



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

ESTUDIO DEL POTENCIAL ANTIOXIDANTE Y
ANTIMICROBIANO DE LA MIEL DE ROMERO DE LA
SIERRA DE AYORA

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ingeniería Agronómica

AUTOR/A: Cámara Campos, Eloy

Tutor/a: Escriche Roberto, M^a Isabel

Cotutor/a: Jiménez Belenguer, Ana Isabel

Cotutor/a: Juan Borrás, María del Sol

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERIA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

ESTUDIO DEL POTENCIAL ANTIOXIDANTE Y
ANTIMICROBIANO DE LA MIEL DE ROMERO
DE LA SIERRA DE AYORA

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN INGENIERÍA AGRONÓMICA

Autor: Eloy Cámara Campos

Tutora: M^a Isabel Escriche Roberto

Cotutora: Ana Isabel Jiménez Belenguer

Directora experimental: M^a del Sol Juan Borrás

Curso académico: 2021-2022

Valencia, Septiembre de 2022

TÍTULO: ESTUDIO DEL POTENCIAL ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANO DE LA MIEL DE ROMERO DE LA SIERRA DE AYORA.

RESUMEN

La apicultura ha sido y es una de las actividades principales de los municipios de la comarca del Valle de Ayora-Cofrentes, con especial importancia en el municipio de Ayora donde encontramos un numeroso registro de explotaciones apícolas las cuales practican la apicultura trashumante por toda la península ibérica. El objetivo del presente trabajo ha sido aportar conocimiento sobre una de las mieles monoflorales más apreciadas y demandadas en la zona como es la miel de romero de la Sierra de Ayora, evaluando sus características fisicoquímicas, su composición en compuestos antioxidantes (perfil de flavonoides y ácidos fenólicos específicos) y su capacidad antimicrobiana frente a cinco cepas bacterianas seleccionadas. El análisis de compuestos antioxidantes se ha realizado mediante cromatografía líquida, previa extracción en fase sólida, para posteriormente identificar los compuestos por comparación de sus tiempos de retención y características espectrales UV (200-400) con estándares auténticos. La cuantificación se ha realizado mediante curvas de calibrado construidas para cada compuesto. Se han identificado 11 compuestos en la miel, 6 ácidos fenólicos (caffeic acid, p-coumaric acid, sinapic acid, trans-cinnamic ellagic acid y cape) y 5 flavonoides (rutin, quercetin, chrysin, naringenin y galangin). Los compuestos identificados que han presentado mayor concentración son el quercetin, naringenin y el caffeic acid. En el ensayo de caracterización microbiológica las mieles de romero ensayadas han presentado una clara inhibición frente a las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *E. coli*, siendo menor el efecto de estas frente a *Pseudomonas aeruginosa* y prácticamente nulo frente a *Bacillus subtilis*. En la relación entre los dos potenciales ensayados, antioxidante y antimicrobiano de las mieles de romero ensayadas, destaca una de las muestras de colmena tipo alza, situada a 1000 msnm y cosechada en el año 2019 (A-1000-19b), la cual ha presentado inhibición frente a las cinco cepas estudiadas y presenta elevadas concentraciones de los compuestos fenólicos caffeic acid, rutin y naringenin, mientras que el resto de las muestras no ha presentado una clara relación.

Palabras clave: Ayora, miel de romero, potencial antioxidante, potencial antimicrobiano

Alumno: Eloy Cámara Campos

Directora Académica: Dña. María Isabel Escriche Roberto

Cotutora: Dña. Ana Isabel Jiménez Belenguer

Directora experimental: Dña. María del Sol Juan Borrás

TÍTOL: ESTUDI DEL POTENCIAL ANTIOXIDANT I ANTIMICROBIÀ DE LA MEL DE ROMER DE LA SERRA DE AIORA.

RESUM

L'apicultura ha sigut i és una de les activitats principals dels municipis de la comarca de la Vall d'Aiora- Cofrentes, amb especial importància en el municipi d'Ayora on trobem un gran nombre de registres d'explotacions apícoles les quals practiquen l'apicultura transhumant per tota la península ibèrica. L'objectiu del present treball ha sigut aportar coneixement sobre una de les mels monoflorals més valorades i demandades en la zona com és la mel de romer de la Serra d'Ayora, avaluant les seues característiques fisicoquímiques, la seua composició en compostos antioxidants (perfil de flavonoides i àcids fenòlics específics) i la seua capacitat antimicrobiana enfront de cinc ceps bacterians seleccionats. L'anàlisi de compostos antioxidants s'ha realitzat mitjançant cromatografia líquida, prèvia extracció en fase sòlida, per a posteriorment identificar els compostos per comparació dels seus temps de retenció i característiques espectrals UV (200-400) amb estàndards autèntics. La quantificació s'ha realitzat mitjançant corbes de calibrat construïdes per a cada compost. S'han identificat 11 compostos en la mel, 6 àcids fenòlics (caffeic acid, p-coumaric acid, sinapic acid, trans-cinnamic ellagic acid i cape) i 5 flavonoides (rutin, quercetin, chrysin, naringenin i galangin). Els compostos identificats que han presentat major concentració són el quercetin, naringenin i el caffeic acid. En l'assaig de caracterització microbiològica les mels de romer assajades han presentat una clara inhibició enfront dels ceps bacterians *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermitis* i *E. coli*, sent menor l'efecte d'aquestes enfront de *Pseudomonas aeruginosa* i pràcticament nul enfront de *Bacillus subtilis*. En la relació entre els dos potencials assajats, antioxidant i antimicrobià de les mels de romer, destaca una de les mostres de rusc tipus alça, situada a 1000 msnm i collida l'any 2019 (A-1000-19b), la qual ha presentat inhibició enfront dels cinc ceps estudiats i presenta elevades concentracions dels compostos fenòlics caffeic acid, rutin i naringenin, mentre que la resta de mostres no ha presentat una clara relació.

Paraules clau: Aiora, mel de romer, potencial antioxidant, potencial antimicrobià

Alumne: Eloy Cámara Campos

Directora Acadèmica: Dña. María Isabel Escriche Roberto

Cotutora: Dña. Ana Isabel Jiménez Belenguer

Directora experimental: Dña. María del Sol Juan Borrás

TÍTULO: TITLE: STUDY OF THE ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL POTENTIAL OF ROSEMARY HONEY FROM THE SIERRA DE AYORA

ABSTRACT

Beekeeping has been and it is one of the most important activities of the Ayora-Cofrentes valley region with singular relevance in the Municipality of Ayora where we can find numerous records of apicultural undertakings that practice transhumant beehive keeping throughout the entire Iberian Peninsula. The aim of this study has been to contribute knowledge to one of the most prized and sought single-flower honeys in the area such as the rosemary honey of Ayora, assessing their physical-chemical characteristics, their antioxidant compounds (both flavonoid and phenolic acids specific profile) antimicrobial ability against five selected bacterial strains. The analysis of the antioxidant compound has been made through liquid chromatography, after extraction at solid stage in order to identify the compounds in comparison of their retention times and spectral characteristics UV (200-400) with genuine standards. Quantification has been made through calibration curves built for each specific compound. A total of 11 compounds have been identified in the honey, 6 phenolic acids (caffeic acid, p-coumaric acid, sinapic acid, trans-cinnamic ellagic acid and gallic acid) and 5 flavonoids (rutin, quercetin, chrysin, naringenin and galangin). The identified compounds with the highest concentration are quercetin, naringenin and caffeic acid. In the testing of microbiological characterisation, the tested rosemary honeys have presented a clear inhibition against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermitis* and *E. coli*, bacterial strains with a minor effect of those against *Pseudomonas aeruginosa* and virtually zero against *Bacillus subtilis*. In the relation between the two tested potentials, antioxidant and antimicrobial of the tested rosemary honeys, highlights one of the hive samples rising type, located at 1000 msnm and picked at 2019 (A-1000-19b), that has presented inhibition against the five tested strains and shows high concentration of phenolic compounds caffeic acid, rutin and naringenin, while the rest of the samples have not presented a clear overview.

Keywords: Ayora, rosemary, potential antioxidant, potential antimicrobial.

Student: Eloy Cámara Campos

Academic Director: Dña. María Isabel Escriche Roberto

Co-tutor: Dña. Ana Isabel Jiménez Belenguer

Experimental Director: Dña. María del Sol Juan Borrás

AGRADECIMENTOS

A mis tutoras María Isabel Escriche Roberto, Ana Isabel Jiménez Belenguer y Marisol Juan Borrás por su dedicación y paciencia durante la realización del trabajo.

A los apicultores de la zona por su colaboración y enseñanzas sobre la apicultura.

Al entorno rural donde he crecido, por enseñarme a valorar y apreciar lugares tan especiales como la Sierra de Ayora.

A mis padres

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 COMPOSICIÓN DE LA MIEL	1
1.1.1 Agua	2
1.1.2 Azúcares	2
1.1.3 Ácidos.....	2
1.1.4 Minerales	2
1.1.5 Proteínas y Aminoácidos.....	2
1.1.6 Enzimas	2
1.1.7 Otros compuestos	2
1.2 LAS MIELES MONOFLORALES.....	4
1.3 MIEL DE ROMERO	4
1.3 PRODUCCIÓN DE MIEL DE ROMERO EN LA ZONA DE LA SIERRA DE AYORA	5
1.3.1 Ubicación geográfica	5
1.3.2 Flora del entorno	6
1.3.3 La apicultura en la Sierra de Ayora	7
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS	9
3.1 ORIGEN DE LAS MUESTRAS	9
3.2. ANALISIS DE PARÁMETROS FISICOQUIMÍCOS	9
3.2.1. Color.....	9
3.2.2. Conductividad eléctrica	9
3.2.3. Humedad.....	9
3.3 ANÁLISIS DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES	9
3.3.1 Reactivos y patrones.....	9
3.3.2 Extracción en fase sólida.....	10
3.4 ANÁLISIS DEL EFECTO ANTIBACTERIANO	10
3.4.1. Cepas de estudio	10
3.4.2 Medios de cultivo	11
3.4.3 Preparación de las diluciones de miel	11
3.4.4 Ensayo de la actividad antimicrobiana	12
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	13
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
4.1. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA.....	14
5.2 CARACTERIZACIÓN ANTIOXIDANTE	16
5.3 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA.....	21

5.4 RELACIÓN DE LOS COMPUESTOS ANTIOXIDANTES Y EL POTENCIAL ANTIMICROBIANO.....	27
6. CONCLUSIONES.....	28
7. BIBLIOGRAFÍA.....	29
8. ANEJOS.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plano polar de un grano de polen de <i>Rosmarinus officinalis</i> . Fuente: LABMIEL (IIAD)....	5
Figura 2. Plano ecuatorial de un grano de polen de <i>Rosmarinus officinalis</i> . Fuente: LABMIEL (IIAD).	5
Figura 3. Ubicación geográfica autonómica y comarcal de Ayora (Valencia).	6
Figura 4 .Pintura rupestre en la Cueva de la Araña en Bicorp (Valencia), en la que se representa a una persona recolectando miel.	8
Figura 5: Placa Petri donde se han realizado cuatro pocillos a distintas diluciones de miel.....	12
Figura 6. Ejemplos de cromatogramas obtenidos a diferentes longitudes de onda (260,280,290 y 350 nm).	18
Figura 7. Efecto de las mieles ensayadas frente a la bacteria <i>Staphylococcus epidermitis</i> . Se muestra en marrón, naranja, amarillo y verde la longitud de halo de inhibición en (mm) creado por las diferentes diluciones de miel ensayadas (100% ,25%, 12,5% y 6,25%) respectivamente. La línea roja horizontal indica el inicio del efecto inhibición (8mm).	22
Figura 8. Efecto de las muestras de miel ensayadas sobre la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> . Se muestra en marrón, naranja, amarillo y verde la longitud de halo de inhibición en (mm) creado por las diferentes diluciones de miel ensayadas (100% ,25%, 12,5% y 6,25%) respectivamente. La línea roja horizontal indica el inicio del efecto inhibición (8mm).	23
Figura 9. Efecto de las mieles ensayadas frente a la bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Se muestra en marrón, naranja, amarillo y verde la longitud de halo de inhibición en (mm) creado por as diferentes diluciones de miel ensayadas (100% ,25%, 12,5% y 6,25%) respectivamente. La línea roja horizontal indica el inicio del efecto inhibición (8mm).	24
Figura 10. Efecto de las mieles ensayadas frente a la bacteria <i>Bacillus subtilis</i> . Se muestra en marrón, naranja, amarillo y verde la longitud de halo de inhibición en (mm) creado por las l diferentes diluciones de miel ensayadas (100% ,25%, 12,5% y 6,25%) respectivamente. La línea roja horizontal indica el inicio del efecto inhibición (8mm).	25
Figura 11. Efecto de las muestras de miel ensayadas sobre la bacteria <i>E. coli</i> . Se muestra en marrón, naranja, amarillo y verde la longitud de halo de inhibición en (mm) creado por las diferentes diluciones de miel ensayadas (100% ,25%, 12,5% y 6,25%) respectivamente. La línea roja horizontal indica el inicio del efecto inhibición (8mm).	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características fisicoquímicas que debe tener la miel destinada al consumo humano, según establece el Real Decreto 1049/2003.	3
Tabla 2. Microorganismos empleados en el estudio. CECT: colección española de cultivos tipo.	10
Tabla 3. Caracterización fisicoquímica (humedad, conductividad eléctrica y color de miel de romero de Sierra Ayora.....	15
Tabla 4. Valores promedio de las concentraciones ($\mu\text{g} /100\text{g}$), mínimos y máximos de los compuestos fenólicos identificados. ANOVA (F-ratio y p-valor).....	20
Tabla 5. Relación de las muestras ensayadas y los compuestos antioxidantes obtenidos en ellas en $\mu\text{g}/100\text{g}$	27
Tabla 6. Codificación de las diferentes muestras ensayadas en el trabajo.....	31

1. INTRODUCCIÓN

La Norma de Calidad relativa a la miel la define como “la sustancia natural dulce producida por la abeja *Apis mellifera* a partir del néctar de plantas o de secreciones de partes vivas de plantas o de excreciones de insectos chupadores presentes en las partes vivas de las plantas, que las abejas recolectan, transforman combinándolas con sustancias específicas propias, depositan, deshidratan, almacenan y dejan en colmenas para que madure” (Real Decreto 1049/2003).

