

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE
VALÈNCIA**

***EVALUACIÓN DE UN MÉTODO
DE DETECCIÓN DE
ADULTERACIÓN DE MIELES
CON JARABE DE ARROZ***

**TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E
INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS**

ALUMNO/A: BALERIOLA MUÑOZ, LAURA

**TUTOR/A ACADEMICO: JUAN BORRÁS, MARÍA DEL SOL
COTUTOR/A: ESCRICHE ROBERTO, M^a ISABEL**

Curso Académico:2019-2020

VALENCIA, NOVIEMBRE 2020

EVALUACIÓN DE UN MÉTODO DE DETECCIÓN DE ADULTERACIÓN DE MIELES CON JARABE DE ARROZ

Baleriola Muñoz L.; Escriche Roberto I.; Jiménez Jiménez, Y.; Juan Borrás M.

Resumen

La miel es uno de los alimentos más susceptible de ser adulterado, lo que supone un importante problema económico para el sector y de seguridad alimentaria para el consumidor. Generalmente, las adulteraciones se producen por adición de jarabes azucarados, especialmente de arroz. En este sentido, el objetivo del presente trabajo ha sido la puesta a punto de un método cromatográfico (mediante HPLC-DAD), para la detección de adulteración de miel con jarabes de arroz identificando el marcador 2-acetil furano 3 glucopiranosido (AFGP). La optimización del método para la cuantificación de este compuesto ha permitido mejorar su resolución cromatográfica y evitar los solapamientos con interferentes propios de la matriz, tanto de mieles monoflorales como milflores. Esto ha permitido distinguir de manera inequívoca la presencia de este marcador en muestras de miel adulteradas con este tipo de jarabe. Además, se ha conseguido reducir el límite de cuantificación de este compuesto hasta un 3% de adulteración, mejorando el 7% reportado en la bibliografía.

PALABRAS CLAVE: Miel, adulteración, jarabe de arroz, HPLC-DAD

Resum

La mel és un dels aliments més susceptible de ser adulterat, fet que suposa un important problema econòmic per al sector i de seguretat alimentària per al consumidor. Generalment, les adulteracions es produeixen per addició de xarops ensucrats, especialment d'arròs. En aquest sentit, l'objectiu d'aquest treball ha sigut la posta a punt d'un mètode cromatogràfic (mitjançant HPLC-DAD), per a la detecció d'adulteració de mel amb xarops d'arròs, identificant el marcador 2-acetil furà 3 glucopiranosid (AFGP). L'optimització del mètode per a la quantificació d'aquest compost ha permès millorar la seva resolució cromatogràfica i evitar els solapaments amb interferents propis de la matriu, tant de mels monoflorals com milflors. Això ha permès distingir de manera inequívoca la presència d'aquest marcador en mostres de mel adulterades amb aquest tipus de xarop. A més, s'ha aconseguit reduir el límit de quantificació d'aquest compost fins a un 3% d'adulteració, millorant el 7% reportat en la bibliografia.

PARAULES CLAU: Mel, adulteració, xarop d'arròs

Summary

Honey adulteration is among the most usual food frauds, which represents a major problem both for the economic sector and consumer food safety. The adulteration of honey usually consists in the addition of syrups, especially rice syrup. In this sense, the purpose of this work has been the development of a chromatographic method (using HPLC-DAD), for the detection of adulteration of honey with rice syrups, identifying the marker 2-acetyl furan-3-glucopyranoside (AFGP). The optimization of the method for the quantification of this compound has improved its chromatographic resolution and avoided overlaps with typical interferents of the matrix, both from monofloral honeys and from multifloral ones. The results show that it is possible to unequivocally distinguish the presence of this marker in honey samples adulterated with this type of syrup. In addition, the limit of quantification of this compound has been reduced to 3% adulteration, improving the 7% reported in the bibliography.

KEYWORDS: honey, adulteration, rice syrup, HPLC-DAD

1. INTRODUCCIÓN

La miel es uno de los alimentos en los que se detecta mayor número de fraudes, junto con el aceite de oliva y la leche (Parlamento Europeo, 2018). Es muy apreciada por sus cualidades organolépticas y nutricionales, pero por su mayor coste sufre adulteraciones con sustancias más económicas, cada vez más difíciles de detectar.

La comercialización de miel adulterada supone un grave problema a nivel económico para el sector ya que la entrada en el mercado de este producto, a un precio muy inferior, supone una competencia desleal para los apicultores que cumplen con la legalidad establecida. Las adulteraciones alcanzan tal dimensión que, pese al problema mundial de disminución del número de abejas, los precios de la miel bajaron casi a la mitad entre 2014 y 2016 (Parlamento Europeo, 2018). Además, la miel adulterada puede implicar un problema de salud pública ya que las sustancias no declaradas en el etiquetado pueden ocasionar problemas toxicológicos, intolerancias o alergias. Tampoco hay que olvidar que éstas pueden ocasionar una reducción de su valor nutricional, puesto que la mayoría de adulterantes empleados únicamente aportan azúcares (Cai et al. 2013)

El Codex Alimentario (2001) y la legislación europea (Directiva 2001/110/CE) establecen que *“la miel vendida como tal no deberá contener ningún ingrediente adicional, incluidos los aditivos alimentarios, ni tampoco se permitirá adición alguna que no sea miel”*. Por tanto, la legislación europea considera que la presencia de cualquier otra sustancia ajena a la miel es fraude.

