



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE  
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

# **Características diferenciadoras de mieles y ceras de abeja del Norte y Centro de Mozambique**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

**Fernando João Tanleque Alberto**

Dirigida por:

**Isabel Escriche Roberto**

**Marisol Juan-Borrás**





UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE  
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

La **Dra. Isabel Escriche Roberto**, Catedrática de Universidad y la **Dra. Marisol Juan Borrás** Técnico superior de Investigación, pertenecientes al Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universitat Politècnica de Valencia e Investigadoras del Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo de la misma Universidad,

Hacen constar que:

La memoria titulada “**Características diferenciadoras de mieles y ceras de abeja del Norte y Centro de Mozambique**” que presenta **D. Fernando João Tanleque Alberto** para optar al grado de Doctor por la Universitat Politècnica de Valencia, ha sido realizada en el Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IuIAD-UPV) bajo nuestra dirección y reúne las condiciones para ser defendida por su autor.

Valencia, 05 de abril de 2019

Fdo. Isabel Escriche Roberto

Fdo. Marisol Juan Borrás



## ***Agradecimientos,***

*Quiero agradecer en primer lugar a mis directoras de Tesis: Dra. Isabel Escriche Roberto y Dra. Marisol Juan Borrás, la ayuda, el apoyo y la paciencia que me han prestado para poder llevar a cabo este Trabajo. Durante estos 4 años aprendí de ellas a enfrentarme a los retos de trabajo científico con una intensa disciplina. Especialmente recuerdo en 2014, cuando Isabel me ofreció la posibilidad de realizar prácticas del Master en su laboratorio y continuar a trabajar en el presente proyecto que está terminando. La fuerza, la vitalidad y energía las definen como persona. Isabel y Marisol mi sincero agradecimiento de corazón por las enseñanzas y lecciones.*

*Quiero agradecer también al Dr. Mario Visquert y la Dra Angela Periche por su apoyo técnico prestado. Al grupo (Vicente, Kike, Santi y otros) del Observatorio Municipal del Árbol de Valencia (OMAV), por sus enseñanzas en las practicas apícolas.*

*A la Universidade Pedagógica de Moçambique-Delegación de Nampula por permitir continuar con mis estudios.*

*Gracias al Ministério de Ciência e Tecnologia Ensino Superior e Técnico Profissional de Moçambique (Project: HEST “Ensino Superior, Ciência e Tecnologia”), por concederme la beca y a la Universidade Pedagógica de Moçambique-Nampula por aceptar continuar con mis estudios.*

*Quiero agradecer a mis amigos y compañeros: Leandro R. Alfredo, Pedrito Vanonto Saidino Lucas y Didacio Salema, por su apoyo, en la toma de muestras e informaciones en Mozambique.*

*Agradezco también la ayuda que he recibido de todos mis compañeros y amigos becarios que también compartieron conmigo sus caminos al realizar sus tesis doctorales, especialmente a Sergio Mulema, Elisa Maria, Jackson, Ginette, Ulrich, Mendel y a todos los que en mayor o menor medida han contribuido para que este trabajo fuese posible.*

*Quiero agradecer a mi madre y demás familiares por las infinitas bendiciones*

*Quiero agradecer especialmente a mi esposa Amina y a mis hijos: Isabel, Tanleque y Marina, por su amor, apoyo, consejos, y sobre todo porque no se cansaron de esperar, mientras realizaba esta tesis. Gracias a DIOS todo poderoso.*



## **RESUMEN**

Mozambique, ubicado en la costa este de África, es un país en vías de desarrollo con un gran potencial en términos de disponibilidad de recursos agroecológicos. En este país, la apicultura no juega un importante papel social, económico o ambiental, pero tiene potencial para aumentar la sostenibilidad de las comunidades rurales pobres. Las regiones norte y central de Mozambique gozan de un clima favorable y cuentan con suficientes recursos naturales, en particular con amplias áreas forestales ricas en flora melífera, excelentes para la apicultura. En Mozambique, la apicultura podría ser una actividad atractiva generadora de ingresos que sería explotada por los pequeños agricultores, incluso por las mujeres de las poblaciones rurales. No hay duda de que en este país, la apicultura puede ayudar a generar un cambio social y desempeñar un papel importante en la sociedad creando medios de vida sostenibles.

En los últimos años, el mercado mundial viene exigiendo productos agroalimentarios diferenciados con características específicas basadas en los siguientes criterios: origen botánico o geográfico, calidad y seguridad, y propiedades organolépticas específicas o nutricionales, entre otros. Por esta razón, es interesante ampliar el conocimiento de los productos apícolas de Mozambique, especialmente en relación con los indicadores de calidad. Esta información podría atraer la atención de las autoridades encargadas de la regulación nacional de este producto. Esto facilitará el control de calidad y promoverá su comercialización en los mercados locales e internacionales lo que apoyará y desarrollará aún más la apicultura en el país.

Por lo tanto, el objetivo de esta tesis doctoral ha sido caracterizar la miel y la cera de abeja de cuatro provincias de Mozambique [Nampula (ubicada en el norte) y Manica, Sofala y Zambezia (en el Centro)], y establecer sus características diferenciadoras, con la finalidad de aportar conocimiento sobre estos productos apícolas como base para su mejor explotación y comercialización.

En general, todos los parámetros fisicoquímicos analizados en las muestras de miel cumplían con las regulaciones internacionales. En la mayoría de los casos, se trataba de miel de mielada, ya que eran oscuras y con valores de conductividad superiores a 0,800 mS/cm. La flora que rodea las colmenas y las prácticas apícolas influyen en la variabilidad

de sus parámetros de calidad fisicoquímica, color, azúcares, antioxidantes totales, análisis de polen y perfil volátil. Según la similaridad del espectro de polen, se encontraron ocho tipos de miel, con los siguientes pólenes predominantes: I-*Astragalus* type; II-*Acanthus* sp.; III-Celastraceae; IV-Brassicaceae; V-Anacardiaceae y *Astragalus* type; VI-*Astragalus* type y Myrtaceae; VII-Asteracea y VIII-desconocida. El Grupo I (de Nampula), se diferenció particularmente de los demás principalmente debido a la abundancia de ciertos compuestos específicos (alcoholes, aldehídos, ésteres, ácidos y terpenos). Los altos niveles de ciertos parámetros de calidad, como el HMF y la humedad, así como la presencia de ciertos compuestos de furano característicos del humo (en gran parte identificados en Sofala y Manica), destacan la importancia de las prácticas apícolas en la mejora de la calidad de la miel de Mozambique.

En las muestras se encontraron siete ácidos fenólicos (*chlorogenic*, *caffeic*, *ellagic*, *ferulic*, *gallic*, *p-coumaric* y *synapic*) y ocho flavonoides (*catechin*, *chrysin*, *kaempferol*, *luteolin*, *naringenin*, *pinocembrin*, *quercetin* y *rutin*). La miel de Nampula mostró un contenido mayor para la mayoría de los ácidos fenólicos y flavonoides en comparación con el de las otras tres provincias, destacando el *chlorogenic acid* (5.22 mg/100 g), que fue significativamente más alto en esta provincia en comparación a las otras (1.24, 1.11 y 0.81 mg/100 g en Sofala, Manica y Zambezia). A diferencia de otras mieles africanas, *luteolin* (con valores promedio de 12.48; 13.10; 6.68 y 8.92 mg/100 g, respectivamente) tuvo el mayor impacto en el contenido de flavonoides, representando solo él más del 50% de esta familia. El valor medio de la actividad antioxidante total también fue mayor para las muestras de Nampula (22.1 mg TE/100 g), llegando incluso a 40.0 mg TE/100 g en algunos casos. Los flavonoides específicos: *pinocembrin*, *kaempferol*, *rutin* y *catechin*, seguido del ácido fenólico *chlorogenic* fueron las variables más importantes en la distinción de la miel de Nampula de la de las otras provincias según el resultado de un análisis discriminante.

El comportamiento newtoniano de la miel de Mozambique es similar al de otros tipos de miel comercializados a nivel mundial. Los módulos  $G'$ ,  $G''$  y  $\eta^*$  disminuyeron con el aumento de la temperatura.  $G'$  y  $G''$  fueron fuertemente influenciados por la frecuencia aplicada, mientras que  $\eta^*$  no dependió de este parámetro, lo que demuestra el comportamiento newtoniano de este tipo de mieles. Aplicando una red neuronal artificial (ANN) para predecir los parámetros reológicos en función de la temperatura, la frecuencia y la composición química, se encontró que un perceptrón multicapa (MLP) es el mejor modelo para  $G''$  y  $\eta^*$  ( $r^2 > 0.950$ ), mientras que la red neural probabilística (PNN) fue la



mejor para  $G'$  ( $r^2 = 0.758$ ). Las pruebas de sensibilidad mostraron que en el caso de  $G''$  y  $G'$ , la frecuencia y la humedad fueron los factores más importantes, mientras que para  $\eta^*$  fueron la humedad y la temperatura.

Además de la miel, este trabajo se ha centrado en la caracterización de cera de abeja procedente de las cuatro provincias de Mozambique en términos del perfil de hidrocarburos saturados (por HT-GC/FID) y de las propiedades térmicas (por DSC); y en la comparación con ceras de diferentes orígenes (España, Honduras y "referencia analítica"). Independientemente del origen, se identificaron un total de 15 hidrocarburos comprendidos entre  $C_{21}H_{44}$  a  $C_{35}H_{72}$  (todos ellos componentes típicos de la cera de abeja pura). La cantidad de hidrocarburos con número de carbonos impares fue mucho mayor a la de carbonos pares, siendo los más abundantes:  $C_{27}H_{56}$  (valores promedio 4.18-5.25 g/100 g) seguidos de  $C_{29}H_{60}$  (2.15-4.10 g/100 g) y  $C_{31}H_{64}$  (2.69-3.42g/100 g). En general, los hidrocarburos no contienen suficiente información útil para la diferenciación de la cera de abeja. Sin embargo, las entalpías de fusión y cristalización junto con todas las temperaturas asociadas con las diferentes formas polimórficas lipídicas permitieron la diferenciación de las provincias de Mozambique de los otros orígenes. Los valores de entalpía de fusión más altos se obtuvieron en las muestras de Mozambique (valores promedio 203-234 J/g) y Honduras (231 J/g), en comparación con las ceras de abeja de España (193 J/g) y la "referencia analítica" (168 J/g), hecho que podría estar vinculado a las mayores temperaturas de los países tropicales. Estos resultados constituyen un paso significativo en la caracterización de la cera de abejas de Mozambique y la mejor comprensión de sus características peculiares.

Este trabajo contribuye a difundir el conocimiento de dos productos apícolas prácticamente desconocidos como son la miel y la cera de abeja de Mozambique. Siempre y cuando las prácticas apícolas se lleven a cabo correctamente, la miel puede tener las características fisicoquímicas de calidad requeridas internacionalmente. El hecho de que la miel de Mozambique es una importante fuente de antioxidantes naturales, puede ser aprovechado por la población local no solo por los beneficios que implica para la salud, sino además por las posibilidades económicas que conllevaría su explotación. La cera de abeja, por otro lado, posee las características típicas que se requieren para la comercialización de este producto, motivo por el cual puede plantearse como una buena opción para ser introducida en un futuro próximo en los mercados, ya que se sabe que está prácticamente libre de residuos veterinarios. En definitiva, esta tesis doctoral puede constituir un primer paso para promover la comercialización de los productos apícolas de

Mozambique en los mercados locales e internacionales y apoyar a desarrollar la apicultura en este país.

## **RESUM**

Moçambic, situat en la costa est d'Àfrica, és un país en vies de desenvolupament amb un gran potencial en termes de disponibilitat de recursos agroecològics. En aquest país, l'apicultura no juga un important paper social, econòmic o ambiental, però té potencial per a augmentar la sostenibilitat de les comunitats rurals pobres. Les regions nord i central de Moçambic gaudeixen d'un clima favorable i compten amb suficients recursos naturals, en particular amb àmplies àrees forestals riques en flora mel·lífera, excel·lents per a l'apicultura. A Moçambic, l'apicultura podria ser una activitat atractiva generadora d'ingressos que podria ser explotada pels xicotets agricultors, fins i tot per les dones de les poblacions rurals. No hi ha dubte que l'apicultura pot ajudar a generar un canvi social i exercir un paper important en la societat creant mitjans de vida sostenibles.

En els últims anys, el mercat mundial ve exigint productes agroalimentaris diferenciats amb característiques específiques basades en els següents criteris: origen botànic o geogràfic, qualitat i seguretat, propietats específiques organolèptiques o nutricionals, entre altres. Per aquesta raó, és interessant ampliar el coneixement dels productes apícoles de Moçambic, especialment en relació amb els indicadors de qualitat. Aquesta informació podria atraure l'atenció de les autoritats encarregades de la regulació nacional d'aquest producte. Això facilitarà el control de qualitat i promourà la seua comercialització en els mercats locals i internacionals el que donarà suport i desenvoluparà encara més l'apicultura al país.

Per tant, l'objectiu d'aquesta tesi doctoral és caracteritzar la mel i la cera d'abelles de quatre províncies de Moçambic: Nampula (situada en el nord) i Manica, Sofala i Zambezia (en el Centre), i establir les seues característiques diferenciadores, juntament amb el coneixement d'aquests productes d'abella com a base per a una millor explotació i comercialització.

En general, tots els paràmetres fisicoquímics analitzats en les mostres de mel complien amb les regulacions internacionals. En la majoria dels casos, es tractava de mel de melada, ja que eren fosques i amb valors de conductivitat superiors a 0,800 ms/cm. La flora que envolta els ruscus i les pràctiques apícoles influeixen en la variabilitat dels seus paràmetres de qualitat fisicoquímica, color, sucres, antioxidants totals, anàlisis de pol·len

i perfil volàtil. Segons la similitud de l'espectre de pol·len, es van trobar huit tipus de mel, amb els següents pò·lens predominants: I-Astragalus type; II-Acanthus sp.; III-Celastraceae; IV-Brassicaceae; V-Anacardiaceae i Astragalus type; VI-Astragalus type i Myrtaceae; VII-Asteraceae VIII-desconeguda. El Grup I (de Nampula), es va diferenciar particularment dels altres principalment a causa de l'abundància de certs compostos específics (alcohols, aldehids, èsters, àcids i terpens). Els alts nivells de certs paràmetres de qualitat, com el HMF i la humitat, així com la presència de certs compostos de furano característics del fum (en gran part identificats en Sofala i Manica), destaquen la importància de les pràctiques apícoles en la millora de la qualitat de la mel de Moçambic.

En les mostres es van trobar set àcids fenòlics (chlorogenic, caffeic, ellagic, ferulic, gallic, p-coumaric i synapic) i huit flavonoides (catechin, chrysin, kaempferol, luteolin, naringenin, pinocembrin, quercetin i rutin). La mel de Nampula va mostrar un contingut major per a la majoria dels àcids fenòlics i flavonoides en comparació amb el de les altres províncies, destacant el chlorogenic acid (5.22 mg/100 g), que va ser significativament més alt en aquesta província en comparació a les altres (1.24, 1.11 i 0.81 mg/100 g en Sofala, Manica i Zambezia). A diferència d'altres mels africanes, luteolin (amb valors faig una mitjana de de 12.48; 13.10; 6.68 i 8.92 mg/100 g, respectivament) va tindre el major impacte en el contingut de flavonoides, representant només ell més del 50% d'aquesta família. El valor mitjà de l'activitat antioxidant total també va ser major per a les mostres de Nampula (22.1 mg ET/100 g), arribant fins i tot a 40.0 mg ET/100 g en alguns casos. Els flavonoides específics: pinocembrin, kaempferol, rutin i catechin, seguit de l'àcid fenòlic clorogénic van ser les variables més importants en la distinció de la mel de Nampula de la de les altres províncies segons el resultat d'una anàlisi discriminant.

El comportament newtonià de la mel de Moçambic és similar al d'altres tipus de mel comercialitzats a nivell mundial. Els mòduls  $G'$ ,  $G''$  i  $\eta^*$  van disminuir amb l'augment de la temperatura.  $G'$  i  $G''$  van ser fortament influenciats per la freqüència aplicada, mentre que  $\eta^*$  no va dependre d'aquest paràmetre, la qual cosa demostra el comportament newtonià. Es va aplicar una xarxa neuronal artificial (ANN) per a predir els paràmetres reològics en funció de la temperatura, la freqüència i la composició química. Es va trobar que un perceptrón multicapa (MLP) és el millor model per a  $G''$  i  $\eta^*$  ( $r^2 > 0.950$ ), mentre que la xarxa neural probabilística (PNN) va ser la millor per a  $G'$  ( $r^2 = 0.758$ ). Les proves de sensibilitat van mostrar que en el cas de  $G''$  i  $G'$ , la freqüència i la humitat van ser els factors més importants, mentre que per a  $\eta^*$  van ser la humitat i la temperatura.

A més de la mel, aquest treball se centra en la caracterització de cera d'abella procedent de les quatre províncies de Moçambic en termes del perfil d'hidrocarburs saturats (per HT-GC/FID) i de les propietats tèrmiques (per DSC); i en la comparació amb ceres de diferents orígens (Espanya, Hondures i "referència analítica"). Independentment de l'origen, es van identificar un total de 15 hidrocarburs compresos entre  $C_{21}H_{44}$  a  $C_{35}H_{72}$  (tots ells components típics de la cera d'abella pura). La quantitat d'hidrocarburs amb nombre de carbonis imparells va ser molt major a la de carbonis parells, sent els més abundants:  $C_{27}H_{56}$  (valors faig una mitjana de 4.18-5.25 g/100 g) seguits de  $C_{29}H_{60}$  (2.15-4.10 g/100 g) i  $C_{31}H_{64}$  (2.69-3.42g/100 g). En general, els hidrocarburs no contenen suficient informació útil per a la diferenciació de la cera d'abella. No obstant això, les entalpies de fusió i cristallització juntament amb totes les temperatures associades amb les diferents formes polimòrfiques lipídiques van permetre la diferenciació de les províncies de Moçambic dels altres orígens. Els valors d'entalpia de fusió més alts es van obtenir en les mostres de Moçambic (valors mitjans de 203-234 J/g) i Hondures (231 J/g), en comparació amb les ceres d'abella d'Espanya (193 J/g) i la "referència analítica" (168 J/g), fet que podria estar vinculat a les majors temperatures dels països tropicals. Aquests resultats constitueixen un pas significatiu en la caracterització de la cera d'abelles de Moçambic i la millor comprensió de les seues característiques peculiars.

Aquest treball contribueix a difondre el coneixement de dos productes apícoles pràcticament desconeguts com són la mel i la cera d'abella de Moçambic. Sempre que les pràctiques apícoles es duguen a terme correctament, la mel pot tindre les característiques físicoquímiques de qualitat requerides internacionalment. El fet que la mel de Moçambic és una important font d'antioxidants naturals, pot ser aprofitat per la població local no solament pels beneficis que implica per a la salut, sinó a més per les possibilitats econòmiques que comportaria la seua explotació. La cera d'abella, d'altra banda, posseeix les característiques típiques que es requereixen per a la comercialització d'aquest producte, motiu pel qual pot plantejar-se com una bona opció per a ser introduïda en un futur pròxim en els mercats, ja que se sap que està pràcticament lliure de residus veterinaris. En definitiva, aquesta tesi doctoral pot constituir un primer pas per a promoure la comercialització dels productes apícoles de Moçambic en els mercats locals i internacionals i donar suport i desenvolupar l'apicultura en aquest país.



**ABSTRACT**

Mozambique, located on the east coast of Africa, is a developing country with great potential in terms of the availability of agroecological resources. In this country, apiculture does not play an important social, economic or environmental role but it has potential to increase the sustainability of poor rural communities. North and Central regions of Mozambique enjoy a favourable climate and have sufficient natural resources, particularly vast forest areas rich in melliferous flora ideal for beekeeping. In Mozambique, beekeeping could be an attractive income generating activity that can be exploited by smallholder farmers even women of rural populations. There is no doubt that beekeeping can help generate social change and play an important role in society while creating sustainable livelihoods.

In the last years, the world market has been demanding differentiated agro-alimentary products with specific characteristics based on the following criteria: botanical or geographical origin, quality and safety, specific organoleptic or nutritional properties, among others. For this reason, is interesting to expand the knowledge about apiculture products from Mozambique, especially related to quality indicators. Advertising could attract the attention of local authorities in charge of the national regulation of this product. This will facilitate its quality control, thus promoting the commercialization in local and international markets and to support and further develop apiculture. Therefore, the objective of this doctoral thesis is to characterize honey and beeswax of four provinces of Mozambique: Nampula (located in the North) and Manica, Sofala and Zambezia (in the Center), and establish their differentiating characteristics, along with providing knowledge of these bee products as a basis for better exploitation and marketing.

In general, all the physicochemical parameters analysed in the honey samples were in agreement with the international regulations. In most cases, they dealt with honeydew honey since they were dark and with conductivity values above 0.800 mS/cm. Flora that surrounds the hives, and the apicultural practices influence in the variability of their physicochemical quality parameters, colour, sugars, total antioxidants, pollen analysis and volatile profile. According to a similar pollen spectrum, eight types of honey were found. In these, the predominant pollens were: I-*Astragalus* type; II-*Acanthus* sp.; III-Celastraceae; IV-Brassicaceae; V-Anacardiaceae and *Astragalus* type; VI-*Astragalus* type and Myrtaceae; VII-Asteraceae and VIII-unknown. Group I (from Nampula),

particularly distanced itself from the others mainly due to the special abundance of certain compounds (alcohols, aldehydes, esters, acids and terpenes). High levels of certain quality parameters such as HMF and moisture, as well as the presence of certain furan compounds characteristic of smoke (largely identified in Sofala and Manica), highlights the importance of beekeeping practices in improving the quality of Mozambiquean honey. Seven phenolic acids (chlorogenic, caffeic, ellagic, ferulic, gallic, p-coumaric and synapic) and eight flavonoids (catechin, chrysin, kaempferol, luteolin, naringenin, pinocembrin, quercetin and rutin) were found in the samples. Honey from Nampula had a higher content of the most phenolic acids and flavonoids compared to the other provinces, highlighting chlorogenic acid (5.22 mg/100 g), which was significantly higher than the other provinces (1.24, 1.11 and 0.81 mg/100 g in Sofala, Manica and Zambezia). Unlike in other African honeys, luteolin (with average values of 12.48; 13.10; 6.68 and 8.92 mg/100 g, respectively) had the greatest impact in the flavonoid content, representing alone more than 50% of this family. The mean value of total antioxidant activity was also higher for the Nampula samples (22.1 mg TE/100 g), even reaching up to 40.0 mg TE/100 g in some cases. The specific flavonoids: pinocembrin, kaempferol, rutin, and catequin; followed by the chlorogenic phenolic acid were the most important variables that distinguishes Nampula from the other provinces as resulted from a discriminant analysis.

The Newtonian behaviour of Mozambican honey is similar to those of other types of honey commercialized globally. The moduli  $G'$ ,  $G''$  and  $\eta^*$  decreased with increasing temperature.  $G'$  and  $G''$  were strongly influenced by the applied frequency, whereas  $\eta^*$  did not depend on this parameter, demonstrating Newtonian behaviour. An artificial neural network (ANN) was applied to predict the rheological parameters as a function of temperature, frequency and chemical composition. A multilayer perceptron (MLP) was found to be the best model for  $G''$  and  $\eta^*$  ( $r^2 > 0.950$ ), while probabilistic neural network (PNN) was the best for  $G'$  ( $r^2 = 0.758$ ). Sensitivity testing showed that in the case of  $G''$  and  $G'$ , frequency and moisture were the most important factors whereas for  $\eta^*$  they were moisture and temperature.

In addition to honey, this work is focused on the characterization of beeswax from the four provinces of Mozambique in terms of saturated hydrocarbon profile (by HT-GC/FID) and thermal properties (by DSC); and to compare them with others from different origins (Spain, Honduras and “analytical reference”). A total of 15 hydrocarbons



ranging from  $C_{21}H_{44}$  to  $C_{35}H_{72}$  (typical components of pure beeswax), identifying a much higher amount of odd than even carbon numbers, being the most abundant:  $C_{27}H_{56}$  (average values 4.18-5.25 g/100 g) followed by  $C_{29}H_{60}$  (2.15-4.10 g/100 g) and  $C_{31}H_{64}$  (2.69-3.42 g/100 g), regardless of the origin. Generally, hydrocarbons do not contain enough useful information for differentiation of beeswax. However, melting and cooling enthalpies together with all the temperatures associated with the different lipid polymorphic forms permitted the differentiation of Mozambique provinces from the other origins. A higher melting enthalpy values obtained in Mozambique samples (average values 203-234 J/g) and Honduras (231 J/g) indicates more energy is required to melt these beeswaxes than those from Spain (193 J/g) and “analytical reference” (168 J/g). This might be linked to the tropical temperatures where the bees produce specific wax. These results are a significant step towards characterizing Mozambiquean beeswax and to better understand its peculiar characteristics.

This work contributes to expanding the knowledge of practically unknown apiculture products, specifically honey and beeswax from Mozambique. The honey could achieve the proper quality physicochemical characteristics according to international mandatory fulfilment, as long as the apiculture practices are carried out correctly. As an added value, this honey is a source of natural antioxidants, which concern the health benefits and its exploitation as a viable and sustainable income for the local population. Beeswax, on the other hand, possess the typical characteristics that are required by the retail sector making it a good option to consider for the near future since it is well known that it is practically free of veterinary residues. This will pave the way to promoting the commercialization in local and international markets and to support and further develop the apiculture in this country.



## ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1. Apicultura en Mozambique</b> .....	3
<b>1.1.1. La abeja melífera</b> .....	4
<b>1.1.2. Condiciones climáticas y botánicas de las zonas de producción de miel</b> .....	5
<b>1.1.3. Producción y comercialización de miel</b> .....	8
<b>1.1.4. Producción y comercialización de cera</b> .....	10
<b>1.1.5. Sistemas de explotación apícolas</b> .....	11
<b>1.1.5.1. Tipos de colmenas usadas</b> .....	11
<b>1.1.5.2. Recolección y procesado de la miel</b> .....	14
<b>1.2. La miel</b> .....	15
<b>1.2.1. Tipos botánicos de miel</b> .....	16
<b>1.2.2. Composición química de la miel</b> .....	18
<b>1.2.3. Parámetros fisicoquímicos y de calidad de la miel</b> .....	27
<b>1.2.3.1. Parámetros de calidad comerciales</b> .....	33
<b>1.2.4. Propiedades beneficiosas de la miel</b> .....	36
<b>1.3. La cera de abeja</b> .....	37
<b>1.3.1. Formación</b> .....	37
<b>1.3.2. Composición</b> .....	38
<b>1.3.3. Propiedades físicas</b> .....	39
<b>1.3.4. Parámetros de calidad</b> .....	40
<b>1.3.5. Uso de la cera de abeja</b> .....	42
<b>1.4. Otros Productos Apícolas</b> .....	43
<b>1.4.1. La jalea real</b> .....	43
<b>1.4.2. El polen</b> .....	43
<b>1.4.3. El propóleo</b> .....	44
<b>1.4.4. El veneno de abeja</b> .....	45
<b>1.5. Referencias de Introducción</b> .....	45
<b>2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO</b> .....	65
<b>2.1. Objetivo general</b> .....	67
<b>2.2. Objetivos específicos</b> .....	67
<b>2.3. Plan de trabajo</b> .....	67
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	69
<b>3.1. Toma de muestras</b> .....	71

3.2.	<b>Análisis melisopalínológico</b> .....	72
3.3.	<b>Determinación de parámetros físicoquímico de la miel</b> .....	73
3.3.1.	<b>Humedad</b> .....	73
3.3.2.	<b>Actividad del agua (<math>a_w</math>)</b> .....	73
3.3.3.	<b>Conductividad eléctrica</b> .....	74
3.3.4.	<b>pH, acidez libre, láctónica y total</b> .....	75
3.3.5.	<b>Hidroximetilfurfural (HMF)</b> .....	76
3.4.	<b>Color</b> .....	76
3.5.	<b>Azúcares</b> .....	78
3.6.	<b>Compuestos volátiles</b> .....	79
3.7.	<b>Antioxidantes</b> .....	81
3.7.1.	<b>Flavonoides y ácidos fenólicos</b> .....	81
3.7.2.	<b>Capacidad antioxidante total</b> .....	83
3.8.	<b>Propiedades reológicas</b> .....	83
3.9.	<b>Análisis de la cera de abeja</b> .....	84
3.9.1.	<b>Perfil de hidrocarburos</b> .....	84
3.9.2.	<b>Calorimetría diferencial de barrido (DSC)</b> .....	85
3.10.	<b>Referencias de Material y Métodos</b> .....	86
4.	<b>RESULTADOS</b> .....	89
4.1.	<b>Quality parameters, pollen and volatile profiles of honey from North and Central of Mozambique</b> .....	91
4.2.	<b>Antioxidant characteristics of honey from Mozambique based on specific compounds</b> .....	123
4.3.	<b>Physicochemical and rheological characterization of honey from Mozambique</b> ...	147
4.4.	<b>Thermal properties and hydrocarbon composition of beeswax from Mozambique and other geographical origins</b> .....	173
5.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	195
5.1.	<b>Conclusiones del objetivo específico 1</b> .....	197
5.2.	<b>Conclusiones del objetivo específico 2</b> .....	198
5.3.	<b>Conclusiones del objetivo específico 3</b> .....	198
5.4.	<b>Conclusiones del objetivo específico 4</b> .....	199
	<b>Conclusión general de la tesis</b> .....	201
6.	<b>ANEXOS</b> .....	203

## ÍNDICE DE FIGURAS

### INTRODUCCIÓN

<b>Figura 1.1.</b> Abeja predominante en Mozambique ( <i>Apis mellifera scutellata</i> ). .....	5
<b>Figura 1.2.</b> Zonas (provincias) de mayor producción de miel en Mozambique.....	7
<b>Figura 1.3.</b> Producción de miel por continentes. ....	8
<b>Figura 1.4.</b> Principales países productores de miel en el mundo.....	9
<b>Figura 1.5.</b> Proporción de producción mundial de cera de abeja. ....	10
<b>Figura 1.6.</b> Construcción de colmena tradicional usando material local, provincia de Zambezia. ....	12
<b>Figura 1.7.</b> Colmenas de barras superiores (horizontales), provincia de Sofala. ....	13
<b>Figura 1.8.</b> Colmenas de cuadros móviles (verticales).....	14
<b>Figura 1.9.</b> Clasificación de los antioxidantes de acuerdo a su naturaleza enzimática. ....	22
<b>Figura 1.10.</b> Estructura química general de: flavonoides (a), ácidos hidroxibenzoicos (b) y ácidos hidroxicinámicos(c).....	23
<b>Figura 1.11.</b> Formación de 5-hidroximetilfurfural. ....	32

### MATERIAL Y MÉTODOS

<b>Figura 3.1.</b> Microscopio óptico de luz.....	72
<b>Figura 3.2.</b> Refractómetro tipo Abbe con baño termostatzado.....	73
<b>Figura 3.3.</b> Higrómetro de punto de rocío. ....	74
<b>Figura 3.4.</b> pH-metro-conductímetro.....	74
<b>Figura 3.5.</b> Valorador automatico.....	75
<b>Figura 3.6.</b> Cromatógrafo HPLC con detector ultravioleta (UV).....	76
<b>Figura 3.7.</b> Colorímetro diseñado específicamente para la miel. ....	77
<b>Figura 3.8.</b> Espectrocolorímetro. ....	78
<b>Figura 3.9.</b> Cromatógrafo HPLC con detector de dispersión de luz evaporativa (ELSD). .....	79
<b>Figura 3.10.</b> Esquema del montaje del sistema “purga y trampa” para extracción de compuestos volátiles.....	80
<b>Figura 3.11.</b> Desorbedor térmico acoplado a un cromatógrafo de gases con detector de masas. ....	81
<b>Figura 3.12.</b> Cromatógrafo HPLC con detector de matriz de fotodiodos. ....	83
<b>Figura 3.13.</b> Reómetro .....	84
<b>Figura 3.14.</b> Cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (FID).....	85
<b>Figura 3.15.</b> Calorímetro Diferencial de Barrido (DSC).....	86

### RESULTADOS

<b>Figure 4.1.1.</b> Box and whisker plots for all the physicochemical parameters considered in this study: moisture, aw, hydroxymethylfurfural (HMF), electrical conductivity, colour Pfund, glucose, fructose, F/G ratio, pH and acidity. ....	103
<b>Figure 4.1.2.</b> An example of light microscope photomicrographs (x 20) of the eight pollen spectrum (groups I to VIII) found in the Mozambiquean regions (Nampula, Zambezia, Manica and Sofala). Scale bars = 20 µm. ....	106
<b>Figure 4.1.3-a.</b> Score of all variables (physicochemical quality parameters, colour, sugar content and volatile compounds).....	115

**Figure 4.2.1.** PCA biplot of score [samples honey from different provinces of Mozambique: Nampula (◆), Sofala (■), Manica (●) and Zambezia (⋈)] and loading (specific flavonoids and phenolic compounds and total antioxidant capacity)..... 141

**Figure 4.3.1.** Typical rheograms for honey from Mozambique:  $G'$  (elastic modulus,);  $G''$  (loss modulus,);  $\eta^*$  (complex viscosity) at different temperatures: rhombus (10 °C); square (15 °C); triangle (20 °C); cross (25 °C); star (30 °C); circle (35 °C) ..... 158

**Figure 4.3.2.** Experimental data vs. predicted data using artificial neural network prediction: a [elastic modulus ( $G'$ ), probabilistic neural network (PNN) with 1 hidden layer prediction]; b [loss modulus ( $G''$ ), multilayer perceptron (MLP) with 1 hidden layer predict c [complex viscosity ( $\eta^*$ ), multilayer perceptron (MLP) with 1 hidden layer prediction]; rhombus (training), square (cross validation) and triangle (testing)..... 160

**Figure 4.3.3.** Measured values of the rheological parameters versus residual values: a [elastic modulus ( $G'$ ), probabilistic neural network (PNN) with 1 hidden layer prediction]; b [loss modulus ( $G''$ ), multilayer perceptron (MLP) with 1 hidden layer prediction]; c [complex viscosity ( $\eta^*$ ), multilayer perceptron (MLP) with 1 hidden layer prediction]..... 162

**Figure 4.4.1.** DSC thermograms (5 °C/min with 5 min isotherm step at 65 °C) of beeswax samples from four provinces of Mozambique (Nampula, Zambezia, Sofala and Manica), Spain, Honduras and “Reference” sample..... 184

**Figure 4.4.2.** DSC thermograms of beeswax samples from four provinces of Mozambique (Nampula, Zambezia, Sofala and Manica) at a rate of 1 °C min<sup>-1</sup>. ..... 185

**Figure 4.4.3.** DSC thermograms of beeswax samples from Spain, Honduras and “Reference” sample at a rate of 1 °C min<sup>-1</sup>. ..... 186

**Figure 4.4.4.** PCA biplot (scores and loadings) of the two principal components from the thermal properties of beeswax samples from four provinces of Mozambique (Nampula (●), Sofala (◆), Manica(▲) and Zambezia (■), Spain (Δ), Honduras (□) and Reference sample..... 190

## INDICE DE TABLAS

### INTRODUCCIÓN

<b>Tabla 1.1.</b> Características composicionales y parámetros de calidad de miel.....	28
<b>Tabla 1.2.</b> Principales componentes orgánicos de la cera pura de abeja. ....	38
<b>Tabla 1.3.</b> Rango de variabilidad de algunos de los de los parámetros fisicoquímicos e índices de calidad de la cera pura de abeja. ....	41

### RESULTADOS

<b>Table 4.1.1.</b> Types of honey according to the similar pollen spectrum (group I to group VIII). Taxas were classified by abundance (category).....	107
<b>Table 4.1.2.</b> Volatile compounds (maximum and minimum expressed as $\mu\text{g}/100\text{g}$ of honey) in honey from Mozambique regarding the province and the pollen spectrum (group I to group VIII). ANOVA results (F-ratio and significant differences) obtained for the factors: “province” and “pollen spectrum group” .....	110
<b>Table 4.1.3.</b> Standardized canonical discriminant function coefficients .....	114
<b>Table 4.1.4.</b> Classification results of the discriminant analysis carried out by cross validated procedure. Percentage of samples well classified by the model. (Group I to Group VIII according to the similar pollen spectrum. ....	117
<b>Table 4.2.1.</b> Mean (and standard deviation), minimum and maximum values of the phenolic acids, flavonoids and total antioxidant, compounds of the honey samples from different provinces of Mozambique (Nampula, Sofala, Manica and Zambezia), and ANOVA F-ratio for the factor “province”. ....	134
<b>Table 4.2.2.</b> Correlation matrix (Pearson correlation coefficients) among specific phenolic acids and flavonoids compounds, and total antioxidant capacity. Numbers in brackets = P-value .....	137
<b>Table 4.2.3.</b> Standardized canonical discriminant function coefficients .....	140
<b>Table 4.2.4.</b> Classification results of the discriminant analysis carried out by cross validated procedure. Percentage of samples well classified by the model.....	142
<b>Table 4.3.1.</b> Mean (and standard deviation), minimum and maximum values of the moisture, HMF, electrical conductivity, aw, colour colour (CIEL*a*b* and mm Pfund) and sugars of the honey samples from three provinces of Mozambique (Nampula, Sofala and Zambezia). ANOVA results (F-ratio and significant differences) obtained for the factor “province” for each variable. ....	156
<b>Table 4.3.2.</b> ANN statistical parameters for elastic modulus $G'$ .....	164
<b>Table 4.3.3.</b> ANN statistical parameters for loss modulus $G''$ .....	165
<b>Table 4.3.4.</b> ANN statistical parameters for complex viscosity $h^*$ . ....	166
<b>Table 4.3.5.</b> Sensitivity testing (percentage) of the input parameters (frequency, moisture, glucose content, fructose content, and temperature) on artificial neural networks (ANN) output models [probabilistic neural network (PNN)-1 hidden layer for $G'$ and multilayer perceptron (MLP)-1 hidden layer for $G''$ and $h^*$ ] to predict the rheological parameters. ....	167

**Table 4.4.1.** Mean and standard deviation values of the saturated hydrocarbons profile (g/100 g) found in beeswax from Mozambique (Nampula, Sofala, Manica and Zambezia), Spain, Honduras and “reference” (analytical reagent of pure beeswax) and ANOVA results (F-ratio and significant differences)..... 181

**Table 4.4.2.** Thermal properties of beeswax samples from four provinces of Mozambique (Nampula, Sofala, Manica and Zambezia), Spain, Honduras and “Reference” samples. Mean values and standard deviation, in brackets ..... 188



## **1. INTRODUCCIÓN**



## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Apicultura en Mozambique**

La apicultura en los países africanos siempre ha formado parte de la agricultura, la silvicultura y de otras actividades de los poblados y asentamientos humanos. Sin embargo, ha sido y es una actividad discreta frente a otras agropecuarias de mucha mayor importancia económica. Los beneficios de la apicultura como actividad recomendable en zonas rurales deprimidas de África han quedado patentes en distintos estudios en los que se plantea como una fuente alternativa o complementaria de alimentos, así como una posibilidad de ingresos para la población campesina sin recursos (Nur, 2016). Concretamente en Etiopía (en las zonas del norte de Tigray), Alemu, Maertens, Deckers, Bauer & Mathijs, (2016) han verificado el impacto positivo de la participación de los productores de miel en las cooperativas de comercialización agrícolas. En Uganda la apicultura, se ha identificado como una actividad de alto potencial económico, debido a la abundancia de recursos naturales y de abejas, a la fácil integración de esta actividad con la agricultura y a los escasos requerimientos tecnológicos necesarios para llevarla a cabo (Ogaba, 2002). Sin embargo, este autor señala también algunos obstáculos para el desarrollo de la apicultura, tales como la falta de legislación y de conocimiento sobre la calidad de la miel y de los productos de la colmena que se recolectan, lo que dificulta el acceso a los mercados. Tampoco hay que olvidar que, en los países africanos, como Mozambique, los apicultores carecen de la formación apropiada para el correcto desarrollo de esta actividad y tienen difícil el acceso a créditos para la compra del material apropiado. Actualmente, esta tendencia está cambiando ya que se está fomentando el desarrollo de proyectos encaminados a que los pequeños productores implementen sus prácticas apícolas.

En Mozambique existen mayoritariamente pequeños productores que actúan de manera individual, y puntualmente otros de mayor envergadura que se agrupan en asociaciones. Todos ellos centran casi exclusivamente su producción en la explotación de miel y cera, sin prestar atención a los restantes productos de la colmena como, el polen, el propóleo, la jalea real y el veneno.

Las regiones del norte y centro de Mozambique gozan de un clima favorable y cuentan con suficientes recursos naturales, en particular vastas áreas forestales ricas en flora melífera, ideales para el desarrollo de la apicultura (Zandamela, 2008). A pesar de su gran potencial, la explotación apícola por parte de la población rural es muy limitada. Su impulso significaría una fuente importante de ingresos y contribuiría a disminuir su

pobreza. Además, la comercialización de la miel puede desempeñar un papel importante en esta sociedad, con la creación de medios de subsistencia sostenibles paralelos a esta actividad, pudiendo favorecer el desarrollo de otros sectores: vendedores, carpinteros que producen colmenas, fabricantes de vestimentas de protección, entre otros (Tanleque-Alberto, Juan-Borrás, Escriche, 2018). Por lo tanto, sería de gran interés implementar políticas que fomentaran y desarrollaran la apicultura en este país, con la finalidad de ayudar a los pequeños productores (mayoritarios) a fortalecer su sistema de vida y desarrollo. Además, no hay que olvidar el beneficio indirecto que la apicultura desarrollaría en el país con la protección del medio ambiente y la biodiversidad (Chambers & Conway, 1992; Bradbear, 2005).

### **1.1.1. La abeja melífera**

Ciertas especies de abejas recogen el néctar y/o las secreciones de las plantas vivas y lo almacenan para luego convertirlo en miel, y así usarlo como fuente de alimento. Sólo las abejas que viven en grandes colonias almacenan cantidades de miel considerables, entre las que se encuentran el género *Apis*, *Trigona* y *Melipona*. Por ello, estas 3 razas han sido identificadas por el ser humano como buenas productoras de miel. La especie *Apis mellifera* es originaria tanto de África, como de Europa, así como del Medio Oriente. Las europeas fueron ampliamente introducidas en América, Asia, Australia y el Pacífico, y las africanas en Sudamérica, expandiéndose a Centroamérica y Estados Unidos (Bradbear, 2005; Junior et al., 2010). La especie que predomina en Mozambique, originaria de África tropical, es *Apis mellifera scutellata* (Figura 1.1.), que se diferencia de la europea básicamente, por su menor tamaño, comportamiento mucho más agresivo en la defensa del panal, y por presentar un ciclo de desarrollo más precoz (18.5 a 19 días en la africana y 21 días en la europea). Estos dos últimos hechos proporcionan a esta abeja una mayor resistencia frente al ácaro varroa (plaga que destruye a las abejas) y por lo tanto no se requiere la aplicación de tratamientos veterinarios (acaricidas, antibióticos, etc.). Por consiguiente, las mieles, ceras, y otros productos apícolas producidos en Mozambique no presentarán los residuos derivados de ciertas prácticas veterinarias, tan comunes en otras partes del mundo. Esta situación podría ser aprovechada en este país para comercializar productos apícolas con un valor añadido por su calidad diferenciada (ecológico, orgánico, comercio-justo, etc.).



**Figura 1.1.** Abeja predominante en Mozambique (*Apis mellifera scutellata*).

**Fuente:** Zandamela, (2008)

### **1.1.2. Condiciones climáticas y botánicas de las zonas de producción de miel**

El clima de Mozambique es tropical, caracterizado por dos estaciones bien distintas: La estación de lluvias (caliente y húmeda), de octubre hasta abril y la estación seca de mayo hasta septiembre (FAO-Gobierno de Moçambique, 2009). La precipitación es más abundante en el centro y norte del país con valores que varían entre 800 a 2000 mm por año. El sur del país es generalmente seco, aunque más en el interior que en la costa, con una precipitación anual aproximada de 800 mm; habiendo zonas en las que disminuye hasta los 300 mm (distrito de Pafuri en Gaza). Las temperaturas medias anuales de Mozambique oscilan entre las distintas zonas del país, en función de factores como la latitud y continentalidad [las regiones montañosas (18-20 °C), las planicies del norte y el centro (22-24 °C) y la zona sur del país (24-26 °C)] y estacionalidad [en verano (25-32 °C) y en invierno (18-23 °C)] (FAO-Gobierno de Moçambique, 2009).

En términos de agro-climatología, Mozambique está dividido en tres zonas: I. La zona al norte de río Zambeze, donde la disponibilidad de lluvias para el cultivo es buena, con más de 80% de probabilidad de que las necesidades mínimas del agua sean suficientes para todo el ciclo vegetativo; II. la zona centro, entre el sur del río Zambeze y el norte del río Save, en la que esta probabilidad es del 60%; III. toda la región al sur del río Save, cuyo potencial de precipitación es bajo llegando a satisfacer solo 30% de las necesidades (Zandamela, 2008).

En cuanto a la vegetación, la superficie cubierta con bosques se estima en 40 millones de hectáreas, de las cuales 22.5 millones (56.2%) son bosques densos y 16.4 millones (40.9%) bosques abiertos. Los manglares ocupan 357 mil hectáreas (0.9% de los bosques) y los bosques abiertos en áreas húmedas 802 mil hectáreas (2.0% del total de los bosques) (MINAG, 2007). La cobertura vegetal, incluyendo la floresta alta y baja, praderas arborizadas y manglares, ocupa una superficie de cerca de 62 millones de hectáreas que corresponden a 78% de la superficie total de Mozambique (Jooster & Smith, 2004; Zandamela, 2008).

La Figura 1.2. muestra las provincias (zonas) de Mozambique en las que se ha centrado el presente estudio por ser las de mayor producción de miel del país. La flora característica de estas zonas se detalla seguidamente (MINAG, 2007; Zandamela, 2008; Palynological Database on line, 2018; Hyde, Wursten, Ballings & Coates Palgrave, 2018):

**Nampula:** Está localizada en el norte de Mozambique con una precipitación media aproximadamente de 2000 mm/año, caracterizándose por la siguiente flora melífera: *Acanthus* sp., *Erythrofheoum* sp, Celastraceae, *Acacia nigrescencis*, Brassicaceae, *Mangisfera indica*, *Astragalus* type, *Vicia* type, Poaceae, *Securidaca longipededumculalata*, *Justicia* sp., Asteraceae, *Lantana cámara*, *Acacia* sp., Asteraceae, *Carex* type, *Lecaniosdiscus flaxinifolii*, *Brachystegia* sp., Combretaceae, *Plyllanthus* sp., *Pterocarpus angolensis*, *Entandophragma caudatun*, *Cholophora excelsa*, *Kaya nyassica*, *Combretum zeyre*, *Julberdina globiflora*, *Pterocarpis brenanii* y Caryophyllaceae.

**Zambezia.** Está localizada en el centro con una precipitación media mayor que 2000 mm/año, caracterizándose por la siguiente flora melífera: *Astragalus* type, Anacardiaceae, *Acacia nigrescencis*, Myrtaceae, Poaceae, *Carex* type, *Acacia* sp., *Mimosa* sp., *Brachystegia* sp., *Sesamum* sp., Nymphaeaceae, *Afzelia quanzensis*, *Ekebergia capensis*, *Lonchocarpus pacassa*, *Pterocarpus brenanii*, *Combretum zeyre*, *Brachystegia boehmii*, *Brachystegia spiciformis*, y *Erythrophleum suaveolens*.

**Sofala.** Está localizada en el centro del país con una precipitación media de 1000 mm/año, caracterizándose por la siguiente flora melífera: *Astragalus* type, *Sterculia africana*, Anacardiaceae, *Acacia nigrescencis*, Myrtaceae, Poaceae, *Carex* type, *Acacia* sp., *Mimosa* sp., *Brachystegia* sp., *Sesamum* sp., Nymphaeaceae, Convolvulaceae, *Vernonia* sp., *Sigesbeckia* sp., *Brachystegia* sp., Caryophyllaceae, *Entandophragma caudatun*,

Campanulaceae, *Diospyros mespiiiformis*, *Brachystegia boehmii*, *Paralepistemon shirensis*, *Acacia robusta*, *Dplorhynchus* sp., *Dalbergia melanoxyton*, *Millettia stuhlmanii*, Asteraceae, *Milicia excelsa*, *Hiteropyx natalensis*, *Plyllanthus* sp. y *Pterocarpus angollensis*.

**Manica.** Está localizada en el centro de Mozambique con una precipitación media de 1000 mm, caracterizándose por ser una región con vegetación tipo sabana, con árboles y arbustos de un elevado potencial para la población de miel como: *Astragalus* type, Myrtaceae, Poaceae, *Carex* type, *Acacia* sp., *Mimosa* sp., *Brachystegia* sp., *Sesamum* sp., Nymphaeaceae, *Vernonia* sp., *Sigesbeckia* sp., *Caryophyllaceae*, *Brachystegia boehmii*, Campanulaceae, Poaceae, Combretaceae, *Guibourta conjugata*, *Azelia quanzensis*, *Ekebergia capensis*, *Lonchocarpus pacassa*, *Pterocarpus brenanii*, *Combretum zeyre*, *Erythrophleum suaveolens*, *Acacia nigrescencis*, Anacardiaceae y *Pterocarpus angolensis*.



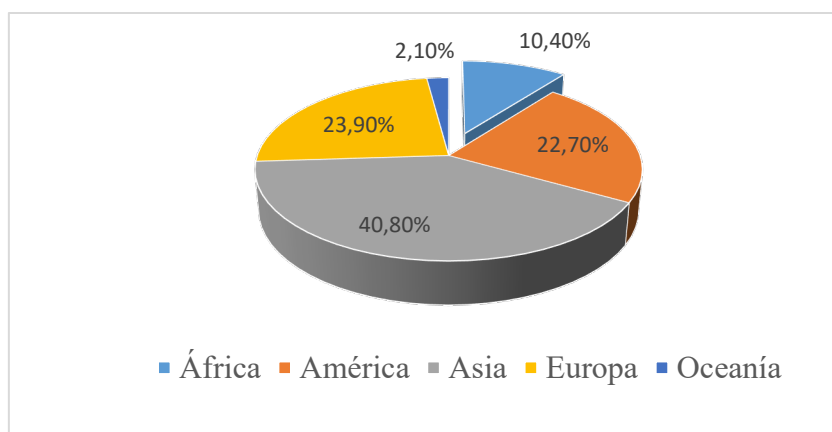
**Figura 1.2.** Zonas (provincias) de mayor producción de miel en Mozambique.

**Fuente:** Autor

### 1.1.3. Producción y comercialización de miel

La producción de miel, como ya se ha comentado, ha sido identificada como un medio para aumentar la sostenibilidad de las comunidades rurales pobres de África (Bradbear, 2005; Serem & Bester, 2012), y su explotación juega un papel importante para el alivio de la pobreza de las poblaciones rurales mozambiqueñas, tanto como alimento, como fuente de ingresos para las familias con las ventas de este producto (Zandamela, 2008; Tanleque-Alberto, et al., 2018).

En África, la cantidad de miel producida es de unas 170 mil toneladas anuales, mostrando una tendencia a la estabilidad en los últimos 10 años. Este volumen de producción representa el 10.4% de la producción mundial de miel, que está liderada por Asia (40.8%), seguida de Europa (23.9%), América (22.7%) y Oceanía (2.1%) (Figura 1.3). El continente africano importa más miel que exporta, 9.9 mil toneladas frente a 2.9 mil toneladas (FAOSTAT, 2016).

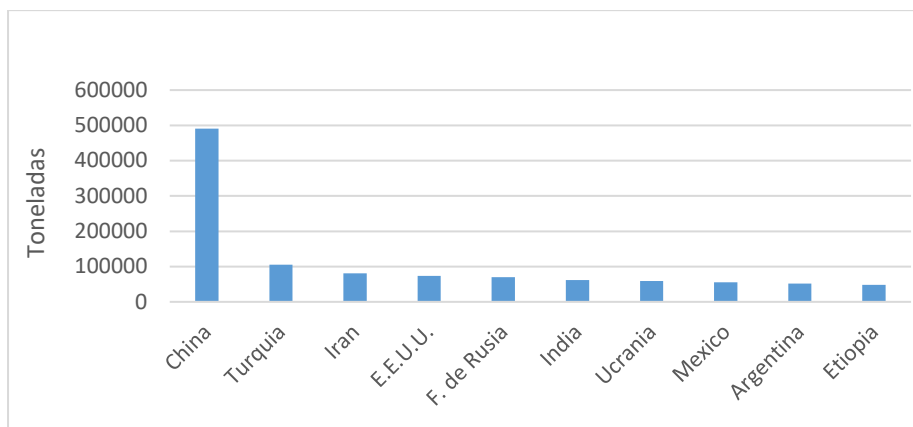


**Figura 1.3.** Producción de miel por continentes.

**Fuente:** FAOSTAT, (2016)

Etiopía es el mayor productor de miel en África y el décimo en el mundo, con 47.7 mil toneladas en 2016 (Figura 1.4.). Recientemente, Etiopía ha empezado a exportar miel a otros países, concretamente en 2014, el volumen de exportación fue de 0.904 mil toneladas (FAOSTAT, 2016).





**Figura 1.4.** Principales países productores de miel en el mundo.

**Fuente:** FAOSTAT, (2016)

En Mozambique, la producción de miel es relativamente escasa, unas 600 toneladas de miel/año (FAOSTAT, 2016), con una tendencia creciente de 100 toneladas de miel/año, en los últimos 5 años. Se estima que la capacidad de producción es de 3.600 toneladas/año (Jooster & Smith, 2004) debido a la disponibilidad de recursos agroecológicos. Sin embargo, hoy en día se está muy lejos de esa cifra debido a que las explotaciones en su mayoría son pequeñas, y además algunos apicultores desconocen las adecuadas técnicas apícolas.

La producción de miel del país se dirige fundamentalmente al mercado interno, vendiéndose directamente por el productor, en pequeños mercados, ferias comerciales y ventas ambulantes o por revendedores. El autoconsumo también es significativo como alimento y algunos productores la utilizan como pago a cambio de servicios. Actualmente, la miel del país tiene dos tipos de mercados paralelos: por un lado, el destinado a satisfacer a clientes exigentes, como instituciones hoteleras (con criterios más rigurosos y una garantía al consumidor en cuanto al origen y calidad del producto), y por otro, el destinado a clientes menos exigentes, a precios relativamente asequibles (Tanleque-Alberto et al., 2018).

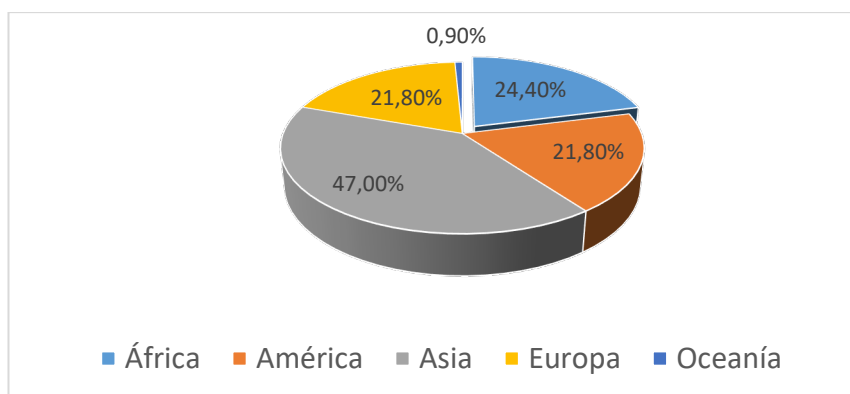
Actualmente algunas asociaciones de apicultores del país están recibiendo apoyos técnicos y financieros por su reconocido potencial. Organizaciones no gubernamentales (ONG) están apoyando a cooperativas de pequeños productores en la gestión de venta de miel de sus asociados. Sin embargo, todavía no se ha observado una red estable de comercialización debido a la falta de la infraestructura necesaria para ello (embalajes adecuados, fragilidad de los contenedores a granel), así como a la baja calidad de los productos. Con este apoyo, se conseguiría satisfacer las necesidades del mercado interno y evitar

la dependencia de las importaciones. Una mejor explotación de este recurso por parte de la población rural significaría una importante fuente de ingresos y, por lo tanto, una disminución de la pobreza (Tanleque-Alberto et al., 2018; Escriche, Tanleque-Alberto, Visquert & Oroian, 2017a).

#### 1.1.4. Producción y comercialización de cera

La cantidad de cera producida en África es de aproximadamente 15.2 mil toneladas anuales, mostrando una tendencia a la estabilidad en los últimos 5 años, según datos de 2016 de la FAO. Este volumen representa el 24.4% de la producción mundial de cera de abeja, liderada por Asia (47%), América (21.8%), Europa (5.9%) y Oceanía (0.9%) (Figura 1.5.). Etiopía es el mayor productor de cera del continente africano y el tercero del mundo, con 4.6 mil toneladas en 2016. Otros países africanos como Kenia y Angola con 2.4 mil y 2.3 mil toneladas, también son importantes productores ocupando el sexto y séptimo lugar en la producción mundial (FAOSTAT, 2016).

En Mozambique la producción y comercialización de cera, al igual que la de otros productos apícolas es escasa. Según datos estimados por la FAO, es de unas 85 toneladas de cera/año con una tendencia creciente de 3 toneladas/año en los últimos 5 años (FAOSTAT, 2016). La mayoría de los apicultores después de recolectar los panales de cera generalmente los destruyen, ya que desconocen el valor que podría tener en el mercado nacional e internacional. Aunque el manejo de este producto no presenta gran dificultad (aplicación de calor y filtrado), es necesario adiestrar a los apicultores en las técnicas de aprovechamiento y transformación del mismo. Además, su almacenamiento y transporte no son complicados ya que no se requiere de contenedores especiales, y no se deteriora con el tiempo (Bradbear, 2005).



**Figura 1.5.** Proporción de producción mundial de cera de abeja.

**Fuente:** FAOSTAT, (2016)

### **1.1.5. Sistemas de explotación apícolas**

Teniendo en cuenta la falta casi total de datos científicos sobre los sistemas de explotación apícolas en Mozambique (Zandamela, 2008), para llevar a cabo la presente tesis, en primer lugar se realizó un trabajo de campo en las zonas de estudio (Nampula, Zambezia, Sofala y Manica) con la finalidad de recopilar información sobre las prácticas apícolas asociadas al sistema de extracción, producción y comercialización de los productos apícolas (miel y cera) del país (Tanleque-Alberto et al., 2018). Esta información no figura en la presente tesis, pero en Anexos se muestra la encuesta que pasó a los apicultores.