Las abejas producen la miel a partir del néctar o las secreciones azucaradas. El néctar es una disolución acuosa formada por (sacarosa, glucosa y fructosa) y otras sustancias como sales minerales, ácidos orgánicos, vitaminas, enzimas etc. Éste es segregado por las plantas en unos órganos denominados nectarios, los cuales se encuentran en lugares estratégicos con la finalidad que los insectos “atrapen” los granos de polen en su cuerpo y garantizar así la polinización de la especie vegetal. La presencia del polen en mayor o menor cantidad en la miel se debe a este hecho. El mielato o melaza también es una secreción azucarada, pero esta es emitida por diferentes tipos de insectos o partes de las plantas diferentes de los nectarios (Piana et al., 1989).

La elaboración de la miel por parte de las abejas es un proceso que se resume en 4 etapas (Sáinz y Gómez, 1999). La primera es la recolección, en la cual la abeja pecoreadora absorbe el néctar o el mielato y lo almacena en el buche melario. En esta fase la abeja aporta enzimas como diastasas, invertasas y glucosaoxidadas al néctar, las cuales son responsables de la transformación de los azúcares en miel. La segunda etapa es la aireación, la consiste en exponer a la miel, que no está madura, a corrientes de aire caliente, originadas en el interior de la colmena para reducir así su contenido en humedad hasta alcanzar valores entre el 30 o 40%. La tercera etapa es el almacenamiento que tiene lugar dentro de las celdillas del panal donde de manera indirecta, por las corrientes generadas dentro de la colmena debido a los cambios térmicos de la noche, se reduce el contenido de agua hasta alcanzar el 18 ó 19%, el cual juega un importante papel en la conservación de la miel. La última etapa es el operculado que consiste en la formación de una fina capa de cera para sellar la celdilla con la finalidad de impedir el contacto de la miel “madura” con el aire, así se evita la absorción de agua, ya que la miel es un producto altamente higroscópico.

Durante este proceso elaboración de la miel, se produce la degradación de la sacarosa, azúcar mayoritario del néctar y los mielatos, en glucosa y fructosa que serán los azúcares más abundantes en la miel. Esto es consecuencia de las reacciones enzimáticas que tienen lugar en las sucesivas etapas de formación de la miel en las cuales se hace imprescindible la participación de la abeja.

1.1 COMPOSICIÓN DE LA MIEL

La composición química de la miel depende del origen floral, de factores edáficos y climáticos, de la raza apícola, del estado de la colonia y de los métodos de recolección (Sáinz y Gómez, 1999). Desde el punto de vista composicional, la miel es básicamente una solución acuosa concentrada de azúcar invertido, que contiene, además, una mezcla compleja de otros hidratos de carbono, ácidos orgánicos, proteínas, minerales y otros compuestos minoritarios.

1.1.1 Agua

Uno de los parámetros más importantes a considerar en la miel es el contenido de humedad, ya que afecta a su peso específico, viscosidad, sabor y conservación (Piana et., 1989). Este parámetro no debe exceder el 20% ya que mieles excesivamente acuosas pueden sufrir fermentaciones a causa de la presencia de levaduras osmófilas, hecho que se minimiza cuando esta humedad es inferior al 17,1 % (Belitz et al., 2014). Este contenido en agua puede variar dependiendo de las condiciones climáticas, estación del año, humedad original del néctar y grado de maduración alcanzado en la colmena (Visquert, 2015).

1.1.2 Azúcares

Los glúcidos son los componentes mayoritarios en la miel, suponen alrededor del 80% de esta. Los monosacáridos, fructosa y glucosa, son los azúcares más importantes de la miel, constituyendo el 85-95% de los azúcares totales. En general la fructosa (33-42%) es más abundante que la glucosa (27-36%). El contenido de sacarosa es generalmente inferior al 3%, mientras que el de maltosa puede alcanzar alrededor del 7%. También pueden presentarse otros polisacáridos, pero en magnitudes menores (Visquert, 2015).

1.1.3 Ácidos

Los ácidos tienen un papel importante en la miel, aparte de conformar el sabor de ésta contribuyen a su estabilidad frente a los microorganismos que se encuentran presentes de forma natural. Hay una gran cantidad de ácidos libres en la miel, sin embargo, el más abundante es el ácido glucónico que se forma por acción de la enzima glucosaoxidasa. Las lactonas actúan como reserva de acidez en la miel, pues pueden liberarse frente a una alcalinización del medio. (Piana et al.,1989; Sáinz y Gómez, 1999; Belitz et al., 2014).

1.1.4 Minerales

El mineral más abundante en la miel es el potasio, que supone cerca del 80% de la materia mineral total. La proporción de minerales presentes en la miel va a depender del tipo de suelo y del origen botánico de la planta. Si bien el contenido de las mieles en minerales es modesto, este es mayor en las provenientes de los mielatos que en las de origen floral (Sáinz y Gómez, 1999; Belitz et al., 2014).

1.1.5 Proteínas y Aminoácidos

El contenido en proteínas y aminoácidos de una miel es muy bajo. Este procede del néctar o mielato, del polen y de las propias abejas (Sáinz y Gómez, 1999). Se han llegado a detectar 19 aminoácidos en la miel, siendo el más abundante la prolina que procede de las abejas y se corresponde con el 50-58% de la fracción aminoacídica (Belitz et al., 2014).

1.1.6 Enzimas

La presencia de enzimas en la miel tiene como origen principalmente las glándulas hipofaríngeas de las abejas, por lo que su presencia es un factor de calidad. Las enzimas más abundantes son la α -glucosidasa (invertasa o sacarasa), α - y β -amilasa (diastasa), glucosaoxidasa, catalasa y fosfatasa ácida (Piana et al.,1989; Sáinz y Gómez, 1999; Belitz et al., 2014).

1.1.7 Otros compuestos

Otro de los parámetros importantes es el Hidroximetilfurfural (HMF) ó 5-(hidroximetil)-2-furaldehído (hidroximetil-furfural), compuesto que procedente de la descomposición de los monosacáridos en medio ácido. Suele hallarse en pequeñas cantidades en mieles frescas, pero

su aparición indica una pérdida de frescor, por lo tanto, de la calidad de la miel. Además del envejecimiento natural, el calentamiento de la miel acelera su formación (Sáinz y Gómez, 1999).

Las características fisicoquímicas de la miel destinada al consumo humano vienen reguladas por el Real Decreto 1049/2003 por el que se aprueba la Norma relativa a la calidad (Tabla1).

Tabla 1. Características fisicoquímicas que debe tener la miel destinada al consumo humano, según establece el Real Decreto 1049/2003.

COMPONENTE	VALORES
AZÚCARES	g/100 g de miel
Glucosa + Fructosa	
• Miel de flores	≥ 60
• Miel de mielada	≥ 45
Sacarosa	
• En general	≤ 5
• Eucalipto y Citrus	≤ 10
• Lavanda	≤ 15
AGUA	
• En general	≤ 20
• Miel para uso industrial	≤ 23
SÓLIDOS INSOLUBLES EN AGUA	
• En general	≤ 0.1
• Miel prensada	≤ 0.5
CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA	mS/cm
• En general	≤ 0.8
• Miel de mielada	≥ 0.8
ÁCIDOS LIBRES	Miliequivalentes/1000 g
• En general	≤ 50
• Miel para uso industrial	≤ 80
ÍNDICE DIASTÁSICO	Escala Schade
• En general	≥ 8
• Mieles con bajo contenido natural de enzimas (azahar) y contenido de HMF no superior a 15 mg/Kg	≥ 3
HMF	mg/ Kg
• En general, excepto para uso industrial	≤ 40
• Miel procedente de origen tropical	≤ 80

1.2 LAS MIELES MONOFLORALES

Las mieles monoflorales son aquellas que proceden mayoritariamente de una planta determinada. Son mieles singulares, con características diferenciales, en las que predominan las debidas al néctar de esa planta (Gómez Pajuelo, 2004). Para que una miel sea considerada como monofloral ha de tener predominancia de características definidas a tres niveles:

- Fisicoquímico: determinado por la presencia de ciertas propiedades físicas o sustancias químicas características. Por ejemplo, la presencia del azúcar minoritario rafinosa en las mieles de romero o la sustancia aromática antranilato de metilo en la de cítricos.
- Polínico: determinado por la aparición de cierta cantidad del polen de la especie a la que se atribuye el origen de la miel, y presencia de los pólenes pertenecientes a las especies acompañantes en la floración, así como la ausencia del polen de especies de floraciones exóticas, no relacionadas con la clasificación de esa miel. Los granos de cada especie son diferentes y pueden identificarse al microscopio óptico a 400-1000 aumentos por su forma, tamaño etc. Además, no todas las especies producen la misma cantidad de polen, por lo que se exige una cantidad mínima de este para atribuir la presencia mayoritaria del néctar. Por ejemplo, en el caso del romero debe de ser >12 %.
- Sensorial: las mieles monoflorales de determinadas especies vegetales han de tener ciertas características sensoriales (color, aroma, gusto, etc.). Las mieles de cítrico, por ejemplo, han de ser de color muy claro y tener el aroma característico de antranilato de metilo.

La clasificación final de una miel de manera precisa, reproducible y científica exige que cumpla con las especificaciones precisas en estos tres niveles. Esto implica un elevado costo de tiempo y dinero por lo que la selección se realiza recurriendo al análisis sensorial y según lotes analizar determinados parámetros fisicoquímicos o polínicos relevantes (Gómez Pajuelo, 2004).

1.3 MIEL DE ROMERO

La miel de romero es una de las principales mieles monoflorales que se producen en España junto con la de azahar, biércol, brezo, castaño, espliego, eucalipto y girasol. Esta presenta las características propias de las mieles monoflorales que son conocidas y apreciadas por el consumidor. Para considerarse miel monofloral de romero esta debe presentar polen de la especie *Rosmarinus officinalis L* (Figura 1 y 2) en un 12 % del total del sedimento polínico (Gómez,2004). Esta baja representación del polen se debe a la baja producción de polen de la planta y a la morfología de la flor, ya que esta presenta un alto grado de adaptación a la polinización por parte de las abejas, por lo que no necesita producir grandes cantidades de polen. En cambio, la planta presenta una elevada producción de néctar (Sáinz y Gómez, 1999).

Esta miel se caracteriza por tener un color amarillo en estado líquido y blanco cuando cristaliza. Su olor vegetal, delicado, ligeramente balsámico y poco intenso es muy perceptible. Su sabor vegetal se asocia con la harina recién molida. Tiene tendencia a cristalizar rápidamente con cristales finos pero angulosos (Sáinz y Gómez, 1999).