La miel se compone esencialmente de diferentes azúcares, mayoritariamente fructosa (33-42%), glucosa (27-36%), maltosa (<7%) y en menor proporción sacarosa (<3%) (Visquert, 2015). Además, tiene un contenido de agua de aproximadamente 17-22% y otras sustancias minoritarias como ácidos orgánicos, enzimas y partículas sólidas derivadas de la recolección (Codex Alimentarius, 2019). Usualmente, la adulteración de la miel se produce adicionando jarabes azucarados ya que por sus características fisicoquímicas se homogenizan relativamente bien con ella. Sin embargo, hay que tener en cuenta otro tipo de adulteración que tiene lugar cuando las abejas son alimentadas por el apicultor en invierno con soluciones azucaradas y éste no tiene la precaución de retirar *“la pseudomiel”* que ellas elaboran a partir de dichas soluciones. Este tipo de producto, aunque haya sido elaborado por la abeja, no se puede considerar miel, y por lo tanto su comercialización es un fraude, y se considera como miel adulterada.

Actualmente, el método de detección de adulteraciones más utilizado se basa en el NMR (Nuclear Magnetic Resonance), que se fundamenta en la



absorción y emisión de energía de los núcleos de las moléculas, proporcionando una huella espectroscópica característica de una miel o de la sustancia en cuestión. Este método, no obstante, presenta el inconveniente de ser muy caro y de requerir una amplia base de datos de mieles puras con las que comparar los resultados (Sobrino et al., 2019). También es de destacar el método SCIRA (Stable carbon isotope ratio), puesto que es la única analítica oficial que realizan las autoridades sanitarias (AOAC 998.129). Este método está basado en la medición de la abundancia de los isótopos de carbono. Debido a las diferencias en la ruta metabólica de la fotorrespiración, las plantas C4 poseen una ratio de $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ mayor respecto a las C3 (L. Elflein, K.-P. Ræzke, 2008). Las abejas se alimentan mayoritariamente del néctar de plantas C3, por lo que este método permite detectar mieles adulteradas con jarabes procedentes de plantas C4 al poseer ratios $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ superiores al esperado. No obstante, resulta insuficiente ya que con él únicamente se identifican adulteraciones producidas por la adición de jarabes procedentes de plantas C4, como el maíz o el azúcar de caña. Sin embargo, no hay un único método genérico que permita detectar adulteraciones realizadas con jarabes provenientes de plantas C3 (arroz, cebada, arce, etc.), sino multitud de métodos distintos enfocados a detectar específicamente una propiedad de cada adulterante. Entre estos, destacan las técnicas cromatográficas, que resultan especialmente útiles por su rapidez y fiabilidad (Danezis et al, 2016). De esta manera, se ha identificado marcadores característicos en jarabe de almidón (Wang et al., 2015) o jarabe de maíz (Ruiz-Matute et al., 2007, Ruiz-Matute et al., 2010).

Actualmente, uno de los adulterantes más empleados por su reducido precio es el jarabe de arroz, especialmente en China (Wu et al, 2017). Este tipo de adulterante resulta difícil de detectar con los métodos anteriormente expuestos, puesto que el arroz es una planta C3, y los azúcares que lo componen mayoritariamente, como la glucosa o maltosa, son sacáridos muy abundantes igualmente en la miel (Cai et al. 2013). Recientemente, se ha aplicado la técnica de PCR para identificar la presencia de jarabe de arroz en mieles, mediante la detección de fragmentos de ADN de dicha planta (Sobrino et al., 2019). Sin embargo, esta técnica, hasta la fecha, únicamente ha resultado concluyente en el caso de adulteración con melaza de arroz.

La detección del biomarcador 2-acetil furano 3 glucopiranosido (AFGP), presente en el jarabe el arroz, puede ser útil para evaluar la presencia de este tipo de jarabe ya que es un compuesto que no está presente en la miel. Por ello, algunos autores lo han propuesto como un marcador que podría ser válido para detectar específicamente este tipo de adulteración. Xue et al. (2013), propusieron la identificación de este compuesto, mediante la técnica HPLC-DAD como un método eficaz para detectar adulteraciones de jarabe de arroz superiores al 7%.



Por lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente trabajo ha sido la optimización de un método cromatográfico para la cuantificación del 2-acetil furano 3 glucopiranosido como marcador de la adulteración de la miel con jarabe y melazas de arroz. Además, la efectividad del método desarrollado se ha probado en el análisis de mieles puras y en muestras en las que se ha simulado la adulteración de la miel con estos adulterantes.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Muestras

Se analizaron 25 mieles españolas de pureza garantizada, proporcionadas por la empresa Melazahar (Montroy, Valencia). Se trataba de mieles monoflorales de orígenes botánicos diversos: azahar, romero, cantueso, girasol, roble y encina, así como procedencia geográfica de toda la península (Castilla La Mancha, Castilla y León, Cataluña, Comunidad Valenciana y Galicia). Por su relevancia a nivel comercial, también se tomaron muestras de 5 mieles multiflorales de origen chino, suministradas por una empresa con el certificado de miel pura.

Para las muestras de mieles en las que se simuló adulteración, se emplearon dos jarabes de arroz, de las marcas comerciales Biocesta (Valencia, España) y Mandolé (Valencia, España), así como melaza de arroz procedente de la empresa Danival (Andiran, Francia).