#### **1.1.5.1. Tipos de colmenas usadas**

Desde el origen de la apicultura las colmenas han sufrido una notable evolución paralela a los cambios tecnológicos aplicados a los trabajos apícolas. El hombre aprendió que las abejas son más productivas y más fáciles de reproducir si ponen sus crías dentro de un nido (colmena) (Bradbear, 2005). La colmena se debe colocar en lugares que dispongan de condiciones favorables para que las abejas melíferas nidifiquen. Es decir, deben disponer de agua en sus cercanías, cantidad de árboles y plantas que florezcan en el área, al abrigo del viento y de la luz directa del sol (Bradbear, 2005; Zandamela, 2008). El único propósito de las colmenas es el de estimular a las abejas para que pongan sus nidos en un lugar accesible para el apicultor, de la misma forma que lo harían en una cavidad natural, facilitando así las tareas de extracción de miel, cera y los demás productos de la colmena.

En Mozambique coexisten las colmenas tradicionales (Figura 1.6), construidas con materiales locales (tales como troncos huecos, cilindros de cortezas, ollas de barro, hierba o cañas entretejidas, en función de su disponibilidad) y las colmenas de construcción más moderna [de barras superiores (horizontales) y de cuadros móviles (verticales)] (Zandamela, 2008; Tanleque-Alberto et al., 2018).



**Figura 1.6.** Construcción de colmena tradicional usando material local, provincia de Zambezia.

**Fuente:** autor

En la temporada 2001/2002 (único dato disponible), se contabilizaron en el país 2000 apicultores, con 700 colmenas modernas y un número sin determinar de colmenas tradicionales (EMTF, 2004).

Las colmenas de barras superiores (horizontales), son ampliamente usadas en países africanos, como es el caso de Mozambique, Tanzania y Kenia (Figura 1.7.). Para que estas colmenas sean funcionales se busca que las abejas construyan sus panales a partir de una serie de barras que facilitarán la posterior manipulación de los marcos individuales. Están hechas en un cajón de sección trapezoide cuyos lados están inclinados en ángulo de 60°, pueden contener hasta 40 marcos (barras) con la misma forma. El ángulo de las paredes laterales sirve para que las abejas no peguen el panal a los lados. El marco es solo un cabezal con algún tipo de alambre que le da más soporte a la cera. Las barras superiores necesitan ser construidas con precisión, para garantizar los mismos espacios que los panales que las abejas encuentran en su nido natural. (Bradbear, 2005; Gutiérrez, 2017; Tanleque-Alberto et al., 2018). Este tipo de colmena es muy económica en su construcción y manejo, no requiriendo de la utilización de cera estampada. Además, permite mantener un número importante de colonias (Bradbear, 2005).



**Figura 1.7.** Colmenas de barras superiores (horizontales), provincia de Sofala.

**Fuente:** autor

Las colmenas de marcos móviles (verticales) se usan mayoritariamente en los países industrializados, y poco en países en vías de desarrollo, como es el caso de Mozambique. Estas, consisten en unos cuadros rectangulares de madera o plástico, que sostienen los panales. Estos cuadros tienen dos ventajas fundamentales: permiten la inspección y manipulación de las colonias (tales como el transporte de los cuadros de abejas o cuadros llenos de una colonia bien desarrollada para reforzar otra más débil) y permiten altas cosechas de miel (al reutilizarse los cuadros varias veces y evitar a las abejas la construcción de nuevos panales) (Bradbear, 2005; Tanleque-Alberto et al., 2018). Sin embargo, esta reutilización puede provocar el deterioro de los cuadros, dejando de ser útiles. Cuando esto ocurre se elimina el panal con cera vieja, y se coloca una nueva lamina de cera estampada, construida a partir de cera vieja, fundida y moldeada. En este tipo de colmena los cuadros se insertan como “una especie de archivador con carpetas suspendidas en vertical”, generalmente de madera, pudiendo tener de 1 a 4 alturas (llamadas alzas) (Figura 1.8.). La parte inferior de la colmena se utiliza para la reproducción (cámara de cría), y es donde la reina deposita sus huevos y se desarrollan las futuras abejas. Encima de ésta se coloca una malla metálica (excluidora de reina) que permite que las abejas obreras circulen a las diferentes alturas, a través de la colmena, impidiendo que lo haga la reina (de mayor tamaño) (Bradbear, 2005; Gutiérrez, 2017; Tanleque-Alberto et al., 2018). Las alzas superiores, son usadas exclusivamente por la colmena para almacenar la miel. Los cuadros deben poder colocarse con exactitud y los espacios entre éstos tienen que ser iguales a los espacios de los nidos naturales, tal y como se ha mencionado en el caso de las colmenas horizontales (Bradbear, 2005).

La madera con la que se fabrican las colmenas debe estar seca, cuidadosamente cortada y cepillada. Requieren mucho trabajo para su construcción y mantenimiento y hay que prever un fácil cambio de las piezas deterioradas (Bradbear, 2005; Gutiérrez, 2017).



**Figura 1.8.** Colmenas de cuadros móviles (verticales).

**Fuente:** autor

#### **1.1.5.2. Recolección y procesado de la miel**

La producción de miel en África proviene principalmente de las colmenas tradicionales y sistemas de explotación tradicional (Muli, Munguti & Raina, 2007). Esta producción depende principalmente de las condiciones climatológicas y de la vegetación. La recolección de miel en el país se lleva a cabo dos veces al año, generalmente a finales de verano y a principios de invierno, dependiendo de la zona. En las zonas de Nampula y Zambezia el periodo de cosecha varía de marzo a mayo y de septiembre a diciembre mientras que en las zonas de Sofala y Manica (centro del país), el periodo de cosecha varía de febrero a abril y de octubre a diciembre (Zandamela, 2008; Tanleque-Alberto et al., 2018).

En la recolección, las prácticas apícolas pueden no ser las adecuadas debido fundamentalmente a falta de información. Algunos apicultores (cazadores de miel) para recolectarla y evitar que las abejas piquen, crean humo prendiendo fuego a las hierbas situadas bajo los árboles donde se encuentran los nidos. Estos fuegos antropogénicos a veces, se extienden, afectando no solo a las colonias de abejas, sino también a otras especies (Snook et al., 2015). En otras ocasiones el humo se hace de manera no destructiva. Como curiosidad cabe decir que algunos apicultores consiguen evitar la agresividad de las abejas utilizando ciertas especies de plantas (conocidas por ellos desde tiempos ancestrales) sin necesidad de crear humo.

Si el apicultor no es hábil, durante la extracción de la miel, puede provocar la muerte de gran parte de las abejas e incluso la destrucción de la colmena. Ésta puede quedar vacía durante un tiempo y si hay abundancia de colonias silvestres en el área, un enjambre ajeno, podría establecerse en esta colmena vacía y comenzar a construir un nido nuevo (Bradbear, 2005; Tanleque-Alberto et al., 2018).

Para procesar la miel, tanto en las colmenas locales tradicionales como en las de barras superiores, los apicultores cortan la parte externa del cuadro con la miel operculada (cubiertos por una capa protectora de cera). En general, seleccionan los cuadros que presenta más del 60% de la superficie operculada, y con un cuchillo desoperculador eliminan la capa de cera que cubre el panal, evitando dañar el resto que contienen la cría. Una vez extraídos, se colocan en un extractor con fuerza centrífuga o prensado a mano, según las condiciones existentes. La extracción mediante prensado a mano es un método artesanal que consiste en colocar los panales de miel, operculados y sin larvas, sobre una malla que se va retorciendo a fin de exprimir y dejar escurrir la miel que contiene, para ir recogéndo-la en un recipiente. En Mozambique, solo los apicultores que tienen cierto apoyo técnico y pertenecen a asociaciones usan la centrifuga para la extracción de miel. En la zona de Sofala es donde más se usa la centrifuga para la extracción de la miel en relación con las otras zonas (Zandamela, 2008; Tanleque-Alberto et al., 2018).

Una vez que el apicultor ha extraído la miel de los panales, la deja decantar unos días para separarla de las diferentes impurezas que puedan quedar, posteriormente la filtran y envasan. En grandes explotaciones o cooperativas, se lleva a cabo un procesado “más industrial”, el cual implica una serie de operaciones: licuación (40-55 °C, generalmente varía entre 2 y 4 días); pasterización y envasado. Estos “procesos industriales” deberían estar bien controlados, ya que la miel no debe calentarse ni procesarse hasta el punto de que pueda sufrir cambios en su composición esencial o que afecte su calidad (Codex Alimentarius, 2001).

## **1.2. La miel**

La miel es un alimento natural producido por las abejas melíferas a partir del néctar o de las secreciones de las plantas vivas. El néctar es una disolución acuosa constituida mayoritariamente de azúcares: sacarosa, glucosa y fructosa, en diferentes proporciones y de otras sustancias como sales minerales, ácidos orgánicos, aromas, etc. Este néctar es segregado por los vegetales (plantas) en los nectarios, situados habitualmente en la flor,

aunque también en las hojas o estípulas (Juan-Borrás, 2016). Para producir la miel, las abejas recogen este néctar y o los mielatos de ciertas plantas, lo transportan a la colmena en una zona especial de su aparato digestivo llamado y lo introducen en las celdillas. Una vez en el panal estas sustancias se siguen deshidratando y experimentando transformaciones bioquímicas gracias a las enzimas aportadas por las abejas (Calatayud, 2002; Juan-Borrás, 2016). Para completar su maduración, las abejas ventilan la colmena con el movimiento de sus alas, produciendo unas corrientes de aire con la finalidad de mantener una temperatura adecuada en el interior y eliminar parte del contenido acuoso de la miel (Bradbear, 2005). El alto nivel de concentración de azúcares, hacen a la miel un producto biológico bastante estable, dificultando el desarrollo de hongos y levaduras. La miel, una vez extraída de los panales y durante su almacenamiento posterior sigue transformándose, por acción de las enzimas, por lo tanto, no es simplemente una mezcla de componentes que se almacenan de forma inerte, sino un conjunto de nutrientes sometidos a unas interacciones y a unas condiciones ambientales que la modelarán como un alimento de calidad (Escuredo, Dobre, Fernández -González & Seijo, 2014; Soares, Amaral, Oliveira & Mafra, 2017). La miel está compuesta principalmente de carbohidratos y otros componentes como enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, carotenoides, vitaminas, antioxidantes, minerales y sustancias aromáticas (Codex Alimentarius, 2001; Alqarni, Owayss & Mahmoud, 2012). Es un producto biológico muy complejo que varía notablemente en su composición, color, aroma y sabor, que depende principalmente de las flores de origen, regiones geográficas, clima y especies de abejas involucradas en su producción. Además, se ve también afectada por las condiciones climáticas, de procesado, manipulación, envasado y almacenado (Tornuk et al., 2013; Escuredo et al., 2014; Juan-Borrás, Domenech, Hellebrandova & Escriche, 2014; Visquert, 2015; Silva, Gauche, Gonzaga, Costa & Fett, 2016).

### **1.2.1. Tipos botánicos de miel**

Hay una amplia variabilidad en las características de la miel, directamente relacionadas con los diversos factores anteriormente mencionados. De esta manera, según el origen botánico de las plantas que liban las abejas, las mieles se clasifican en (Codex Alimentarius, 2001; Zandamela, 2008; Juan-Borrás et al., 2014; Visquert, 2015; Soares et. al., 2017):

- Mielles monoflorales: en cuya composición domina el néctar de una determinada especie vegetal, por ejemplo, la miel de azahar o la miel de romero se



obtienen por libación, principalmente, de las flores de los géneros citrus y rosmarinus, respectivamente.

- Miel multiflorales o "milflores": éstas resultan de la libación de muy diversas plantas, sin que ninguna de ellas predomine sobre las otras en un porcentaje suficiente para ser considerada como monofloral.
- Miel de mielada: son las producidas, mayoritariamente, a partir de sustancias azucaradas segregadas por las plantas o por los seres vivos que habitan en ellas; por ejemplo: mieles de encina, roble, carrasca

Todas las mieles monoflorales tienen estipulados (nivel comercial, marcas de calidad) unos % mínimos de polen de la principal fuente botánica, y por lo tanto no existe una miel puramente monofloral, debido a que las abejas pecorean siempre en diferentes especies botánicas, incluso cuando hay una especie predominante. De esta manera, ciertas variedades de mieles pueden ser producidas en diferentes países con diferentes niveles de 'unifloralidad', a raíz de la mayor o menor presencia de la planta correspondiente, y esto puede conducir a una percepción ligeramente diferente, de un país a otro (Juan-Borrás, 2016).

Por lo general, una miel se clasifica como monofloral cuando al menos el 45% de los granos de polen presentes provienen de una sola especie botánica. Sin embargo, hay ciertas excepciones, y hablamos de mieles "infrarrepresentadas" cuando este porcentaje es mucho menor, como en el caso de las mieles de lavanda y azahar, para las que solo se requiere el 10% de pólenes presentes (Juan-Borrás, M., Periche, A., Domenech, E. & Escriche, I. 2015). Por el contrario, hablamos de mieles "suprarrepresentadas" cuando se requiere un porcentaje mucho mayor, así la miel de eucalipto y castaño, entre otras, necesitan contener un 70% y 90% de pólenes presentes respectivamente (Soares et. al., 2017). Las mieles de mielada, al no proceder principalmente de néctar de flores, contienen un menor número de pólenes de estas plantas y una cantidad mayor de pólenes de plantas anemófilas (contaminantes) (Juan-Borrás et al., 2014; Visquert, 2015; Soares et. al., 2017). Además, estas mieles suelen presentar restos de hongos, hifas, determinadas clorofíceas (algas verdes) y en menor medida especies de los géneros *Chlorococcus* y *Cystococcus*, que son consideradas como bioindicadores de mielada (García-Pérez, 2003).

El hecho de que una miel dependa de su origen geográfico, región y entorno circundante en el que se ubican las colmenas, hace que adquieran ciertas características y propiedades (Soares et. al., 2017). Así, otra forma de clasificar la miel para darle un valor

añadido es según su origen geográfico, utilizando, por ejemplo, ciertas etiquetas, como denominaciones de origen protegida (DOP) o identificaciones geográficas protegidas (IGP) (Regulation (EEC) N° 2081/92). Como ocurre con otros productos, las mieles DOP y IGP generalmente presentan características que están relacionadas, de manera esencial o exclusiva, con una región específica o un entorno local particular, como factores naturales y humanos inherentes al lugar de producción. Es por ello, que el origen geográfico es un parámetro importante con respecto a la diferenciación y valorización de la miel. Cabe destacar, que en Mozambique no existen este tipo de denominaciones, ni siquiera se distinguen variedades de miel en función de su origen botánico.

### 1.2.2. Composición química de la miel

La miel está compuesta en su mayoría por azúcares (60-85%) y agua (12-23%) (Escuredo, Míguez, Fernández-González, & Seijo, 2013; Machado De-Melo, Almeida-Muradian, Sancho & Pascual-Maté, 2017), además de 200 componentes minoritarios, entre los que se encuentran, proteínas (enzimas), ácidos orgánicos, minerales (incluyendo calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, potasio, sodio y zinc), vitaminas (especialmente vitamina B6, tiamina, niacina riboflavina y ácido pantoténico), pigmentos, compuestos antioxidantes y una gran variedad de compuestos volátiles (Pontes, Marques & Câmara, 2007; Ciulu et al., 2011; Alqarni et al., 2012; Escuredo et. al., 2013; Alberto, 2015; Silva et al., 2016).

#### *Carbohidratos*

Los carbohidratos constituyen los componentes mayoritarios de la miel, representando el 95-99% de la materia seca y entre el 75 y 82% del total. Los monosacáridos, fructosa y glucosa, son los azúcares más importantes (85-95%) (Machado De-Melo et al., 2018), siendo de manera general la fructosa (33-42%) más abundante que la glucosa (27-36%). Aunque en casi todos los tipos de miel, la fructosa es el carbohidrato mayoritario, hay algunas excepciones, tales como, por ejemplo, la miel de colza (*Brassica napus*) y la de diente de león (*Taraxacum officinalis*), donde la fracción de glucosa puede llegar a ser mayor que la de fructosa (Escuredo et al., 2014), hecho que produce que este tipo de mieles, en general, tengan una cristalización más rápida. En menor proporción se encuentran los disacáridos sacarosa (generalmente inferior al 5%) y maltosa (4%), y por último otros disacáridos y oligosacáridos como erlosa, ramnosa, trehalosa, nigerobiosa, isomaltosa, maltotetraosa, maltotriosa, maltulosa, melezitosa, melibiosa, nigerosa, palatinosa,

turanosa, rafinosa, y otros (Fuente, Ruiz -Matute, Valencia-Barrera, Sanz & Castro, 2011). Cabe destacar que el disacárido sacarosa, rico en el néctar, está formado por una molécula de fructosa y una de glucosa a través de una unión  $\alpha$ -1,4. Cuando es hidrolizado por la enzima invertasa, aportada por la abeja, produce una mezcla equimolar de las hexosas fructosa y glucosa en la miel (Kamal & Klein, 2011; Silva et al., 2016). La maltosa también sufre una hidrolización enzimática, pero en este caso por efecto de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, dando como resultado dos moléculas de glucosa (Soldatkin et al., 2013). El contenido del resto de azúcares minoritarios (producidos por la acción de la invertasa) es mayor en las mieles de mielada que en las de néctar (Bogdanov, 2011).

### *Agua*

El agua es el segundo componente más importante de la miel. Su contenido puede oscilar entre un 13 y un 25%, dependiendo de las condiciones climáticas, estación del año, humedad del néctar de origen, grado de maduración alcanzado en la colmena, manipulación por parte de los apicultores, y condiciones de almacenamiento (Gallina, Stocco & Mutinelli, 2010; Yücel & Sultanoglu, 2013; Escriche, Tanleque-Alberto, Visquert & Oroian, 2017a). El nivel de agua de una miel contribuye en su peso específico, viscosidad, sabor, calidad y en definitiva en el valor comercial del producto (Sáenz & Gómez, 2000; Silva et al., 2016).

### *Compuestos aromáticos*

Los componentes volátiles, presentes en una miel están constituidos principalmente por alcoholes, aldehídos, cetonas, éteres, terpenos, compuestos fenólicos, derivados de benceno, ácidos grasos, ácidos, hidrocarburos y compuestos cíclicos (Alissandrakis, Daferera, Tarantilis, Polissiou, & Harizanis, 2003; Jerkovic', Tuberoso, Marijanovic, Jelic & Kasum, 2009; Juan-Borrás, 2016; Machado De-Melo et al., 2018). Estos compuestos, tienen su origen fundamentalmente de las plantas, bien directamente o como consecuencia de reacciones químicas. Además, pueden aparecer compuestos negativos por malos tratamientos postcosecha o alteraciones microbianas (Escriche, Visquert, Juan-Borrás & Fito, 2009; Barra, Ponce-Díaz & Venegas-Gallegos, 2010; Silva et al., 2016).

Los componentes volátiles junto con los azúcares, los ácidos de la miel, así como ciertos componentes del néctar contribuyen definitivamente en su aroma y sabor (Montenegro, Gómez, Pizarro, Casaubon & Peña, 2008; Juan-Borrás, 2016; Machado De-Melo, et al., 2017). Las mieles uniflorales tienen un sabor distintivo de la planta, debido a la

presencia de ciertos compuestos orgánicos volátiles de los néctares de los que proceden (Castro-Vázquez, Díaz-Maroto & Pérez-Coello, 2007; Escriche, Sobrino-Gregorio, Conchado & Juan-Borrás, 2017b). Algunos alcoholes, como por el ejemplo el 3-metil-3-buten-1-ol y el 2-metil-2-buten-1-ol, presentes en ciertas variedades de miel les proporcionan características de frescura (Castro-Vázquez et al., 2007; Escriche et al., 2017b). La presencia en ciertas mieles de los ácidos carboxílicos de cadenas de carbono larga, proporcionan a la miel sabores que pueden variar de picante a rancio, por su parte los de cadena corta, como el ácido acético, le aportan un aroma y sabor picante, mientras que el ácido butanoico y hexanoico (propios de mantequilla) le dan un aroma rancio (Escriche, 2009; Barra, Ponce-Díaz & Venegas-Gallegos, 2010).

Se han identificado más de 400 compuestos diferentes en la fracción volátil de la miel. Algunos de ellos, pueden servir como marcadores de mieles monoflorales. Muchos estudios se han llevado a cabo en las últimas décadas en relación a los componentes volátiles de las diferentes variedades de mieles y distintas procedencias (Radovic et al., 2001; De la Fuente, 2005; Castro-Vázquez et al., 2009). En algunos de ellos, la caracterización de la fracción volátil ha ayudado en la autenticación de su origen botánico (Kadar et al., 2011). Por ejemplo, el 3,9-epoxi-1- $\beta$ -mentadieno, t-8- $\beta$ -menthan-óxido-1,2-diol y cis-rose se han propuesto como marcadores de miel de limón, las dicetonas, compuestos de azufre y alcanos son característicos de la miel de eucalipto, mientras que el hexanal y el heptanal son los principales compuestos en el aroma de la miel de lavanda (Radovic et al., 2001; Castro-Vázquez et al., 2007; Karabagias, Badeka, Kontakos, Karabournioti & Kontominas, 2014; Silva et al., 2016; Machado De-Melo et al., 2018; Escriche et al., 2017b).

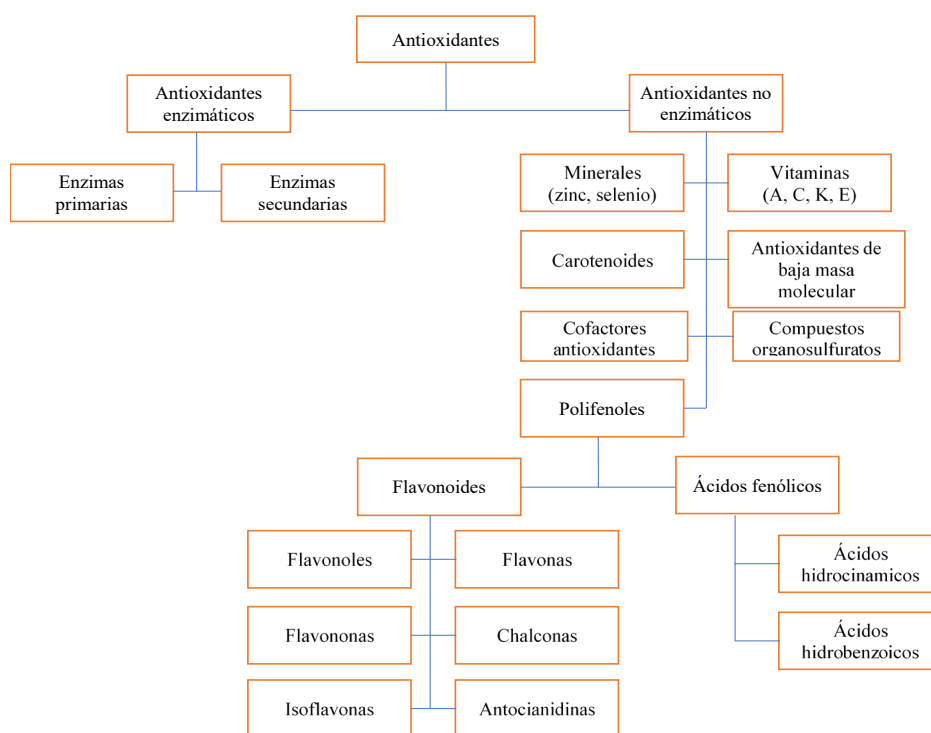
Muchos de estos componentes son muy lábiles y dependiendo de las condiciones ambientales a las que sea sometida la miel, pueden llegar a desaparecer (excesivo calentamiento o inadecuada conservación). Las mieles mantenidas durante algunos años a temperatura ambiente pierden su aroma natural y se vuelven muy semejantes entre sí por la presencia de productos de degradación, que son en su mayoría desagradables al paladar (Visquert, 2015; Silva et al., 2016).

### *Antioxidantes*

Los antioxidantes son compuestos o sistemas que pueden interactuar de forma segura con los radicales libres (Asimi, Sahu & Pal, 2013; Oroian & Escriche, 2015).

Los radicales libres poseen diferentes papeles en el organismo, de manera positiva se encuentran involucrados en la producción de energía, fagocitosis, regulación del crecimiento celular, señalización intercelular y síntesis de sustancias biológicas importantes (Shami & Moreira, 2004). Sin embargo, su exceso puede llegar a ser perjudicial produciendo daños en el ADN, proteínas y a nivel celular (mitocondrias, membranas, alteraciones estructurales, etc. Pueden estar involucrados en diversas patologías, como son cáncer, envejecimiento precoz, enfermedades cardiovasculares, degenerativas y neurológicas, choque hemorrágico, cataratas, disfunciones cognitivas, etc. Para combatir el exceso de estos radicales libres, los organismos vivos por un lado producen sustancias antioxidante capaces de regenerar o prevenir los daños oxidativos, y por otro las obtienen de fuentes externas (alimentos), tales como la miel (Silva, Borges & Ferreira, 1999; Alves, David, David, Bahia & Aguiar, 2010).

En los últimos años la miel ha sido descrita como una importante fuente de antioxidantes naturales, por ello su consumo está asociado a la reducción del riesgo de determinadas patologías: enfermedades cardíacas, cáncer, enfermedades del sistema inmunológico, entre otras (Ferreira et al., 2009). Los compuestos bioactivos con actividad antioxidantes son omnipresentes en todos los órganos de las plantas, son transferidos a la miel cuando las abejas recogen el néctar o los mielatos. Estos compuestos (Figura 1.9) incluyen sustancias enzimáticas (catalasa, glucosa oxidasa, peroxidasa) y no enzimáticas (ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol, carotenoides, aminoácidos, proteínas, productos de reacción de Maillard, flavonoides y ácidos fenólicos) (Gheldof et al., 2002; Al et al., 2009; Ferreira et al., 2009; Kadar, Juan-Borrás Carot, Domenech & Escriche, 2011). Entre los de naturaleza no enzimática destacan, los polifenoles especialmente los flavonoides (flavonas, flavonoles, flavanonas, antocianidinas, isoflavonas y chalconas) y los ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos y hidroxicinámicos), que en su conjunto constituyen un grupo importante por sus propiedades funcionales y su importancia terapéutica (Challacombe, Abdel-Aal, Seetharamana & Duizer, 2012). Los compuestos polifenólicos pueden ser desde simples con un anillo aromático de bajo peso molecular, hasta moléculas complejas y polifenoles derivados (Silici, Sagdic & Ekici, 2010; Crozier, Jaganath & Clifford, 2009; Oroian & Escriche, 2015; Silva et. al., 2016).



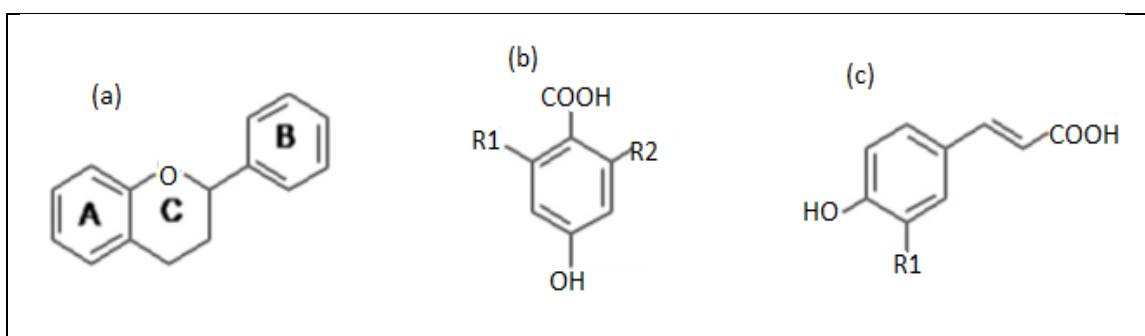
**Figura 1.9.** Clasificación de los antioxidantes de acuerdo a su naturaleza enzimática.

**Fuente:** Ribeiro, (2013)

La actividad antioxidante de los ácidos fenólicos y flavonoides, en la mayoría de los casos, depende del número y de la posición de los grupos hidroxilo, además, de otros sustituyentes, así como de la glicosilación de las moléculas. Los flavonoides tienen una estructura nuclear  $C_6-C_3-C_6$ , que implica dos anillos de benceno conectados por un anillo de pirano (Figura 1.10, imagen a). Las sustituciones en los anillos dan lugar a sus clases principales de flavonoides (Silva et al., 2016), en los que la presencia de ciertos grupos hidroxilo en estos anillos aumenta su actividad antioxidante. Los patrones de sustitución en el anillo A y el anillo B, el enlace 2,3-doble (insaturado) y el grupo 4-oxo en el anillo C, también afectan a la actividad antioxidante de estos compuestos (Figura 1.10 a); así, su glicosilación disminuye su actividad antioxidante cuando se compara con las correspondientes agliconas (Sghaier et al., 2011; Silva et al., 2016).

En el caso de ácidos fenólicos, los ácidos hidroxibenzoicos tienen una estructura general  $C_1-C_6$  derivada del ácido benzoico (Figura 1.10, imagen b). Se pueden encontrar variaciones en esta estructura en la metilación e hidroxilación del anillo aromático (Tsao, 2010; Silva et al., 2016), entre los que cabría mencionar el ácido hidroxibenzoico, vanílico, jerárquico, salicílico, gálico y elágico. Estos ácidos fenólicos pueden estar presentes

en su forma soluble en células, combinados con azúcares o ácidos orgánicos, o bien junto con células unidas con ligninas (Silva et al., 2016). De la misma manera, los ácidos hidroxicinámicos tienen una estructura general de C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (Figura 1.10, imagen c), que cuando presentan diferencias en los sustituyentes de los anillos dan lugar a diferentes compuestos tales como ácido cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico, entre otros. Éstos están presentes normalmente en su forma conjugada como ésteres de hidroxiácidos (Rice-Evans & Packer, 2003).



**Figura 1.10.** Estructura química general de: flavonoides (a), ácidos hidroxibenzoicos (b) y ácidos hidroxicinámicos(c).