Las zonas de producción principales de esta miel son la Comunidad Valenciana, Cataluña, Andalucía, Extremadura, Aragón, Murcia y Castilla la Mancha. La Comunidad Valenciana es la segunda comunidad autónoma con más producción de miel (19,9%) del total nacional, detrás

de Andalucía (25,1%) (MAPA, 2020). Dentro de esta producción, a pesar de la falta de datos oficiales sobre producción de miel a nivel nacional y autonómico, las principales mieles que se recolectan en la Comunidad Valenciana son la de romero y la de azahar. La producción de miel de romero se reparte a lo largo de las 3 provincias, Valencia, Alicante y Castellón, especialmente en las comarcas del interior. En la provincia de Valencia destacan las situadas en las zonas de: El Valle de Ayora – Cofrentes, La Canal de Navarrés y la Plana de Utiel-Requena.



Figura 1. Plano polar de un grano de polen de *Rosmarinus officinalis*. Fuente: LABMIEL (IIAD).



Figura 2. Plano ecuatorial de un grano de polen de *Rosmarinus officinalis*. Fuente: LABMIEL (IIAD).

1.3 PRODUCCIÓN DE MIEL DE ROMERO EN LA ZONA DE LA SIERRA DE AYORA

La Sierra de Ayora, por las características geográficas, climáticas y ambientales, además de por su tradición apícola es una de las zonas más importantes de producción de miel de romero en la Comunidad Valenciana.

1.3.1. Ubicación geográfica

La Sierra de Ayora se encuentra ubicada en el interior de la Comunidad Valenciana, entre las comarcas del Valle de Ayora y la Canal de Navarrés como se muestra en la Figura 3, esta cuenta con una amplia extensión de territorio forestal, alrededor de 28.000 ha. Está compuesta por territorio de los municipios de Ayora y Enguera, pero también, por los términos municipales de Teresa de Cofrentes, Bicorp y Quesa. Esta se corresponde con el sector suroccidental de la plataforma calcárea del pico Caroché tratándose de una zona muy montañosa y agreste, con una fisiografía compleja, que proporciona al paisaje un aspecto montano y forestal (PAISAJES TURISTICOS VALENCIANOS, 2021.)

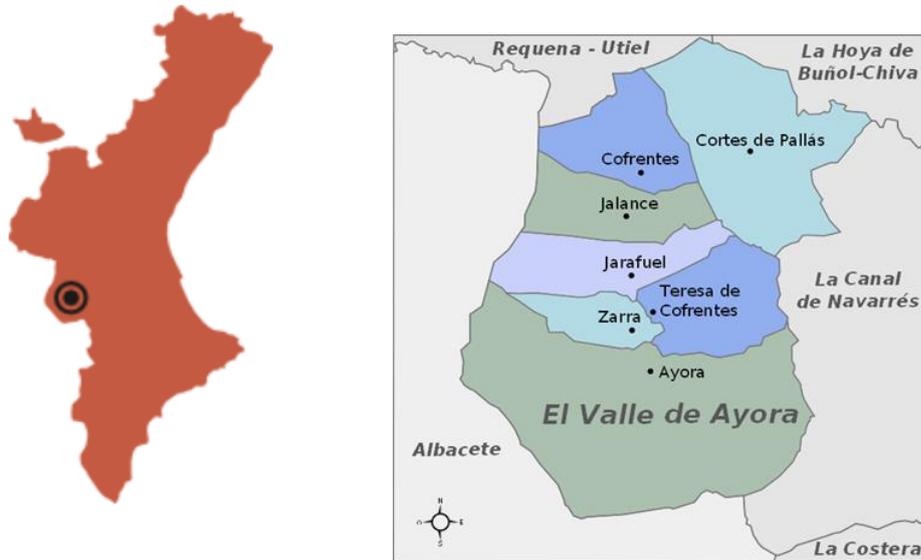


Figura 3. Ubicación geográfica autonómica y comarcal de Ayora (Valencia).

A lo largo de este territorio podemos encontrar en los suelos substratos calcáreos predominantes en todo el territorio, sobre todo las calizas duras, las cuales dan lugar a afloramientos rocosos y a suelos superficiales y pedregosos (ADENE,2021). La Sierra de Ayora presenta una altura máxima de 1.126 msnm en el Macizo de Caroché y el Peñón de los Machos con 1.094 msnm, contrastada con otras cotas mucho más inferiores, lo cual genera una amplia variabilidad de altitud, que es reflejado en el amplio grado de diversidad tanto de flora, suelos y paisajes. Esta variabilidad se refleja en las numerosas figuras de protección que podemos encontrar en la sierra, como zonas LICs, ZEPAs, IBAs a nivel europeo y autonómico.

La mayor parte del territorio se encuentra dentro de la Red Natura 2000, una red ecológica de áreas de conservación de la biodiversidad que tiene como finalidad asegurar la supervivencia a largo plazo de las especies y todo tipos de habitats de Europa. Esta se compone de Zonas Especiales de Conservación (ZEC) establecidas de acuerdo con la Directiva Hábitat y de Zonas de Especial Protección para las Aves (ZEPA) designadas en virtud de la Directiva Aves. (VISOR CARTOGRÁFICO DE LA GENERALITAT VALENCIANA, 2021).

La Sierra de Ayora es una zona escasamente alterada y con un alto despoblamiento, por lo tanto se considera una de las zonas más agrestes y menos alterada por el hombre de la Comunidad Valenciana.

1.3.2. Flora del entorno

La vegetación y flora presente en la Sierra de Ayora se encuentra condicionada por los dos incendios forestales sufridos en el año 1979 y posteriormente en el año 1992. Estos acontecimientos marcan un punto de inflexión en cuanto al desarrollo de las especies vegetales. Tras los incendios, el desarrollo de la vegetación arbustiva aumenta en primer lugar y crea un amplio tapiz de especies arbustivas y herbáceas, posteriormente y a un ritmo mucho menor prolifera la vegetación arbórea. En la actualidad, trascurridos 30 años desde el último incendio, la vegetación que podemos encontrar en la Sierra de Ayora es principalmente arbustiva y herbácea, pero también escasas zonas de vegetación arbórea, la cual no fue afectada por el fuego, además de otras zonas que se encuentran en proceso de regeneración que presentan en la actualidad una buena densidad de vegetación arbórea.

La vegetación arbórea que podemos encontrar en la Sierra de Ayora está compuesta principalmente por pino carrasco (*Pinus halepensis*), el cual se encuentra principalmente en las zonas de degradación de los carrascales, el pino rodeno (*Pinus pinaster*) y algún escaso ejemplar de (*Pino piñonero*). La carrasca (*Quercus ilex*) la cual era predominante en este territorio se ha visto reducida considerablemente en número de ejemplares, aunque aún podemos encontrar algunas zonas con poblaciones notables de esta especie. En menor proporción podemos encontrar ejemplares de roble valenciano (*Quercus faginea*) (ADENE, 2021).

Como especies arbustivas y herbáceas podemos encontrar principalmente:

- Coscoja (*Quercus coccifera*)
- Lentisco (*Pistacia lentiscus*)
- Aliaga (*Ulex parviflorus*)
- Madroño (*Arbutus unedo*)
- Enebro (*Juniperus oxycedrus*)
- Jara blanca (*Cistus Albidus*)
- Brezo (*Erica multiflora*)
- Romero (*Rosmarinus officinalis*)
- Tomillo (*Thymus vulgaris*)
- Pebrella (*Thymus piperella*)
- Rabo de gato (*Sideritis tragoriganum*)

Además de las anteriormente especies citadas, podemos encontrar algunas especies endémicas de la Sierra de Ayora- Enguera como el Rabo de gato lanoso (*Sideritis sericea*), el poleo de roca (*Teucrium buxifolium subsp. Buxifolium*) y la Pelosilla de cueva (*Chaenorhinum tenellum*) descubierta por José Cavanilles en Cueva Horada, cueva próxima al pico del Peñón de los Machos (1.094 msnm) (ADENE, 2021).

1.3.3. La apicultura en la Sierra de Ayora

La Sierra de Ayora cuenta con una gran tradición apícola. Prueba de ello son las pinturas rupestres de la cueva de la araña, situadas en el vecino término municipal de Bicorp (Valencia) datadas entre los 5.000 y 8.000 años A.C, pertenecientes al Arte Rupestre Levantino. Se trata de un mural pintado sobre la roca de un abrigo en la montaña, donde se puede apreciar la figura de una persona, seguramente una mujer, escalando a un árbol para recolectar la miel (Figura 4). Estas fueron descubiertas a inicios del siglo XX por J. Poch y declaradas desde el año 1998 Patrimonio de la Humanidad por la Unesco.



Figura 4 .Pintura rupestre en la Cueva de la Araña en Bicorp (Valencia), en la que se representa a una persona recolectando miel.

Desde entonces hasta nuestros días la apicultura se encuentra presente en el Valle de Ayora adquiriendo una fuerte consolidación con la creación de la Sociedad Cooperativa Apícola de España en el año 1979 en el municipio de Ayora (Valencia). La apicultura es hoy en día una de las principales actividades económicas de los municipios de la comarca especialmente en la población de Ayora, estableciéndose como una de las principales actividades económicas de la localidad, con un numeroso registro de explotaciones que practican la apicultura trashumante por toda la península ibérica.

2. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo ha sido aportar conocimiento sobre la miel de romero de la Sierra de Ayora evaluado sus características fisicoquímicas, su composición en compuestos antioxidantes (perfil de flavonoides y ácidos fenólicos específicos), así como su capacidad antimicrobiana frente a cinco cepas bacterianas seleccionadas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 ORIGEN DE LAS MUESTRAS

En el presente trabajo se analizaron 15 muestras de miel de romero (*Rosmarinus officinalis*) procedentes de asentamientos apícolas ubicados a diferentes cotas en la Sierra de Ayora (700, 900 y 1000 msnm, recolectadas en 3 campañas sucesivas, 2019, 2020, 2021 y procedentes de diferentes tipos de colmenas (tipo Layens y tipo alza). Estas fueron aportadas por apicultores locales y almacenadas en tarros de cristal cerrados herméticamente con la identificación del apicultor y la campaña de recolección. Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente y en la oscuridad hasta el comienzo del ensayo.

3.2. ANÁLISIS DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS

Los métodos utilizados para el análisis de los parámetros físicoquímicos se encuentran descritos en la normativa para la miel (B.O.E. 18-6-86).

3.2.1. Color

El color se determinó utilizando un colorímetro digital (HANNA C221) basado en la escala mm Pfund que mide la transmitancia de la luz. Se introdujo cada muestra de miel en una cubeta y se comparó con un patrón (glicerol analítico de grado reactivo), el valor fue expresado en milímetros de la escala Pfund.

3.2.2. Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica se determinó mediante un conductímetro (Mettler Toledo Seven Multi, Suiza). Para ello se pesó la cantidad equivalente a 20 g de materia seca de miel, se disolvió en agua bidestilada y se aforó a 25 mL. Los resultados se expresaron en $\mu\text{S}/\text{cm}$.

3.2.3. Humedad

La determinación del contenido de humedad se realizó mediante el método refractométrico, midiendo el índice de refracción de la miel. Se tomó una gota de miel de cada muestra, lo más licuada posible y se analizó usando un refractómetro (ATAGO 3T, Japón), termostatzado a 20 °C. Los valores obtenidos fueron extrapolados en la tabla de Chataway, expresando el resultado en g/100 g de miel.

3.3 ANÁLISIS DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

3.3.1 Reactivos y patrones

Durante el proceso se utilizó acetonitrilo, metanol de grado HPLC y agua purificada de un sistema mili-Q disponible en el laboratorio. Para la realización del análisis se emplearon patrones (Sigma-Alfrich, St. Louis, USA). Se obtuvieron en primer lugar disoluciones madre individuales de cada compuesto a una concentración de 1000 mg/L en metanol. Posteriormente estas fueron

mezcladas creando una una solución intermedia con una concentración final de 100 mg/L. Por último, se prepararon las soluciones patrón mediante la disolución apropiada de la solución intermedia para obtener 6 niveles de concentración (1000 mg/L; 5000 mg/L; 10.000 mg/L; 25.000 mg/L; 50.000 mg/L; 60.000 mg/L).

3.3.2 Extracción en fase sólida

Se utilizó el método de extracción en fase sólida, SPE (Solid Phase Extraction), como etapa de limpieza, para eliminar los compuestos que interfieren antes del análisis cromatográfico. Para ello se procedió a disolver 10 g de muestra de miel en 15 mL de agua acidulada a pH 2 hasta que estuvieron completamente diluidas. Estas disoluciones se hicieron pasar a través de los cartuchos Strata™ – X 33 , los cuales fueron previamente acondicionados con 3 mL de MeOH y 3 mL de agua ultrapura. Una vez pasada la muestra por los cartuchos estos se lavaron con 5 mL de agua acidulada y 15 mL de agua ultrapura, con la finalidad de eliminar los azúcares y otros constituyentes polares de las mieles. Finalmente, se secaron a vacío durante 2 min, y las fracciones fenólicas retenidas se eluyeron con 3 mL de MeOH:ACN (2:1) (metanol: acetonitrilo) (2:1).