2.2 Reactivos y disoluciones patrones

Tanto los reactivos como disolventes empleados eran de calidad apta para HPLC. El acetonitrilo y los reactivos Carrez I y II fueron suministrados por Scharlab (Sentmenat, España). Los filtros de PVDC, de 0,45 μm fueron adquiridos en Phenomenex (Torrance, CA, USA). El patrón de 2-acetil furano 3 glucopiranosido (1-[3-(3,4,5- trihidroxi-6-metoxi-tetrahidro-2H-pirano-2-iloxi) furan-2-il]-etanona) con una pureza del 99%, (también denominado 3-O- α -D-Glucosil Isomaltol o AFGP), fue proporcionado por TRC (Toronto, Canadá) El agua bidestilada se obtuvo de un sistema de agua Milli-Q (Millipore Corp., Billerica, MA).

El reactivo Carrez I se preparó disolviendo 15g de acetato de zinc en agua mili-Q, aforando a 100 mL. Para obtener el reactivo Carrez II, se disolvieron 30g de ferrocianuro potásico en 1000 mL de agua mili-Q.

A fin de obtener la disolución madre, se disolvieron 2,5 mg de AFGP en 1 ml de agua bidestilada. Los estándares de trabajo se realizaron mediante la dilución de la solución madre patrón en agua bidestilada, para obtener 6 niveles de calibración: 5, 25, 50, 100, 150 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.3 Preparación y extracción de la muestra

El método de preparación de la muestra fue una modificación del descrito por Xue et al. (2013). Se tomaron 5 gramos de miel, pura o adulterada, jarabe o melaza, que fueron diluidos en agua bidestilada en relación 1:1 en peso. Las mieles adulteradas se realizaron adicionando a la miel pura jarabe o melaza de arroz en distintas proporciones (3, 5, 7, 15, 30 ó 50%). Para eliminar interferencias en la medida cromatográfica, a las diluciones anteriores se les añadió 0,5 mL de Carrez I y 0,5 mL de Carrez II. Estas disoluciones se centrifugaron a 5300 rpm durante 5 minutos y se hicieron pasar por un filtro de PVDC. Aproximadamente 1 mL del filtrado se transfirió a un vial, que era introducido en el HPLC-DAD.

2.4 Análisis cromatográfico: HPLC-DAD

Se utilizó un equipo HPLC 1200 Series Rapid Resolution, provisto de un desgasificador, una bomba binaria, un inyector automático y un compartimento termostatzado de columna, acoplado a un detector de diodos Serie (Agilent, Palo Alto, CA, USA). El Software ChemStation se utilizó para el tratamiento de datos. Se utilizaron una columna cromatográfica AqC18 tipo C18 y una columna Luna Omega Sugars tipo HILIC, ambas suministradas por Phenomenex (Torrance, CA, USA).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Optimización del método de análisis

3.1.1. SELECCIÓN DE LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA

Se comenzó utilizando una columna específica para detección de azúcares, basada en un mecanismo de retención por interacción hidrofílica (HILIC), ya que este tipo de columnas son específicas para mejorar la retención y selectividad de compuestos polares, como el compuesto objeto de este estudio (el carbohidrato AFGP). Las condiciones de los parámetros

cromatográficos ensayadas fueron las propuestas por Xue et al., 2013. La Figura 1 muestra, como ejemplo, un cromatograma correspondiente al patrón del marcador AFGP en una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ (a) y una muestra de miel pura (b). En el cromatograma correspondiente a la miel (b) se observa una señal cromatográfica al mismo tiempo de retención (RT) en el que aparece el AFGP (a). Este pico se observó en todas las mieles puras ensayadas, por lo tanto se puede considerar que es algún compuesto inherente de la matriz, con independencia de su origen botánico y procedencia geográfica. Dicho compuesto, es posiblemente un azúcar, ya que la columna cromatográfica HILIC es específica para la detección de carbohidratos.

