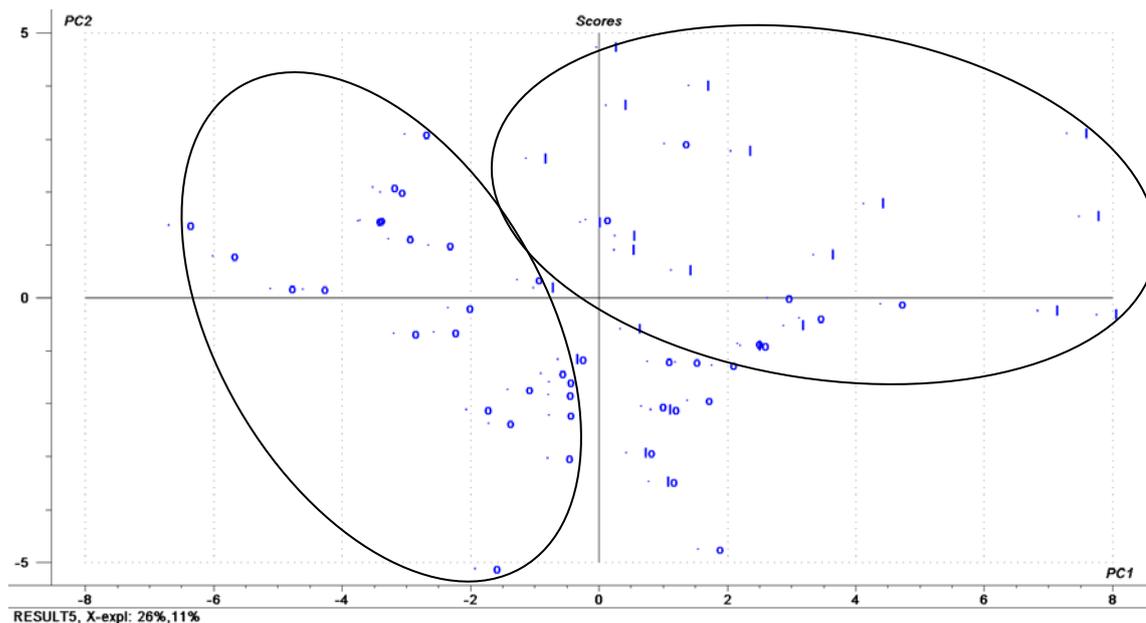
### 3.2 Variabilidad en la fracción volátil debida al origen botánico y geográfico

Después de la observación individual de cada compuesto, el efecto global debido al origen geográfico y botánico ha sido analizado a través de un PCA (puntuaciones de las muestras:  $a_1$  "origen geográfico" y  $a_2$  "origen botánico" y b: cargas) obtenido considerando la totalidad de los compuestos volátiles analizados (figura 1). El PCA retiene 4 componentes principales que explican casi el 53.4% de la variabilidad de los datos, el PC1 el 26% y el PC2 el 11%. En el gráfico de las puntuaciones, la proximidad entre muestras implica similar comportamiento en el perfil volátil y en el gráfico de cargas la proximidad entre compuestos implica un grado de correlación entre sus variaciones de concentración (similar comportamiento). La localización de las muestras (o, l, lo) indica que el cuadrante izquierdo corresponde fundamentalmente a la miel de naranjo (Comunidad Valenciana) mientras que el derecho corresponde fundamentalmente a las de limón (cuadrante superior derecho) o mezcla de naranjo y limón (cuadrante inferior derecho). El primer componente principal permite en gran medida diferenciar las mieles puras de naranjo, de las que no lo son. Esto parece indicar que el origen botánico de las mieles puede influir en la fracción volátil lo suficiente como para permitir su diferenciación.