Varios estudios han demostrado una fuerte correlación entre el contenido de compuestos fenólicos en mieles de diversas fuentes geográficas y botánicas, y sus capacidades antioxidantes y actividades antibacterianas (Gheldof, Wang & Engeseth, 2002; Meda, Lamien, Romito, Millogo, Nacoulma, 2005; Álvarez-Suárez et al., 2012; Escuredo, Silva, Valentao, Seijo & Andrade, 2012). Por ejemplo, la naringenina, el ácido cafeico, y la hesperidina se ha utilizado como marcadores para la miel de cítricos (Tomás-Barberán, Martos, Ferreres, Radovic & Anklam, 2001; Escriche et al., 2011); el kaempferol para la miel de romero; la quercetina para la miel de girasol (Tomás-Barberán et al., 2001); algunos ácidos fenólicos como el ácido elágico para la miel de brezo (Antony, Han, Rieck & Dawson, 2000), y los hidroxicinamatos (ácidos cafeico, p-cumárico y ferúlico) para la de castaño (Merken & Beecher, 2000).

### *Proteínas y aminoácidos*

La miel tiene un contenido en proteínas muy bajo, su principal fuente es el polen, y en menor medida los líquidos y secreciones del néctar, y además de las glándulas salivales y de la faringe de la especie de abeja productora (Escuredo et al., 2013). La miel de *Apis*

*cerana* contiene entre 0.1% y 3.3% de proteína, mientras que la miel de *Apis mellifera* contiene entre 0.2% y 1.6%.

Los aminoácidos libres están presentes en una cantidad aproximada de 100 mg/100 g de materia seca (Won, Li, Kim Rhee, 2009; Juan-Borrás, 2016). Se han detectado alrededor de 26 aminoácidos en la miel (Hermosín, Chicon & Cabezudo, 2003; Machado De-Melo et al., 2018), y su abundancia depende del origen de la miel, si es de néctar o mielada (Hermosín et al., 2003). Por otro lado, también dependen de las prácticas apícolas, así el mayor porcentaje se encuentra en las mieles de prensado, actualmente poco comunes, y por consiguientes ricas en sustancias nitrogenadas. Por el contrario, el contenido en nitrógeno (0.04% correspondiente a un 0.26% de proteína) de las mieles centrifugadas es menor (Visquert, 2015; Juan-Borrás, 2016). Entre los aminoácidos destaca la prolina (procedente de las abejas) que constituye entre el 50 y 85% de esta fracción aminoacídica (Iglesias et al., 2006; Juan-Borrás, 2016). Se ha utilizado como criterio para evaluar la maduración de la miel y, en algunos casos, la adulteración con azúcares. Se acepta un valor mínimo de 180 mg/kg de prolina (Manzanares, García, Galdón, Rodríguez & Romero, 2014; Hermosín et al., 2003). Además de la prolina, otros aminoácidos presentes en la miel incluyen el ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina, histidina, glicina, treonina,  $\beta$ -alanina, arginina,  $\alpha$ -alanina, ácido aminobutírico, tirosina, valina, metionina, cisteína, isoleucina, leucina, triptófano, fenilalanina, ornitina, lisina, serina y asparagina (Rebane & Herodes, 2010; Silva et al., 2016).

#### *Ácidos orgánicos*

La miel es un producto ácido, debido a la presencia tanto de ácidos orgánicos como de inorgánicos, oscilando su pH entre valores de 3.2 y 4.5 (Visquert, 2015). Este medio ácido ayuda a inhibir la presencia y crecimiento de microorganismos (Karabagias, Badeka, Kontakos, Karabournioti & Kontominas, 2014; Visquert, 2015; Juan-Borrás, 2016). Los ácidos orgánicos, que son los mayoritarios, derivan, tanto de los azúcares por la acción de las enzimas segregadas por las abejas, como del néctar (Silva et al., 2016). El ácido predominante en la miel es el ácido glucónico, y su origen es la glucosa-oxidasa, que las abejas melíferas segregan (Karabagias et al., 2014). Además de éste, el ácido cítrico también está presente en la miel, y la concentración de ambos, se utiliza como un parámetro para diferenciar la miel floral de la de mielada (Mato, Huidobro, Simal-Lozano & Sancho, 2006). También son de destacar los ácidos levulínico y fórmico derivados de las sucesivas reacciones del aldehído hidroximetilfurfural presente en la miel, que tras



enlazarse con dos moléculas de agua, producen una molécula de ácido levulínico y otra de fórmico, aumentando así la concentración de acidez libre en la miel (Cavia, Fernández-Muino, Alonso-Torre, Huidobro & Sancho, 2007). El origen de los demás ácidos es todavía incierto, aunque parece que algunos proceden del néctar o del mielato, mientras que otros se forman mediante procesos enzimáticos y fermentativos (Visquert, 2015).

Los ácidos intervienen en las propiedades organolépticas de la miel, ya que, ayudan a otorgarle aroma, si bien no llegan a ser apreciados al estar enmascarados por los azúcares. También están relacionados con el color, el sabor de la miel y con sus propiedades químicas: acidez, pH y conductividad eléctrica. Por ello, los ácidos orgánicos se usan para discriminar las mieles de acuerdo con su origen botánico y/o geográfico (Mato et al., 2006; Silva et al., 2016).

### *Vitaminas*

La miel contiene pequeñas cantidades de vitaminas, que provienen principalmente del polen de las flores visitadas por las abejas, así como del néctar o los mielatos (Sainz-Lain & Gómez-Ferreras, 2000; Machado De-Melo et al., 2018). Las vitaminas presentes en la miel se conservan debido a su bajo pH (Bonté & Desmoulière, 2013). El contenido de vitaminas hidrosolubles es mayor que el de liposolubles, ya que la miel difícilmente contiene sustancias lipídicas (Machado De-Melo et al., 2018). Entre las primeras se incluyen vitamina C, tiamina (B1), riboflavina (B2), ácido nicotínico (B3), ácido pantoténico (B5), piridoxina (B6), biotina (B8 o H) y ácido fólico (B9) (León-Ruiz, Vera, González-Porto & Andrés, 2013; Machado De-Melo et al., 2018). Entre las segundas se incluyen la vitamina A, D, E y K (Sainz-Lain & Gómez-Ferreras, 2000).

### *Enzimas*

Las enzimas presentes en la miel son las encargadas de transformar los azúcares del néctar o de los mielatos. Entre ellas destacan la diastasa, la invertasa ( $\alpha$ -glucosidasa), la glucosa oxidasa, fosfatasa ácida, y la catalasa (Sak-Bosnar & Sakač, 2012). Algunas de ellas son introducidas por las abejas procedentes de su tracto gastrointestinal y otras proceden del néctar o mielatos (Juan-Borrás, 2016).

Las diastasas ( $\alpha$ -amilasas), que proceden tanto de la abeja como del néctar, se sabe que son enzimas transformadoras de almidón. Al parecer, participan en la digestión del polen, y no está clara su función en el proceso de obtención de la miel, ya que el néctar

no contiene almidón (Juan-Borrás, 2016). Las invertasas ( $\alpha$ -glucosidasas), de origen animal, por su parte, son las encargadas de desdoblar la sacarosa en fructosa y glucosa. Por su parte las glucosa-oxidasas, de origen animal, actúan sobre la glucosa para producir ácido glucónico y peróxido de hidrogeno (Moreira, María, Pietroluongo & Trugo, 2007). Este último tiene un efecto antibacteriano (Juan-Borrás, 2016). La fosfatasa ácida, está presente principalmente en el polen, aunque también en el néctar. Está relacionada con la fermentación de la miel, de manera que aquellas que presentan mayores valores de su actividad, tendrán una mayor tendencia a fermentar. Cabe destacar que dicha actividad está fuertemente influenciada por el pH de la miel, por lo que, a mayores valores de pH, mayor es su actividad y mayor es el riesgo de fermentación (Sáenz & Gómez, 2000; Juan-Borrás, 2016).

### *Minerales*

Los minerales, en la naturaleza, se absorben en sus sales, se disuelven en el agua, se mueven de las raíces a la savia de la planta y luego se bombean al néctar o mielada, así como al polen (Machado De-Melo et al., 2018). En la miel los minerales son componentes minoritarios procedentes de las plantas de las que pecorean las abejas, y consecuentemente son característicos de los diferentes tipos de miel (Madejczyk & Baralkiewicz, 2008; Alqarni et al., 2012; Silva et al., 2016).

El contenido de minerales en la miel oscila entre 0.02 y 0.3% en mieles de flores, mientras que en miel de mielada puede alcanzar el 1% (Alqarni et al., 2012; Silva et al., 2016; Machado De-Melo et al., 2018). En general, las mieles oscuras, tales como las de mielada, contienen más minerales que las claras (Karabagias, Louppis, Kontakos, Papathephanou & Kontominas, 2017).

En las diferentes mieles se han encontrado minerales tales como potasio, magnesio, calcio, hierro, fósforo, sodio, manganeso, yodo, zinc, litio, cobalto, níquel, cadmio, cobre, bario, cromo, selenio, arsénico y plata (Belitz & Grosch, 1997; Madejczyk & Baralkiewicz, 2008; Silva et al., 2016). El potasio es el mineral más abundante en la miel, representando el 80% del total de estos, como resultado de su rápida secreción por las fuentes de néctar (Alqarni et al., 2012; Yücel & Sultanoglu, 2013; Machado De-Melo et al., 2018).

La miel ha sido considerada como un potencial indicador de contaminación ambiental, como resultado de un proceso de bioacumulación (Popa, Bostan & Popa, 2013).

Algunos metales pesados, como arsénico, plomo, mercurio y cadmio, son tóxicos si se excede un cierto límite. Por lo tanto, la cuantificación de estos elementos tóxicos en las mieles se vuelve importante por los posibles efectos que pueden presentar en la salud humana, así como el permitir indirectamente el biomonitorio ambiental (Ajtony, Bencs, Haraszi, Szigeti & Szoboszlai, 2007; Bilandzic et al., 2011).

### **1.2.3. Parámetros fisicoquímicos y de calidad de la miel**

La autenticidad de la miel mediante la identificación o diferenciación por su origen botánico y/o geográfico, ha sido estudiada por múltiples autores, utilizando diferentes métodos tales como: análisis polínico y análisis de componentes intrínsecos (volátiles, compuestos fenólicos, aminoácidos, carbohidratos, etc.), junto con otros parámetros como: la conductividad eléctrica, el color, la actividad enzimática, entre otros.

Los criterios de calidad para la miel están definidos por el Codex Alimentarius. (2001) (Tabla 1.1.). En el se establecen los requisitos esenciales de calidad que debe cumplir una miel destinada al consumo humano. Esta norma se aplica a la miel producida por las abejas abarcando todos los estilos de presentación de miel.

El Codex es un referente internacional que ha servido de base para elaborar normas más específicas a nivel de cada país (Oyarzun, Figueroa & Tartanac, 2005). Esta norma define, entre otras, las propiedades sensoriales y fisicoquímicas de la miel, y la cantidad mínima o máxima relacionada con los parámetros de madurez, pureza y deterioro de las mieles.

#### **1.2.1.1. Parámetros fisicoquímicos y de calidad legislados**

##### **Azúcares**

Tal y como se ha comentado, los azúcares son el constituyente mayoritario de la miel y a ellos se les atribuye gran parte de sus cualidades, como la viscosidad, propiedades térmicas, sabor, tendencia a la granulación, higroscopicidad, poder rotatorio, etc. (Kamal & Klein, 2011; Silva et al., 2016). Según las normas del Codex Alimentarius, (2001), la cantidad mínima de azúcares reductores debe ser de 60 g/100 g para la miel floral. Además, la cantidad de sacarosa es un parámetro muy importante para evaluar la madurez y/o adulteración de las mieles.

**Tabla 1.1.** Características composicionales y parámetros de calidad de miel.

Fuente: Codex Alimentarius, (2001)

<b>Contenido de azúcares</b>	
Contenido de fructosa y glucosa (suma de ambas)	
Miel de flores	≥60 g/100 g
Miel de mielada, mezclas de miel de mielada con miel de flores	≥ 45 g/100 g
Contenido de sacarosa	
En general	≤5 g/100 g
Falsa acacia ( <i>Robinia pseudoacacia</i> ), alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ), Banksia de Menzies ( <i>Banksia menziesii</i> ), Sulla ( <i>Hedysarum</i> ), Eucalipto rojo ( <i>Eucalyptus camaldulensis</i> ), <i>Eucryphia lucida</i> , <i>Eucryphia milliganii</i> , <i>Citrus</i> pp	≤10 g/100 g
Espliego « <i>Lavandula</i> spp.», borraja « <i>Borago officinalis</i> »	≤15 g/100 g
<b>Contenido de agua</b>	
En general	≤20%
Miel de brezo « <i>Calluna</i> » y miel para uso industrial en general	≤23%
Miel de brezo « <i>Calluna vulgaris</i> » para uso industrial	≤25%
<b>Contenido de sólidos insolubles en agua</b>	
En general	≤0.1 g/100 g
Miel prensada	≤0.5 g/100 g
<b>Conductividad eléctrica</b>	
Miel no incluida en la enumeración de los dos párrafos más abajo indicados, y mezclas de estas mieles	<0.800 mS/cm
Miel de mielada y miel de castaño, y mezclas de éstas, excepto con las mieles que se enumeran a cotinuación	≥0.800 mS/cm
Excepciones: madroño « <i>Arbutus unedo</i> », argaña « <i>Erica</i> », eucalipto, tilo « <i>Tilia</i> spp», brezo « <i>Calluna vulgaris</i> », manuka o jelly Bush « <i>Leptospermum</i> », árbol del té « <i>Melaleuca</i> spp.»	
<b>Ácidos libres</b>	
En general	≤50meq/kg
Miel para uso industrial	≤80meq/ kg
<b>Índice diastásico (escala de Schade)</b>	
En general, excepto miel para uso industrial	no menos de 8
Mieles con un bajo contenido natural de enzimas (por ejemplo, mieles de cítricos) y un contenido de HMF no superior a 15 mg/kg	no menos de 3
<b>HMF</b>	
En general, excepto miel para uso industrial	≤40 mg/kg
Miel de origen declarado procedente de regiones de clima tropical y mezclas de estas mieles	≤80 mg/kg.

Niveles altos de este azúcar pueden indicar: -adulteración/fraude (por adición de edulcorantes o jarabes), -cosecha temprana (ya que la sacarosa no se ha transformado completamente en glucosa y fructosa), -alimentación artificial (con jarabes de sacarosa) (Escuredo et al., 2013; Puscas, Hosu & Cimpoi, 2013; Tornuk et al., 2013; Silva et al., 2016; Escriche et al., 2017a). Por todo ello, el Codex Alimentarius, (2001) estipula un valor máximo de 5 g de sacarosa total en 100 g de miel.

#### *Humedad y Actividad de agua*

El contenido en agua de la miel es un factor determinante en su calidad, no solo porque influye en sus características organolépticas (viscosidad, condiciones de palatabilidad y sabor), sino, además por ser determinante en su vida útil (Sáenz & Gómez, 2000; Bogdanov, 2002; Bogdanov et al., 2004). La miel por ser higroscópica, absorbe la humedad del ambiente, por lo tanto, las condiciones de almacenamiento, así como las operaciones de procesamiento del producto deben ser adecuadas para evitar este problema (Karabagias, Badeka, Kontakos, Karabournioti & Kontominas, 2014). Las mieles con un contenido de humedad alto (20-23%) pueden favorecer el crecimiento de levaduras osmófilas, mientras que las mieles con un porcentaje de humedad inferior al 14% son excesivamente viscosas y difíciles de extraer y manipular (Estupiñán, Sanjuán, Millán, González-Cortés, 1998; Visquert, 2015). El Comité del Codex Alimentarius, (2001) ha estipulado que el contenido de humedad en la miel no debe exceder de 20 g/100 g.

La miel generalmente tiene una  $a_w$  entre 0.500 y 0.650, valores de  $a_w$  por encima de 0.600 representan un umbral crítico para la estabilidad microbiana (Acquarone, 2004), siendo este valor considerado por algunos autores como límite para una miel de buena calidad (Belitz & Grosch, 1997). El valor de  $a_w$  (agua disponible para el desarrollo de microorganismo) es muy importante, aunque no existen límites impuestos por las normas, ya que valores altos, facilitan la fermentación por la presencia de levaduras osmófilas. Esto da lugar a la formación de alcohol etílico y dióxido de carbono, lo que va en detrimento de su calidad (Zamora & Chirife, 2006; Escuredo et al., 2013; Tornuk et al., 2013; Yücel & Sultanoglu, 2013).

Cuando se produce la cristalización de la miel (de la glucosa), en ocasiones la parte superior puede contener una alta  $a_w$ , facilitando así el peligro de fermentación. Para que se produzca este hecho es necesario un contenido de 100 levaduras/g miel, así como un

contenido en humedad superior a 20% y una temperatura ambiente de unos 25 °C (Díaz-Moreno, 2009).

#### *Conductividad eléctrica*

La conductividad eléctrica representa la capacidad de un material para conducir una corriente eléctrica. La de la miel está relacionada con su contenido en cenizas (contenido mineral) y acidez, que revelan la presencia de iones, ácidos orgánicos, proteínas y otros componentes como polioles y granos de polen, que pueden actuar como electrolitos (Machado De-Melo et al., 2018; Yücel & Sultanoglu, 2013). Por lo tanto, cuanto mayor sea su contenido, mayor será la conductividad resultante. La conductividad eléctrica es un parámetro de calidad de gran utilidad, ya que permite distinguir perfectamente la miel de mielada de la de néctar (Karabagias et al., 2014; Persano-Oddo & Piro, 2004), siendo mayor en las primeras (De lorenzo & Guadalix, 2002). Las normas del Codex Alimentarius, (2001), establece que una miel solo se puede considerar de mielada si el valor de este parámetro es superior a 0.800 mS/cm (Bogdanov et al., 2004; Kaskoniene et al., 2010; Machado De-Melo et al., 2018). La conductividad eléctrica está directamente relacionada con el contenido de cenizas, por este motivo recientemente el Codex Alimentarius sustituyó ésta última determinación por la de conductividad eléctrica. Por otro lado, el contenido de ciertos minerales en la miel, puede ser indicativo de contaminación ambiental y origen geográfico, ya que depende del suelo utilizado y de la flora de las cual se recolectó el néctar (Suárez-Luque, Mato, Huidobro & Simal-Lozano, 2005; Karabagias et al., 2014).

Cabe señalar que la conductividad está relacionada con el color de la miel y ambos parámetros dependen del contenido mineral. Cuanto más oscura es una miel (suelen ser de sabor más intenso) mayor es el contenido mineral y la conductividad (Escuredo et al., 2013; Visquert et al., 2014; Juan-Borrás et al., 2014; Karabagias et al., 2014; Escriche et al., 2017a).

#### *pH, acidez libre, lactónica y total*

La acidez de la miel contribuye en gran medida a su flavor característico y puede ser responsable de sus propiedades antisépticas y estabilidad contra el desarrollo microbiano (García, 2003). En la miel se pueden distinguir tres tipos de acidez: libre, lactónica y total, siendo esta última la suma de las otras dos (Visquert, 2015). La miel contiene

ácidos orgánicos libres y lactonas, que originan los ácidos correspondientes cuando la miel se alcaliniza, constituyendo una reserva potencial de acidez.

La acidez libre es un parámetro importante relacionado con el deterioro de la miel. Se caracteriza por la presencia de ácidos orgánicos en equilibrio con lactonas, ésteres internos y algunos iones inorgánicos tales como fosfatos, sulfatos y cloruros (Moreira, María, Pietroluongo & Trugo, 2007; Silva et al., 2016). El Codex Alimentarius, (2001) permite un valor máximo de 50 meq/kg para la acidez libre. Valores más altos pueden ser indicativos de la fermentación de azúcares en ácidos orgánicos. Aunque, la presencia de otros ácidos orgánicos, origen geográfico y época de cosecha puede afectar también a la acidez de las mieles (Codex Alimentarius, 2001; Tornuk et al., 2013; Silva et al., 2016). Si bien, el límite de pH aún no ha sido regulado, un nivel de pH entre 3.2 y 4.5, inhiben el crecimiento de microorganismos (Suárez-Luque, Mato, Huidobro, Simal-Lozano & Sancho, 2002; Karabagias et al., 2014).

#### *Actividad diastásica*

Las mieles frescas no procesadas de diferentes procedencias florales pueden presentar grandes variaciones en su actividad diastásica. Esta variación es debida a las diferencias de pH entre mieles, a la cantidad, forma y período de recolección del néctar que procesan las abejas pecoreadoras, así como al estado fisiológico de la colonia (Juan-Borrás, 2016). De manera general las enzimas son sensibles al calor, y al almacenamiento prolongado. La enzima diastasa juega un papel muy importante en la calidad de la miel, al ser usada como indicadora de la pérdida de frescura, tanto por envejecimiento como por un excesivo calentamiento durante su procesado (Bogdanov, 2011). En este sentido, la legislación señala un mínimo de 8 ID (índice diastásico según la escala Schade), para la actividad diastásica, excepto para aquellas mieles con bajo contenido enzimático, que pueden tener un valor mínimo de 3 ID, siempre que el valor de hidroximetilfurfural no sea superior a 15 mg/kg (Codex Alimentarius, 2001).

#### *Hidroximetilfurfural (5-HMF)*

El 5-HMF ( $C_6H_6O_3$ ) es un aldehído cíclico que se forma en la miel por la deshidratación espontánea, en un medio ácido, de los azúcares, especialmente de la fructosa y glucosa. Una miel recién extraída con buenas prácticas de manipulación contiene pequeños porcentajes de este aldehído (0 a 7 mg/kg). Sin embargo, su concentración aumenta significativamente con el almacenamiento prolongado (o condiciones inadecuadas), y/o

por tratamiento térmico excesivo, siendo este hecho más pronunciado cuanto más ácida es la miel (Sancho, Muniategui, Huidobro & Simal Lozano, 1992; Castro-Vázquez et al., 2007; Wang, Juliani, Simon & Ho, 2009; Barra, Ponce-Díaz & Venegas-Gallegos, 2010; Silva et al., 2016). La Figura 1.11, ilustra la vía principal para la formación de 5-HMF en alimentos. La reacción implica la formación de un catión altamente reactivo, el fructofuranosilo, que puede convertirse rápidamente en 5-HMF a pH bajos ( $\text{pH} < 5$ ), como en el caso de la miel (Capuano & Fogliano, 2011). Por este motivo, para garantizar que la miel llegue al consumidor lo más fresca posible y sin alteración de sus características intrínsecas, la legislación establece que los valores de este parámetro no deben ser superior a 40 mg/kg, y un máximo de 80 mg/kg para la miel de regiones de clima tropical y sus mezclas (Codex Alimentarius, 2001).

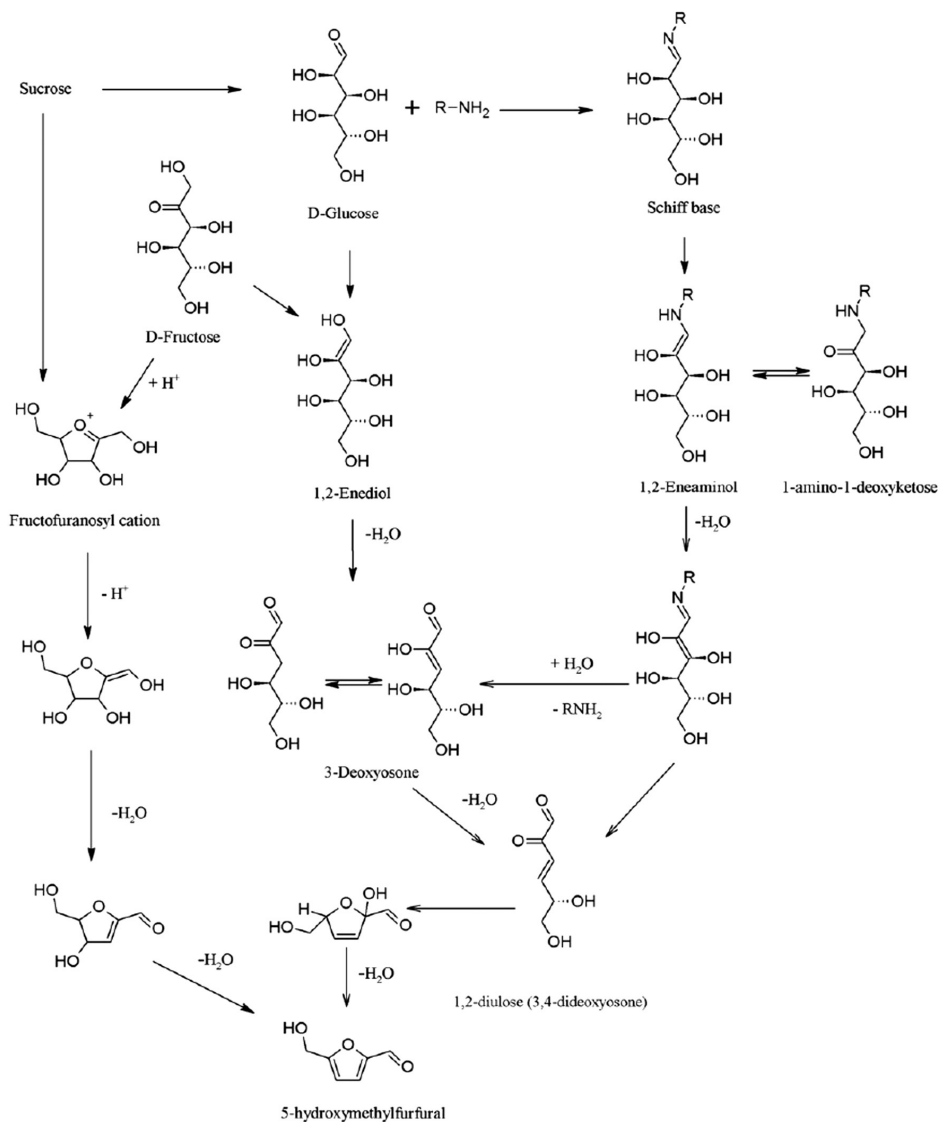


Figura 1.11. Formación de 5-hidroximetilfurfural.

Fuente: Silva et al., (2016)



### **1.2.3.1. Parámetros de calidad comerciales**

#### *Color*

El color de la miel es uno de los parámetros de calidad importante para el consumidor, a la hora de su adquisición. En muchos países, el precio de la miel está relacionado con su color. Las mieles de colores claros son más apreciadas en determinadas regiones (Comunidad Valenciana), mientras que en otras son más valoradas las oscuras (norte de España) (Tuberoso et al., 2014), lo que demuestra que la aceptación general del color de las mieles por los consumidores puede variar ampliamente (Gámbaro, Ares, Giménez & Pahor, 2007; Silva et al., 2016). El color es un criterio muy útil para la clasificación de mieles monoflorales, variando desde blanco agua, a través de tonos ámbar, hasta casi negro. Algunas mieles presentan tonalidades típicas, como son el color amarillo brillante (miel de girasol), verdoso (miel de tomillo) o rojizo (miel de brezo), etc. (Boussaid et al., 2018).

El color de la miel depende de muchos factores como pueden ser el origen floral y la composición fisicoquímica, las características climatológicas y ambientales, la presencia de compuestos pigmentarios, el estado de maduración, la presencia de impurezas, de su contenido de cenizas, la temperatura en la colmena y el tiempo de almacenamiento (Gámbaro, Ares, Giménez & Pahor, 2007; Silva et al., 2016).

#### *Cristalización*

La cristalización de la miel es un fenómeno natural de gran importancia para el sector de envasado de miel, por un lado, porque dificulta su manejo industrial, y por otro puede ser motivo de rechazo por parte del consumidor, ya que ven la cristalización como una consecuencia de la adulteración (Kabbani, Sepulcre & Wedekind, 2011; Machado De-Melo et al., 2018). Por el contrario, cierto tipo de miel cristalizada (controlada) es deseable para algunos fines, tales como la comercialización de miel cremosa. La cristalización afecta en gran medida al color y la textura de la miel, dejando prácticamente inalterados el resto de propiedades de calidad de la miel líquida. En principio, la miel cristalizada no se puede considerar un producto deteriorado, pero puede llegar a provocar fermentación por el aumento del contenido de humedad y  $a_w$  superior (líquida) (Kolayli, Boukraa, Ahin & Abdellah, 2012; Machado De-Melo et al., 2018).

La cristalización de miel depende de factores como temperatura, viscosidad, contenido de agua, azúcares (principalmente contenido de glucosa y fructosa), y la presencia

de partículas que podrían actuar como núcleos de cristalización (proteínas y otros coloides, granos de polen, polvo y otras partículas suspendidas, levadura, cera, propóleos o burbujas de aire, entre otros) (Crane, 1980; Sancho et al., 1991; Estupiñan et al., 1998; Bhandari, D'Arcy & Kelly, 1999). La proporción media de fructosa y glucosa es de 1.2:1, pero depende en gran medida de la fuente del néctar del que se extrajo la miel. Esta se utiliza para evaluar la futura cristalización de una miel, debido a la menor solubilidad de la glucosa en agua en comparación con la fructosa (Fuente, Ruiz-Matute, Valencia-Barrera, Sanz & Castro, 2011; Tornuk et al., 2013; Escuredo et al., 2014). White, Riethof, Subers & Kushnir, (1962), demostraron que la concentración de glucosa y el contenido de humedad de una miel (G/H) ayudan a predecir la tendencia de una miel a la cristalización. Así, para valores de esta relación inferiores a 1.60 la capacidad de cristalización de una miel es prácticamente nula o muy lenta, en cambio para valores superiores a 2 es más rápida y completa. (Visquert, 2015; Juan-Borrás, 2016).