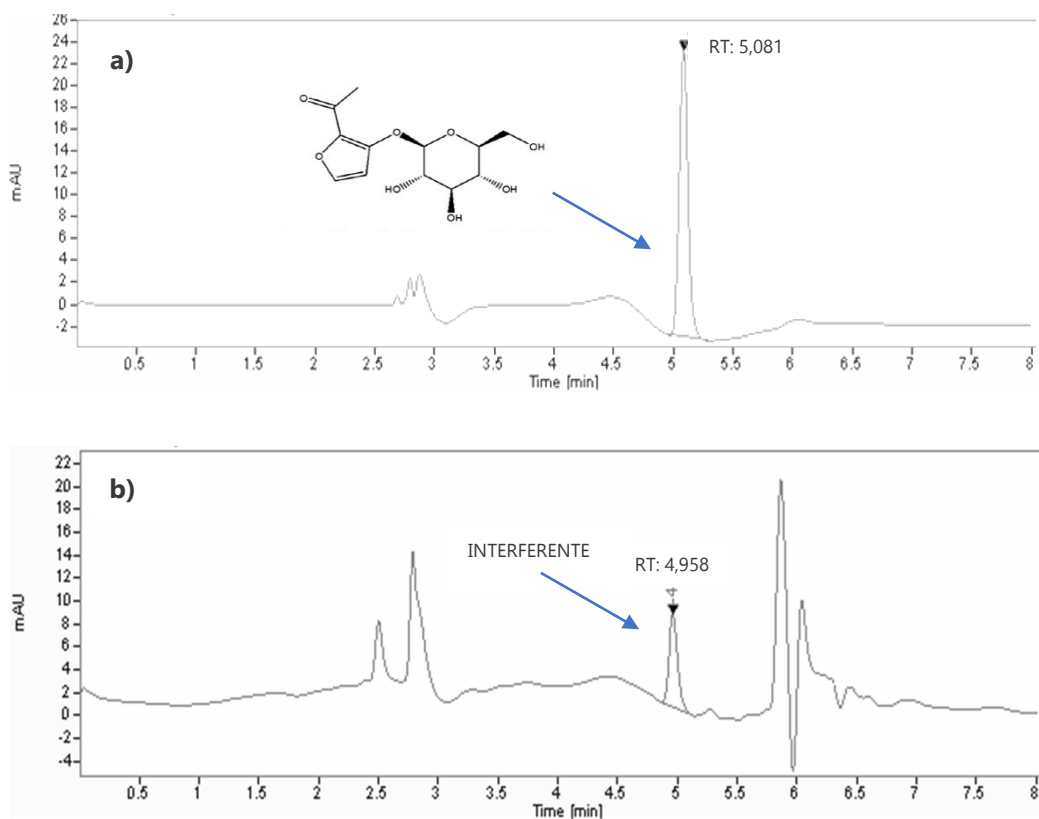


FIGURA 1. Ejemplos de cromatograma de patrón AFGP (50 $\mu\text{g/mL}$) (a) y de miel pura (b)

Con la finalidad de conseguir desplazar el interferente y que no coeluyera con el marcador AFGP, se probaron distintos gradientes, variando la composición de la fase móvil (datos no mostrados). De nuevo se producía una coelución, ya que, aunque el pico del interferente se desplazaba, también lo hacía el compuesto marcador. Por ello, se concluyó que esta columna no era adecuada, ya que el interferente no permitía determinar la presencia de AFGP en la muestra de miel, y por tanto no era

posible identificar la posible adulteración con jarabe de arroz. Este hecho también fue observado por otros autores (Du et al., 2015) que descartaron el uso de este tipo de columna (HILIC) para la identificación de AFGP en miel, al no conseguir una separación eficaz del compuesto.

Una vez descartada la columna HILIC, se probó con la columna C18 en las mismas condiciones cromatográficas del ensayo anterior. En la Figura 2 se muestran, como ejemplo, un cromatograma obtenido para el marcador AFGP (a) y otro para una miel pura (b). Se puede observar en este caso, que no aparece ninguna señal en el mismo tiempo del AFGP (4.354 min). Por lo tanto, se eligió la columna C18 para continuar con el experimento.

Du et al. (2015), en el análisis de mieles adulteradas con jarabe de arroz también obtuvieron una buena separación del compuesto AFGP con este tipo de columna C18, y además también reportaron buenos resultados con el empleo de una columna tipo amida.

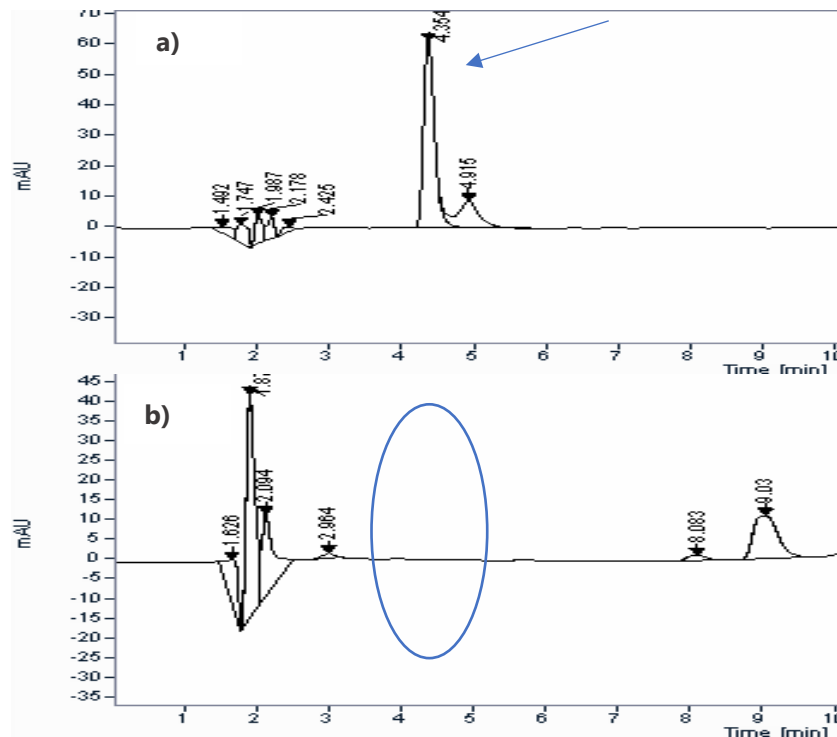


Figura 2. Ejemplo de cromatograma de patrón AFGP (50 µg/mL) (a) y de miel pura (b)

3.1.2. MEJORA DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Una vez seleccionada la columna que permitía la correcta identificación del compuesto objeto de estudio, se decidió trabajar para definir las

condiciones óptimas de los parámetros del método cromatográfico que permitieran ahorrar tiempo y disolvente sin disminuir la resolución. Tras varias pruebas se pasó de un caudal inicial de 0.2 mL/min hasta el caudal seleccionado de 0.8 mL/min. De igual forma se probaron diferentes gradientes de dilución de la fase móvil tal y como se detalla en la Tabla 1, que muestra el inicial (Gradiente 1) y el seleccionado para continuar el experimento (Gradiente 2). En ambos casos, la fase A fue agua bidestilada y la fase B acetonitrilo.