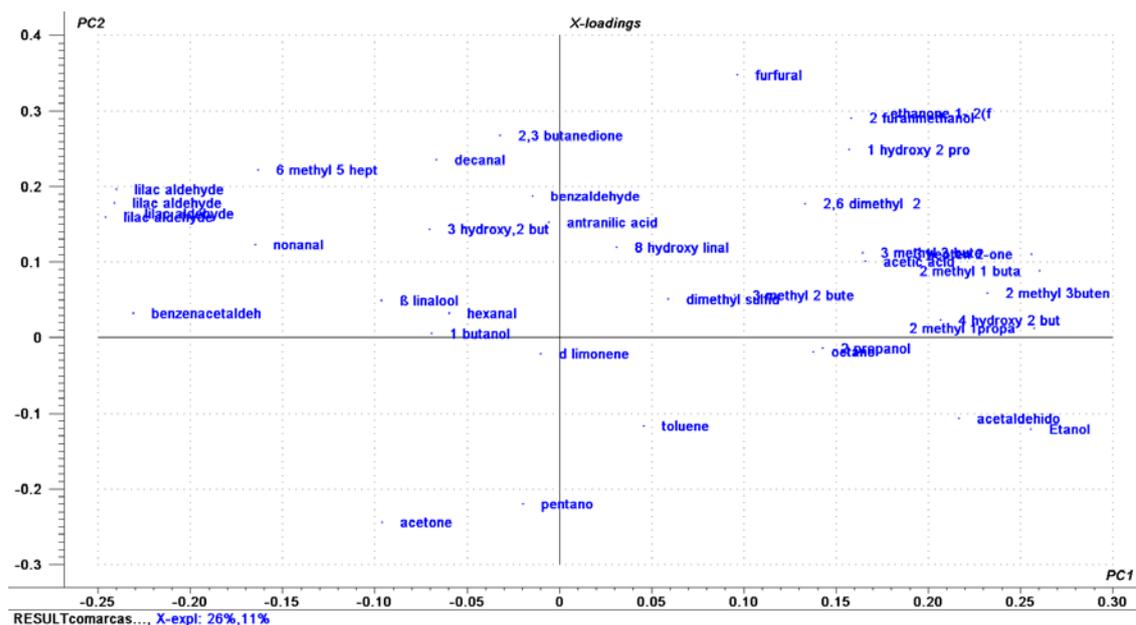
La carga de cada compuesto muestra que algunos de ellos parecen ser en gran medida responsables de la agrupación de las diferentes mieles. Por ejemplo el grupo de los aldehídos especialmente los lilac A, B, C y D, el bencenacetaldéhyde y el nonanal, se encuentran en cantidades más abundantes en las mieles de naranjo que en la de limonero o en las mezcladas. Por el contrario, compuestos como: 2-methyl-3-buten-2-ol, ethanol y acetaldéhyde: son más abundantes en las mieles de limón.



a<sub>1</sub>. Origen geográfico



a<sub>2</sub>. Origen botánico



b. gráfico de cargas

**FIGURA 1.** Resultado del Análisis de Componentes Principales realizado sobre la relación de áreas de los compuestos volátiles identificados. (a<sub>1</sub>) gráfico de puntuaciones para el origen geográfico (scores); (a<sub>2</sub>) gráfico de puntuaciones para el origen botánico (scores); (b) gráfico de cargas (loadings).

No se ha encontrado interpretación de los resultados reflejados en los componentes tercero y cuarto, por lo que, a pesar de que estadísticamente se han retenido (atendiendo a sus valores propios), no se han considerado en el estudio.