El proceso de cristalización puede ser retrasado, con un apropiado almacenamiento, manteniendo la miel a una temperatura de almacenaje controlada. Temperaturas por debajo de 10 °C y entre 21 y 27 °C previenen la cristalización mientras que temperaturas entre 10 y 21 °C generalmente la promueven. El tratamiento de pasteurización que se aplica en la industria (aprox. 75 °C, durante varios minutos) tiene por objeto retrasar la cristalización, eliminando núcleos de cristalización (cristales) (Visquert, 2015; Machado De-Melo et al., 2018).

#### *Propiedades reológicas*

La viscosidad es una propiedad importante para el manejo y el procesado ya que afecta a las operaciones tecnológicas en la industria (Anupama, Bhat & Sapna, 2003; Oroian, Ropciuc, Paduret & Todosi, 2018), ya que cuanto más viscosa es más difícil es su homogeneización. Además, influye en la aceptación de los consumidores, por contribuir decisivamente en su percepción organoléptica (Escriche et al., 2017a).

En general las propiedades reológicas de la miel, depende de varios factores como: temperatura, contenido de humedad, origen botánico y composición química (como por ejemplo la relación fructosa/glucosa, F/G) (Ahmed, Prabhu, Raghavan & Ngadi, 2007; Oroian, Amariei, Escriche & Gutt, 2013; Oroian et al., 2014; Oroian, 2015). Esta disminuye con el aumento de la temperatura, el contenido de agua, y el menor contenido de polisacáridos (Machado De-Melo et al., 2018). Además, algunos compuestos de miel

como azúcares, proteínas y otras sustancias coloidales tienden a aumentar la viscosidad de la miel (Rybak-Chmielewska & Szczêsna, 2004; Ren, Bian, Lin, Bai & Wang, 2010; Sodre, Marchini, Moreti, Otsuk & Carvalho, 2011).

La granulación de una miel da como resultado un aumento espectacular de la viscosidad de un factor de 10 (Bogdanov, 2011). La viscosidad y la tensión superficial son responsables de las características espumosas de la miel (Manzoor, Mathivanan, Shah, Mir & Selvisabhanayakam, 2013; Machado De-Melo et al., 2018;). La viscosidad también tiene una relación con la fluidez de las partículas.

De acuerdo con su viscosidad, la gran mayoría de las mieles se pueden describir como fluidos newtonianos. Este es el caso de mieles de algunos países africanos como Mozambique (Escriche et al., 2017), Etiopía (Belay, Haki, Birringer, Borck, Addi, Baye, & Melaku, 2017) y Burkina Faso (Escriche et al., 2016); países europeos como España (Oroian et al., 2013), Rumania (Oroian, 2012) y Polonia (Juszczak & Fortuna, 2006) y países de Medio Oriente como Israel (Cohen & Weihs, 2010) y Turquía (Karaman, Yilmaz & Kayacier, 2011). Sin embargo, ciertos tipos de mieles presentan un comportamiento no newtoniano, debido a la presencia de compuestos de alto peso molecular. La miel de *Piptadenia moniliformis* tiene un comportamiento de fluido pseudoplástico (Stelmakienė, Ramanauskienė, Briedis & Leskauskaitė, 2012), varias mieles de eucalipto y miel de *Opuntia engelmanni* de Nigeria presentan un comportamiento de dilatación y efecto Weissenberg principalmente debido a la presencia de dextranos de alto peso molecular (Yanniotis, Skaltsi & Karaburnioti, 2006; Juszczak & Fortuna, 2006). Por otra parte las mieles de manuka (*Leptospermum* sp.), trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*), trébol blanco (*Trifolium repens*) y Karvi indio (*Carvia callosa*) exhiben un comportamiento tixotrópico debido a su alto contenido en proteínas (Witczak, Juszczak & Gałkowska, 2011; Stelmakienė, Ramanauskienė, Briedis & Leskauskaitė, 2012). La tixotropía confiere a las mieles una estructura similar a un gel, lo que dificulta su extracción de los panales y su manipulación. Esta consistencia gelatinosa se puede convertir en líquido, mediante agitación o mediante la aplicación de energía mecánica (Bogdanov, 2011; Witczak et al., 2011).

#### **1.2.4. Propiedades beneficiosas de la miel**

La miel tiene una buena reputación desde tiempos ancestrales, como alimento sano, por ello se ha utilizado a lo largo de la historia, en muchas civilizaciones y culturas antiguas, con fines alimentarios y medicinales (Bayram & Demir, 2018). Hay quien afirma que la palabra "medicina" proviene de "mead" (vino de miel). Y quienes optan encontrar su origen en el latín "medicus"; otros hacen referencia al griego (Bradbear, 2005). Esta acepción probablemente se asocia a sus propiedades medicinales. Tal como se ha comentado anteriormente la miel es un alimento natural, compuesto principalmente de azúcares y otros componentes tales como enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, carotenoides, vitaminas, minerales y sustancias aromáticas. Además, es rica en polifenoles principalmente flavonoides y ácidos fenólicos que exhiben una amplia gama de efectos biológicos y actúan como antioxidantes naturales (Alqarni et al., 2012; Silva et al., 2016).

La miel ocupa un lugar importante en la preparación de alimentos tradicionales. Es usada ampliamente como fuente de azúcares para producir vino y cerveza de miel. (Bradbear, 2005). Tiene también un alto valor cultural: consumir miel o usarla para ungüentos forma parte de muchas ceremonias tradicionales, nacimientos, casamientos, funerales, etc. Esta conexión cultural es evidente en la "luna de miel". En las tribus africanas Masai, la miel es usada para pagar el valor de la esposa. En Etiopía el vino de miel es ofrecido en los matrimonios (Bradbear, 2005).

Las numerosas propiedades organolépticas, químicas y bioactivas encontradas en la miel, la convierten en un producto complementario de la alimentación humana, apreciada en todas partes como un alimento dulce y apetitoso. La aportación energética (320 kcal/100 g), con azúcares de asimilación directa, la hacen muy indicada en la práctica de deportes o de ejercicio físico, ya que mejora la resistencia física y favorece la recuperación (Beltz & Grosch, 2007). Es una fuente útil de carbohidratos que contiene oligoelementos y agrega una diversidad nutritiva en un régimen alimenticio demasiado pobre. Así mismo, se han reportado también efectos beneficiosos sobre el sistema circulatorio, el hígado, los intestinos (laxante), los riñones y las vías urinarias (diurética) (Beltz & Grosch, 2007; Oroian & Escriche, 2015; Oryan, Alemzadeh & Moshiri, 2016).

La miel y sus derivados han sido utilizados por las civilizaciones como medicinas de manera cotidiana. En los países asiáticos y del este europeo tradicionalmente la apiterapia es muy valorada (propiedades curativas de los productos derivados de las abejas).

En la actualidad el interés por este producto ha vuelto a ponerse de moda. La miel posee propiedades antibióticas: es una solución estéril con altas concentraciones de azúcar que previene el desarrollo de microorganismos. Es altamente ácida (pH entre 3.2 y 4.5) y contiene enzimas que producen peróxido de hidrógeno que eliminan bacterias. Es un producto utilizado en la cura de heridas y en tratamientos de la piel: sus propiedades higroscópicas ayudan a secar las heridas, y su permeabilidad permite que el oxígeno la atraviese. Asimismo, es un agente natural rentable y seguro con una rápida capacidad de curación de heridas diabéticas (Alam, Islam, Gan & Khalil, 2014; Mohamed et al., 2015). Se han realizado numerosos estudios para investigar la composición de la miel y sus efectos beneficiosos, especialmente en la práctica médica (Bayram & Demir, 2018). De hecho, en la actualidad existen hospitales como el de Limoges, en Francia, en el que se utiliza la miel para la curación de heridas quirúrgicas y quemaduras, de forma sistemática y protocolizada (Visquert, 2015). La miel también puede actuar como expectorante y calmante de la tos, ayudando a combatir infecciones, promoviendo la regeneración de las mucosas y mejorando el estado anímico general (Calatayud, 2002). Estas propiedades se deben fundamentalmente a la presencia de componentes volátiles (especialmente terpenos), azúcares y a su poder antiséptico. Actualmente, entre sus propiedades más destacadas cabe subrayar su poder como fuente de antioxidantes naturales, una de las principales razones por las que su consumo es recomendado (Escriche Kadar, Juan-Borrás & Domech, 2014; Oroian & Escriche, 2015).

### **1.3. La cera de abeja**

#### **1.3.1. Formación**

La cera es la sustancia que las abejas usan para construir el panal. Es producida por las abejas melíferas jóvenes que la segregan líquida a través de sus glándulas cereras. Al contacto con el aire, la cera se endurece y forma pequeñas escamillas de cera en la parte inferior de la abeja. Estas escamas son moldeadas por sus mandíbulas, que con la ayuda del primer par de patas. Sirven para construir los alvéolos hexagonales de sus panales (Bradbear, 2005). Estos sirven para que la reina deposite en ellas sus huevos y las nuevas abejas se críen en su interior, así como, para conservar la miel y el polen (Visquert, 2015). Las ceras producidas por diferentes especies de abejas tienen ciertas diferencias en sus propiedades químicas y físicas (Bradbear, 2005).

### 1.3.2. Composición

La cera de abejas está constituida por más de 300 componentes (Bogdanov, 2004; Tulloch, 1980). Consiste principalmente en ésteres de ácidos grasos superiores (67%) hidrocarburos de cadena lineal C<sub>20</sub>-C<sub>33</sub> (12-16%); ácidos grasos libres C<sub>24</sub>-C<sub>32</sub> (12-14%), la mayoría saturados (aproximadamente 85%); alcoholes grasos libres (aproximadamente 1%) de C<sub>28</sub>-C<sub>35</sub>; lactonas (0.6%); pigmentos (0.4%) e impurezas minerales (2%) (Tabla 1.2). Aproximadamente 50 componentes volátiles han sido identificados en la cera (Bogdanov, 2016). Su composición es bastante compleja, ya que contiene un conjunto de sustancias heterogéneas pertenecientes al grupo de las grasas, resultante de la esterificación de diversos alcoholes por los ácidos grasos correspondientes, con una gran estabilidad química. Sus ésteres contienen ácido hidroxipalmítico o dioles, que a través del grupo hidroxilo se enlazan a otra molécula de ácido graso (Tulloch, 1980; Bogdanov, 2016; Kutnesof & Whitehouse, 2005; Benedetti & Pieralli, 1990; Serra Bonvehí & Orantes Bermejo, 2012).

**Tabla 1.2.** Principales componentes orgánicos de la cera pura de abeja.

**Fuente:** European pharmacopoeia, (2008)

Compuestos	Valor (g/100 g)
Monoésteres	35
Diésteres	14
Triésteres	3
Hidroxi monoésteres	4
Hidroxi poliésteres	8
Ácidos ésteres	1
Poliésteres ácidos	2
Hidrocarburos	14
Ácidos libres	12
Alcoholes	1
Otros	6

En general la cera producida por diferentes razas tiene una composición semejante, aunque sus componentes están en diferentes proporciones (Brand-Garnys & Sprenger, 1988; Beverly, Kay & Voorhees, 1995; Bogdanov, 2009b). La cera de abejas se puede clasificar generalmente en tipos europeos, africanos, y asiáticos. La composición de esta última es mucho más simple y contiene menos compuestos y en diferentes proporciones,

especialmente tiene un mayor porcentaje de monoésteres (>60%) (Tulloch, 1980; Serra Bonvehí & Orantes Bermejo, 2012). La cera africana se compone principalmente de hidrocarburos (15-18%), monoésteres (45-55%), ácidos grasos libres (15-18%), alcohol graso libre (1-2%) y componentes menores (5-10%) (Koster Keunen, 2010; Serra Bonvehí & Orantes Bermejo, 2012). Beverly et al., (1995) en un trabajo donde estudiaron ceras africanizadas híbridas y europeas encontraron diferencias en las intensidades relativas de varios compuestos; sin embargo, no detectaron biomoléculas distintivas de las ceras estudiadas.

### **1.3.3. Propiedades físicas**

La cera a temperatura ambiente se organiza principalmente siguiendo una estructura ortorrómbica (principalmente alcanos y ésteres), aunque una pequeña cantidad está constituida por una monoclinica (ácidos y alcoholes libres) (Kameda & Tamada, 2009). El proceso de cristalización de la cera aumenta con el tiempo de almacenamiento hasta unos 4 meses, aumentando también su rigidez y elasticidad. Sus propiedades mecánicas son importantes en relación con su uso como "la casa de las abejas". La dureza de la cera de abejas es un factor de calidad importante: cuanto más dura mejor es su calidad (Bogdanov, 2016).

La cera es un material inerte de alta plasticidad a una temperatura relativamente baja (alrededor de 32 °C). Por el contrario, a esta temperatura la mayoría de las ceras de otros orígenes (carnauba, etc.) son mucho más duras y de estructura cristalina. Al calentarla cambian las propiedades físicas: a 30-35 °C se vuelve plástica, a 46-47 °C se destruye la estructura de su cuerpo duro y entre 60 y 70 °C comienza a derretirse. Calentar a 95-105 °C conduce a la formación de espuma superficial, mientras que a 140 °C las fracciones volátiles comienzan a evaporarse. El calentamiento a 120 °C durante al menos 30 minutos provoca un aumento de la dureza debido a la eliminación del agua restante (Kameda & Tamada, 2009; Bogdanov, 2016). Después de enfriarse la cera se contrae en aproximadamente un 10%.

La cera de abejas es insoluble en agua y soluble en la mayoría de los solventes orgánicos tales como acetona, éter, benceno, xilol, tolueno, cloroformo, tetraclorometano, etc., además es resistente a muchos ácidos. Sin embargo, a temperatura ambiente, no se disuelve por completo en ninguno de los disolventes, pero al calentarla por encima del punto de fusión es fácilmente soluble (Tulloch, 1980; Bogdanov, 2009b).

#### **1.3.4. Parámetros de calidad**

La calidad de la cera de abejas es un factor importante en apicultura, no solo para preservar las propiedades naturales de los productos apícolas que contienen, sino también para evitar el rechazo de cera reciclada por parte de las abejas. La cera en su origen es de color blanco, posteriormente va cambiando de tonalidad volviéndose más oscura debido al contenido de polen y a la acumulación de restos de mudas de larvas de la cámara de cría (Serra Bonvehí & Orantes Bermejo, 2012). La pureza y color de la cera son parámetros importantes relacionados con su calidad, la oscura tiene menor valor que la de color claro, siendo la más fina la que se extrae de la fundición de la cera de los opérculos (Bradbear, 2005).

La cera de abejas presenta unas características fisicoquímicas determinadas, que pueden ser útiles para su diferenciación. La Farmacopea y la International Honey Commission (IHC) han propuesto criterios de calidad para la cera de abejas (pruebas rutinarias). El número de ácidos debe estar entre 17-24 mg KOH/g; el punto de fusión entre 61-65 °C; un máximo de hidrocarburos totales de 14.5% (cera de abejas africanas y africanizadas: máximo 13.8%), el número de saponificación entre 87-102 mg de KOH/g y la densidad debe estar entre 0.950-0.965 g/mL (Tabla 1.3) (Bogdanov & Gallmann, 2008; Serra Bonvehí & Orantes Bermejo, 2012; Bogdanov, 2016).

Actualmente, para una buena caracterización y determinación de la calidad de cera de abejas se usa técnicas tales como la cromatografía de gases a altas temperaturas con detección de ionización de llama (HT-GC/FID), que permiten su caracterización química (Giumanini, Verardo, Strazzolini & Hepburn, 1995; Jiménez, Bernal, Del Nozal, Martín & Bernal, 2006; Serra Bonvehí & Orantes Bermejo, 2012).

El análisis de hidrocarburos es útil para la caracterización química de la cera ya que permite fácilmente diferenciar entre la cera de buena y baja calidad o adulterada. Estudios sobre la composición de los hidrocarburos de cera de abeja pura realizados en los últimos años revelan la predominancia de hidrocarburos con número impar de carbono, con altas proporciones de  $C_{27}H_{56}$ ,  $C_{29}H_{60}$ ,  $C_{31}H_{64}$  y  $C_{25}H_{52}$ . Por el contrario, las ceras adulteradas suelen tener concentraciones relativamente mayores de hidrocarburos con números pares de carbonos (Serra Bonvehí & Orantes Bermejo 2012). Por ello, algunos autores han sugerido que la relación entre sumatorio de los carbonos de números pares e impares ( $\sum \text{pares} / \sum \text{impares}$ ) puede ser un índice para diferenciar la cera pura de la adulterada “carbon



preference index” (CPI). Estos autores consideraron que la cera pura de abeja debía tener un CPI comprendido entre 0.02-0.09 (Jimenez et al., 2009; Serra Bonvehí & Orantes Bermejo, 2012; Waś, Szczęśna & Rybak-Chmielewska, 2014a).

**Tabla 1.3.** Rango de variabilidad de algunos de los de los parámetros fisicoquímicos e índices de calidad de la cera pura de abeja.

Fuente: British Pharmacopeia, (1993)

Parámetros fisicoquímicos	Valores
Punto de fusión	61-65 °C
Densidad	0.950-0.965 g/mL
Índice de refracción (a 75 °C)	1.440-1.445
Índice de saponificación	87-102 mg KOH/g
Índice de acidez	17-22 mg KOH/g
Relación éster/ácidos	3.3-4.3
Contenido de agua	>1 g/100 g

En este sentido, diversos estudios han analizado ceras con esta metodología para evaluar la calidad de las mismas (Aichholz & Lorbeer, 1999, 2000; Jimenez et al., 2004; Serra Bonvehí & Orantes Bermejo, 2012; Maia & Nunes, 2013; Waś et al., 2014 a; Waś et al., 2014 b).

Entre las técnicas actuales para análisis de propiedades térmicas, que puede ser útil para distinguir ceras distintas calidades, destaca la calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Buchwald, Breed & Greenberg, 2008). Se trata de una técnica de análisis térmico que permite la caracterización cuantitativa de las transiciones polimórficas. El DSC permite la determinación del rango de temperaturas sobre el que se produce la fusión, así como la cantidad de energía asociada con la transición de fusión, es decir, el calor de fusión (Turi, 1997; Aboul-Gheit, Abd-el-Moghny & Al-Eseimi, 1997; Buchwald et al., 2008). El punto de fusión de la cera de abejas no es constante ya que la composición varía ligeramente con su origen, varias farmacopeas dan un rango de 61-66 °C o más comúnmente 62-65 °C. (FAO, 1992; British Pharmacopeia, 1993; Unites States Code of Federal Regulations, 2004).

### **1.3.5. Uso de la cera de abeja**

La cera de abeja tiene una excelente demanda en el mercado mundial. Las industrias de cosméticos y farmacéuticas son los principales consumidores, representando el 70% de este mercado. Principalmente se utiliza en la fabricación de velas, moldes de cirugía dental, como ingrediente o soporte en productos específicos para la industria cosmética y farmacéutica, en fabricación de pinturas, productos de limpieza, etc. (Bogdanov, 2009b). La cera de abeja tiene otros muchos usos tradicionales como es el caso de fabricación de pequeños adornos de metal, fabricación de velas y la creación de tejidos de *batik* (práctica predominante en algunos países de Asia y África) por medio del método de la cera fundida, (Bradbear, 2005). Es ampliamente utilizada como agente impermeabilizante para la madera y el cuero y para el refuerzo de hilos, y también como ingrediente para ungüentos medicinas, jabones y betunes. Se usa también en la manufactura de componentes electrónicos y discos compactos, en el modelado y en el mercado de la industria y del arte, en betunes para calzado, muebles y ceras de injerto para pisos y en las fábricas de lubricantes (Bradbear, 2005; Bogdanov & Gallmann, 2008).

Otro de los sectores consumidores más importantes son la industria del sector apícola. Los apicultores, con el objetivo de facilitar la tarea de construcción de nuevos panales a las abejas, proveen a estas con láminas de cera prensada, fijándolas e introduciéndolas en los cuadros del interior de la colmena. La mayoría de los apicultores entregan sus panales viejos a los fabricantes de cera, para que produzcan bloques de fundición y a partir de ahí producir las láminas estampadas que serán las que se vuelvan a introducir en la colmena (Bogdanov, 2009b; Waś et al., 2014a). Actualmente se ha reportado la contaminación por acaricidas de una parte importante de la cera de abejas comercial, es por ello que cada día más existe una mayor necesidad en el mercado de cera de abejas ecológica libre de residuos (Schroeder & Wallner, 2003; Bogdanov, 2016). La cera de abejas africanas (como es el caso de Mozambique), al estar libre de acaricidas por ser tolerantes al acaro varroa, es un buen candidato para el futuro cercano. En general, la cera de abejas utilizada en la apicultura europea es casera, mientras que la cera utilizada en la farmacia y en otros campos es en su mayoría importada, siendo China el principal importador (Bogdanov & Gallmann, 2008).

#### **1.4. Otros Productos Apícolas**

Además de la miel y la cera, de la colmena se obtienen otros productos muy apreciados en la actualidad por sus características nutricionales, farmacológicas y cosméticas. Entre ellos tenemos: la jalea real, el polen, el propóleo y el veneno.

##### **1.4.1. La jalea real**

Se trata de una sustancia fluida, con apariencia similar a la leche condensada, de color blanquecino y sabor ácido. Es secretada por las glándulas hipofaríngeas y mandibulares de las abejas obreras jóvenes cuando tienen entre los 5 y 14 días de edad. La jalea real es el alimento que las obreras dan a las larvas durante sus dos primeros días de vida. Posteriormente consumen miel, polen y agua. Por el contrario las reinas reciben jalea real durante toda su vida (Bradbear, 2005; Visquert, 2015). Como consecuencia de esta diferencia en la alimentación, las abejas reinas son las únicas que viven alrededor de 4 años, son fértiles y además tienen un tamaño mucho mayor que las obreras (Visquert, 2015).

La jalea real contiene las hormonas para el crecimiento de la reina y es de gran valor como medicina, tónico o afrodisíaco en muchas partes del mundo. Está compuesta por muchos elementos, incluyendo agua (60-70%), proteínas (12-15%), azúcares (10-16%), grasas (3-6%), y en proporciones menor minerales y vitaminas (Bradbear, 2005; Moriyama, Ito, Omote, Miura, Tsumoto, 2015). La jalea real se caracteriza principalmente por su contenido en los ácidos grasos hidroxí y dicarboxílicos (Melliou & Chinou, 2005; Isidorov, Czyżewska, Isidorova & Bakier, 2009). Siendo su ácido principal el 10-hidroxi-2-decenoico, que tiene diversos efectos farmacológicos, incluyendo el antibiótico (Nakaya et al., 2007), antioxidativo (Nagai, Inoue, Suzuki & Nagashima, 2006; Jamnik, Goranović & Raspor, 2007), así como una actividad hipoglucémica (Kramer, Tager, Childs & Speirs, 1977; Isidorov, Czyżewska, Jankowska & Bakier, 2011).

##### **1.4.2. El polen**

El polen es recolectado por las abejas de la parte masculina de las flores, lo mezclan con un poco de néctar y lo transportan a la colmena en su tercer par de patas, especialmente adaptado para ello (Visquert, 2015). Éste es recolectado por los apicultores fácilmente por medio de trampas (cazapolen) colocadas a la entrada de la colmena. Cuando las abejas atraviesan estas trampas (rejilla con agujeros suficientemente estrechos) las bolas de polen contenidas en sus patas traseras caen en un contenedor situado debajo de

la entrada (Bradbear, 2005). Es posible identificar las principales plantas poliníferas explotadas por las abejas en una región delimitada, a través de la identificación de los tipos de polen que lo componen (Simeão, Silveira, Sampaio & Bastos, 2015). Los granos de polen son la fuente natural de proteínas (30%), carbohidratos (30%), lípidos (5%), vitaminas y sales minerales para las abejas. Es la única fuente de alimento nitrogenado disponible para las larvas de abejas, y su ausencia puede resultar en la extinción de la colmena (Minckley, Cane & Kervin, 2000; Simeão et al., 2015).

El polen tiene valor como alimento saludable, así algunas poblaciones creen que puede ayudar a combatir las alergias (Bradbear, 2005). Sus propiedades revigorizantes se deben a su intensa acción estimulante, que los consumidores habituales no dudan en definir como extraordinaria. Es recomendado especialmente para casos de anemia, ya que aumenta el número de glóbulos rojos; mujeres embarazadas y lactantes, personas débiles convalecientes y para personas que realizan grandes esfuerzos físicos y mentales. (Bradbear, 2005; Visquert, 2015;). Se recomienda que sea ingerido en estado natural o mezclado con miel, agua, jugos de fruta o té (Bradbear, 2005).

### **1.4.3. El propóleo**

El propóleo es un producto natural que pertenece a la gran familia de productos de la abeja. Es una sustancia pegajosa, generalmente de color marrón. Las abejas melíferas recogen la resina y la goma de las partes deterioradas de las plantas (Kasiotis, Anastasiadou, Papadopoulos, Machera 2017). Al igual que la miel, su composición varía con las diferentes regiones geográficas en relación con el clima y sobre todo con las fuentes vegetales (Bradbear, 2005; Visquert, 2015; Kasiotis et al., 2017). La palabra propóleo se deriva del griego pro- “para” o “en defensa de”- y polis- “ciudad”, o sea, “defensa de la ciudad” (o la colmena). Es utilizado en la colmena con múltiples fines, como pueden ser cerrar las grietas en el interior de la colmena, construir obstáculos para impedir la entrada de enemigos, embalsamar los cadáveres de animales que se hayan introducido en la colmena y que las abejas no pudieron sacar fuera de la colmena debido a su volumen (Bradbear, 2005) evitando que estos se descompongan dentro de la colmena (efecto bactericida). Los principales efectos biológicos del propóleo que se han descrito son una actividad antioxidante, antimicrobiana, y citotoxicidad. Éste contiene mayores cantidades de compuestos fenólicos que las mieles (Socha, Galkowska, Bugaj & Juszczak, 2015; Osés, Pascual-Maté, Fernández-Muiño, López-Díaz & Sancho, 2016; Escriche & Juan-Borras,

2018). Además, un número cada vez mayor de estudios se están realizando últimamente para investigar su actividad antiparasitaria (Dantas et al., 2017).

El propóleo es usado ampliamente por los seres humanos como medicina, debido a su científicamente comprobado efecto antibacteriano. Disolviéndolo en alcohol se produce una tintura con excelentes propiedades medicinales. Se utiliza actualmente en diferentes industrias como ingrediente de caramelos, productos biofarmacéuticos y como componente de los cosméticos. Recientemente ha ganado popularidad como conservante natural y fuente de compuestos bioactivos para alimentos y bebidas, ayudando a mejorar la vida útil de estos productos así como la salud de los consumidores (Osés et al., 2016).

#### **1.4.4. El veneno de abeja**

El veneno de abeja se compone de una mezcla de aminos biogénicos, péptidos y proteínas. El componente principal, es la melitina (50–60% en peso seco) (Van Vaerenbergh, Debysse, Devreese & de Graaf, 2014). El veneno de la abeja recibe el nombre de apitoxina, causando daño a los tejidos locales, lo que induce la muerte en otros insectos y el dolor y la inflamación en organismos superiores. Las abejas obreras usan sus aparatos de picadura para defender la colonia y sus reservas de alimentos. Además, se ha demostrado recientemente que los péptidos del veneno de la colmena se impregnan en la superficie del cuerpo de las hembras y en la de cera. Se planteado la hipótesis de que esta sustancia tiene una función adicional en la inmunidad social de la colmena (Junior et al., 2010).

La apitoxina aplicada por un profesional en una persona que no es alérgica, y en dosis recomendadas, puede tener grandes beneficios por sus propiedades: antitumorales, antibacterianas, analgésicas y antifúngicas (Van et al., 2014; Junior et al., 2010).

### **1.5. Referencias de Introducción**

Aboul-Gheit, A. K., Abd-el-Moghny, T. & Al-Eseimi, M. M. (1997). Characterization of oils by differential scanning calorimetry. *Thermochemica Acta* 306,127-130.

Acquarone, C. A. (2004). *Parámetros físicoquímicos de mieles, relación entre los mismos y su aplicación potencial para la determinación del origen botánico y/o geográfico de mieles argentinas* (Doctoral dissertation). Universidad de Belgrano.

Ahmed, J., Prabhu, S. T., Raghavan, G. S. V. & Ngadi, M. (2007). Physico-chemical, rheological, calorimetric and dielectric behavior of selected Indian honey. *Journal of Food Engineering*, 79(4), 1207-1213.

Aichholz, R. & Lorbeer, E. (1999). Investigation of combwax of honeybees with high-temperature gas chromatography and high-temperature gas chromatography–chemical ionization mass spectrometry. I – High-temperature gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 855: 601-615.

Aichholz R. & Lorbeer E. (2000). Investigation of combwax of honeybees with high-temperature gas chromatography and high-temperature gas chromatography–chemical ionization mass spectrometry. II – High-temperature gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 883: 75-88.

Ajtony, Z., Bencs, L., Haraszi, R., Szigeti, J. & Szoboszlai, N. (2007). Study on the simultaneous determination of some essential and toxic trace elements in honey by multi-element graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 71(2), 683-690.

Al, M. L., Daniel, D., Moise, A., Bobis, O., Laslo, L. & Bogdanov, S. (2009). Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chemistry*, 112(4), 863-867.

Alam, F., Islam, M., Gan, S. H. & Khalil, M. (2014). Honey: a potential therapeutic agent for managing diabetic wounds. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.

Alberto, F.J.T. (2015). *Análisis químico de mieles de Mozambique*. (Master dissertation), Universitat Politècnica de València.

Alemu, A. E., Maertens, M., Deckers, J., Bauer, H. & Mathijs, E. (2016). Impact of supply chain coordination on honey farmers' income in Tigray, Northern Ethiopia. *Agricultural and Food Economics*, 4(1), 9.