TABLA 1. Gradientes de elución utilizados seleccionados

| Tiempo (min) | Agua bidestilada- acetonitrilo (%) | |
|-----------------|---------------------------------------|----------------|
| | Gradiente 1 | Gradiente 2 |
| 0 | 99-1 | 99-1 |
| 11 | “ | 90-10 |
| 14 | “ | 99-1 |
| 15 | 95-5 | “ |
| 16 | 10-90 | “ |
| 18 | “ | 99-1 |
| 22 | 99-1 | - |
| 32 | 99-1 | - |

La Tabla 2 resume las condiciones de los parámetros cromatográficos iniciales (Método 1) y los definitivos propuestos (Método 2). Con este último método se consiguió que los picos cromatográficos estuvieran mejor definidos y sin solapamientos, lo que facilitó la identificación y cuantificación del compuesto AFGP.

TABLA 2. Condiciones de los parámetros cromatográficos ensayados.

| Condiciones cromatográficas | Método 1 (Xue et al., 2013) | Método 2 (optimización) |
|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| Caudal (mL/min) | 0.2 | 0.8 |
| Volumen de inyección (µl) | 20 | 20 |
| Longitudes de onda (nm) | 190, 250, 280, 290 | 190, 250, 280, 290 |
| Tiempo de retención (min) | 32 | 18 |
| Temperatura (°C) | 30 | 30 |

3.2 Efecto de la monofloralidad en la detección del marcador AFGP

Con la finalidad de comprobar que las condiciones cromatográficas optimizadas (columna C18 y Método 2) eran adecuadas, se analizaron 2 jarabes y una melaza de arroz, así como las 30 mieles puras, anteriormente descritos en el apartado de Material y Métodos.

Para confirmar que efectivamente el compuesto marcador AFGP estaba presente en los 2 jarabes y la melaza de arroz siguiendo la metodología descrita en el apartado anterior. Como se observa en la Figura 3, el jarabe de arroz (b) presenta el pico cromatográfico correspondiente a la señal de AFGP (a), sin embargo, no se detectó en la melaza de arroz (c) este. Por tanto, la molécula AFGP resulta adecuada como marcador de adulteración de miel con jarabe de arroz, pero no como marcador para su melaza.

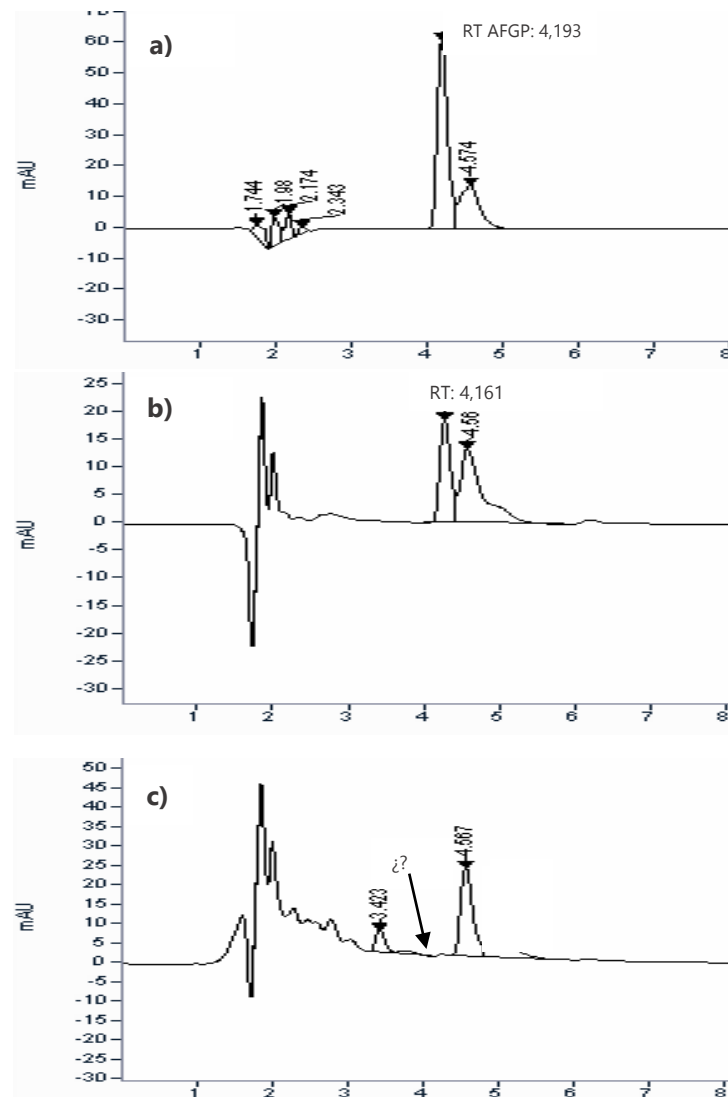


FIGURA 3. Ejemplo de cromatograma de patrón AFGP (50 µg/mL) (a), jarabe de arroz (b) y melaza de arroz (c)

Se seleccionó la longitud de onda en la que el patrón AFGP presentaba su máxima absorción y se continuó el experimento únicamente con los cromatogramas obtenidos a 280 nm (Figura 4). La Figura 5-a muestra un cromatograma del patrón AFGP, mientras que el resto, muestran como ejemplos cromatogramas de las mieles monoflorales españolas (Figura 5-b a 5-g) y de las milflores chinas (Figura 5h). En la mayoría de las mieles, especialmente las monoflorales, se observaban distintos picos propios de cada miel (probablemente azúcares) y en distintas proporciones. Sin embargo, en ningún caso se observó la presencia de ningún pico al tiempo de retención al que eluyó el patrón (aprox. 4.1 min). Lo mismo ocurrió con la miel milflores procedente de China.