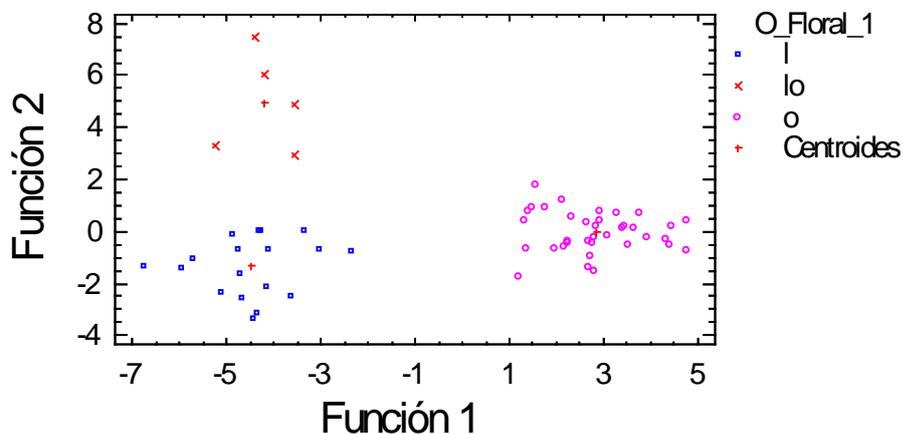
A la vista de los resultados obtenidos en el PCA había claras evidencias de que el perfil de volátiles obtenido en las muestras contiene información relevante sobre su diferenciación en cuanto a su origen geográfico y botánico. Es por ello que se realizó un estudio específico para este fin, a través de un análisis discriminante.

El análisis discriminante llevado a cabo sobre el conjunto de componentes volátiles (relaciones de áreas) de las muestras de naranjo (o), limón (l) y mezcla de ambos (lo), permitió la diferenciación de las muestras en función de dos variables canónicas (tabla 3). La primera función ha permitido diferenciar las muestras que sólo son de naranjo de aquellas que tienen limón y la segunda función diferencia las puras de las mezclas (figura 2).

**TABLA 3.** Autovalor, % relativo y correlación canónica de las funciones discriminantes según origen botánico.

Origen botánico			
Función discriminante	Autovalor	% relativo	Correlación canónica
1	13,1403	82,77	0,96399
2	2,7360	17,23	0,85577

**Gráfico de Funciones Discriminantes**



**FIGURA 2.** Gráfico discriminante de las muestras atendiendo al origen botánico: l=limón; o= naranjo; lo= mezcla de limón y naranjo.

La tabla 4 muestra los coeficientes estandarizados de las funciones discriminantes para las distintas variables. Con relación a la función 1, las variables que más han contribuido a la separación han sido: lilac aldehyde A, 3-methyl-3-buten-1-ol, 2-methyl-1-propanol y 4-hydroxy-2-butanone, mientras que para la función 2 han sido principalmente los 4 lilac.