Alissandrakis, E., Daferera, D., Tarantilis, P. A., Polissiou, M. & Harizanis, P. C. (2003). Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from citrus flowers and citrus honey. *Food Chemistry*, 82(4), 575-582.

Alqarni, A. S., Owayss, A. A., Mahmoud, A. A. & Hannan, M. A. (2014). Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. *Journal of Saudi Chemical Society*, 18(5), 618-625.

Álvarez-Suárez, J. M., Giampieri, F., González-Paramás, A. M., Damiani, E., Astolfi, P. & Martínez-Sánchez, G. (2012). Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 1508–1516.

Alves, C. Q., David, J. M., David, J. P., Bahia, M. V. & Aguiar, R. M. (2010). Methods for determination of in vitro antioxidant activity for extracts and organic compounds. *Química Nova*, 33(10), 2202-2210.

Antony, S. M., Han, I. Y., Rieck, J. R. & Dawson, P. L. (2000). Antioxidative effect of Maillard reaction products formed from honey at different reaction times. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3985-3989.

Anupama, D., Bhat, K. K. & Sapna, V. K. (2003). Sensory and physico-chemical properties of commercial samples of honey. *Food Research International*, 36(2), 183-191.

Asimi, O. A., Sahu, N. P. & Pal, A. K. (2013). Antioxidant activity and antimicrobial property of some Indian spices. *Int J Scientific and Research Publications*, 541.

Barra, M. P. G., Ponce-Díaz, M. C. & Venegas-Gallegos, C. (2010). Volatile compounds in honey produced in the central valley of Ñuble Province, Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70, 75–84.

Bayram, N. E. & Demir, E. (2018). Specifying Some Quality Characteristics of Monofloral and Multifloral Honey Samples. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 46(3), 417-423.

Belay, A., Haki, G. D., Birringer, M., Borck, H., Addi, A., Baye, K. & Melaku, S. (2017). Rheology and botanical origin of Ethiopian monofloral honey. *LWT-Food Science and Technology*, 75, 393-401.

Belitz, H.D & Grosch, W. (2007). *Química de los alimentos*. 2ª Ed. Acribia S.A.

Benedetti, L. & Pieralli, L. (1990). *Apicultura*. Ediciones Omega, S. A. Barcelona.

Beverly, M. B., Kay, P. T. & Voorhees, K. J. (1995). Principal component analysis of the pyrolysis-mass spectra from African, Africanized hybrid, and European beeswax. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 34(2), 251-263.

Bhandari, B., D'Arcy, B. & Kelly, C. (1999). Rheology and crystallization kinetics of honey: present status. *International Journal of Food Properties*, 2(3), 217-226.

Bogdanov, S. (2004). Quality and standards of pollen and beeswax. *Apiacta*, 38(2004), 334-341.

Bogdanov, S. (2009b). Beeswax: uses and trade. *Bee Product Science*, 1-11.

Bogdanov, S. (2011). The honey book. *Bee product science*. Available in: <http://www.bee-hexagon.net>.

Bogdanov, S. (2016). *Beeswax: Production, properties, composition and control*. Beeswax book. *Bee product science*. <[info@bee-hexagon.net](mailto:info@bee-hexagon.net)>.

Bogdanov, S. & Gallmann, P. (2008). *Authenticity of honey and other bee products state of the art*. Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP, Bern (Switzerland).

Bogdanov, S., Martin, P. & Lullmann, C. (2002). Harmonised methods of the international honey commission. *Swiss Bee Research Centre, FAM, Liebefeld*.

Bogdanov, S., Ruoff, K. & Oddo, L. P. (2004). Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie*, 35(Suppl. 1), S4-S17.

Bonté, F. & Desmoulière, A. (2013). Le miel: origine et composition. *Actualités pharmaceutiques*, 52(531), 18-21.

Boussaid, A., Chouaibi, M., Rezig, L., Hellal, R., Donsi, F., Ferrari, G. & Hamdi, S. (2018). Physicochemical and bioactive properties of six honey samples from various floral origins from Tunisia. *Arabian Journal of Chemistry*, 11(2), 265-274.

Bradbear, N. (2005). *La apicultura y los medios de Vidas sostenibles*. Folheto de la FAO sobre diversificación. Roma.

Brand-Garnys, E. E. & Sprenger, J. (1988). Beeswax—new aspects of a classic raw material for cosmetics. *Seifen Öle Fette Wachse* 114, 547-552.

British Pharmacopeia (1993). *The British Pharmacopeia Commission Secretariat*. London: HMSO Publications Centre.

Buchwald, R., Breed, M. D. & Greenberg, A. R. (2008). The thermal properties of beeswaxes: unexpected findings. *Journal of Experimental Biology*, 211(1), 121-127.



Calatayud, F. (2002). Les abelles de mel i els humans, una llarga coexistència amb un futur incert. *Mètode: Revista de difusió de la investigació de la Universitat de València*, 33, 32-39.

Capuano, E. & Fogliano, V. (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *Food Science and Technology*, 44, 793–810.

Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. C. & Pérez-Coello, M. S. (2007). Aroma composition and new chemical markers of Spanish citrus honeys. *Food Chemistry*, 103, 601–606.

Cavia, M. M., Fernández-Muino, M. A., Alonso-Torre, S. R., Huidobro, J. F. & Sancho, M. T. (2007). Evolution of acidity of honeys from continental climates: Influence of induced granulation. *Food Chemistry*, 100, 1728–1733.

Challacombe, C. A., Abdel-Aal, E. M., Seetharamana, K. & Duizer, L. M. (2012). Influence of phenolic acid content on sensory perception of bread and crackers made from red or white wheat. *Journal of Cereal Science*, 56, 181–188.

Chambers, R. & Conway, G. (1992). *Sustainable rural livelihoods: practical concepts for the 21st century*. Institute of Development Studies (UK).

Ciulu, M., Solinas, S., Floris, I., Panzanelli, A., Pilo, M. I., Piu, P. C. & Sanna, G. (2011). RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey. *Talanta*, 83(3), 924-929.

Codex Alimentarius. (2001). Revised Codex Standard for Honey. Codex Stan 12-1981.

Cohen, I. & Weihs, D. (2010). Rheology and microrheology of natural and reduced-calorie Israeli honeys as a model for high-viscosity Newtonian liquids. *Journal of Food Engineering*, 100(2), 366-371.

Crane, E.E. (1980). *A book of honey*. Oxford: Oxford University Press. ISBN 9780192860101.

Crozier, A., Jaganath, I. B. & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26(8), 1001-1043.

Dantas Silva, R. P. D., Machado, B. A. S., de Abreu Barreto, G., Costa, S. S., Andrade, L. N., Amaral, R. G. & Umsza-Guez, M. A. (2017). Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *Plos One*, 12(3), e0172585.

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

De Lorenzo, C. & Guadalix, M. (2002). *La miel de Madrid*. Editorial de la Consejería de Economía e Innovación Tecnológica de Madrid. Madrid.

Díaz-Moreno A. (2009). *La influencia de las condiciones de almacenamiento sobre la calidad físico-química y biológica de la miel* (Doctoral dissertation). Universidad de Zaragoza.

EMTF [External Market Task Force] (2004). *Annex 6 to the Study on the export marketing prospects of six selected Mozambican commodities for the South African market*. Report on Honey. External Market Study No. 3 (6). Maputo.

Escriche, I., Visquert, M., Juan-Borrás, M. & Fito, P. (2009). Influence of simulated industrial thermal treatments on the volatile fractions of different varieties of honey. *Food Chemistry*, 112(2), 329-338.

Escriche I., Kadar M., Juan-Borrás M. & Domenech E. (2011). Using flavonoids, phenolic compounds and headspace volatile profile for botanical authentication of lemon and orange honeys. *Food Research International*, 44, 1504-1513.

Escriche, I., Kadar, M., Juan-Borrás, M. & Domenech, E. (2014). Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment. *Food Chemistry*, 142, 135-143.

Escriche, I., Tanleque-Alberto, F., Visquert, M. & Oroian, M. (2017) a. Physico-chemical and rheological characterization of honey from Mozambique. *LWT-Food Science and Technology*, 86, 108-115.

Escriche, I., Sobrino-Gregorio, L., Conchado, A. & Juan-Borrás, M. (2017) b. Volatile profile in the accurate labelling of monofloral honey. The case of lavender and thyme honey. *Food Chemistry*, 226, 61-68.

Escriche, I. & Juan-Borrás, M. (2018). Standardizing the analysis of phenolic profile in propolis. *Food Research International*, 106, 834-841.

Escuredo O., Silva L., Valentao P., Seijo M.C. & Andrade P. (2012). Assessing *Rubus* honey value: pollen and phenolic compounds content and antibacterial capacity. *Food Chemistry*, 130 (3), 671–678.

Escuredo, O., Dobre, I., Fernández-González, M. & Seijo, M. C. (2014). Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chemistry*, 149, 84–90.

Escuredo, O., Míguez, M., Fernández-González, M. & Seijo, M. C. (2013). Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. *Food Chemistry*, 138(2-3), 851-856.

Escuredo, O., Seijo, M. C., Salvador, J. & González-Martín, M. I. (2013). Near infrared spectroscopy for prediction of antioxidant compounds in the honey. *Food Chemistry*, 141(4), 3409-3414.

Estupiñán, S., Sanjuán, E., Millán, R. & González-Cortés, M. A. (1998). Parámetros de calidad de la miel. II. Composición química. *Alimentaria*, 35(297), 117-122.

European pharmacopoeia. (2008). *Council of Europe Strassbourg* (6. edition)

FAO, (1992). Expert Committee on Food Additives. Beeswax. In *Compendium of Food Additive Specifications: Combined Specifications from 1<sup>st</sup> Through the 37<sup>th</sup> Meetings*, 1956-1990. Food & Agriculture.

FAO-Governo de Moçambique. (2009). Quadro das demandas e propostas de Moçambique para o desenvolvimento de um programa regional de cooperação entre países da CPLP no domínio da luta contra a desertificação e gestão sustentável das terras. TCP CPLP/FAO

FAOSTAT, (2016). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistic Division. Available in: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QL/visualize>.

Ferreira, I. C., Aires, E., Barreira, J. C. & Estevinho, L. M. (2009). Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*, 114(4), 1438-1443.

Fuente, E., Ruiz-Matute, A. I., Valencia-Barrera, R. M., Sanz, J. & Castro, I. M. (2011). Carbohydrate composition of Spanish unifloral honeys. *Food Chemistry*, 129, 1483–1489.

Gallina A., Stocco N. & Mutinelli F. (2010). Karl Fischer Titration to determine moisture in honey: A new simplified approach. *Food Control*, 21(6), 942-944.

Gámbaro, A., Ares, G., Giménez, A. & Pahor (2007). Preference mapping of color of Uruguayan honeys. *Journal of Sensory Studies*, 22, 507–519

García-Pérez, R. (2003). *Estudio palinológico y colorimétrico de mieles monoflorales de la Región de Murcia*. Proyecto Fin de carrera en Ingeniería agrónoma. Universidad Politécnica de Cartagena.

Gheldof, N., Wang X.H. & Engeseth N. (2002). Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (21), 5870–5877.

Giumanini, A. G., Verardo, G., Strazzolini, P. & Hepburn, H. R. (1995). Rapid detection of high-molecular-mass dienes in beeswax. *Journal of Chromatography A*, 704, 224–227.

Gutiérrez, V. V. (2017). Caracterización socioeconómica de la producción de miel de abeja (*Apis mellifera*) en el municipio de Quime. *Apthapi*, 3(1), 63-77.

Hermosín, I., Chicon, R. M. & Cabezudo, M. D. (2003). Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 83(2), 263-268.

Hyde, M.A., Wursten, B.T., Ballings, P. & Coates Palgrave, M. (2018). Flora of Mozambique: Home page. Available at: <https://www.mozambiqueflora.com/index.php>.

Iglesias, M. T., Martián-Alvarez, P. J., Polo, M. C., Lorenzo, C., Gonzalez, M. & Pueyo, E. N. (2006). Changes in the free amino acid contents of honeys during storage at ambient temperature. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9099–9104.

Isidorov, V. A., Czyzewska, U., Isidorova, A. G. & Bakier, S. (2009). Gas chromatographic and mass spectrometric characterization of organic acids extracted from some preparations containing lyophilized royal jelly. *Journal of Chromatography B*, 877, 3776–3780.

- Isidorov, V. A., Czyzewska, U., Jankowska E., A. G. & Bakier, S. (2011). Determination of royal jelly acids in honey. *Food Chemistry* 124, 387–391.
- Jamnik, P., Goranovič, D. & Raspor, P. (2007). Antioxidative action of royal jelly in the yeast cell. *Experimental Gerontology*, 42(7), 594-600.
- Jerković, I., Tuberoso, C. I. G., Marijanović, Z., Jelić, M. & Kasum, A. (2009). Headspace, volatile and semi-volatile patterns of *Paliurus spina-christi* unifloral honey as markers of botanical origin. *Food Chemistry*, 112(1), 239-245.
- Jiménez, J. J., Bernal, J. L., Aumente, S., del Nozal, M. J., Martín, M. T. & Bernal Jr, J. (2004). Quality assurance of commercial beeswax: Part I. Gas chromatography–electron impact ionization mass spectrometry of hydrocarbons and monoesters. *Journal of Chromatography A*, 1024(1-2), 147-154.
- Jiménez, J. J., Bernal, J. L., del Nozal, M. J., Martín, M. T. & Bernal, J. (2006). Sample preparation methods for beeswax characterization by gas chromatography with flame ionization detection. *Journal of Chromatography A*, 1129(2), 262-272.
- Jiménez, J. J., Bernal, J. L., del Nozal, M. J., Martín, M. T. & Toribio, L. (2009). Identification of adulterants added to beeswax: Estimation of detectable minimum percentages. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(9), 902-911.
- Jooster, A. & Smith, M. (2004). Report on Honey. External Market Study nº.3. *Ministerio de Industria e Comercio*. Mozambique.3, 2-3.
- Juan-Borrás, M., Domenech, E., Hellebrandova, M. & Escriche, I. (2014). Effect of country origin on physicochemical, sugar and volatile composition of acacia, sunflower and tilia honeys. *Food Research International*, 60, 86-94.
- Juan-Borrás, M., Periche, A., Domenech, E. & Escriche, I. (2015). Correlation between methyl anthranilate level and percentage of pollen in Spanish citrus honey. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(7), 1690-1696.
- Juan-Borrás, M. D. S. (2016). *Herramientas analíticas en la clasificación de mieles en base a criterios de calidad e inocuidad* (Doctoral dissertation). Universitat Politècnica de Valencia.
- Junior, R. S. F., Sciani, J. M., Marques-Porto, R., Junior, A. L., Orsi, R. D. O., Barraviera, B. & Pimenta, D. C. (2010). Africanized honeybee (*Apis mellifera*) venom

profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A2 levels. *Toxicon*, 56(3), 355-362.

Juszczak, L. & Fortuna, T. (2006). Rheology of selected Polish honeys. *Journal of Food Engineering*, 75(1), 43-49.

Kabbani, D., Sepulcre, F. & Wedekind, J. (2011). Ultrasound-assisted liquefaction of rosemary honey: Influence on rheology and crystal content. *Journal of Food Engineering*, 107(2), 173-178.

Kadar M., Juan Borrás M., Carot J. M., Doménech E. & Escriche I. (2011). Volatile fraction composition and physicochemical parameters as tools for the differentiation of lemon blossom honey and orange blossom honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 2768 – 2776.

Kamal, M. A. & Klein, P. (2011). Determination of sugars in honey by liquid chromatography. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18, 17–21.

Kameda, T. & Tamada, Y. (2009). Variable-temperature <sup>13</sup>C solid-state NMR study of the molecular structure of honeybee wax and silk. *International Journal of Biological Macromolecules*, 44(1), 64-69.

Karabagias, I. K., Badeka, A., Kontakos, S., Karabournioti, S. & Kontominas, M. G. (2014). Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics. *Food Chemistry*, 146, 548–557.

Karabagias, I. K., Louppis, A. P., Karabournioti, S., Kontakos, S., Papastephanou, C. & Kontominas, M. G. (2017). Characterization and geographical discrimination of commercial Citrus spp. honeys produced in different Mediterranean countries based on minerals, volatile compounds and physicochemical parameters, using chemometrics. *Food Chemistry*, 217, 445-455.

Karaman, S., Yilmaz, M. T. & Kayacier, A. (2011). Simplex lattice mixture design approach on the rheological behavior of glucomannan based salep-honey drink mixtures: An optimization study based on the sensory properties. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1319-1326.

Kasiotis, K. M., Anastasiadou, P., Papadopoulos, A & Machera, K. (2017). Revisiting Greek propolis: chromatographic analysis and antioxidant activity study. *Plos One*, 12(1).

Kaskoniene, V., Venskutonis, P. R. & Ceksteryte, V. (2010). Carbohydrate composition and electrical conductivity of different origin honeys from Lithuania. *Food Science and Technology*, 43, 801–807.

Keunen, L. L. C. (2010). *Waxes, beeswax, natural wax*. Bladel, The Netherlands: Koster Keunen Holland BV.

Kolayli, S., Boukraa, L., Sahin, H. & Abdellah, F. (2012). Sugars in honey. In V.R. Preedy (Ed.), *Dietary sugars: Chemistry, analysis, function and effects*, 3–15. Cambridge: Royal Society of Chemistry Publishing.

Kramer, K. J., Tager, H. S., Childs, C. N. & Speirs, R. D. (1977). Insulin-like hypoglycemic and immunological activities in honeybee royal jelly. *Journal of Insect Physiology*, 23, 293–295.

Kutnesof, P. M. & Whitehouse, D. B. (2005). *Beeswax. Chemical and technical assessment (CTA)*. Chemical and technical assessment 65<sup>th</sup> meeting (June 2005) of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Rome.

León-Ruiz, V., Vera, S., González-Porto, A. V. & Andrés, M. P. S. (2013). Analysis of water-soluble vitamins in honey by isocratic RP-HPLC. *Food Analytical Methods*, 6, 488–496.

Machado De-Melo, A. A., Almeida-Muradian, L. B. D., Sancho, M. T. & Pascual-Maté, A. (2018). Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of Apicultural Research*, 57(1), 5-37.

Madejczyk, M. & Baralkiewicz, D. (2008). Characterization of Polish rape and honeydew honey according to their mineral contents using ICP-MS and F-AAS/AES. *Analytica Chimica Acta*, 617(1-2), 11-17.

Maia, M. & Nunes, F. M. (2013). Authentication of beeswax (*Apis mellifera*) by high-temperature gas chromatography and chemometric analysis. *Food Chemistry*, 136(2), 961-968.

Manzanares, A. B., García, H., Galdón, B. R., Rodríguez, E. R. & Romero, C. D. (2014). Physicochemical characteristics of minor monofloral honeys from Tenerife, Spain. *Food Science and Technology*, 55, 572–578.

Manzoor, M., Mathivanan, V., Shah, G. N. & Mir, G. M. (2013). Selvisabhanayakam. Physico-chemical analysis of honey of *Apis cerana indica* and *Apis mellifera* from different regions of Anantnag district, Jammu & Kashmir. *Int. J. Pharm. Pharm Sc*, 5(3), 635-638.

Mato, I. S., Huidobro, J. F., Simal-Lozano, J. S. & Sancho, M. T. (2006). Rapid determination of nonaromatic organic acids in honey by capillary zone electrophoresis with direct ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1541–1550.

Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J. & Nacoulma, O. G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Faso honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91(3), 571-577.

Melliou, E. & Chinou, I. (2005). Chemistry and bioactivity of royal jelly from Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8987–8992.

Merken, H. M. & Beecher, G. R. (2000). Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 577-599.

MINAG. Ministerio de Agricultura (2007). Plano Director De Extensão Agraria 2007–2016.

Minckley, R. L., Cane, J. H. & Kervin, L. (2000). Origins and ecological consequences of pollen specialization among desert bees. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 267(1440), 265-271.

Mohamed, H., Salma, M. A., Al, B. L., Abdi, S., Gouda, Z., Barakat, N. & Al, S. M. (2015). The efficacy and safety of natural honey on the healing of foot ulcers: a case series. *Wounds: A Compendium of Clinical Research and Practice*, 27(4), 103-114.

Montenegro, G., Gómez, M., Pizarro, R., Casaubon, G. & Peña, R. C. (2008). Implementation de un panel sensorial para mieles chilenas. *Ciencia e Investigación Agraria*, 35(1), 51-58.



- Moreira, R. F. A., Maria, C. A. B., Pietroluongo, M. & Trugo, L. C. (2007). Chemical changes in the non-volatile fraction of Brazilian honeys during storage under tropical conditions. *Food Chemistry*, *104*, 1236–1241.
- Moriyama, T., Ito, A., Omote, S., Miura, Y. & Tsumoto, H. (2015). Heat resistant characteristics of major royal jelly protein 1 (MRJP1) oligomer. *PloS One*, *10*(5).
- Muli, E., Munguti, A. & Raina, S. K. (2007). Quality of honey harvested and processed using traditional methods in rural areas of Kenya. *Acta Veterinaria Brno*, *76*(2), 315-320.
- Nagai, T., Inoue, R., Suzuki, N. & Nagashima, T. (2006). Antioxidant properties of enzymatic hydrolysates from royal jelly. *Journal of Medicinal Food*, *9*, 363–367.
- Nakaya, M., Onda, H., Sasaki, K., Yukiyoshi, A., Toshihana, H. & Yamada, K. (2007). Effect of royal jelly on bisphenol A-induced proliferation of human breast cancer cells. *Biosciences, Biotechnology and Biochemistry*, *71*, 253–255.
- Nur Mário Alves, R. (2016). *Proyecto de cooperación para el desarrollo: Fomento de prácticas apícolas en el Distrito de Muanza-Sofala-Mozambique* (Master dissertation). Available from: [https://uvadoc.uva.es/bitstream/10234/19231/1/TMF\\_F\\_2016\\_4.pdf](https://uvadoc.uva.es/bitstream/10234/19231/1/TMF_F_2016_4.pdf).
- Ogaba, M. (2002). Household poverty reduction through beekeeping amongst Uganda rural women. *Standing Commission of Beekeeping for Rural Development, Monmouth*.
- Oroian, M. & Escriche, I. (2015). "Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis". *Food Research International*. *74*, 10–36.
- Oroian, M. (2012). Physicochemical and rheological properties of Romanian honeys. *Food Biophysics*, *7*(4), 296-307.
- Oroian, M. (2015). Influence of temperature, frequency and moisture content on honey viscoelastic parameters—Neural networks and adaptive neuro-fuzzy inference system prediction. *LWT-Food Science and Technology*, *63*(2), 1309-1316.
- Oroian, M., Amariei, S., Escriche, I. & Gutt, G. (2013). Rheological aspects of Spanish honeys. *Food and Bioprocess Technology*, *6*(1), 228-241.

Oroian, M., Amariei, S., Escriche, I., Leahu, A., Damian, C. & Gutt, G. (2014). Chemical composition and temperature influence on the rheological behaviour of honeys. *International Journal of Food Properties*, 17(10), 2228-2240.

Oroian, M., Ropciuc, S., Paduret, S. & Tudosii, E. (2018). Rheological analysis of honeydew honey adulterated with glucose, fructose, inverted sugar, hydrolysed inulin syrup and malt wort. *LWT-Food Science and Technology*, 95, 1-8.

Oroian, M., Amariei, S., Escriche, I. & Gutt, G. (2013). "Rheological aspects of Spanish honeys". *Food and Bioprocess Technology*, 6(1), 228–241.

Oryan, A., Alemzadeh, E. & Moshiri, A. (2016). Biological properties and therapeutic activities of honey in wound healing: a narrative review and meta-analysis. *Journal of Tissue Viability*, 25(2), 98-118.

Osés, S. M., Pascual-Maté, A., Fernández-Muiño, M. A., López-Díaz, T. M. & Sancho, M. T. (2016). Bioactive properties of honey with propolis. *Food Chemistry*, 196, 1215-1223.

Oyarzun, M. T., Figueroa, A. & Tartanac, F. (2005). Oportunidades de mejoramiento en la calidad e inocuidad de la cadena productiva de la miel en Chile. *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Santiago de Chile*.

Palynological Database on line. Available at: <https://www.palдат.org/info>.

Persano-Oddo L. & Piro R. (2004). Main European unifloral honeys: Descriptive sheets. *Apidologie*, 35, 38-81.

Pontes, M., Marques, J. C. & Câmara, J. D. S. (2007). Screening of volatile composition from Portuguese multifloral honeys using headspace solid-phase microextraction-gas chromatography–quadrupole mass spectrometry. *Talanta*, 74(1), 91-103.

Popa, M., Bostan, R. & Popa, D. (2013). Honey-marker of environmental pollution. Case study-the Transylvania Region, Romania. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 14(1), 273-280.

Puscas, A., Hosu, A. & Cimpoi, C. (2013). Application of a newly developed and validated high-performance thin-layer chromatographic method to control honey adulteration. *Journal of Chromatography A*, 1272, 132–135.

Radovic, B. S., Careri, M., Mangia, A., Musci, M., Gerboles, M. & Anklam, E. (2001). "Contribution of dynamic headspace GC–MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey". *Food Chemistry*, 72, 511–520.

Rebane, R. & Herodes, K. (2010). A sensitive method for free amino acids analysis by liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection using precolumn derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate: Application to the honey analysis. *Analytica Chimica Acta*, 672, 79–84.

Regulation (EEC) N° 2081/92 of 14 July 1992 on the protection of geographical indications and designations of origin for agricultural products and foodstuffs. *Off J Eur Comm L 208:1–8*.

Ren, Z., Bian, X., Lin, L., Bai, Y. & Wang, W. (2010). Viscosity and melt fragility in honey–water mixtures. *Journal of Food Engineering*, 100(4), 705–710.

Ribeiro, L. P. M. (2013). *Avaliação da qualidade do mel: atividade antioxidante, análise polínica e percepção do consumidor* (Doctoral dissertation). Universidade do Porto (Portugal).

Rice-Evans, C. A. & Packer, L. (2003). Flavonoids in health and disease. In A. AnnieFleuriet & J.-J. Macheix (Eds.), *Phenolic acids in fruits and vegetables*. New York: Marcel Dekker.

Rybak-Chmielewska, H. & Szczêsna, T. (2004). HPLC study of chemical composition of honeybee (*Apis mellifera* L.) venom. *J Apicultural Sci*, 48(2), 103-9.

Sáenz C. & Gómez C. (2000). Mieles españolas: Características e identificación mediante el análisis del polen. *Ediciones Mundi-Prensa. Madrid* (España).

Sak-Bosnar, M. & Sakač, N. (2012). Direct potentiometric determination of diastase activity in honey. *Food Chemistry*, 135(2), 827-831.

Sancho M. T., Muniategui S., Huidobro J. F. & Simal Lozano J. (1992). Aging of honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(1), 134-138.

Schroeder, A. & Wallner, K. (2003). The actual situation of varroacides in beeswax: *An International Comparison. Apidologie*, 34 (5), 1-3.

Serem, J. C. & Bester, M. J. (2012). Physicochemical properties, antioxidant activity and cellular protective effects of honeys from southern Africa. *Food Chemistry*, 133(4), 1544-1550. Available in: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.047>.

Serra Bonvehí, J. & Orantes Bermejo, F. O. (2012). Detection of adulterated commercial Spanish beeswax. *Food Chemistry*, 132(1), 642-648.

Sghaier, M. B., Skandrani, I., Nasr, N., Franca, M. D., Chekir-Ghedira, L. & Ghedira, K. (2011). Flavonoids and sesquiterpenes from *Teucrium ramosissimum* promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: A structure–activity relationship study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32, 336–348.

Shami, N. J. I. E. & Moreira, E. A. M. (2004). Lycopene as an antioxidant agent. *Revista de Nutrição*, 17(2), 227-236.

Silici, S., Sagdic, O. & Ekici, L. (2010). Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of *Rhododendron* honeys. *Food Chemistry*, 121(1), 238-243.

Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O. & Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196, 309-323.

Simeão, C. M. G., Silveira, F. A., Sampaio, I. B. M. & Bastos, E. M. A. F. (2015). Pollen analysis of honey and pollen collected by *Apis mellifera linnaeus*, 1758 (Hymenoptera, *Apidae*), in a mixed environment of Eucalyptus plantation and native cerrado in Southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 75(4), 821-829.

Snook, L.; Alves, T.; Sousa, C.; Loo, J.; Gratzner, G.; Duguma, L.; Schrotter, C.; Ribeiro, N.; Mahanzule, R.; Mazuze, F.; Cuco, E. & Elias, M. (2015) Relearning traditional knowledge to achieve sustainability: honey gathering in the miombo woodlands of northern Mozambique. In: *XIV World Forestry Congress, Durban, South Africa, 7-11 September 2015. FAO*.

Soares, S., Amaral, J. S., Oliveira, M. B. P. & Mafra, I. (2017). A comprehensive review on the main honey authentication issues: Production and origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 1072-1100.

Socha, R., Gałkowska, D., Bugaj, M. & Juszcak, L. (2015). Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland. *Natural Product Research*, 29(5), 416-422.

Sodré, G. D. S., Marchini, L. C., Moreti, A. C. D. C. C., Otsuk, I. P. & Carvalho, C. A. L. D. (2011). Physico-chemical characteristics of honey produced by *Apis mellifera* in the Picos region, state of Piauí, Brazil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40(8), 1837-1843.

Soldatkin, O. O., Peshkova, V. M., Saiapina, O. Y., Kucherenko, I. S., Dudchenko, O. Y. & Melnyk, V. G. (2013). Development of conductometric biosensor array for simultaneous determination of maltose, lactose, sucrose and glucose. *Talanta*, 115, 200–207.