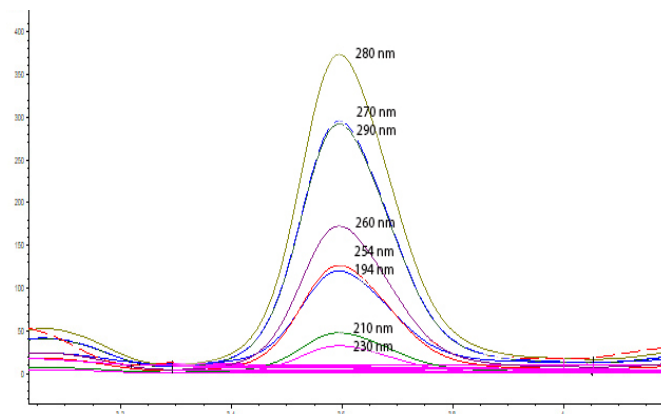


FIGURA 4. Máximo de absorción del patrón AFGP a distintas longitudes de onda.

Por tanto, atendiendo a los resultados obtenidos, se podría afirmar que la variedad botánica de la miel, y en principio la procedencia geográfica, no interfieren en la detección de este marcador. Sería interesante profundizar en este tema analizando más tipos de mieles, especialmente milflores ya que tienen mayor riesgo de ser adulteradas (Sobrino, 2020).

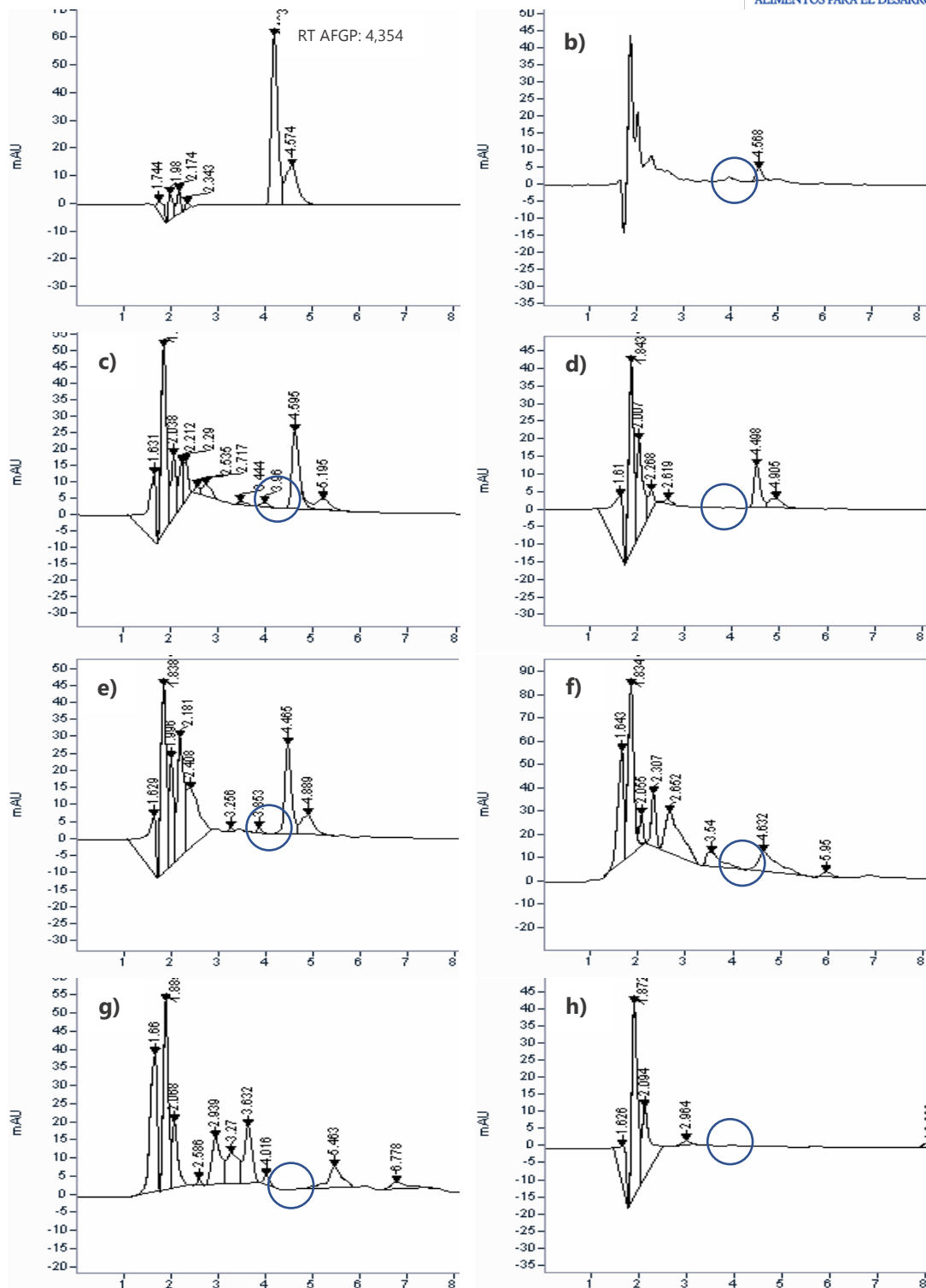


FIGURA 5. Ejemplo de cromatograma de patrón AFGP (50 µg/mL) (a), de mieles de distinta variedad botánica española: romero (b), girasol (c), azahar (d), cantueso (e), roble (f), encina (g) y de miel de procedencia china (h).