**TABLA 4.** Coeficientes estandarizados de las funciones discriminantes utilizando el factor origen botánico.

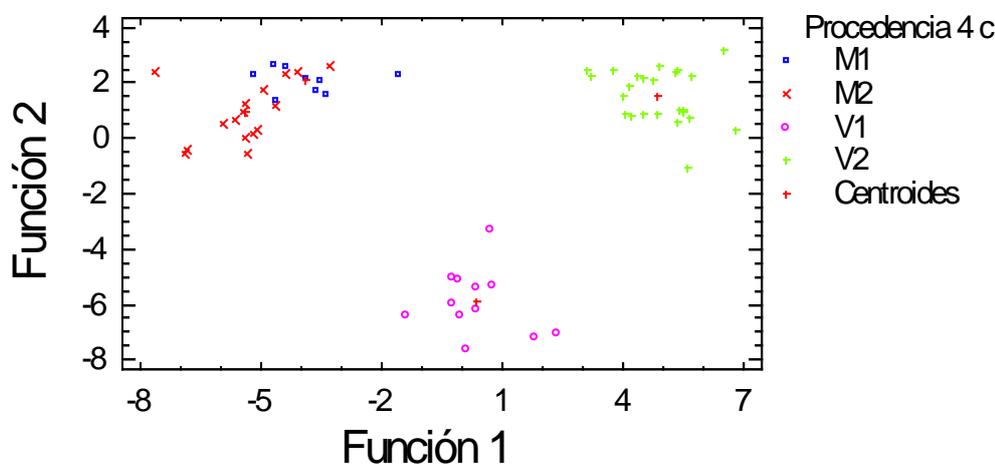
Compuesto	Función 1	Función 2
1-butanol	0.866118	0.228187
2-furanmethanol	-1.27368	0.981555
3-hepten-2-one	1.19492	0.187526
4-hydroxy-2-butanone	<b>-1.73794</b>	0.518316
1-hydroxy-2-propanone	-0.0855165	0.141396
8-hydroxylinalool	0.598283	-1.7887
3-hydroxy-2-butanone	-0.0092213	-0.0573585
$\beta$ -linalool	-0.0460894	0.289711
2-methyl-1-butanol	-0.463946	-0.019866
2-methyl-1-propanol	<b>1.88806</b>	-1.95724
3-methyl-2-buten-1-ol	0.707238	0.0262727
3-methyl-3-buten-1-ol	<b>1.99166</b>	0.92223
2-methyl-3-buten-2-ol	-1.58423	-1.358
6-methyl-5-hepten-2-one	-0.759465	0.546193
2-propanol	0.297281	0.157652
2,3-butanedione	-0.242326	0.42297
2,6-dimethyl-2,7-octadien-1,6-ol	-0.472084	-0.0953495
acetaldehyde	0.981403	0.936963
acetic acid	0.0666187	0.30218
acetone	1.19545	-1.26709
antranilic acid methyl ester	0.507325	0.362979
benzaldehyde	-0.516129	-1.18145
benzenacetaldehyde	0.546129	0.560454
d-limonene	-0.683656	-0.119316
decanal	-0.807634	-0.0930517
dimethylsulphide	-0.0512535	1.30524
etanol	-0.208673	0.875767
1-2(furanyl)-ethanone	-0.00802029	-0.343576
furfural	-0.195586	0.345157
hexanal	0.284415	-0.0275088
lilac aldehyde A	<b>2.65506</b>	<b>11.026</b>
lilac aldehyde B	1.24061	<b>-6.35859</b>
lilac aldehyde C	-1.6869	<b>-2.51253</b>
lilac aldehyde D	-0.371712	<b>-2.51378</b>
nonanal	0.718126	0.107795
ectane	-0.518624	-0.398398
pentane	-0.714883	1.27865
toluene	-0.197013	0.090145

Por otra parte, también se ha evaluado el efecto global del origen geográfico, utilizando otro análisis discriminante, llevado a cabo de la misma forma que anteriormente pero utilizando el factor procedencia. Este análisis permitió la diferenciación de las muestras en función de dos variables canónicas que explican el 89,83% de la varianza (tabla 5). La función 1 explica el 61.92% y la función 2 el 27.91%. Con estas funciones se ha podido diferenciar perfectamente las muestras que son de Murcia de las de Valencia, e incluso entre las dos comarcas de Valencia, sin embargo no ha sido capaz la diferenciación entre las dos comarcas de Murcia (figura 3). Esto puede ser debido a la proximidad de las dos comarcas murcianas, ya que la Comunidad de Murcia es mucho menos extensa que la de Valencia.

**TABLA 5.** Autovalor, % relativo y correlación canónica de las funciones discriminantes según origen geográfico.

Función discriminante	Origen geográfico		
	Autovalor	% relativo	Correlación canónica
1	20,5871	61,92	0,97656
2	9,2812	27,91	0,95012

**Gráfico de Funciones Discriminantes**



**FIGURA 3.** Gráfico discriminante de las muestras atendiendo al origen geográfico (M1=Murcia comarca 1; M2=Murcia comarca 2; V1= Valencia comarca 1; V2=Valencia comarca 2). Las variables corresponden a las relaciones de áreas de los diferentes compuestos volátiles.

La tabla 6 muestra los coeficientes estandarizados de las funciones discriminantes para las distintas variables. Con relación a la función 1 las variables que más han contribuido a la separación han sido: lilac aldehyde C, lilac aldehyde B, 2-methyl-1propanol y 3-methyl-3-buten-1-ol. Mientras que para la función 2 han sido: lilac aldehyde A, lilac aldehyde B, lilac aldehyde D y 2-methyl-1-propanol.