Los análisis de los extractos se realizaron con un cromatógrafo líquido Agilent Technologies 1120 Compact LC acoplado a un detector de array de diodos (DAD). Los flavonoides y los compuestos fenólicos fueron separados en una columna Kinetex® 3.5 µm XB-C18 100. La fase móvil binaria consistió en un 1% de ácido fórmico como fase A y acetonitrilo como fase B con una velocidad de flujo de 0.7 mL/min a un volumen de inyección de 5 µL y un tiempo de ejecución de 45 minutos.

3.4 ANÁLISIS DEL EFECTO ANTIBACTERIANO

3.4.1. Cepas de estudio

Se utilizaron 5 cepas de diferentes bacterias, como se muestra en la Tabla 2, todas ellas pertenecientes a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

Tabla 2. Microorganismos empleados en el estudio. CECT: colección española de cultivos tipo.

	Bacteria	Nº CECT
GRAM -	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	110
	<i>Escherichia coli</i>	1103
GRAM +	<i>Bacillus subtilis</i>	356
	<i>Staphylococcus aureus</i>	240
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	231

3.4.2 Medios de cultivo

Para la realización del ensayo se procedió a utilizar medios de cultivo generales, con el objetivo de estandarizar los resultados y evitar variabilidad de los resultados. Los medios de cultivo utilizados en el presente estudio fueron los siguientes:

TSA (Tryptic Soy Agar)

Para la utilización de las cepas y su uso en fase exponencial en 24 horas se utilizó el medio de cultivo TSA (Tryptic Soy Agar) suministrado por la casa comercial SCHARLAU S.L, siendo incubadas a 37°C durante 24 horas en la estufa.

AGAR SEMISÓLIDO

Se preparó un medio de cultivo semisólido formado por Tryptic Soy Broth (TSB) (Eur. Pharm) y Agar de la casa comercial SCHARLAU S.L.

Estos medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave durante 15 min a 121°C, posteriormente atemperados en un baño hasta alcanzar la temperatura de 45°C y finalmente distribuidos en placas Petri.

PBS (1X)

También se procedió a preparar el tampón Phosphate Buffered Saline (PBS 1X), una solución acuosa y salina que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio, con el objetivo de mantener las células in vitro para que no se dañen.

Todos los medios fueron conservados en la cámara frigorífica.

3.4.3 Preparación de las diluciones de miel

Estas diluciones se realizaron con el objetivo de ver el efecto que presenta la miel a concentraciones de azúcares menores que presenta la miel natural. Para comprobar este efecto se realizó un pocillo a modo de control donde se aplicó una gota de miel al 100% de concentración de azúcares. Este se usó de control frente a las demás diluciones y fue denominado con la letra (D). Estas diluciones se almacenaron en el almacén en un lugar fresco y en la oscuridad.

Se partió de las muestras de miel para preparar diluciones decimales de éstas. Para ello, se utilizaron tubos de ensayo, los cuales se tararon en primer lugar, a continuación, se añadieron 2 gramos de miel de la muestra y 8 mL de agua, de esta manera se obtuvo una dilución [1:4] al 25%, a partir de este tubo con esa dilución se cogieron 3 mL y se vertieron en otro tubo al que se le añadieron otros 3 mL de agua destilada, de esta manera obtenemos una dilución [1:2] al 12,5%. Una vez obtenida esta dilución se volvió a añadir 3 mL de esta y se vertieron a un nuevo tubo, al que se le añadieron otros 3 mL de agua destilada, obteniendo así una dilución [1:2] al 6,25%.

Para la realización del ensayo se estableció un control negativo el cual fue una miel artificial, creada en el laboratorio con las mismas características osmóticas que otras mieles. Esta se elaboró teniendo en cuenta la cantidad promedio y tipo de azúcares presentes en la miel natural. Para ello se pesaron 40 g de fructosa, 30 g de glucosa, 8 g de maltosa y 2 gramos de

sacarosa como en el estudio realizado por (Peter J. et al., 2001). Se adicionaron 100 mL de agua destilada a estos azúcares y se esterilizaron a 121 °C durante 15 min.

3.4.4 Ensayo de la actividad antimicrobiana

Para la preparación de los inóculos se realizaron cultivos de 24 horas de cada cepa microbiana. Estos se realizaron mediante la suspensión directa de colonias. Para ello se procedió a recoger colonias con un asa de siembra de la placa de cultivo puro y se transfirieron a un tubo con 5 ml de tampón PBS. A continuación, se agitó el tubo en el vortex durante 15- 20 segundos hasta alcanzar la turbidez de McFarland 2. Se tomó un alícuota de 50 µl del inóculo y se transfirió a un tubo con agar semisólido a 45 °C. Se agitó en el vortex durante 10 segundos y se vertió el contenido en la placa Petri 1X, donde se había vertido previamente el media TSA (Tryptic Soy Agar). Por último, se realizaron movimientos circulares a la placa para la correcta homogeneización del medio y se dejó solidificar.

La evaluación de la capacidad antimicrobiana de las muestras se realizó siguiendo el método de pocillos (Figura 5), el cual a partir de un cultivo de 24 horas de los diferentes microorganismos a ensayar se aplicó una pequeña cantidad de miel o dilución de miel en el centro de un pocillo de 8 mm de diámetro, cortado en una placa de TSA (Tryptic Soy Agar) previa siembra del microorganismo en un medio de agar semisólido fundido. El tamaño de la zona clara alrededor del pocillo de aplicación de la miel, la zona de inhibición (ZOI), se estableció como una medida de la potencia antimicrobiana de la muestra de miel ensayada. Se prepararon las placas, en las cuales se realizaron 4 pocillos, 3 con las diferentes diluciones de miel (25%, 12,5%, 6,25%) y uno con miel natural (D) al 100%, sin diluir.

Se sembraron las muestras por duplicado para cada microorganismo. Estas fueron incubadas en posición invertida en estufa a 37°C durante 24 horas. Pasadas 24 horas se midió el diámetro en mm del halo inhibición generado por la miel de cada pocillo. Este proceso se realizó con las 15 muestras de miel de romero, 1 muestra de miel de girasol (*Helianthus annuus*) así como con la miel artificial elaborada en el laboratorio, la cual se utilizó como control negativo en el ensayo atribuyendo los resultados de inhibición registrados al efecto de osmolaridad de la miel. La inhibición se fue considerada positiva cuando el diámetro del halo fue superior a 8 mm, diámetro, que corresponde con el diámetro del pocillo realizado en el ensayo.

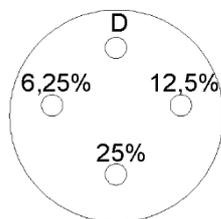


Figura 5: Placa Petri donde se han realizado cuatro pocillos a distintas diluciones de miel.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis descriptivo de los datos obtenidos. Para ello se calculó la media, desviación estándar, mínimo y máximo de cada uno de los compuestos identificados. Además, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para cada una de las variables obtenidas, considerando los factores: "año de recolección", "tipo de colmena" y "altura". Todo ello con la finalidad de evaluar si existen diferencias significativas entre las tres campañas de recolección de miel (2019, 2020 y 2021); entre colmenas de desarrollo vertical y horizontal (tipo Layens y tipo alza) y entre las cotas (msnm) dónde se ubican los asentamientos apícolas. El programa utilizado fue el Statgraphics Centurion XVII para Windows.

4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

Todas las muestras se caracterizaron desde el punto de vista de los parámetros fisicoquímicos humedad, color y conductividad. En la Tabla 3 se muestran los valores mínimo y máximo, el valor promedio, así como la desviación estándar de los resultados obtenidos. Además, también aparecen los resultados del ANOVA (cociente F y diferencias significativas) obtenidos para cada una de las variables estudiadas.

Se observan diferencias significativas para la variable humedad en función del tipo de colmena (alza/layens). Estas diferencias pueden deberse a las prácticas apícolas, principalmente al estado de maduración de la miel en la colmena en el momento de su recolección. Para los demás factores, año de recolección y altura, las diferencias observadas no fueron significativas.

Los resultados obtenidos para este parámetro se ajustan a lo establecido en la normativa (Real Decreto 1049/2003) el cual establece un valor máximo de humedad para la miel de 20.00g/100g, cumpliendo todas las muestras utilizadas para este trabajo.

La conductividad eléctrica también mostró diferencias significativas únicamente en función del tipo de colmena empleada por el apicultor, con valores más elevados en las muestras de miel recolectadas en colmenas tipo Layens. Este hecho puede ser debido a que el manejo de este tipo de colmena puede ocasionar el solapamiento de miel de diferentes orígenes botánicos al ser desplazadas las colmenas de un asentamiento a otro sin haber realizado la extracción de la miel del anterior. Todas las muestras de miel utilizadas cumplieron con lo establecido en la normativa (Real Decreto 1049/2003) referente a la conductividad eléctrica de la miel, no superando ninguna muestra los 800 $\mu\text{S}/\text{cm}$ establecidos en esta.

Con respecto al color, este parámetro solo fue significativo para el año de recolección. Esta situación puede deberse a las condiciones climatológicas que influyen sobre la floración tanto del romero como de las especies acompañantes: almendro, brezo, tomillo, etc, aunque también puede haber una cierta influencia debida a las prácticas apícolas anteriormente comentadas. Resultados que difieren mínimamente en el estudio de (Persano -Oddo y Piro,2004) donde la media de las mieles europeas analizadas fue de 15 (mm/Pfund) encontrando máximos de hasta 26 (mm/Pfund) acercándose los resultados obtenidos en el presente trabajo a lo establecido por (Orantes et al.,2008) donde establece un límite máximo de color para la miel de romero de 35 mm/Pfund. A pesar de ello la normativa no establece unos límites para el color de la miel, este se considera un aspecto más bien comercial.

Tabla 3. Caracterización fisicoquímica (humedad, conductividad eléctrica y color de miel de romero de Sierra Ayora

	HUMEDAD		CONDUCTIVIDAD ELECTRICA $\mu\text{S}/\text{cm}$		COLOR mm/pfund	
	Mín.-máx.	Media (SD)	Mín.-máx.	Media (SD)	Mín.-máx.	Media (SD)
TIPO COLMENA						
Alza	17.3-18.7	18.0 (0.3) ^a	116-147	132 (7.6) ^a	18.-27	22.6 (2.1) ^a
Layens	18.7-21.1	19.9 (0.5) ^b	149-201	174.7(12.8) ^b	24-39	31.4 (3.5) ^a
ANOVA (Fratio/p-valor)	7.02*		6.80*		ns	
ALTURA (msnm)						
700	17.2-19.5	18.3 (0.6)	109-161	136.3 (12.8)	15-30	22.4 (3.5)
900	18.9-21.2	20.1 (0.6)	147-201	174.2 (13.1)	22-37	29.6 (3.6)
1000	17.5-19.4	18.4 (0.5)	129-172	150.6 (10.3)	23-35	29.1 (2.9)
ANOVA (Fratio/p-valor)	ns		ns		ns	
AÑO DE RECOLECCIÓN						
2019	17.7-19.7	18.7 (0.5)	143-190	166.5 (11.4)	23-37	29.9 (3.2) ^a
2020	18.9-21.1	19.9 (0.5)	136-187	161.5 (12.4)	26-40	32.7 (3.4) ^a
2021	17.3-19.1	18.2 (0.4)	111-153	132.1 (10.1)	13-24	18.4 (2.8) ^b
ANOVA (Fratio/p-valor)	ns		ns		5.78*	

5.2 CARACTERIZACIÓN ANTIOXIDANTE

Se comenzó inyectando en el cromatógrafo una batería de 12 estándares identificados previamente en otras mieles analizadas en LABMIEL, por lo tanto, ya disponibles en el laboratorio (caffeic acid, cape, chrysin, ellagic acid, galangin, gallic acid, naringenin, p-coumaric acid, quercetin, rutin, sinapic acid, trans-cinnamic acid). En las mieles objeto de este estudio, se llegaron a identificar todos ellos, a excepción del gallic acid. Cabe destacar que los nombres de los compuestos fenólicos aparecen a lo largo del trabajo en inglés para facilitar la comparación con otros estudios revisados.

La identificación de los flavonoides y los ácidos fenólicos se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención y de las características espectrales UV de los analitos presentes en las muestras con los de estándares auténticos. Los cromatogramas fueron registrados entre 200 y 400 nm. La cuantificación de cada compuesto se realizó en base al valor de λ_{max} con mayor absorbancia y la realización de las correspondientes rectas de calibrado obtenidas a partir de los estándares de trabajo. La figura 6 muestra las rectas de calibrado obtenidas para todos los compuestos estudiados. En ella podemos observar un valor de r^2 entre 0.9645 y 0.9995 lo que indica una buena linealidad del método que se ha utilizado y en consecuencia una adecuada cuantificación de los compuestos que se han analizado.