Stelmakienė, A., Ramanauskienė, K., Briedis, V. & Leskauskaitė, D. (2012). Examination of rheological and physicochemical characteristics in Lithuanian honey. *African Journal of Biotechnology*, 11(60), 12406-12414.

Suárez-Luque, S., Mato, I., Huidobro, J. F. & Simal-Lozano, J. (2005). Capillary zone electrophoresis method for the simultaneous determination of cations in honey. *Journal of Chromatography A*, 1083, 193–198.

Suárez-Luque, S., Mato, I., Huidobro, J. F., Simal-Lozano, J. & Sancho, M. T. (2002). Rapid determination of minority organic acids in honey by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 955, 207-214.

Tanleque-Alberto, F. J., Juan-Borrás, M. & Escriche, I. (2018, febrero) *Implicación de las Prácticas Apícolas en las Características de Calidad de Miel de Mozambique*. Presentación de la sesión de póster en el V Congreso Ibérico de Apicultura 2018, Coimbra-Portugal. Available in: [https://www.uc.pt/ffuc/congresso\\_iberico\\_de\\_apicultura/livro\\_resumos](https://www.uc.pt/ffuc/congresso_iberico_de_apicultura/livro_resumos).

Tomás-Barberán, F. A., Martos, I., Ferreres, F., Radovic, B. S. & Anklam, E. (2001). HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(5), 485-496.

Tornuk, F., Karaman, S., Ozturk, I., Toker, O. S., Tastemur, B., Sagdic, O., Doganb, M. & Kayacier, A. (2013). Quality characterization of artisanal and retail

Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. *Industrial Crops and Products*, 46, 124–131.

Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. Review. *Nutrients*, 2, 1231–1246.

Tuberoso, C. I. G., Jerkovic, I., Sarais, G., Congiu, F., Marijanovic, Z. & Kus, P. M. (2014). Color evaluation of seventeen European unifloral honey types by means of spectrophotometrically determined CIE  $L^*C^*_{ab}H_{ab}$  chromaticity coordinates. *Food Chemistry*, 145, 284–291.

Tulloch, A. P. (1980). Beeswax—composition and analysis. *Bee World*, 61(2), 47–62.

Turi, E. A. (1997). *Thermal Characterization of Polymeric Materials* (2nd ed.). San Diego: Academic Press.

United States Code of Federal Regulations (2004). *Beeswax (yellow and white)*. Title 21, Section 184.1973. US Government Printing Office, Washington, DC.

Van Vaerenbergh, M., Debyser, G., Devreese, B. & de Graaf, D. C. (2014). Exploring the hidden honeybee (*Apis mellifera*) venom proteome by integrating a combinatorial peptide ligand library approach with FTMS. *Journal of Proteomics*, 99, 169–178.

Visquert F. M. (2015). *Influencia de las condiciones térmicas en la calidad de la miel* (Doctoral dissertation). Universitat Politècnica de València. (Spain).

Wang, Y., Juliani, H. R., Simon, J. E. & Ho, C. T. (2009). Amino acid-dependent formation pathways of 2-acetylfuran and 2, 5-dimethyl-4-hydroxy-3 [2H]-furanone in the Maillard reaction. *Food Chemistry*, 115(1), 233–237.

Waś, E., Szczęśna, T. & Rybak-Chmielewska, H. (2014) a. Determination of beeswax hydrocarbons by gas chromatography with a mass detector (GC-MS) technique. *Journal of Apicultural Science*, 58(1), 145–157.

Waś, E., Szczęśna, T. & Rybak-Chmielewska, H. (2014) b. Hydrocarbon composition of beeswax (*Apis mellifera*) collected from light and dark coloured combs. *Journal of Apicultural Science*, 58(2), 99–106.

White, J. W. (1962). *Composition of American honeys* (No. 1261). US Dept. of Agriculture.

Witczak, M., Juszczak, L. & Gałkowska, D. (2011). Non-Newtonian behaviour of heather honey. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 532-537.

Won, S. A., Li, C., Kim, J. & Rhee, H. (2009). Immunological characterization of honey major protein and its application. *Food Chemistry*, 113, 1334–1338.

Yanniotis, S., Skaltsi, S. & Karaburnioti, S. (2006). Effect of moisture content on the viscosity of honey at different temperatures. *Journal of Food Engineering*, 72(4), 372-377.

Yücel, Y. & Sultanoglu, P. (2013). Characterization of honeys from Hatay region by their physicochemical properties combined with chemometrics. *Food Bioscience*, 1, 16–25.

Zamora M.C. & Chirife J. (2006). Determination of water activity change due to crystallization in honeys from Argentina. *Food Control*, 17 (1), 59–64.

Zandamela, Mungoi, E.M.F 2008.: *Caracterización Fisico-Química y Evaluación Sanitaria de la miel de Mozambique* (Doctoral dissertation). Bellaterra Universitat Autònoma de Barcelona (España).





## **2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**



## **2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**

### **2.1. Objetivo general**

Caracterizar la miel y cera de abeja del Norte y Centro de Mozambique y establecer sus características diferenciadoras, con la finalidad de aportar conocimiento sobre estos productos apícolas como base para mejorar su explotación y comercialización.

### **2.2. Objetivos específicos**

- 2.2.1. Caracterizar la miel en relación a parámetros fisicoquímicos de calidad, color, azúcares, contenido polínico y perfil de compuestos volátiles.
- 2.2.2. Determinar las características antioxidantes de la miel en términos de la cuantificación de compuestos específicos (ácidos fenólicos y flavonoides), así como de la capacidad antioxidante total.
- 2.2.3. Evaluar las características reológicas dinámicas de la miel.
- 2.2.4. Caracterizar la cera de abeja en términos del perfil de hidrocarburos y de las propiedades térmicas, y contrastarlas con las de ceras de abeja de otras procedencias.

### **2.3. Plan de trabajo**

- 2.3.1. Revisión bibliográfica.
- 2.3.2. Trabajo de campo para la recolección de muestras de diferentes regiones del norte (Nampula) y centro (Manica, Sofala y Zambezia) de Mozambique, y la obtención de información sobre las prácticas apícolas llevadas a cabo en dichas regiones.
- 2.3.3. Puesta a punto y realización de las determinaciones analíticas en las mieles:
  - Humedad (refractometría)
  - Hidroximetilfurfural “HMF” (HPLC-UV)
  - Actividad de agua “ $a_w$ ” (higrómetro de punto de rocío)
  - Conductividad eléctrica (conductímetro)
  - pH, acidez libre, lactónica y total (valorador automático)
  - Color (colorímetro escala Pfund y espectrocolorímetro de coordenadas CIE-L\*a\*b\*)
  - Azúcares (HPLC-ELSD)

- Compuestos volátiles (GC-MS)
- Ácidos fenólicos y flavonoides específicos (HPLC-DAD)
- Actividad antioxidante total (DPPH)
- Propiedades reológicas (reómetro)

2.3.4. Puesta a punto y realización de las determinaciones analíticas en las ceras:

- Perfil de hidrocarburos saturados (HT-GC/FID)
- Propiedades térmicas (DSC)

2.3.5. Tratamiento de datos aplicando técnicas estadísticas

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1. Toma de muestras**

Para llevar a cabo la presente tesis, se han recolectado 75 muestras de miel y 46 de cera de abeja, de las 4 zonas con mayor producción apícola en Mozambique (provincias): norte (Nampula) y centro (Sofala, Manica y Zambezia). Paralelamente se ha realizado un trabajo de campo con la finalidad de recopilar información sobre las prácticas apícolas llevadas a cabo en las 4 provincias, asociadas al sistema de extracción, producción y comercialización de los productos apícolas estudiadas (miel y cera), para ello se elaboró una encuesta (anexos). Se detalla a continuación el muestreo llevado a cabo en cada provincia, por distritos.

- **Zona A** (norte del país) provincia de Nampula (distritos de Moma, Angoche y Ribáuè): 20 y 12 muestras de miel y cera respectivamente.
- **Zona B** (centro del país) Zambezia (distritos de Gile, Alto Molucue, Namacura): 15 y 10 muestras de miel y cera respectivamente.
- **Zona C** (centro del país) provincia de Sofala (distritos de Gorongosa, Caia y Marrromeu): 20 y 12 muestras de miel y cera respectivamente.
- **Zona D** (centro del país) provincia de Manica (distritos de Sussundega, Machaze y Tambara): 20 y 12 muestras de miel y cera respectivamente.

Cada muestra de miel y cera consistió entre 750-1000 g y se recolectaron en 2014 y 2015. Las muestras (miel y cera) de Nampula y Zambezia se obtuvieron de colmenas tradicionales construidas con materiales locales (troncos huecos, cilindros de corteza o ramitas entretrejidas) y usando métodos de recolección tradicional. Sin embargo, las muestras de Sofala (envasadas/o procesadas por la compañía de miel de Mozambique) y la mayoría de Manica se obtuvieron y procesaron utilizando procedimientos más modernos. En la presente tesis, con la finalidad de comparar la miel y la cera de Mozambique con la de otros orígenes geográficos, han analizado muestras procedentes de Honduras (adquiridas directamente en la comunidad Lenca) y de España (cooperativa Melazahar).

### **3.2. Análisis melisopalinológico**

Este análisis requiere de una gran experiencia y conocimientos previos, por ello fue llevado a cabo por personal cualificado del laboratorio donde se realizó esta tesis. Los análisis melisopalinológicos se llevaron a cabo según lo reportado por Juan-Borrás, Domenech, Hellebrandova & Escriche, (2014). Se pesaban 10 g de miel en un vaso de precipitados de 50 mL y se añadían 20 mL de agua acidulada ( $H_2SO_4$ , al 5%), después se ponía en agitación a 40 °C. Posteriormente se trasvasaba a un tubo de centrifuga graduado y se centrifugaba a 3500 rpm durante 10 min, se desechara el sobrenadante y se completaba hasta 10 mL con agua destilada. Seguidamente se agitaba en el vortex y se centrifugaba a 3500 rpm durante 5 min. Se eliminaba un poco de agua y se cogía el polen con ayuda de un capilar, depositando el sedimento en un portaobjetos y poniendo a secar en estufa a 50 °C, aproximadamente durante 30 min. Finalmente se añadía una gota de glicerina para sellarlo y se sellaba con un cubreobjetos

El residuo (polen) obtenido se observó mediante un microscopio óptico de luz con un aumento de x40 (Zeiss Axiolab, Göttingen, Alemania) (Figura 3.1). Los granos de polen se identificaron considerando las bases de datos palinológicas generales (Marangoni & Wesdorp, 2012; Gosling, Miller & Livingstone, 2013; Oroian, Amariei, Escriche & Gutt, 2013; Juan-Borrás et al., 2014; Oroian, 2015; Escriche et al., 2016; Schüller & Hemp, 2016; Palynological Database on line, 2018; Hyde, Wursten, Ballings & Coates Palgrave, 2018), y la información existente sobre la flora presente en las áreas de recolección de miel (Crane, 1973; Johansmeier, 2016).



**Figura 3.1.** Microscopio óptico de luz.

**Fuente:** autor

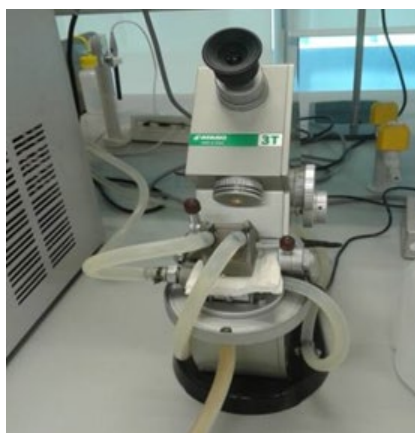


### **3.3. Determinación de parámetros fisicoquímico de la miel**

Los métodos de la Comisión Internacional de la Miel (Bogdanov, 2009a); los métodos oficiales de análisis de la Asociación de Químicos (AOAC, 2000) y los métodos oficiales españoles (BOE núm. 145, 1986), se aplicaron para determinar los parámetros fisicoquímicos de la miel. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

#### **3.3.1. Humedad**

La determinación del contenido de humedad fue realizada por el método refractométrico basado en la medida del índice de refracción de la miel. Se tomaba una gota de la muestra de miel, más licuada posible y se analizaba usando un refractómetro tipo Abbe (ATAGO 3T, Japón) con baño termostatzado (Figura 3.2). El índice de refracción se midió a  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El valor obtenido fue extrapolado a la tabla de Chataway, y el resultado se expresaba en g/100 g de miel.



**Figura 3.2.** Refractómetro tipo Abbe con baño termostatzado.

**Fuente:** autor

#### **3.3.2. Actividad del agua ( $a_w$ )**

La actividad de agua fue medida, a temperatura constante de  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  mediante un higrómetro de punto de rocío (Decagon Devices Inc. modelo Aqualab Serie 4TE, Estados Unidos) con una precisión de  $\pm 0.003$  (Figura 3.3). Se introducía una muestra de aproximadamente 5g en una capsula de plástico, y una vez selladas se realizaban las medidas de las muestras (Chirife, Zamora & Motto, 2006).



Figura 3.3. Higrómetro de punto de rocío.

Fuente: autor

### 3.3.3. Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica se determinó mediante un pH-metro-conductímetro Seven Multi™ (Mettler Toledo, Suiza) (Figura 3.4). Para ello, se pesaba una cantidad equivalente a 20 g de materia seca de la miel, se disolvía en 25 mL agua bidestilada y finalmente se llevaba a un volumen de 100 mL. Se anotaba la conductividad obtenida junto con la temperatura de la disolución. El resultado final se obtenía aplicando la ecuación 1.

$$k_{20}(\mu S/cm) = \frac{kt}{1+\alpha(t-20)} \quad \text{Eq (1)}$$

Siendo:

K<sub>20</sub> = conductividad eléctrica de la disolución de la miel corregida a 20 °C

K<sub>t</sub> = conductividad eléctrica a temperatura de la disolución de la miel

α = 0.0261 (coeficiente de temperatura a 20 °C)

t = temperatura de la disolución de miel



Figura 3.4. pH-metro-conductímetro.

Fuente: autor

### 3.3.4. pH, acidez libre, lactónica y total

Estos parámetros se determinaron usando un valorador automático 905 (Metrohm, Herisau, Suiza) (Figura 3.5). Para ello se pesaban 10 g de miel y se disolvían en 75 mL de agua destilada con la ayuda de un agitador magnético. Para evaluar la acidez libre, se adicionaba una disolución de hidróxido de sodio 0.05 N, a una velocidad de 5 mL/min. La adición se detenía cuando el valor del pH alcanzaba 8.5. Rápidamente, se vertían, 10 mL de la disolución anterior y se valoraba por retroceso la acidez lactónica con una disolución de ácido clorhídrico 0.05 N hasta llegar a un pH de 8.3. La acidez total se calculaba sumando la acidez libre y lactónica, así mismo se tomaba el valor del pH de la disolución de la miel que se determinaba automáticamente. Hay que destacar que, aunque sin disminuir la velocidad de incorporación del álcali en las proximidades a 8.50, era necesario valorar con la mayor rapidez posible, con agitación constante para tener una buena reproducibilidad del método, ya que el valor del pH desciende rápidamente debido a la hidrólisis de las lactonas. El resultado final se obtenía aplicando la ecuación 2 y 3.

$$\text{Acidez libre (meq/kg)} = [(V_b - V_o)N_b 1.000]/P \quad \text{Eq. (2)}$$

$$\text{Acidez lactónica (meq/kg)} = [(10N_b - V_a N_a) 1.000]/P \quad \text{Eq. (3)}$$

Siendo:

$V_b$  = Volumen, en mL, de base consumida para alcanzar pH 8.50

$V_o$  = Volumen, en mL de base consumidos por 75 mL de agua destilada para alcanzar pH 8.50

$V_a$  = Volumen, en mL, de ácido gastado en la valoración por retroceso para alcanzar pH 8.30.

$N_b$  = Normalidad de la base

$N_a$  = Normalidad del ácido

$P$  = Peso, en g, de la muestra



**Figura 3.5.** Valorador automático.

**Fuente:** autor

### **3.3.5. Hidroximetilfurfural (HMF)**

El HMF se analizó mediante un cromatógrafo líquido (Agilent 1120 Series) (Figura 3.6) acoplada a un detector de ultravioleta (HPLC-UV). Se utilizó una columna ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6 x 150 mm, tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$ ) (Agilent Technologies, USA). Se usó como fase móvil agua: metanol (90:10, v: v). El detector se ajustó a 285 nm. El software del sistema EZChrom Elite se usó para el procesamiento de los datos (Escriche, Oroian, Visquert, Gras & Vidal, 2016).

En primer lugar se pesaban 5 g de miel (no calentada) y se disolvían con 25 mL de agua destilada, se transfería a un matraz aforado de 50 mL, al que se le adicionaban 0.5 mL de una solución Carrez I (15 g de ferrocianuro potásico trihidratado en 100 mL de agua destilada) y 0.5 mL de una solución Carrez II (30 g de acetato de cinc dihidratado en 100 mL de agua destilada). Finalmente se llevaba al volumen final con agua destilada (para evitar la formación de espuma se añadían unas gotas de etanol). Posteriormente, una alícuota se pasaba a través de un filtro de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$ , y se inyectaban 5  $\mu\text{L}$ . La cuantificación de HMF se realizó utilizando el método de estándar externo, para ello se construyó una curva de calibración con un rango de 0.1-10.0 mg/kg.



**Figura 3.6.** Cromatógrafo HPLC con detector ultravioleta (UV)

**Fuente:** autor

### **3.4. Color**

En la determinación del color de las muestras de miel se han usado dos metodologías distintas: 1. Colorímetro específico para la miel (escala pFund), ya que, por su gran

versatilidad es hoy en día ampliamente usado en los laboratorios de control de calidad de mieles (HANNA C221, Spain) (Figura 3.7.) y 2. Espectrocolorímetro de coordenadas CIE-L\*a\*b\* (Minolta Cm-3600d, Japón). (Figura 3.8.), por ser el habitualmente usado en el mundo científico. En ambos casos, si la miel se encontraba en estado cristalizado, ésta se ponía el tiempo necesario en una estufa (45-55 °C), hasta que quedaba completamente líquida (Escriche et al., 2016). En el primer caso se medía la transmitancia de luz de la muestra, introducida en una cubeta y se comparaba con la de un patrón (glicerol analítico de grado reactivo), el valor se expresaba en milímetros en la escala Pfund. En el segundo caso, el color de las mieles se medía a partir de su espectro de reflexión. Para ello se obtuvieron las coordenadas de color CIE-L\*a\*b\* utilizando como referencia un observador de 2° y un iluminante D65. Se utilizó la teoría de Kubelka-Munk, debido a la naturaleza translúcida de las mieles, mediante la cual se determinaban los valores de reflectancia de un espesor infinito de la miel. La miel era introducida en una cubeta de 2 cm de paso de luz, realizándose todas las medidas con un fondo blanco y negro. (Visquert, Vargas & Escriche, 2014; Visquert, 2015).



**Figura 3.7.** Colorímetro diseñado específicamente para la miel.

**Fuente:** autor

Los valores de un espesor infinito se obtienen con la expresión de la ecuación (4).

$$R_{\infty} = a - b \quad \text{Eq. (4)}$$

$$a = 1/2[(R + (R_o - R + R_g)/R_o * R_g)] \quad \text{Eq. (5)}$$

$$b = \sqrt{(a^2 - 1)} \quad \text{Eq. (6)}$$

Siendo:

$R$  = Reflectancia de la muestra sobre fondo blanco

$R_o$  = Reflectancia de la muestra sobre fondo negro

$R_g$  = Reflectancia del fondo blanco

A partir de los valores de  $L^*$  (luminosidad),  $a^*$  y  $b^*$ , se calcularon las coordenadas psicométricas tono ( $h^*$ ) (ecuación 7) y croma ( $C^*$ ) (ecuación 8), así como la diferencia de color ( $\Delta E$ ) (ecuación 9).

$$h^* = \arctg \frac{b^*}{a^*} \quad \text{Eq. (7)}$$

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad \text{Eq. (8)}$$

$$\Delta E = \sqrt{a^{*2} + L^{*2} + b^{*2}} \quad \text{Eq. (9)}$$



**Figura 3.8.** Espectrocolorímetro.

**Fuente:** autor

### **3.5. Azúcares**

El contenido de azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) se analizó en un cromatógrafo líquido modelo 1200 Series (Agilent Technologies, Ratigen, Alemania), acoplado a un detector de dispersión de luz evaporativa (ELSD) (Agilent Technologies modelo 1200 Series, Ratigen, Alemania) (Figura 3.9). Se utilizó una columna cromatográfica (Waters Carbohydrate 4.6 x 250 mm de 4  $\mu$ m). La fase móvil fue agua/ acetonitrilo (25:75) en modo isocrático a un flujo de 0,8 mL/min (Escriche et al., 2017). Para el análisis de datos se usó el software Mass Hunter.

Para ello se pesaba 0.5 g de miel, se disolvía con 25 mL de agua bidestilada y se transfería a un matraz aforado de 50 mL. Se añadía con la ayuda de una micropipeta 0.5 mL de solución Carrez I (15 g de ferrocianuro de potasio trihidratado en 100 mL de agua destilada), y 0.5 mL de solución Carrez II (30 g de acetato de zinc dihidratado en 100 mL de agua destilada). Se mezclaba y se añadía agua hasta el enrase. Seguidamente se transfería una alícuota a un tubo que se centrifugaba durante 5 minutos, del sobrenadante se inyectaban 5  $\mu$ L en el cromatógrafo. La cuantificación de azúcares se realizó utilizando

estándares externos con los que se construían las curvas de calibración correspondientes. Todos los análisis se realizaron por triplicado.



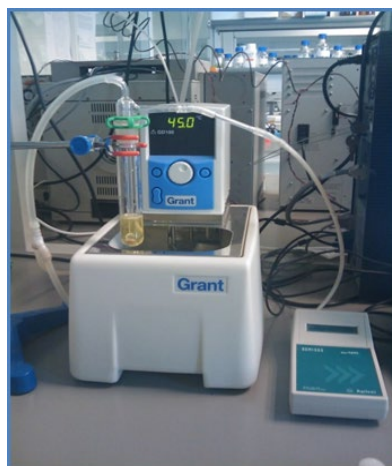
**Figura 3.9.** Cromatógrafo HPLC con detector de dispersión de luz evaporativa (ELSD).

**Fuente:** autor

### **3.6. Compuestos volátiles**

La extracción de la fracción volátil de las muestras de miel se llevó a cabo mediante el método conocido como “purga y trampa” (Figura 3.10.) (Escriche, Visquert, Juan-Borrás & Fito, 2009; Kadar, Escriche, Juan-Borrás, Carot & Domenech, 2011). Para ello, se pesaban 20 g de miel en el tubo de vidrio con cuello esmerilado al que se añadían 100  $\mu$ L de un patrón interno (2-pentanol, 10  $\mu$ g/mL). A continuación, se sumergía el tubo con la miel en un baño termostatzado a 45 °C hasta cubrirla. El gas de arrastre, nitrógeno purificado, circulaba a través de la muestra con un caudal constante de 100 mL/min. En el extremo del montaje se colocaba un tubo, relleno con un absorbente (3000 mg de Tenax, TA 20-35 mesh), en el que se atrapaba la fracción volátil arrastrada por el gas.

Pasados 20 minutos del proceso de extracción, se procedía a la desorción de la fracción volátil retenida en la matriz de Tenax, utilizando un desorbedor térmico Turbo-matrix TD (Perkin Elmer, Wellesley, USA). La desorción fue realizada bajo un flujo de helio, a 220 °C durante 10 minutos, y los compuestos volátiles eran criofocados en una trampa fría a -30 °C, que se transferían directamente a la cabeza de la columna por calentamiento (rampa de temperatura 99 °C/s) de esta hasta los 250 °C.



**Figura 3.10.** Esquema del montaje del sistema “purga y trampa” para extracción de compuestos volátiles.

**Fuente:** autor

La separación de los compuestos volátiles se llevó a cabo mediante un cromatógrafo de gases (Trace GC 2000) acoplado a un detector de masas (Finnigan TRACETM MS, Thermo Quest, Austin, EE. UU.) (Figura 3.11). Equipado con una columna capilar DB-WAX (SGE, Australia) (60 m de longitud, 0.32 mm id, 1.0  $\mu\text{m}$  de tamaño poro), utilizando helio como gas portador (caudal de 1 mL/min). El programa de temperatura del horno fue: 40 °C (mantenido 2 minutos) hasta 190 °C a 4 C/min (mantenido 11 minutos) y finalmente se alcanzaron 220 °C a 8 °C/min (mantenido 8 minutos). La fragmentación para obtener los espectros de masas se llevaron a cabo mediante impacto electrónico a 70 eV<sup>+</sup>, en un rango de masas de m/z 45-433.

La identificación de compuestos volátiles se realizó comparando sus espectros de masas, tiempos de retención e índices de retención lineal (ecuación 10) (índices de Kovats) con los obtenidos a partir de estándares auténticos. Los índices de Kovats se obtuvieron inyectando un estándar de alcanos (C<sub>8</sub> a C<sub>20</sub>) en el Tenax, y aplicando el mismo programa de temperatura que las muestras.

$$RI = 100 \frac{tR(i) - tR(z)}{tR(z+1) - tR(z)} + 100z \quad \text{Eq. (10)}$$

Siendo:

*RI* = Índice de Kovats (índice de retención)

*RI(i)*: índice relativo de retención de la sustancia *i*

*R(i)*: tiempo de retención del compuesto *i*, con tiempo de retención entre el alcano *z* y el alcano *z+1*

*z*: número de átomos de carbono en el alcano *z*

*R(z)*: tiempo de retención del alcano *z*

*R(z+1)*: tiempo de retención del alcano *z+1*



Cuando no se disponía de estándares auténticos, los compuestos se identificaban comparando sus espectros de masas (valores  $m/z$  de los iones más abundantes) con los de la biblioteca de referencia NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología), Las variables utilizadas en el análisis estadístico para la diferenciación entre las mieles, fueron los datos de los compuestos semi-cuantificados, ya que no siempre estaban disponibles los estándares comerciales auténticos para todos los compuestos identificados. Estos datos se obtuvieron considerando el área relativa entre las áreas de los picos de cada compuesto y el área del pico del estándar interno, asumiendo un factor de respuesta igual a uno, los cálculos fueron hechos a partir de la ecuación (11) y expresados como  $\mu\text{g}$  de compuesto/100 g de miel (Juan-Borrás et al., 2014).

$$C_x = \frac{FR \cdot A_x \cdot C_{pi}}{A_{pi}} [\mu\text{g}/100 \text{ g muestra}] \quad \text{Eq. (11)}$$

Siendo:

FR: Factor de respuesta

$A_{pi}$ : Área del pico del patrón interno

$A_x$ : Área del pico de compuesto

$C_{pi}$ : Cantidad de patrón interno adicionado a la muestra ( $\mu\text{g}$ )

$C_x$ : Cantidad del compuesto ( $\mu\text{g}$ )



**Figura 3.11.** Desorbedor térmico acoplado a un cromatógrafo de gases con detector de masas.

**Fuente:** autor

### **3.7. Antioxidantes**

#### **3.7.1. Flavonoides y ácidos fenólicos**

Dado que la miel es una matriz compleja, 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 disolvían 3g de

muestra de miel en 15 mL de agua acidificada (pH 2, HCl 1M) hasta que estuvieron completamente diluidas. Estas disoluciones de miel pasaron a través de los cartuchos Strata-X SPE previamente acondicionados (3 mL de metanol y 3 mL de agua). Posteriormente se lavaron con 5 mL de agua acidificada 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 3 min, y las fracciones fenólicas retenidas se eluyeron con 3 mL de metanol: acetonitrilo (2:1, v: v).

Los análisis de los extractos se llevaron a cabo utilizando un cromatógrafo líquido Alliance 2695, con un detector de matriz de fotodiodos 2996 (Waters, EE.UU.) (Figura 3.12). Los flavonoides y los compuestos fenólicos se separaron en una columna Brisa LC2, C18 (250 x 4,6 mm x 5 µm) (Teknokroma, España). La fase móvil binaria consistió en acetonitrilo como fase A, y una mezcla de agua: ácido fórmico (99:1, vv:v) como fase B. Usándose las siguientes condiciones de gradiente binario: inicial de 90% de B, gradiente lineal hasta 40% de B al minuto 25, bajando hasta 20% de B al minuto 26 (manteniendo estas condiciones hasta el minuto 30), seguido de un gradiente lineal hasta las condiciones iniciales al minuto 35 min, manteniendo estas condiciones hasta el minuto 40. La columna se mantuvo a 30 °C. El caudal y el volumen de inyección fueron de 0,5 mL / min. y 10 µL, respectivamente.

Los flavonoides y ácidos fenólicos se identificaron mediante la comparación de los tiempos de retención cromatográficos y las características espectrales UV de analitos desconocidos con estándares auténticos y datos disponibles de la literatura (Merken & Beecher, 2000). Los cromatogramas se registraron entre 290 y 400 nm.

Las curvas de calibrado se construyeron mediante análisis de regresión lineal de mínimos cuadrados, relacionando área del pico de cada compuesto frente a su concentración respectiva (0,5-30 ng/mL). Se fortificó una muestra conocida con cada compuesto para construir las curvas de calibración para tener en cuenta el efecto de la matriz en el análisis. Se inyectó un control de calidad interno (una solución estándar) en el equipo como primer paso, antes de cada lote de la muestra, para garantizar la calidad de los resultados y evaluar la estabilidad del método propuesto. Los resultados cuantitativos se expresaron en mg de compuesto por 100 g de miel, y todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.