**TABLA 6.** Coeficientes estandarizados de las funciones discriminantes utilizando el factor origen geográfico.

<b>Compuesto</b>	<b>Función 1</b>	<b>Función 2</b>
1-butanol	0,57429	-0,436774
2-furanmethanol	-0,72353	-0,0703382
3-hepten-2-one	1,6958	-0,609921
4-hydroxy-2-butanone	-0,710868	0,471907
1-hydroxy-2-propanone	-0,470641	0,192898
8-hydroxylinalool	0,37713	1,81675
3-hydroxy-2-butanone	-0,407597	-0,469883
β-linalool	0,547449	-0,280876
2-methyl-1-butanol	1,12295	1,84407
2-methyl-1-propanol	<b>-2,51585</b>	<b>-4,57579</b>
3-methyl-2-buten-1-ol	1,75202	0,361399
3-methyl-3-buten-1-ol	<b>-2,3636</b>	-0,0694309
2-methyl-3-buten-2-ol	1,12968	-0,467572
6-methyl-5-hepten-2-one	-0,351279	0,544049
2-propanol	0,232598	0,117584
2,3-butanedione	-0,242112	-0,130964
2,6-dimethyl-2,7-octadien-1,6-ol	-0,469072	-0,369667
acetaldehyde	2,14959	0,789302
acetic acid	0,248536	-0,0392614
acetone	0,795542	0,332178
antranilic acid methyl ester	-0,0607449	0,524255
benzaldehyde	-0,0781687	0,371776
benzenacetaldehyde	-0,3095	-1,19941
d-limonene	-0,536982	-0,575898
decanal	-0,85517	0,175961
dimethylsulphide	-0,658799	-1,19625
etanol	-0,219186	1,77673
1-2(furanyl)-ethanone	0,221324	0,434453
furfural	-0,471575	-0,149179
hexanal	0,324811	-0,0573439
lilac aldehyde A	0,989431	<b>-8,77877</b>
lilac aldehyde B	<b>3,11244</b>	<b>4,66568</b>
lilac aldehyde C	<b>-3,75941</b>	0,718793
lilac aldehyde D	1,18962	<b>4,01101</b>
nonanal	0,398997	-0,875078
ectane	-0,352608	0,899885
pentane	-1,2022	-1,07629
toluene	-0,45153	-0,540725

#### 4. CONCLUSIONES

El perfil de compuestos volátiles identificados por purga y trampa GC-MS con desorción atómica junto con un análisis quimiométrico adecuado, ha permitido diferenciar las mieles de citrus según sus especies botánicas (*Citrus sp.* y *Citrus limon*). Las mieles de naranja y limón han mostrado tener un perfil volátil diferenciado, al igual que las procedentes de la mezcla de ambas.

Esta metodología aporta una nueva herramienta que puede complementar e incluso sustituir la metodología clásica del análisis melisopalinológico.

La diferenciación de las mieles de citrus, como de naranjo o limonero, puede ser utilizado por el sector como herramienta de marketing para la promoción de La Marca de Calidad CV de la miel de azahar.

## 5. AGRADECIMIENTOS

Agradecer a mis directores toda la atención y el tiempo dedicado en la realización de este trabajo.

## 6. REFERENCIAS

Alissandrakis, E.; Daferera, D.; Tarantilis, P. A.; Polissiou, M.; Harizanis, P. C. (2003). Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from citrus flowers and citrus honey. *Food Chemistry*, 82, 575-582.

Alissandrakis E., Tarantilis P.A., Polissiou M. and Harizanis P.C. (2005). Evaluation of four isolation techniques for honey aroma compounds, *J Sci. Food Agric.* 5, 91-97.

Alissandrakis, E.; Tarantilis, P.A.; Polissiou, M.; Harizanis P.C. (2007). Aroma investigation of unifloral Greek citrus honey using solid-phase microextraction coupled to gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *Food Chemistry*, 100, 396-404.

Bouseta, A.; Collins, S.; Dufour, J.P. (1992). Characteristic aroma profiles of unifloral honeys obtained with dynamic headspace GC-MS system, *Journal of Apicultural Research.*, 31, 96-109.