La figura 7 muestra como ejemplo cromatogramas obtenidos a diferentes longitudes de onda de una de las muestras analizadas, donde se aprecia las áreas de los picos, que varían en función de la longitud de onda seleccionada.

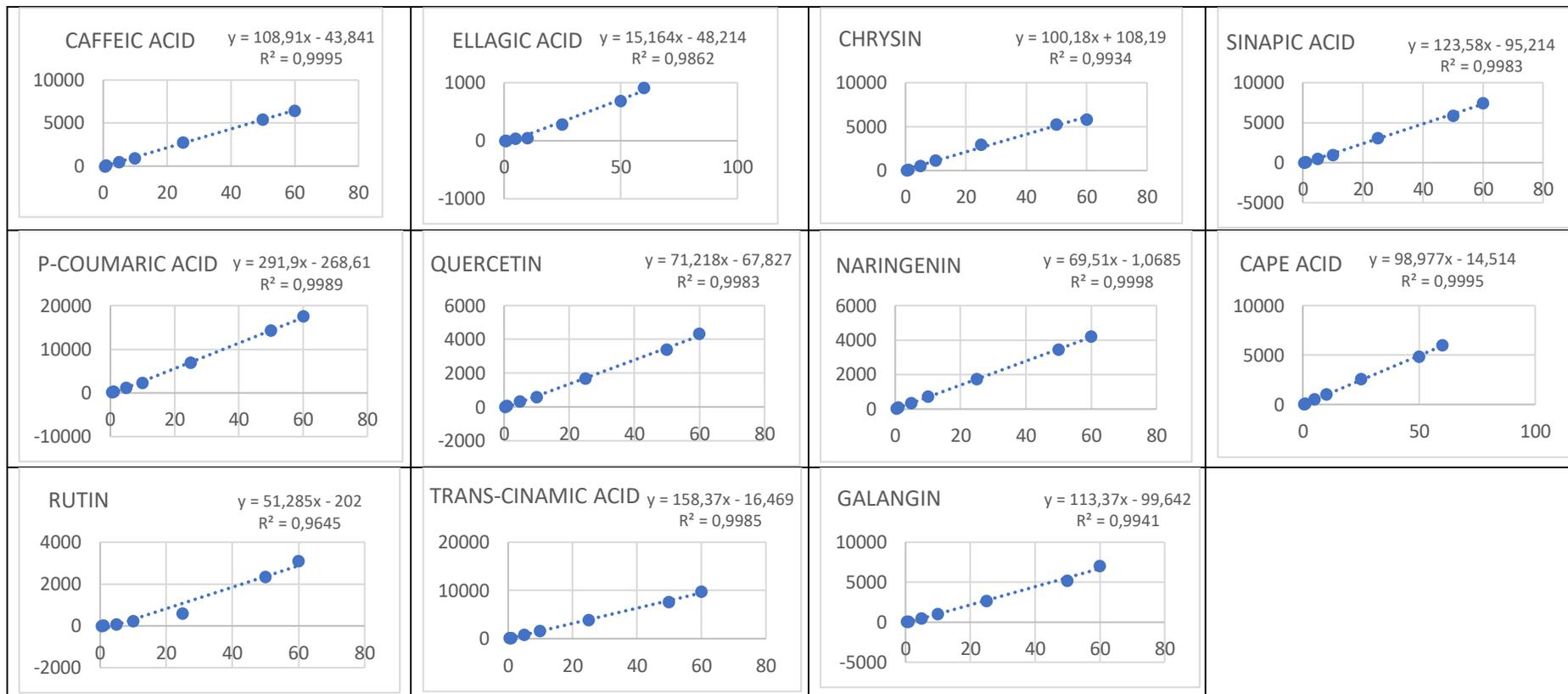


Figura 6. Rectas de calibrado obtenidas para los compuestos antioxidantes (flavonoides y ácidos fenólicos) analizados.

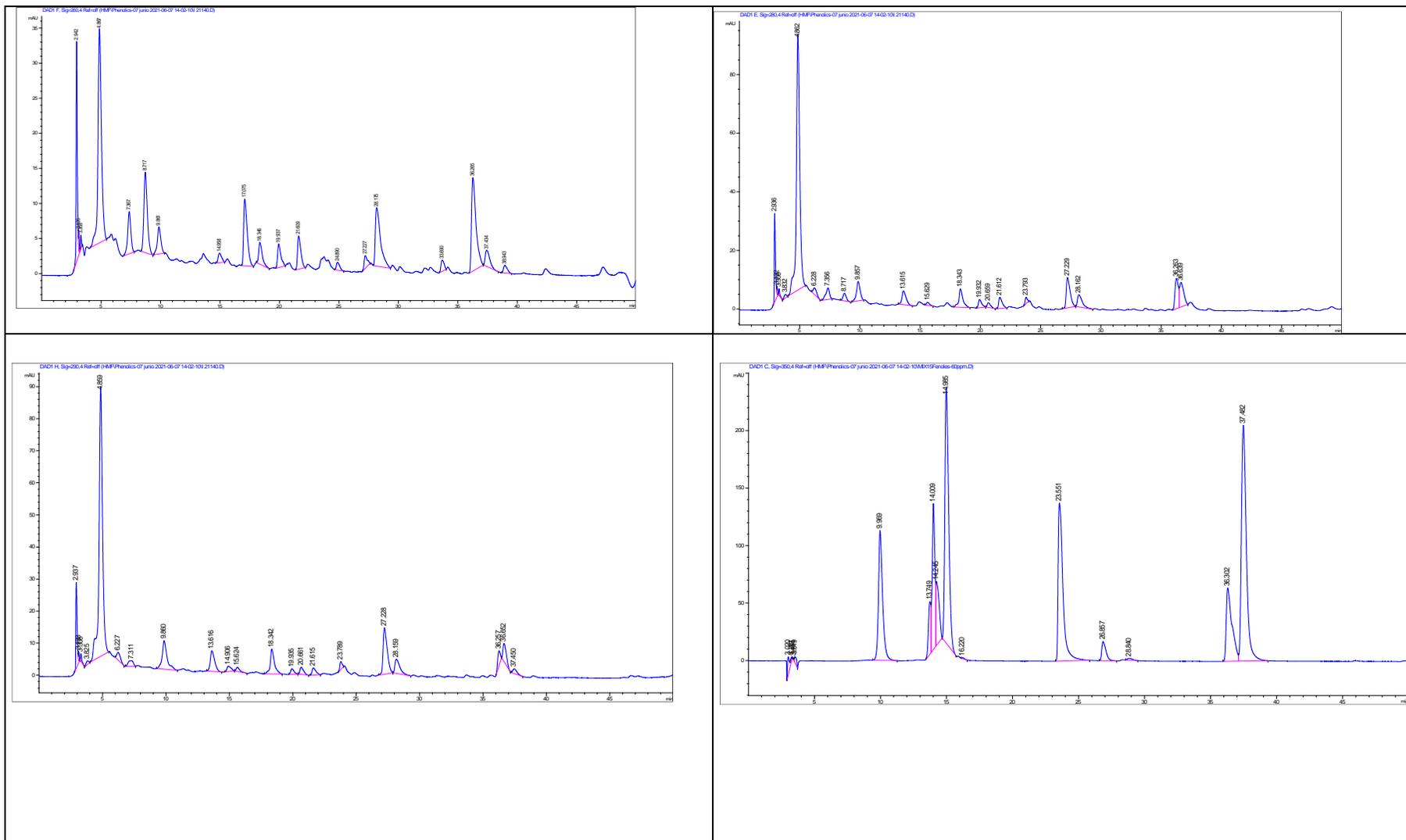


Figura 7. Ejemplos de cromatogramas obtenidos a diferentes longitudes de onda (260,280,290 y 350 nm).

En la Tabla 4 se muestran los valores mínimo y máximo, así como valores promedio de las concentraciones obtenidas para cada compuesto fenólico identificado, expresados en $\mu\text{g}/100\text{g}$ de miel. También se detallan los resultados de la ANOVA (F-ratio y diferencias significativas) obtenidos para cada compuesto.

En general, los compuestos analizados no mostraron diferencias significativas entre los factores estudiados, con la única excepción del ellagic y trans-cinamic acid que fueron significativos para el “tipo de colmena” y el rutin para la “altura del colmenar”. La escasa variabilidad observada puede deberse a que todas las muestras estudiadas proceden del mismo origen botánico y de una zona geográfica concreta.

Se observa que la mayor concentración la presentó el flavonoide naringenin para el factor “tipo de colmena”, con un valor máximo de $4.7 \mu\text{g}/100\text{g}$ de miel en las colmenas tipo alza, frente a un $3.7 \mu\text{g}/100\text{g}$ de miel obtenido en las muestras con colmena tipo Layens. El compuesto que menor concentración mostró para este factor fue el ellagic acid, con una concentración media de $0.1 \mu\text{g}/100\text{g}$ de miel en muestras de colmenas tipo alza.

Para el factor “año de recolección” podemos observar que el compuesto con mayor valor medio ($5.48 \mu\text{g}/100\text{g}$ de miel) y valor máximo registrado $7.0 \mu\text{g}/100\text{g}$ de miel fue el quercetin, para la campaña de recolección del año 2021. El segundo flavonoide con mayor concentración ($5.2 \mu\text{g}/100\text{g}$ de miel) y mayor valor medio ($2.9 \mu\text{g}/100\text{g}$ de miel) fue el naringenin para la campaña de recolección del año 2020.

Resultados que coinciden con los obtenidos por (D’arcy B, 2005), en un trabajo sobre las mieles australianas, donde el Naringenin presentan elevadas concentraciones, entre otros flavonoides.

En el caso del factor “altura” los resultados obtenidos muestran también la mayor concentración para el compuesto naringenin, con un máximo de $5.6 \mu\text{g}/100\text{g}$ de miel y media de $3.6 \mu\text{g}/100\text{g}$ de miel para los asentamientos ubicados a 1000 msnm. Por contra, el compuesto que menor concentración mostró fue el elagic acid con una concentración media de $0.1 \mu\text{g}/100\text{g}$ de miel en muestras ubicadas a 900 msnm.

Los compuestos que presentaron mayores concentraciones fueron los flavonoides, al contrario que en otros estudios de otras regiones como en Turquía (Can et al., 2015), Brasil (Bueno-Costa et al., 2016), Polonia (Jasicka-Misiak et al., 2011). De los ácidos fenólicos identificados el caffeic acid fue el que mostró mayor concentración dentro de los ácidos fenólicos, coincidiendo con estudios realizados por (Günes ME et al., 2017) en mieles de castaño.

Tabla 4. Valores promedio de las concentraciones ($\mu\text{g}/100\text{g}$), mínimos y máximos de los compuestos fenólicos identificados. ANOVA (F-ratio y p-valor).