3.3. Mejora de la sensibilidad de la señal del AFGP en muestras de miel adulteradas

Para comprobar la eficacia del método empleado en mieles adulteradas se hizo un primer experimento adicionando jarabe de arroz a 10 de las 30 muestras del estudio (8 españolas monoflorales y 2 chinas multiflorales). Para obtener una señal inequívoca, se adulteraron adicionando un 15, 30 y 50% de jarabe de arroz. Se hicieron 5 réplicas de cada análisis. En todas ellas se observó claramente un pico cromatográfico en el tiempo de retención del AFGP.

Una vez demostrado la efectividad del método, el siguiente paso fue tratar de mejorar el límite de cuantificación del 7% reportado en la bibliografía (Xue et al. (2013)). Para ello se disminuyó el porcentaje de jarabe de arroz adicionado un 3, 5, y 7% (n= 5). Con el objetivo de eliminar al máximo posible interferentes de la matriz de la miel y que la detección del AFGP fuera lo más clara posible, se adicionó Carrez I y II en la preparación de las muestras, ya que estos reactivos reducen las interferencias en las medidas cromatográficas (ruido). Candelaria Foitzich Molina (2013) reportó también una mejora en la definición de los picos cromatográficos en la medición de hidratos de carbono en mieles con HPLC al añadir los reactivos Carrez en la preparación de las muestras.

En todos los niveles de adulteración ensayados se observó un pico cromatográfico correspondiente al AFGP. Por tanto, finalmente se estableció el límite de detección de este trabajo en un 3%, mejorando el límite de detección del 7% obtenido por Xue et al. (2013). Esta mejora en la detección de la adulteración es debida, probablemente, a la adición de los reactivos Carrez I y II, que al obtener una señal más “limpia” permitieron identificar y cuantificar el pico correspondiente al AFGP en el nivel más bajo de adulteración (3%). En la Figura 6 se muestran ejemplos de los cromatogramas obtenidos para una miel pura y con 3 niveles de adición de jarabe de arroz (3, 7 y 15%).