Bouseta, A.; Collin, S. (1995). Optimized Likens-Nickerson methodology for quantifying honey flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43, 1890-1897.

Castro Vazquez, L.; Diaz Maroto M.C.; Pérez Coello, M. (2006). Volatile composition and contribution to the aroma of Spanish honeydew honeys. Identification of a new chemical marker. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4809-4813.

Cuevas Glory, L.F.; Pino, J.A.; Santiago, L.S.; Sauri-Duch, E. (2007). A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. *Food Chemistry*. 1032-1043.

D'Arcy, B.R.; Rintoul, G. B.; Rowland, C.Y.; Blackman, A. J. (1997). Composition of Australian honey extractives. Norisoprenoids, monoterpenes, and other natural volatiles from blue gum (*Eucalyptus leucoxylon*) and yellow box (*Eucalyptus melliodora*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1834-1843.

De la Fuente, E.; Martínez-Castro, I; Sanz, J. (2005). Characterization of Spanish unifloral honeys by solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 28, 1093-1100.

Escrive, I.; Visquert, M.; Juan-Borrás, M.; Fito, P. (2008) Influence of simulated industrial thermal treatments on the volatile fractions of different varieties of honey. *Food Chemistry* 112, 329-338.

Ferreres, F.; Giuer, J.M.; Tomás-Barberán, F.A.(1994)."A comparison study of hesperetin and methyl anthranilate as markers of the floral origin of citrus honey", *Journal Science Food Agriculture*, 65, 371-372.

Fisher, C.; Scott, T.R. (1997). *Food Flavours. Biology and Chemistry*.Ed.The Royal Society of Chemistry. Thomas Graham House. Science Park, Milton Road, Cambridge DB4 4WF,UK.

Louveaux,J.; Mauricio, A.; Vorwohl,G. (1978). Methods of melissopalynology. *Bee Word*, 59, 139-157.

Overton, S.; Manura, J. (1994). Flavour and aroma in commercial bee honey.A purge-and-trap thermal desorption technique for the identification and quantification of volatiles and semivolatiles in honey. *American laboratory*. 45, 45-53.

Pérez, R. A.; Sanchez- Brunete, R. M.; Tadeo, J: L: (2002). Analysis of volatiles from Spanish honeys by solid-phase microextraction an gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50,2633-2637.

Piasenzotto, L.; Gracco, L.; Conte,L. (2003). Solid phase microextraction(SPME) applied to honey quality control. *Journal of Science and Food Agriculture*, 83,1037-1044.

Radovic, B. S.; Careri-Piazza, M.; Zellini, G.(1995) Caratteristiche cromatiche dei mieli unifloral. *Apicoltura*, 10, 109-120.

Serra Bonvehi, J. (1988).Determinación de antranilato de metilo en la miel de cítricos (Citrus sp.) del Levante Espanol, y su influencia en la actividad diastásica de la miel, *Alimentaria* 197, 37-40.

Serra-Bonvehí, J.; Ventura-Coll, F. (2003). Flavour index and aroma profiles of fresh and processer honeys. *Journal of the Sicence of food Agriculture*, 83, 275-282.

Soria, A.C.; González, M.M.; Sans, J.(2002)."Los componentes volátiles y el aroma". *La miel de Madrid*, 121-136.

Soria, A.C.; Martinez-Castro, I.; Sanz, J. (2003). Analysis of volatile composition of honey by solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 26, 793-801.

Verzera, A.; Campisi, S.; Zappalá,M.; Bonaccorsi, I. (2001). SPME-GC-MS analysis of honey volatile components for the characterization of different floral origin. *American laboratory News* ,18-21.Julio.

Visser, F. R.; Allen, J. M.; Shaw, G. J. (1988) The effect of heat on the volatile flavor fraction from a unifloral honey. *Journal of Apiculture Research*, 27, 175-181.

Wootton, M.; Edwards, R. A.; Faraji-Haremi, R. (1978). Effect of accelerated storage conditions on the chemical composition and properties of Australian honeys. *Journal of apicultural Research*, 17(3) 167-172.