	CAFFEIC ACID		P-COUMARIC ACID		RUTIN		ELLAGIC ACID		SINAPIC ACID		QUERCETIN		TRANS-CINAMIC ACID		NARINGENIN		CHRYSIN		GALANGIN		CAPE		
	Mín/máx	Media (SD)	Mín/máx	Media (SD)	Mín/máx	Media (SD)	Mín/máx	Media (SD)	Mín/máx	Media (SD)	Mín/máx	Media (SD)	Mín/máx	Media (SD)	Mín/máx	Media (SD)	Mín/máx	Media (SD)	Mín/máx	Media (SD)	Mín/máx	Media (SD)	
TIPO COLMENA																							
Alza	1.8-4.1	3 (0.5)	0.9-1.8	1.4 (0.2)	0.7-2.3	1.5 (0.4)	0-0.6	0.1-0.4	0.5-1.1	0.8 (0.2)	1.19-3.5	2.36 (0.56)	0.6-1.6	1 (0.2)a	1.8-4.7	3.3 (0.7)	1.3-3.0	2.1 (0.4)	0.3-1	0.6 (0.2)	0.3-0.9	0.6 (0.1)	
Layen	0.5-4.3	2.4 (0.9)	0.5-2	1.2 (0.4)	0-1.17	0 (0.7)	0-0.9	0.4 (0.2)	0.2-1.3	0.8 (0.3)	0.78-4.67	2.72 (0.94)	0.2-2	1 (0.4)a	0-3.7	1.3 (1.2)	0-2.3	0.9 (0.7)	0-0.8	0.2 (0.3)	0-0.8	0.3 (0.2)	
ANOVA (Fratio/p-valor)	ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns		
ALTURA (msnm)																							
700	1.6-5.5	3.6 (0.9)	0.9-2.4	1.7 (0.4)	0.6-3.4	2 (0.7)a	0-1	0.5 (0.2)	0.4-1.6	1 (0.3)	0.36-4.2	2.3 (0.93)	0.4-2	1 (0.2)	0.1-5	2.6 (1.2)	0.9-3.7	2.3 (0.7)	0-1.2	0.6 (0.3)	0.2-1.1	0.7 (0.4)	
900	0-3.7	1.7 (0.9)	0.17-1.7	1 (0.4)	0-0.7	0.4(0.7)a	0-0.9	0.1 (0.2)	0-1.2	0.6 (0.3)	0.31-4.41	2.4 (1)	0.1-1.8	1 (0.4)	0-3.2	0.7 (1.2)	0-2.2	0.7 (0.7)	0-0.8	0.2 (0.3)	0-0.7	0.2 (0.4)	
1000	1.2-4.3	2.7 (0.7)	0.7-1.9	1.3 (0.3)	0-1.8	0.7 (0.5)a	0.2-0.9	0.6 (0.2)	0.3-1.2	0.7 (0.2)	1.3-4.5	2.9 (0.77)	0.4-1.7	1 (0.3)	1.6-5.6	3.6 (1)	0.4-2.7	1.5 (0.5)	0-0.9	0.4 (0.2)	0-0.9	0.5 (0.3)	
ANOVA (Fratio/p-valor)	ns		ns		3,94*		ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns		ns		
AÑO																							
2019	1.2-4.6	2.8 (0.8)	0.5-1.9	1.2 (0.3)	0-1.7	0.6 (0.6)	0-0.6	0.2 (0.2)	0.4-1.4	0.9 (0.2)	-3.66	0.9 (0.9)	0-1	0.3 (0.4)	0.4-4.8	2.6 (1)	0.7-3.2	1.9 (0.6)	0.2-1.3	0.8 (0.3)	0.3-1.1	0.7 (0.2)	
2020	0.7-4.4	2.6 (0.9)	0.5-1.9	1.2 (0.3)	0-1.9	0 (0.6)	0-0.4	0 (0.2)	0.3-1.4	0.9 (0.3)	-3.82	1.25 (0.92)	0-1	0.5 (0.4)	0.4-5.2	2.8 (1.1)	0.3-3	1.7 (0.7)	0-1	0.4 (0.3)	0-1	0.5 (0.2)	
2021	1.1-4.2	2.7 (0.7)	0.9-2.1	1.5 (0.3)	0.2-2.4	1.3 (0.5)	0.6-1.4	1 (0.2)	0.1-1	0.6 (0.2)	3.9-7.0	5.48 (0.75)	1.9-3,2	2.5 (0.3)	0-3.5	1.5 (0.9)	1-0.5	1.3 (0.5)	0-0.5	0 (0.2)	0-0.5	0 (0.2)	
ANOVA (Fratio/p-valor)	ns		ns		ns		7*		ns		ns		12,73*		ns		ns		ns		ns		

5.3 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA

En el ensayo para evaluar la actividad antimicrobiana que presenta la miel de romero se testaron 5 cepas bacterianas, frente a 15 muestras de miel de romero a 4 concentraciones diferentes (100%, 25%, 12,5% y 6,25%), además de evaluar el efecto de osmolaridad que presenta debido a su elevado contenido en azúcares. Este se llevó a cabo por el método de los pocillos descrito en el apartado de material y métodos. Los resultados de inhibición obtenidos se muestran a continuación, siendo estos expresados en mm del diámetro que presentó el halo de inhibición creado en cada pocillo a las diferentes concentraciones de miel ensayadas. Para la evaluación de esta actividad antimicrobiana se tomó como inhibición positiva aquellas muestras que presentasen halos de inhibición superiores a 8 mm y como inhibición negativa el tamaño del pocillo que equivalía a 8 mm. A continuación, se muestran los valores obtenidos para cada cepa bacteriana, cada muestra y las diferentes concentraciones ensayadas. Además, se muestran los resultados obtenidos en el ensayo con una miel artificial y con otra miel de diferente origen botánico (Girasol) a modo de comparación, para establecer el efecto debido solo a la presencia de azúcares y a componentes distintos a los que se encuentran en la miel de romero.

Las muestras de miel de romero y la de miel de girasol ensayadas han mostrado efecto frente a *Staphylococcus epidermitis*, encontrándose la inhibición en un rango entre 9 y 49 mm de inhibición mostrándose la mayoría del efecto en la miel al 100%(v/v) y presentándose los rangos más altos en las muestras con colmena tipo alza, situadas a 1000 msnm y de la campaña 2019 (A-1000-19a y A-1000-19b). Además, la muestra A-1000-19a también presentó inhibición a una dilución del 25% (v/v) (25 y 24 mm de inhibición). El resto de las muestras de miel de romero, así como la miel artificial no presento efecto ninguno sobre esta cepa bacteriana (Figura 7).

Resultados similares a los obtenidos por (Basualdo C., et al 2007) donde la miel sin diluir inhibió notablemente el crecimiento de *S. epidermitis* en 9 de las 15 muestras de miel ensayadas, es decir el (60 %) de estas.

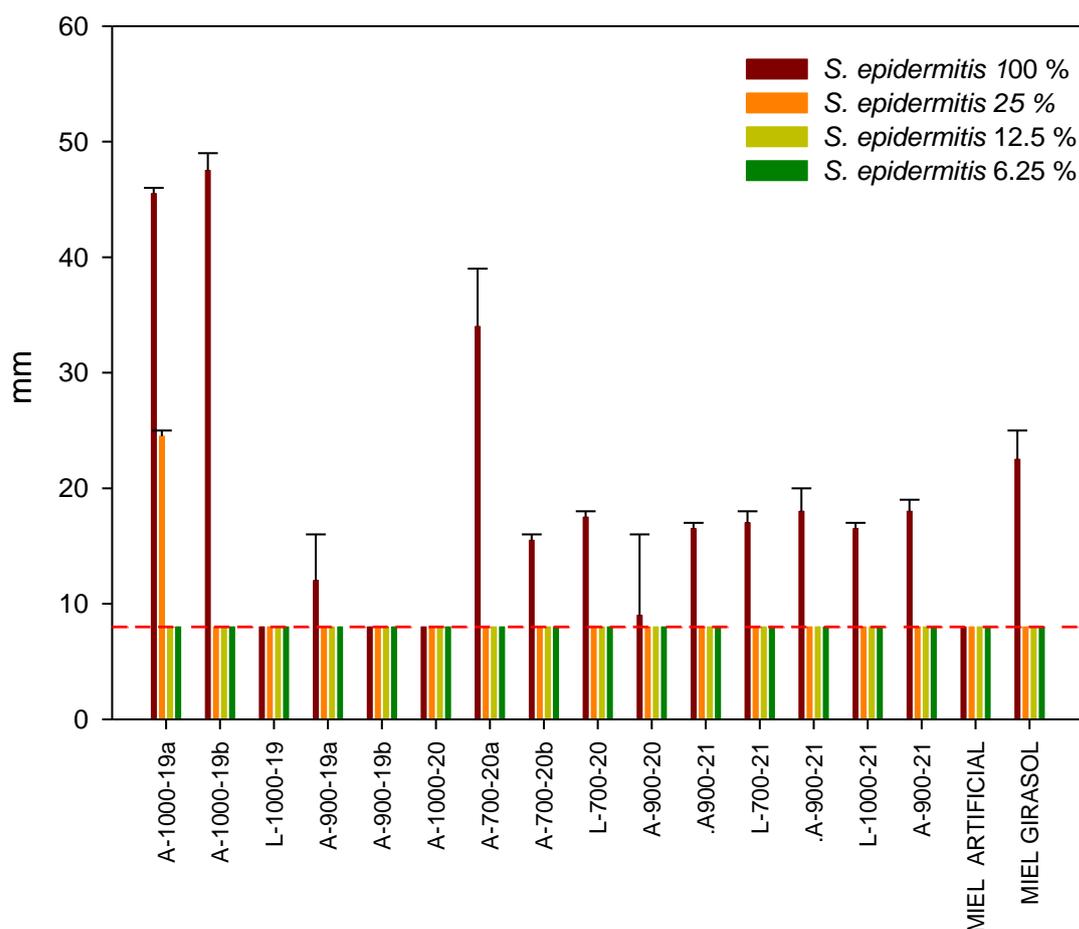


Figura 7. Efecto de las mieles ensayadas frente a la bacteria *Staphylococcus epidermitis*. Se muestra en marrón, naranja, amarillo y verde la longitud del halo de inhibición en (mm) creado por las diferentes diluciones de miel ensayadas (100% ,25%, 12,5% y 6,25%) respectivamente. La línea roja horizontal indica el inicio del efecto inhibición (8mm).

En la Figura 8 se muestran los resultados de inhibición obtenidos frente a *Staphylococcus aureus* fueron positivos, obteniéndose una inhibición positiva en todas las muestras de miel de romero al 100% de concentración, mostrando unos valores elevados de inhibición. La dilución de miel al 25% también presentó inhibición en las muestras A-1000-19a, A-1000-19b, L-1000-19, A-900-19a, A-900-19b, A-700-20a, A-700-20b, L-700-20, A-900-20,y L-700-21. La muestra de miel de girasol presentó una ligera inhibición (16 y 17 mm) al 100% (v/v), mientras que la miel artificial no mostro ningún efecto sobre esta cepa bacteriana, lo cual indica que el efecto osmolar que la miel ejerce sobre el microorganismo no es determinante para su inhibición.

Podemos observar similar efecto de esta bacteria como en el estudio realizado por Estrada H., et al, 2005) donde un 24% de las muestras lograron inhibir el crecimiento de *S. aureus*, hasta en una concentración de 25% (v/v) siendo el microorganismo cuyo crecimiento se vio mayormente afectado por la miel, obteniéndose halos de inhibición aún con concentraciones de 50% (v/v) y de 25% (v/v).

Además, diversos estudios realizados como (Cooper et al., 1999) y (Taormina et al., 2001) han demostrado la sensibilidad de *S. aureus* a la miel de abeja, inclusive de cepas resistentes a antibióticos. Estos datos son de gran importancia teniendo en cuenta que este es uno de los microorganismos más frecuentemente aislado de heridas infectadas y muchas cepas han desarrollado una gran resistencia a los antibióticos.

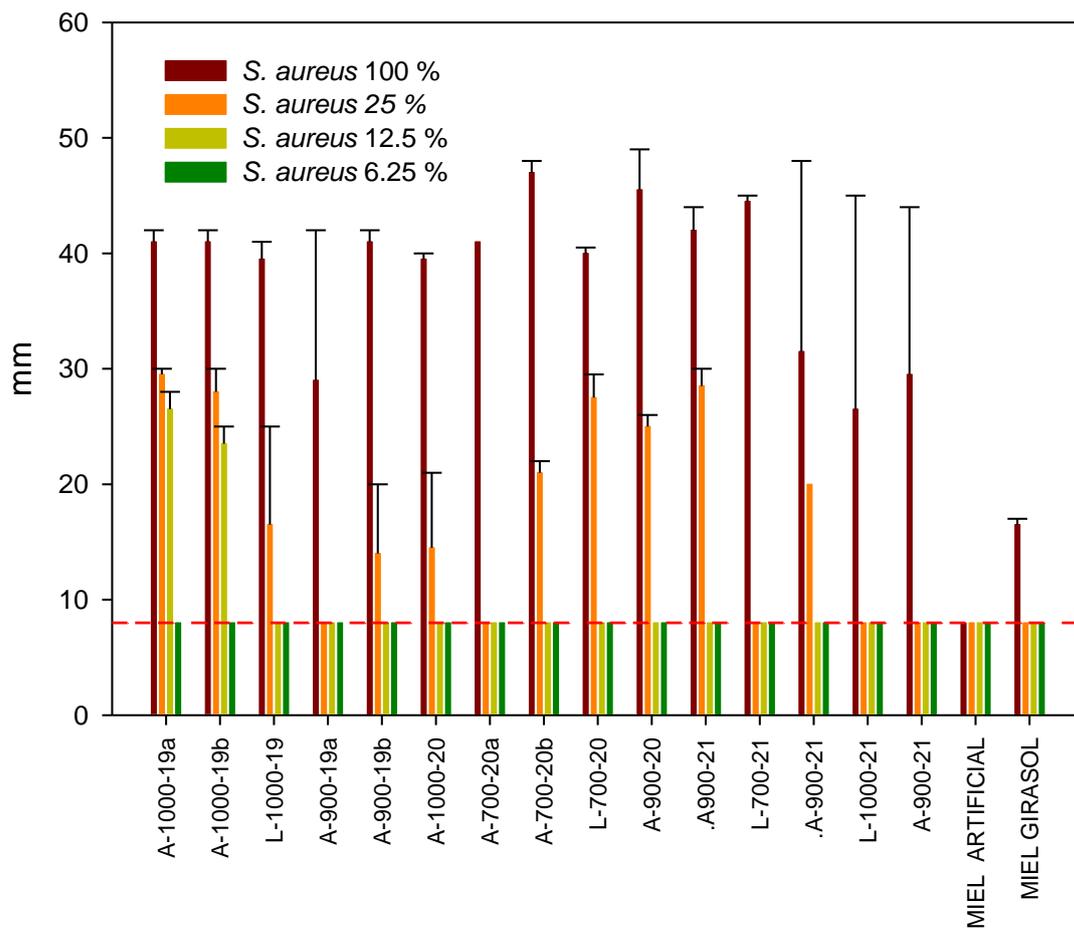


Figura 8. Efecto de las muestras de miel ensayadas sobre la bacteria *Staphylococcus aureus*. Se muestra en marrón, naranja, amarillo y verde la longitud de halo de inhibición en (mm) creado por las diferentes diluciones de miel ensayadas (100% ,25%, 12,5% y 6,25%) respectivamente. La línea roja horizontal indica el inicio del efecto inhibición (8mm).