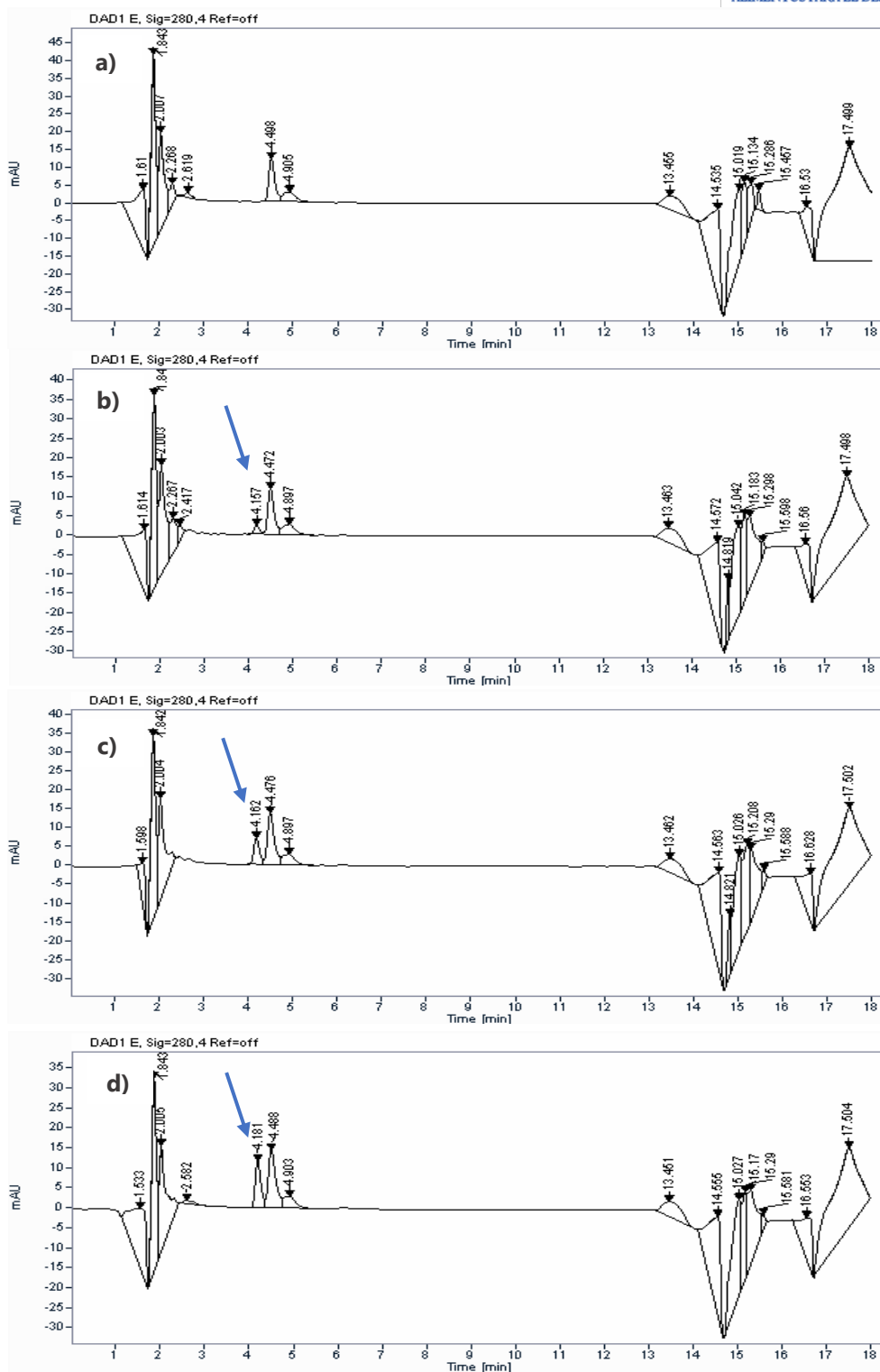


FIGURA 6. Cromatograma de miel pura (a) y miel adulterada al 3% (b), 7% (c) y 15% (d)

4. CONCLUSIONES

La optimización del método cromatográfico para la cuantificación del 2-acetil furano 3 glucopiranosido (AFGP) como marcador de la adulteración de la miel con jarabe de arroz ha permitido mejorar la resolución de los picos cromatográficos y evitar los solapamientos con interferentes propios de la matriz tanto de mieles monoflorales como milflores. Esto ha permitido distinguir de manera inequívoca la presencia de este marcador en muestra de miel adulteradas con este tipo de jarabe. Además, se ha conseguido reducir el límite de cuantificación de este compuesto hasta un 3% de adulteración, mejorando el 7% reportado en la bibliografía. Atendiendo a los resultados obtenidos, el AFGP no sería útil para detectar adulteración por melaza de arroz ya que este compuesto no se ha identificado en este producto.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado en el marco de un proyecto concedido por la Agencia Estatal de Investigación AGL2016-77702-R (Diseño de un biosensor de ADN basado en tecnología HFF-QCM para la detección de sustancias adulterantes en miel). Los autores también agradecen a la Universitat Politècnica de València el apoyo prestado para la contratación de Marisol Juan Borrás en el marco del PAID-10-17 (Ayuda para la contratación de acceso al Sistema Español de Ciencia, Tecnología e Innovación en Estructuras de Investigación).

6. REFERENCIAS

AOAC Official Method 998.12. C-4 plant sugars in honey, first revision. AOAC International: Gaithersburg, MD, USA, 2013; 44.4.18^a

Cai J, Wu X, Yuan L, Han E, Zhoua L, Anhong Zhoua A (2013): Determination of Chinese Angelica honey adulterated with rice syrup by an electrochemical sensor and chemometrics. *Anal. Methods*, 2013, 5, 2324

Codex Alimentarius: Draft revised standard for honey (at step 10 of the Codex procedure). Alinorm 01/25 19–26 (2001).

Consejo de la Unión Europea. (2002). Directiva 2001/110/CE del Consejo de 20 de diciembre de 2001 relativa a la miel. *Diario oficial de las Comunidades europeas*, L10, 47–52

Danezis G.P., Tsagkaris A.S., Camin F, Brusic V., Georgiou C.A. (2016): Food authentication: Techniques, trends & emerging approaches. *Trends in Analytical Chemistry* 85, 123–132

Du B, Wu L, Xue X, Chen L, Li Y, Zhao J, Cao W (2015): Rapid screening of multiclass syrup adulterants in honey by ultrahigh-performance liquid chromatography/quadrupole time of flight mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2015, 63, 6614–6623

Elflein, L., Raezke K. (2008). Improved detection of honey adulteration by measuring differences between $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ stable carbon isotope ratios of protein and sugar compounds with a combination of elemental analyzer - isotope ratio mass spectrometry and liquid chromatography - isotope ratio mass spectrometry ($\delta^{13}\text{C}$ -EA/LC-IRMS). *Apidologie* 39 574–587

Parlamento Europeo (2018). Documento de sesión: Informe sobre las perspectivas y desafíos para el sector apícola de la Unión. Recuperado de http://www.europarl.europa.eu/doceo/document/A-8-2018-0014_ES.html

Ruiz-Matute AI, Soria AC, Martínez-Castro I, Sanz L (2007): A new methodology based on GC-MS to detect honey adulteration with commercial syrups. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 7264-7269

Ruiz-Matute AI, Rodríguez-Sánchez S, Sanz M.L, Martínez-Castro I. (2010): Detection of adulterations of honey with high fructose syrups from inulin by GC analysis. *Journal of Food Composition and Analysis* 23 (2010) 273-276

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

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

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

Sobrino-Gregorio, L (2020): Avances en el esclarecimiento de la autenticidad de la miel. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.

Visquert, M. (2015). Influencia de las condiciones térmicas en la calidad de la miel. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.

Xue, X., Wang, Q., Li, Y., Wu, L., Chen, L., Zhao, J., y Liu F., (2013). 2-Acetylfuran-3-Glucopyranoside as a Novel Marker for the Detection of Honey Adulterated with Rice Syrup. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 7488–7493

Wang, J; Xue,Z; Du,X; Cheng, N; Chen,L; Zhao, J; Zheng, J &Cao, W., 2014, Identification of Acacia Honey Adulteration with Rape Honey Using Liquid Chromatography-Electrochemical Detection and Chemometrics, *Food Analytical Methods*, 7(10): 2003-2012

Wu L., Du B., Vander Heyden Y., Chen L., Zhao L. Wang M., Xue X. (2017): Recent advancements in detecting sugar-based adulterants in honey- A challenge. *Trends in Analytical Chemistry* 86, 25-38