En la (Figura 9) se muestra el rango de inhibición detectado para la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* fue entre 9 y 51 mm. Las muestras de miel de romero de la campaña 2019 y 2020 (A-1000-19a, A-1000-19b, L-1000-19 y A-900-20) fueron las que mayor inhibición mostraron al 100% (v/v). Además, la muestra L-1000-19 mostró inhibición también en una dilución al 25% (v/v). Las muestras correspondientes a la campaña 2021 fueron las que menos efecto presentaron. La muestra de miel de girasol mostro un bajo nivel de inhibición (14 mm), mientras que la miel artificial no llegó a tener ningún efecto frente a esta cepa bacteriana, confirmando

al igual que en el caso anterior que el efecto de inhibición es debido a los compuestos antioxidantes entre otros presentes en la miel.

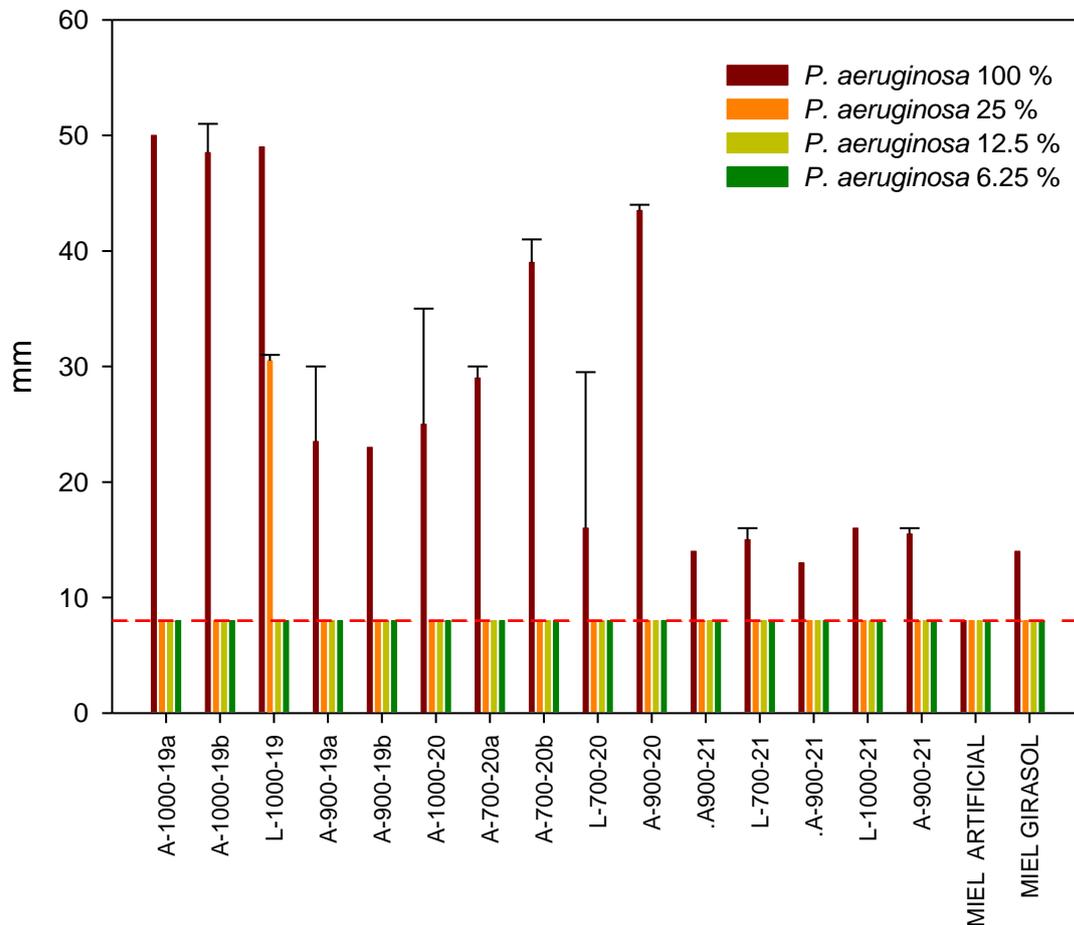


Figura 6. Efecto de las mieles ensayadas frente a la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. Se muestra en marrón, naranja, amarillo y verde la longitud de halo de inhibición en (mm) creado por as diferentes diluciones de miel ensayadas (100% ,25%, 12,5% y 6,25%) respectivamente. La línea roja horizontal indica el inicio del efecto inhibición (8mm).

Los resultados de inhibición obtenidos frente a *Bacillus subtilis* fueron mínimos (Figura 10), mostrando únicamente efecto las muestras de miel de romero A-1000-19b, A-700-20a y A-700-20b en un rango de valores entre 9 y 44 mm. El resto de las muestras de miel de romero, así como la miel artificial y la miel de girasol no mostraron efecto alguno frente a esta bacteria a ninguna de las concentraciones ensayadas. Estos resultados pueden indicar que al ser esta una bacteria esporulada presenta más resistencia y aunque es una bacteria gram positiva la miel debe contener mayor cantidad de compuestos antimicrobianos.

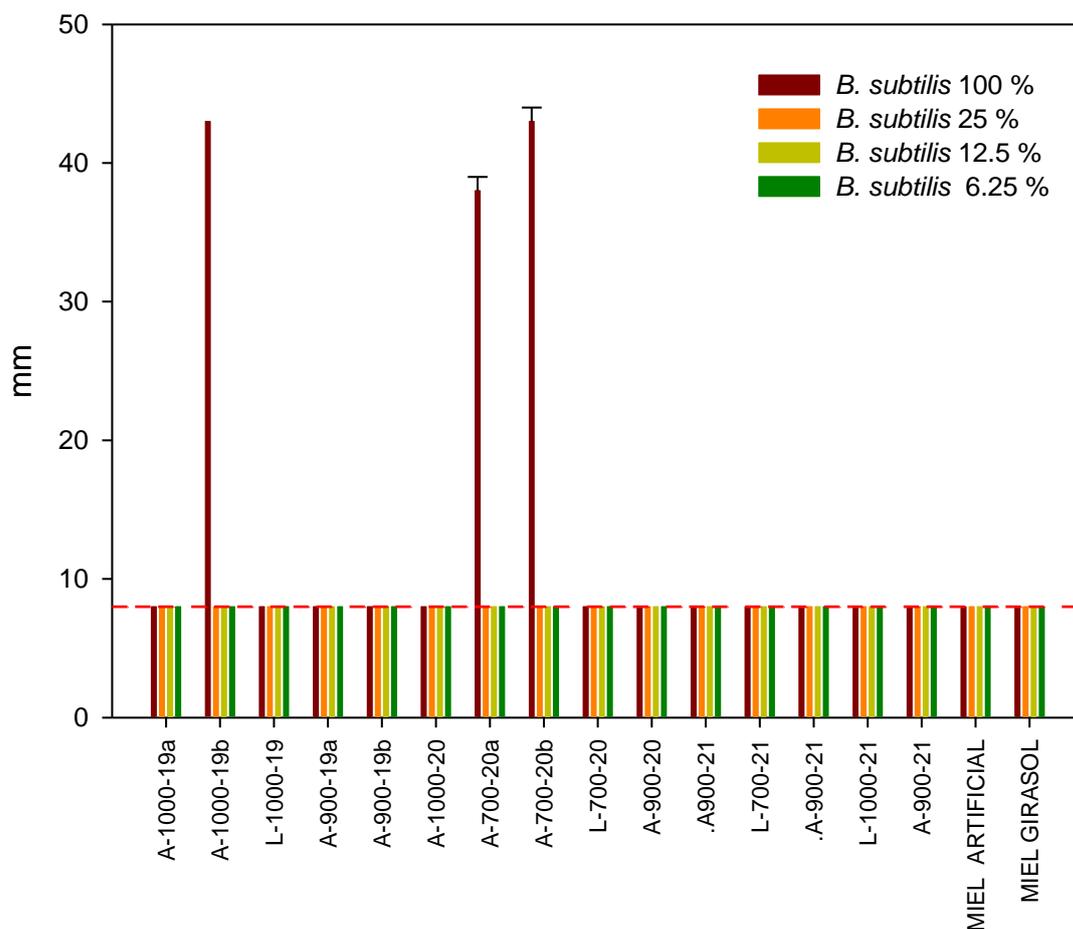


Figura 7. Efecto de las mieles ensayadas frente a la bacteria *Bacillus subtilis*. Se muestra en marrón, naranja, amarillo y verde la longitud de halo de inhibición en (mm) creado por las diferentes diluciones de miel ensayadas (100%, 25%, 12,5% y 6,25%) respectivamente. La línea roja horizontal indica el inicio del efecto inhibición (8mm).

Los resultados obtenidos en la inhibición de *E. coli* fueron positivos y homogéneos entre las muestras (Figura 11). Todas las muestras de miel de romero presentaron inhibición frente a esta bacteria al 100 % (v/v) con valores en un rango entre 9 y 55 mm. Todas las muestras de miel de romero mostraron también efecto en una dilución al 25% (v/v) menos la muestras A-1000-19a, A-900-19a, A-700-20a y A-900-20. Las muestras de miel artificial y miel de girasol en este caso sí que mostraron inhibición frente a esta bacteria, al 100% (v/v). Al igual que en el estudio realizado por (Mohammedaman et al., 2019) donde muestran que la miel mostró un efecto inhibidor completo con una clara zona de inhibición contra el organismo probado al 100% (v/v).

Estos resultados obtenidos para un microorganismo gran negativo que posee membrana externa indica que hay sustancias presentes en la miel de romero han sido capaces de ejercer efecto sobre este microorganismo. Pudiendo ser beneficioso el uso de miel de romero frente a este microorganismo que puede producir toxiinfecciones alimentarias

El estudio realizado por (Coniglio et al., 2013) también mostró una importante inhibición (diámetro de la zona de inhibición > 25 mm) contra *E. coli* de muestras de miel de castaño y multiflorales.

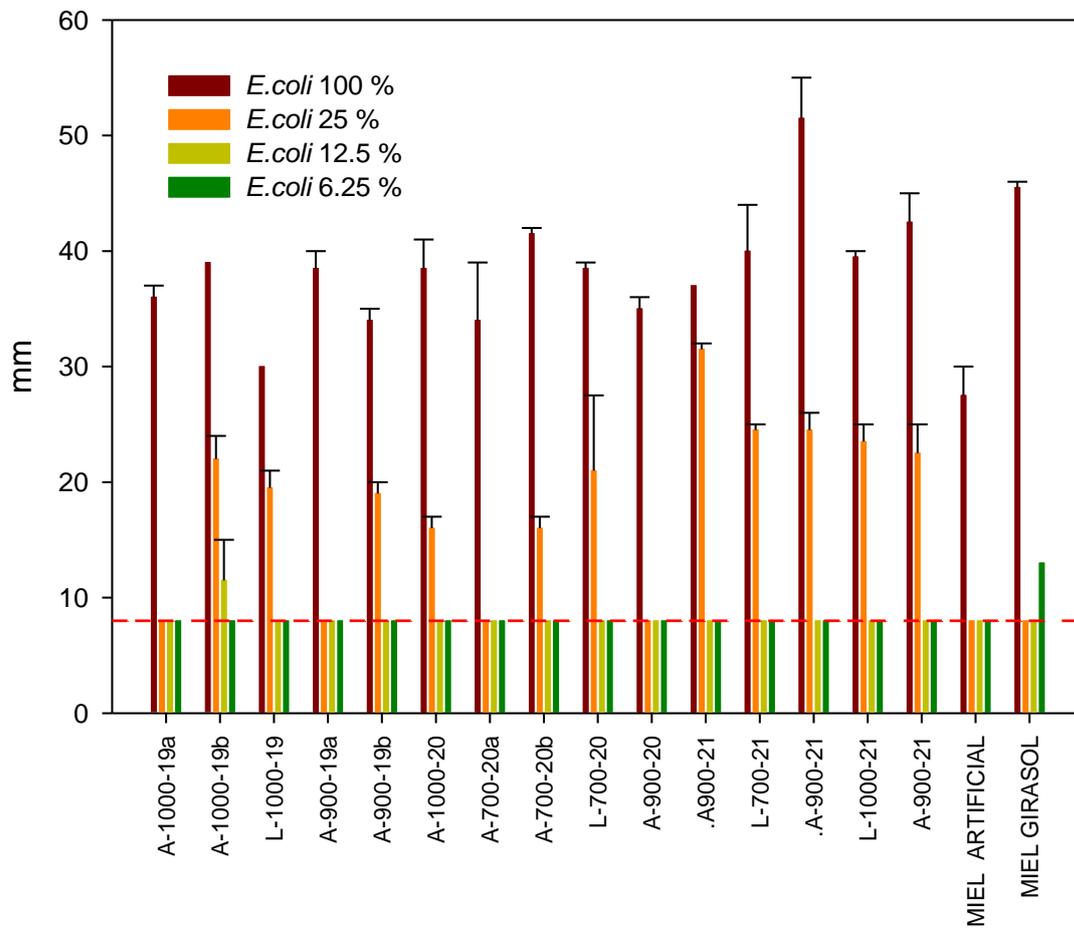


Figura 8. Efecto de las muestras de miel ensayadas sobre la bacteria *E. coli*. Se muestra en marrón, naranja, amarillo y verde la longitud de halo de inhibición en (mm) creado por las diferentes diluciones de miel ensayadas (100%, 25%, 12,5% y 6,25%) respectivamente. La línea roja horizontal indica el inicio del efecto inhibición (8mm).

5.4 RELACIÓN DE LOS COMPUESTOS ANTIOXIDANTES Y EL POTENCIAL ANTIMICROBIANO.

Una vez obtenidos los resultados de la caracterización en compuestos antioxidantes y la caracterización microbiológica de la miel, se procedió a relacionar los resultados obtenidos, con el objetivo de poder establecer las posibles relaciones de los parámetros ensayados para cada muestra.

Tabla 5. Relación de las muestras ensayadas y los compuestos antioxidantes obtenidos en ellas en $\mu\text{g}/100\text{g}$.

MUESTRAS	CAFFEIC ACID	P-COUMARIC ACID	RUTIN	ELLAGIC ACID	SINAPIC ACID	QUERCETIN	TRANS-CINAMIC ACID	NARINGENIN	CHRYSIN	GALANGIN	CAPE
A-1000-19a	2.84	1.44	0.01	0.01	1.07	1.47	0.28	4.69	2.46	0.01	0.43
A-1000-19b	6.50	2.16	5.75	1.93	1.31	1.83	0.25	10.76	4.83	1.71	1.44
L-1000-19	3.16	1.53	0.01	0.01	1.58	1.85	0.20	3.10	0.86	0.01	1.58
A-900-19a	6.13	2.45	0.01	0.01	1.43	2.07	0.51	1.76	5.70	2.74	1.77
A-900-19b	2.27	1.34	0.01	0.01	1.31	0.01	0.44	2.27	1.05	0.41	0.51
A-1000-20	4.95	2.01	0.01	0.01	1.25	1.62	0.32	7.86	3.18	0.98	1.31
A-700-20a	1.79	1.28	0.01	0.01	0.54	0.01	0.45	3.86	1.90	0.41	0.51
A-700-20b	4.70	1.93	5.52	0.01	1.69	1.92	1.14	2.19	3.91	1.18	1.57
L-700-20	3.86	1.75	0.01	0.01	1.27	1.60	0.77	3.99	2.58	0.58	0.49
A-900-20	5.19	2.00	0.01	0.01	1.39	1.72	0.33	7.19	3.55	0.94	0.75
A-900-21	2.59	1.72	1.04	0.62	0.32	7.07	3.57	1.51	0.85	0.01	0.01
L-700-21	3.49	1.63	1.36	1.44	0.58	4.71	2.30	0.97	0.79	0.01	0.01
A-900-21	3.17	1.64	1.20	1.49	0.75	5.32	2.58	0.97	0.56	0.01	0.01
L-1000-21	2.62	1.69	1.21	1.48	0.64	6.91	2.87	1.19	1.01	0.01	0.01
A-900-21	2.89	2.12	0.92	0.01	1.58	11.14	4.56	2.26	1.97	0.01	0.01

Como se puede observar en la Tabla 5, tomando como concentraciones destacadas las superiores a 5.5 ($\mu\text{g}/100\text{g}$) en cada muestra, observamos que la muestra A-1000-19b es la que más concentración de compuestos fenólicos ha registrado, obteniendo 6.50 ($\mu\text{g}/100\text{g}$), 5.75 ($\mu\text{g}/100\text{g}$) y 10.76 ($\mu\text{g}/100\text{g}$) de caffeic acid, rutin y naringenin respectivamente relacionándolo con los resultados obtenidos en la caracterización microbiológica observamos que esta muestra también ha presentado inhibición antes las cinco cepas bacterianas ensayadas.

Las muestras A-700-20a y A-700-20b a pesar de haber mostrado inhibición con las cinco cepas bacterianas ensayadas no muestran concentraciones significativas de ningún compuesto fenólico.

Las muestras A-900-21, L-1000-21 y A-900-21 las cuales han presentado concentraciones elevadas del flavonoide quercetin mostraron inhibición a una concentración del 100 % frente a todos los microorganismos ensayados menos en el caso de *Bacillus subtilis*, ejerciendo el mayor efecto inhibitorio frente a *E. coli* y *Staphylococcus aureus* y un menor efecto frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

6. CONCLUSIONES

En las muestras de romero analizadas, se ha observado que el tipo de colmena influye significativamente, tanto en la humedad como la conductividad eléctrica de la miel. Además, el año de recolección también implica diferencias significativas entre los parámetros fisicoquímicos analizados. Al parecer, las condiciones climáticas y principalmente a las prácticas apícolas pueden influir en estas diferencias.

Se identificaron 11 compuestos antioxidantes: 6 ácidos fenólicos y 5 flavonoides, con mayores concentraciones para los flavonoides quercetín y naringenin, además del ácido fenólico caffeic acid. En general, se evidencia una gran homogeneidad en compuestos antioxidantes para todas las mieles analizadas, lo que en principio era de esperar por su mismo origen botánico y su proximidad geográfica.

Con respecto a la actividad antimicrobiana, los resultados obtenidos muestran un claro efecto de inhibición de las muestras ensayadas frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *E. coli.*, siendo este efecto inhibitorio menor frente a *Pseudomonas aeruginosa* y casi nulo frente a *Bacillus subtilis*.

La relación entre los resultados obtenidos para los compuestos antioxidantes y su posible efecto antimicrobiano es poco destacable, con escasas excepciones en las que mayores concentraciones de los compuestos fenólicos caffeic acid, rutin y naringenin coincidieron con una mayor inhibición frente a las cinco cepas bacterianas estudiadas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- AHMED, M.; S. SAHILE & C. SUBRAMANIAN (2014) Evaluación del potencial antibacteriano de la miel contra algunos patógenos humanos comunes en la zona norte de Gondar de Etiopía", *Revista internacional de zoología pura y aplicada* , vol. 2, núm. 4, págs. 286–295.
- BASUALDO, C.; SGROY,V.; FINOLA,MS & MARIOLI J.M. (2007) Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds-*Veterinary microbiology*, 2007.
- BELITZ, H.; GROSCH, W & SCHIEBERLE, P. (2014). *Food Chemistry*. 4th ed. Berlin: Springer-Verlag.
- BUENO-COSTA, F.; ZAMBIAZI, R.C.; BOHMER, B. W., CHAVES, F; DA SILVA, W., ZANUSSO, J., & DUTRA, I. (2016). Antibacterial and antioxidant activity of honeys from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 333-340.
- CAN, Z.; YILDIZ, O.; SAHIN, H.; TURUMTAY, E. A; SILICI, S & KOLAYLI, S. (2015). An investigation of Turkish honeys: their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. *Food chemistry*, 180, 133-141.
- CONIGLIO,MA.;FARO,G.;GIAMMANCO,G.;PIGNATO,S.&MARRANZANO,M.(2013).Potencial antimicrobiano de las mieles sicilianas frente a Escherichia coli comensal y Salmonella serovar infantis patógena.2013 diciembre ;54(4):223-6.
- COOPER,R; MOLAN, PC & HARDING, KG (1999). Antibacterial activity of honey against strains of Staphylococcus aureus from infected wounds. *J R Soc Med*. 1999; 92:283-285.
- D'ARCY, B. (2005). Antioxidantes en mieles florales australianas: identificación de componentes de nutrientes que mejoran la salud: un informe para la Corporación de Investigación y Desarrollo de Industrias Rurales . *Corporación de Investigación y Desarrollo de Industrias Rurales*, 2005.
- ESTRADA, H; GAMBOA,M ;CHAVEZ,C;&ARIAS,ML. (2005).evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja contra staphylococcus aureus, staphylococcus epidermidis, pseudomonas aeruginosa, escherichia coli, salmonella enteritidis, listeria monocytogenes y aspergillus niger. evaluación de su carga microbiológica. *Alan* v.55 n.2 Caracas 2005.
- GÓMEZ PAJUELO, A. (2004): Origen botánico de la miel. Miel de España y Portugal. Eds. Montagud, Barcelona, 50-56.
- GÜNEŞ, ME, ŞAHIN, S., DEMIR, C., BORUM, E. Y TOSUNOĞLU, A. (2017). Determinación del perfil de compuestos fenólicos en mieles de castaño y de flores y su actividad antioxidante y antimicrobiana. *Revista de bioquímica alimentaria* , 41 (3), e12345.
- JASICKA-MISIAK, I.; POLIWODA, A.; DEREŃ, M & KAFARSKI, P. (2012). Phenolic compounds and abscisic acid as potential markers for the floral origin of two Polish unifloral honeys. *Food Chemistry*, 131(4), 1149-1156.
- JUAN-BORRÁS, M. (2016). Herramientas analíticas en la clasificación de mieles en base a criterios de calidad e inocuidad. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València.

ORANTES, J.; GONELL, F.; TORRES, C. & GÓMEZ-PAJUELO, A (2018) Guía de mieles monoflorales Ibéricas. Castellón, 2018. ISBN: 978-84-09-04709-3.

PERSANO-ODDO, L., & PIRO, R. (2004). Main European unifloral honeys: Descriptive sheets. *Apidologie*, 35, 38–81.

PEÑARRIETA, J. M., TEJEDA, L., MOLLINEDO, P., VILA, J. L., & BRAVO, J. A. (2014). Phenolic compounds in food. *Revista boliviana de química*, 31(2), 68-81.

PIANA, G.; RICCIARDELLI D'ALBORE, R.; & ISOLA, A. (1989). La miel. Versión española de ASENSIO DE LA SIERRA, E. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 106 pp.

SÁINZ LAÍN, C & GÓMEZ FERRERAS, C. (1999). Mielles Españolas. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 163 pp.

TAORMINA, P.; NIEMIRA, B.; & BEUCHAT ,L. (2001). Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *Int J Food Microb.* 2001; 69: 217-225.

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

8.ANEJOS

Tabla 6.Codificación de las diferentes muestras ensayadas en el trabajo.

Código muestras LABM	Tipo colmena	Altitud colmenar (m.s.n.m)	Año	Código trabajo
I-21140	alza	1000	2019	A-1000-19a
I-21141	alza	1000	2019	A-1000-19b
I-21142	layen	1000	2019	L-1000-19
I-21143	alza	900	2019	A-900-19a
I-21144	alza	900	2019	A-900-19b
I-21145	alza	1000	2020	A-1000-20
I-21146	alza	700	2020	A-700-20a
I-21147	alza	700	2020	A-700-20b
I-21148	layen	700	2020	L-700-20
I-21149	alza	900	2020	A-900-20
I-21150	alza	900	2021	A-900-21
I-21151	layen	700	2021	L-700-21
I-21152	alza	900	2021	A-900-21
I-21153	layen	1000	2021	L-1000-21
I-21154	alza	900	2021	A-900-21