**Figura 3.12.** Cromatógrafo HPLC con detector de matriz de fotodiodos.

**Fuente:** autor

### **3.7.2. Capacidad antioxidante total**

La actividad antioxidante (AA) de las muestras se determinó mediante el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) descrito por Scherer & Godoy, (2009). Para ello, se mezclaron 0.1 mL de la muestra [diluida en metanol: agua (80:20)] con 3.9 mL de una solución metanólica de DPPH [0.025 mg/mL preparada en metanol: agua (80:20)]. La solución se agitó, después de 30 minutos, se midió la absorbancia de la muestra a 515 nm usando metanol como blanco. La cuantificación se calculó usando el compuesto Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-carboxílico) como estándar de referencia. Los resultados se expresaron en mg de Trolox equivalente por 100 gramos de miel. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

### **3.8. Propiedades reológicas**

Las propiedades reológicas dinámicas de las muestras de miel se obtuvieron con un reómetro RheoStress 1 (Thermo Haake, Karlsruhe, Alemania) (Figura 3.13) con las siguientes condiciones, temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 °C y usando un sistema de placas paralelas ( $\varnothing$  60 mm) con un espacio de 500  $\mu$ m (Oroian, Amariei, Escriche & Gutt, 2013; Oroian, 2015; Escriche, Oroian, Visquert, Gras & Vidal, 2016). Después de cargar la muestra, se esperaron 5 minutos para permitir que la muestra alcanzara la temperatura deseada. Para determinar la región viscoelástica lineal, los barridos de estrés se realizaron primero a 1 Hz. Luego, los barridos de frecuencia se realizaron en el rango  $f = 0.1$ -10 Hz a 1 Pa de tensión (región viscoelástica lineal). El software Rheowin Job (v.2.93, Haake) se utilizó para obtener los datos experimentales y calcular el módulo de almacenamiento (o elástico) ( $G'$ ), el módulo de pérdida (viscosa) ( $G''$ ) y la viscosidad compleja

( $\eta^*$ ). La viscosidad compleja  $\eta^*$  representa la resistencia total del material al flujo (Marangoni & Wesdorp, 2012) (ecuación 12). Las mediciones se realizaron por triplicado para cada muestra y condición.

$$\eta^* = \frac{\tau^*}{\omega \cdot \gamma^*} \quad \text{Eq. (12)}$$

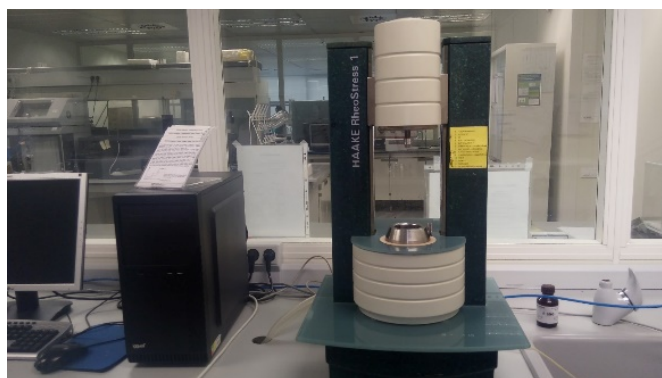
Siendo:

( $\eta^*$ ) = viscosidad compleja

( $\tau^*$ ) = amplitud máxima de esfuerzo resultante

( $\gamma^*$ ) = deformación aplicada

( $\omega$ ) = ángulo velocidad



**Figura 3.13.** Reómetro

**Fuente:** autor

### **3.9. Análisis de la cera de abeja**

#### **3.9.1. Perfil de hidrocarburos**

La preparación de las muestras se realizó pesando 0.025 g de muestra en un matraz aforado de 5 mL, al el cual se adicionaban 100  $\mu$ L de escualeno (4 mg/mL), se aforaba con cloroformo (Scharlau al 99%) y se agitaba. Finalmente esta se dejaba reposar hasta la completa disolución de la cera (aprox. 15 min). Seguidamente se inyectaban 2  $\mu$ L de muestra en el cromatógrafo.

El análisis cromatográfico se llevó a cabo mediante un cromatógrafo de gases CE Instruments (CG 8000 TOP), equipado con detector de ionización de llama (FID), la columna usada fue una columna capilar (SGE) de 25 m x 0.32 mm, i.d. 0.1  $\mu$ m (Figura 3.14). El modo de inyección fue en splitless, y el gas portador fue helio con un flujo de 1 mL/min. La temperatura del inyector fue de 275  $^{\circ}$ C, la del detector 330  $^{\circ}$ C y el horno se programó con una temperatura inicial de 70  $^{\circ}$ C durante 2 minutos, y una rampa de 5

°C/min hasta llegar hasta 310 °C, manteniéndose durante 5 minutos, y finalmente se alcanzaron 330 °C a 10 °C/min, manteniéndose durante 35 minutos.

La identificación de los diferentes hidrocarburos en las muestras se ha realizó comparando los tiempos de retención obtenidos de cada compuesto con los de los patrones de referencia inyectados en las mismas condiciones. Para la cuantificación de los hidrocarburos, se utilizó el método del patrón interno (escualeno). La concentración de los compuestos se calculó a partir del procedimiento descrito por Serra Bonvehí & Orantes Bermejo, 2012.



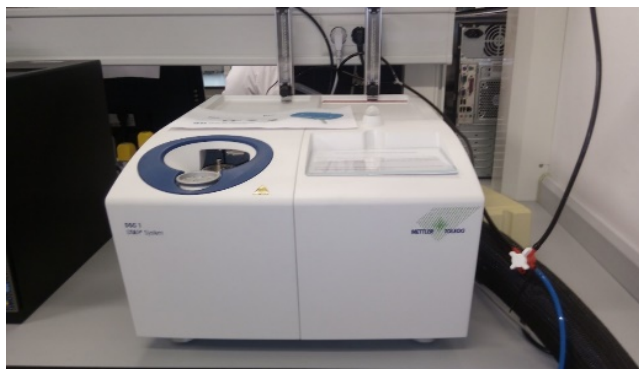
**Figura 3.14.** Cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (FID).

**Fuente:** autor

### **3.9.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Las propiedades térmicas de las muestras se analizaron por medio de un calorímetro diferencial de barrido (Mettler Toledo, DSC1, Suiza) equipado con un enfriador interno (Figura 3.15). El gas de purga utilizado fue nitrógeno (pureza del 99,99% a 20 mL/min). El equipo fue calibrado con indio y zinc. Las muestras (entre 9 y 12 mg) se colocaron en bandejas de aluminio (40  $\mu$ L, ME-26763, Al-Crisoles), se cubrieron, se cerraron herméticamente y se pesaron (balanza analítica Mettler Toledo XS205, Suiza). Un crisol vacío se consideró como la muestra de referencia. Con el fin de obtener la entalpía de fusión y cristalización ( $\Delta H_m$  y  $\Delta H_c$ ) y la temperatura de fusión y cristalización ( $T_m$  y  $T_c$ ), las muestras se sometieron a las siguientes condiciones (denominada condición rápida): enfriamiento desde 25 °C a 5 °C a una velocidad de 5 °C/min, mantenida durante 5 min; calentamiento desde 5 °C a 65 °C a una velocidad de 5 °C/min, mantenida durante 5 min. Calentamiento de 65 °C a 85 °C y enfriamiento de 85°C a 5°C a una velocidad de 5 °C/min (Buchwald et al., 2008). Además, con la finalidad de obtener todas las posibles temperaturas de fusión y cristalización asociadas a las formas polimórficas de los lípidos de la

cera, éstas fueron sometidas a las siguientes condiciones (denominada condición lenta): calentamiento desde 20 °C a 75 °C a una velocidad de 1 °C/min; enfriamiento desde 75 °C a 20 °C a una velocidad de 1 °C/min (Gaillard et al., 2011).



**Figura 3.15.** Calorímetro Diferencial de Barrido (DSC).

**Fuente:** autor

### **3.10. Referencias de Material y Métodos**

AOAC [Association of Official Analytical Chemists]. (2000). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 17<sup>th</sup> ed. Virginia. USA: Arlington.

BOE núm. 145, 18 de junio de 1986. Orden ministerial RCL 1986/1975 del 12 de junio de 1986. Métodos oficiales para el análisis de la miel.

Bogdanov, S. (2009a). Harmonized methods of the International Honey Commission. Available at: <http://www.bee-hexagon.net/en/network.htm>

Chirife, J., Zamora, M. C. & Motto, A. (2006). The correlation between water activity and % moisture in honey: Fundamental aspects and application to Argentine honeys. *Journal of Food Engineering*, 72(3), 287-292.

Crane, E. (1973). Honey sources of some tropical and subtropical countries. *Bee World*, 54, 177-186.

Escriche, I., Oroian, M., Visquert, M., Gras, M. L. & Vidal, D. (2016). Rheological properties of honey from Burkina Faso: Loss modulus and complex viscosity modeling. *International Journal of Food Properties*, 19(11), 2575-2586.

Escriche, I., Visquert, M., Juan-Borrás, M. & Fito, P. (2009). Influence of simulated Industrial thermal treatments on volatile fractions of different varieties of honey. *Food Chemistry*, 112, 329-338.

Gaillard, Y., Mija, A., Burr, A., Darque-Ceretti, E., Felder, E., & Sbirrazzuoli, N. (2011). Green material composites from renewable resources: Polymorphic transitions and phase diagram of beeswax/rosin resin. *Thermochimica acta*, 521(1-2), 90-97.

Gosling, W. D., Miller, C. S. & Livingstone, D. A. (2013). Atlas of the tropical West African pollen flora. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 199, 1-135.

Hyde, M.A., Wursten, B.T., Ballings, P. & Coates Palgrave, M. (2018). Flora of Mozambique: Home page. Available at: <https://www.mozambiqueflora.com/index.php>.

Johannsmeier, M. F. (2016). *Beeplants of South Africa. Sources of nectar, pollen, honeydew and propolis for honeybees*. South African National Biodiversity Institute.

Juan-Borrás, M., Domenech, E., Hellebrandova, M. & Escriche, I. (2014). Effect of country origin on physicochemical, sugar and volatile composition of acacia, sunflower and tilia honeys. *Food Research International*, 60, 86-94.

Kadar, M., Juan-Borrás, M., Carot, J. M., Domenech, E. & Escriche, I. (2011). Volatile fraction composition and physicochemical parameters as tools for the differentiation of lemon blossom honey and orange blossom honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(15), 2768-2776.

Marangoni, A. G. & Wesdorp, L. H. (2012). *Structure and properties of fat crystal networks*. CRC Press. Merken & Beecher, 2000.

Oroian, M. (2015). Influence of temperature, frequency and moisture content on honey viscoelastic parameters—Neural networks and adaptive neuro-fuzzy inference system prediction. *LWT-Food Science and Technology*, 63(2), 1309-1316.

Oroian, M., Amariei, S., Escriche, I. & Gutt, G. (2013). Rheological aspects of Spanish honeys. *Food and Bioprocess Technology*, 6(1), 228-241.

Palynological Database on line, 2018, Available at: <https://www.paladat.org/info>.

Sancho, M. T., Pascual-Maté, A., Rodríguez-Morales, E. G., Osés, S. M., Escriche, I., Periche, Á. & Fernández-Muiño, M. A. (2016). Critical assessment of antioxidant-related parameters of honey. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(1), 30-36.

Scherer, R. & Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112(3), 654-658.

Schüler, L. & Hemp, A. (2016). Atlas of pollen and spores and their parent taxa of Mt Kilimanjaro and tropical East Africa. *Quaternary International*, 425, 301-386.

Serra Bonvehí & Orantes Bermejo. (2012). Physicochemical properties, antioxidant activity and cellular protective effects of honeys from southern Africa. *Food Chemistry*, 133(4), 1544-1550.

Visquert, F. M. (2015). *Influencia de las condiciones térmicas en la calidad de la miel* (Doctoral dissertation). Universitat Politècnica de València.

Yao, L. & Wang, T. (2012). Textural and physical properties of biorenewable “waxes” containing partial acylglycerides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(1), 155-166.



## **4. RESULTADOS**



**4.1. Quality parameters, pollen and volatile profiles of honey from  
North and Central of Mozambique**

Fernando Tanleque-Alberto, Marisol Juan-Borrás, Isabel Escriche

*Food Chemistry*

*277, 543-553 (2019)*



## Abstract

Honey from different provinces of North and Central Mozambique was characterised considering their physicochemical quality parameters, colour, sugars, total antioxidants, pollen analysis and volatile profile. Flora that surrounds the hives, and the apicultural practices also influence in their characteristics. According to a similar pollen spectrum, eight types of honey were found. In these, the predominant pollens were: I-Astragalus type; II-*Acanthus* sp; III-Celastraceae; IV-Brassicaceae; V-Anacardiaceae and Astragalus type; VI-Astragalus type and Myrtaceae; VII-Asteraceae family and VIII-unknown. Group I (from Nampula), specially distanced itself from the others mainly due to the special abundance of certain compounds (alcohols, aldehydes, esters, acids and terpenes). The presence of furan compounds largely identified in Sofala and Manica honeys could be due to because of inadequate beekeeping practices or storage conditions. A discriminant analysis correctly classified 96.7% of the groups, being electrical conductivity and moisture followed by the volatile compound 3-Methylbutan-1-ol and the free acidity, the variables that most contributed.

**Keywords:** Mozambique, honey, pollen, physicochemical quality parameters, volatile compounds.

## 1. Introduction

Mozambique, located in the Southeast coast of Africa is one of the poorest countries in the world. Here, apiculture does not play an important social, economic or environmental role but it has potential to increase the sustainability of poor rural communities (Bradbear, 2005; Serem & Bester, 2012). North and Central regions of Mozambique enjoy a favourable climate and have sufficient natural resources, particularly vast forest areas rich in melliferous flora ideal for beekeeping. At present, honey production in Mozambique is very low, about 600 tons/year (FAOSTAT, 2016), with a growing trend in the last 5 years. However, due to the availability of agro-ecological resources, the production capacity could reach 3,600 tons/ year (Jooster & Smith, 2004).

In Mozambique, there are several possible benefits to beekeeping. It could be an attractive income generating activity for smallholder farmers and be exploited by women of rural populations. There is no doubt that beekeeping can help generate social change and play an important role in society while creating sustainable livelihoods. In addition,

it can favour the development of many different sectors within society: vendors, carpenters who manufacture beehives, garment makers, protective clothes, and packaging processors. All this keeping in mind the contribution of apiculture for the development of agriculture and the environment associated with the increase of pollination.

In the last years, the world market demands differentiated agro-alimentary products with specific characteristics based on the following criteria: botanical or geographical origin, quality and safety, specific organoleptic or nutritional characteristics, among others (Juan-Borrás, Domenech, Hellebrandova, & Escriche, 2014). For this reason, there is a large number of global research studies about the characteristics of honey; however, there are very few focused on properties of African honeys. Among these, it is worth mentioning those papers of different African countries: Ethiopia (Sime, Atlabachew, Redi-Abshiroand, & Zewde, 2015); Burkina Faso (Meda, Lamien, Romito, Millogo, & Nacoulma, 2005; Nombéré, Schweitzer, Boussim, & Rasolodimby, 2010; Paul, Issa, Kwamé, & Joseph, 2013; Escriche, Oroian, Visquert, Gras, & 52 Vidal, 2016); South Africa (Serem & Bester, 2012); Sudán (Makawi, Gadkariem, & Ayoub, 2009); Túnez (Martos, Cossentini, Ferreres, & Tomas-Barbera, 1997); Morroco (Malika, Mohamed, & Chakib, 2005) and Mozambique (Escriche, Tanleque-Alberto, Visquert, & Oroian, 2017). Generally, those papers are focused on physicochemical and rheological properties. However, they do not deal with other important characteristics appreciated by the consumers such as; aroma and colour, or even the origin (botanical or geographical) that also provide added value in the marketplace. With respect to origin, pollen present in honey is "the witness" of the flowers that the bee has visited, since its entrainment by adhesion occurred when they collect the nectar. Therefore, the pollen analysis (consisting in the recognition of the pollen grains morphology of the different botanical species) is a powerful tool that allows to knowing the botanical and geographical origin of honey (Oddo et al., 2004; Juan-Borrás et al., 2014).

Considering Mozambiquean honey, there is an almost total lack of scientific data, therefore, as a result, it would be interesting to expand its knowledge, especially related to quality indicators. Advertising could attract the attention of local Mozambiquean authorities in charge of the national regulation of this product. This will facilitate its quality control, thus promoting the commercialization in local and international markets and to support and further develop the apiculture in this country. All this in context of the mandatory fulfilment of the international requirements with regards to specific quality criteria

parameters (Council Directive 2001/110 relating to honey, 2002) and intrinsic characteristic that also provide added value in the marketplace.

Taking this into consideration, the aim of this work was to characterise honey from different provinces of North and Central Mozambique in terms of their physicochemical quality parameters, colour, sugars, pollen analysis and volatile profile. This will serve as useful information for the future regulation of honey from Mozambique.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Collection samples*

Seventy-five honey samples from northern and central Mozambique were analysed in the present study: 20 from Nampula (districts of Moma, Angoche and Ribáuè) in the north and 15 from Zambezia, 20 from Manica, and 20 from Sofala, in the centre. Each sample consisted of 750 g and collected in 2014 and 2015. Honey from Nampula and Zambezia was obtained using traditional beehives (made with local resources such as twigs, trunks and barks) and harvesting methods. However, samples from Sofala (packaged by Mozambique honey Company) and the majority of Manica were obtained and processed using more modern procedures.

### *2.2. Physicochemical quality parameters, colour and sugar analyses*

The methods of the International Honey Commission (Bogdanov, 2009a) were applied to determine the physicochemical quality parameters: Moisture by refractrometry (Abbe-type T1 Atago, Washington, USA, and the Chataway table); hydroxymethylfurfural (HMF) by HPLC-UV with a Compact LC 1120 (Agilent Technologies California, USA) using a column ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6 x 150 mm, 5 µm particle size, Agilent Technologies, USA); with isocratic mode, water: acetonitrile (25:75); electrical conductivity by electrical conductivity by a conductimeter C830 (Crison Instrument, Barcelona, Spain,); pH, free and lactonic acidity by potentiometric titration with a 905 Titrando (Metrohm, Herisau, Switzerland). Furthermore, colour was measured using a millimeter Pfund scale Honey Colour Analyzer C221 (Hanna Instruments, Barcelona, Spain) (Escriche et al., 2016). Water activity ( $a_w$ ) was determined at 25 °C ( $\pm$  0.2 °C) with an electronic dewpoint water activity meter, Aqualab Series 4 TE (Decagon Devices, Washington, USA), fitted with a temperature-controlled system (Escriche et al., 2016). The content of sugar samples (glucose, fructose, and sucrose) was determined with a HPLC Compact LC 1120 (Agilent Technologies, California, USA), coupled to an Evaporative

Light Scattering detector 1200 (Agilent Technologies, Ratingen, Germany), equipped with a chromatographic Carbohydrate column (4.6 x 250 mm, 4 µm particle size, Waters, Ireland). The antioxidant activity was measured based on the scavenging activities of the stable 2,2- diphenyl- 1- picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma- Aldrich, Madrid, Spain), in a UV-Vis spectrophotometer Helios alpha (Thermo Scientific, England) (Juan- Borrás, Soto, Gil- Sánchez, Pascual- Maté, & Escriche, 2017). All determinations were carried out in triplicate.

The laboratory where this study was carried out (Laboratory of Quality Control of Honey and apiculture products of Universitat Politecnica de Valencia) participated with the described methods in the last edition (June-August 2018) of “FAPAS® Proficiency Test specifically designed for Quality indicators of Honey” (accredited by UKAS as complying with the requirement of ISO/IEC 17043:2010). The z-score values resulted from this last edition for all the parameters analyzed in the present study ranged from -0.2 to 1.8. Considering that acceptable range must be  $-2 \leq z \leq 2$ , the validity of the analytical methods is proven. Other authors also reported the Proficiency Test procedure as the best way to achieve this goal (Camino-Sánchez, et al., 2012; Anagnostopoulos & Miliadis, 2013; De Girolamo, et al., 2017).

The total antioxidant activity in honey is the only parameter, which was not a target of the FAPAS Proficiency Test. For this reason, this parameter had to be validated by an internal and separate procedure [linearity=0.9982; repeatability estimated as RSD=5.3% and reproducibility=8.0 (n=5) and accuracy calculated as recovery=84%-110%].

### 2.3. Pollen analysis

The melissopalynological analyses were carried out as reported by Juan-Borrás et al., (2014). In brief, 10 g of honey was dissolved in 20 mL of acidulated water (sulphuric acid, 5%) and then centrifuged. After the supernatant was discarded, and the sediment was re-dissolved with distilled water and centrifuged again. The residue obtained was then observed under ×40 magnification using a Light optical microscope (Zeiss Axiolab, Göttingen, Germany). Pollen grains were identified considering general palynological databases (Gosling, Miller, & Livingstone, 2013; Schüller & Hemp, 2016; Palynological Database on line, 2018; Hyde, Wursten, Ballings, & Coates Palgrave, 2018); and the existing information about the flora present in the areas of honey collection (Crane, 1973; Johannsmeier, 2016). In the same manner to what was performed for ensuring the quality



physicochemical parameters, colour and sugar analyses results, this laboratory has participated in one of the few Proficiency Tests specifically designed for pollen analysis in honey, organized by the “*Laboratorio Arbitral Agroalimentario-Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (LAA-MAPAMA) (Spain)*” in cooperation with “*Gabinete de Servicios para la Calidad (SGCLA)*”. In this case our Z-score was  $-0.07$  (within the before mentioned acceptable range), which indicates that the validity of the pollen analysis is demonstrated.

#### 2.4. Volatile compound analysis

The extraction of volatile compounds was done by the purge and trap methodology ( $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 20 min) using purified nitrogen ( $100\text{ mL min}^{-1}$ ) (Juan-Borrás et al., 2014). The compounds were trapped in a glass tube packed with Tenax TA (20–35 mesh), thermally desorbed ( $220\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 10 min at  $10\text{ mL min}^{-1}$  helium flow), cryofocused in a cold trap at  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , and then transferred into a capillary column by heating the cold trap to  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$  (rate of  $99\text{ }^{\circ}\text{C/s}$ ) using a TurboMatrix TD (Perkin Elmer TM, CT-USA). Thereafter, the extracted volatile compounds were separated and identified in a GC–MS (Finnigan TRACETM MS, Thermo Quest, Austin, USA) equipped with a DB-WAX capillary column (SGE, Australia) (60 m length, 0.32 mm i.d.,  $1.0\text{ }\mu\text{m}$  film thickness), using helium as a carrier gas (flow rate of  $1\text{ mL min}^{-1}$ ). The temperature oven programme was: from  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  (2-minute hold time) to  $190\text{ }^{\circ}\text{C}$  at  $4\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  (11-minute hold time) and finally to  $220\text{ }^{\circ}\text{C}$  at  $8\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  (8-minute hold time). Electron ionization mass spectra were recorded in impact ionization mode at  $70\text{ eV}$  (mass range of  $m/z$  33–433). 2-Pentanol was used as an internal standard. Three extracts were obtained for each sample.

The identification of isolated volatile compounds was performed by comparing their mass spectra, retention times and linear retention indices against those obtained from authentic standards. When authentic standards were not available, the compounds were tentatively identified by comparing their mass spectra ( $m/z$  values of the most important ions) with those from the NIST library (National Institute of Standards and Technology) as well as the linear retention indices of all the compounds. These indices were obtained by injecting a range of  $\text{C}_8$  to  $\text{C}_{20}$  alkanes into the Tenax applying the same temperature-programme as the samples. The variables used in the statistical analysis for differentiation between honeys were the semi-quantified compounds data since authentic commercial standards for all identified compounds were not always possible. This data was obtained considering the relative area between the peak areas of each compound and the peak area

of the internal standard, assuming a response factor equal to one and expressed as  $\mu\text{g}$  of compound/100 g of honey (Juan-Borrás et al., 2014).

### 2.5. Statistical analysis

An analysis of variance (ANOVA) (using Statgraphics Centurion for Windows) was carried out to study the influence of the province where the harvesting took place on the physicochemical quality parameters, colour, sugars and volatile compounds. The method used for multiple comparisons was the LSD test (least significant difference) with a significance level  $\alpha=0.05$ . Furthermore, a Principal Component Analysis (PCA) data was applied by means of the software Unscrambler X.10. Stepwise linear discriminant analyses were carried out using the ‘forward’ procedure, which begins with no variables in the model and adds the variables with the greatest discriminating power (SPSS 16.0).

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Physicochemical quality parameters, colour and sugar content

With the aim of facilitating the comparison of variability patterns between “province” where the harvesting took place, Figure 4.1.1. shows the box and whisker plots for all the physicochemical quality parameters (moisture,  $a_w$ , HMF, electrical conductivity, total antioxidant, free acidity, lactic acidity and pH) as well as fructose, glucose, fructose/glucose ratio (F/G) and colour Pfund. According to the ANOVA analysis performed (data not shown), most parameters among provinces showed statistically significant differences, with electrical conductivity, colour, and F/G ratio being the only exception. However, the main cause of these exceptions is primarily due to the large range of variability observed for these parameters. For example, these values in Nampula samples ranged from 0.30 to 1.54 mS/cm; 54 to 152 mm Pfund scale; and 0.90 to 1.52 (F/G ratio), respectively. Considering the F-ratio values from ANOVA, moisture and  $a_w$  are the parameters most affected by the factor province.

In general, Manica and Sofala samples had the lowest moisture contents, fulfilling the international criteria for moisture (less than 20 g/100 g) (Council Directive 2001/110 relating to honey, 2002). This condition has a positive influence on the quality of the honey harvested in both provinces because low moisture levels slow down the probability of fermentation. The high stability of the honey from both provinces, especially from Manica, also remains patent due to the low levels of  $a_w$ . However, in Nampula, some samples exceeded the recommended limit of moisture and because of their high  $a_w$ , are at

risk of presenting different problems of quality alteration. All these alterations, although not harmful for human health, may be the cause of negative appearance and consequently having an adverse effect on its market value. The highest moisture levels found in honey samples from specific areas of Mozambique as is the case of Nampula, could be associated with pluviosity conditions such as in fact, Nampula located in the north, is humid with an average annual rainfall around 2000 mm, in Manica and Sofala, in the centre, only 1000 mm (Zandamela, 2008). Different authors reported that the fermentation processes of honey could be accelerated in humid areas and rainy seasons, resulting in a more vulnerable honey (Tornuk et al., 2013; Silva, Gauche, Gonzaga, Costa, & Fett, 2016). In addition to the climate conditions, inadequate beekeeping practices is another important factor that can affect the final moisture content; for instance, if it is extracted before the bees are able to dry it with their wings or if the honey is stored (after harvesting) in a very humid environment (due to the honey's higroscopicity). Keeping in line with good beekeeping practices, another important parameter to consider is HMF, since it can increase during handling, extraction, conditioning, or storage operations and mostly as a result of thermal treatments (time and temperature) (Silva et al., 2016). In the present work HMF is ranged by province among the following minimum and maximum values: 1.1-65.0 mg/kg in Nampula; 25.3-60.6 mg/kg in Zambezia; 11.2-114.5 mg/kg in Manica and 2.2-47.19 mg/kg in Sofala. Although, in many cases these honeys exceeded the generally admitted maximum of 40 mg/kg, it must be considered that Mozambique has a tropical climate and therefore this parameter up to 80 mg/kg is permitted (Council Directive 2001/110 relating to honey, 2002). When this value is exceeded, honey is deemed unacceptable to be commercialised. The great dispersion observed for HMF within the same province, highlights the importance of the beekeepers role. If some beekeepers obtain honey with very low HMF values, others in the same region should do the same. All this suggests that training in good practices is the first step in guaranteeing good quality honey that has the potential of being sold on international markets.

In contrast to the above mentioned parameters, the dispersion of colour in most cases (54-152 mm Pfund in Nampula; 140-150 mm Pfund in Zambezia; 88-150 mm Pfund in Manica and 84-137 mm Pfund in Sofala) and electrical conductivity values (0.30-1.54 mS/cm in Nampula; 1.21-1.39 mS/cm in Zambezia; 0.46-1.33 mS/cm in Manica and 0.39-1.36 mS/cm in Sofala) could be logical as a consequence of the flora present in the different geographic areas. This is because both parameters directly depend on the nectar

or secretions of plants visited by bees. Since all Zambezia samples had electrical conductivity values above 0.80 mS/cm, they could be considered as honeydew honeys. However, in the other provinces, the electrical conductivity was indistinctly above and below this value, for this reason, these honeys could come from both nectar of flowers or secretions of plants (Council Directive 2001/110 relating to honey, 2002). The wide dispersion in the values of electrical conductivity observed in the present work is in line with those reported for honey samples from Manica and Sofala (Zandamela, 2008), although these authors found values of up to 2.62 mS/cm. Colour and electrical conductivity parameters are related to each other, because the darker the colour, the higher the mineral content resulting in higher conductivity (Juan-Borrás et al., 2014). Moreover, this trend could be generally correlated to the antioxidant activity levels to the point that, in general, the greater the intensity of colour and conductivity, the higher the phenolic total content of a honey (Juan-Borrás et al., 2017). In fact, in the present work, one sample from Nampula simultaneously had the highest total antioxidant activity (40.0 mg Trolox equivalent/100 g), colour (152 mm Pfund) and electrical conductivity (1.54 mS/cm).

As usual in honey, fructose in all samples was the most abundant sugar, followed by glucose. The average values for fructose was 39.1, 41.3, 45.1 and 39.2 g/100 g, and for glucose was 32.5, 32.4, 35.7 and 30.3 g/100 g, respectively for Nampula, Zambezia, Manica and Sofala. The observed differences are attributed to the variable vegetation existing in provinces. The level of sucrose was less than 1g/100 g in all cases (LOQ, Limit of Quantification of the method).

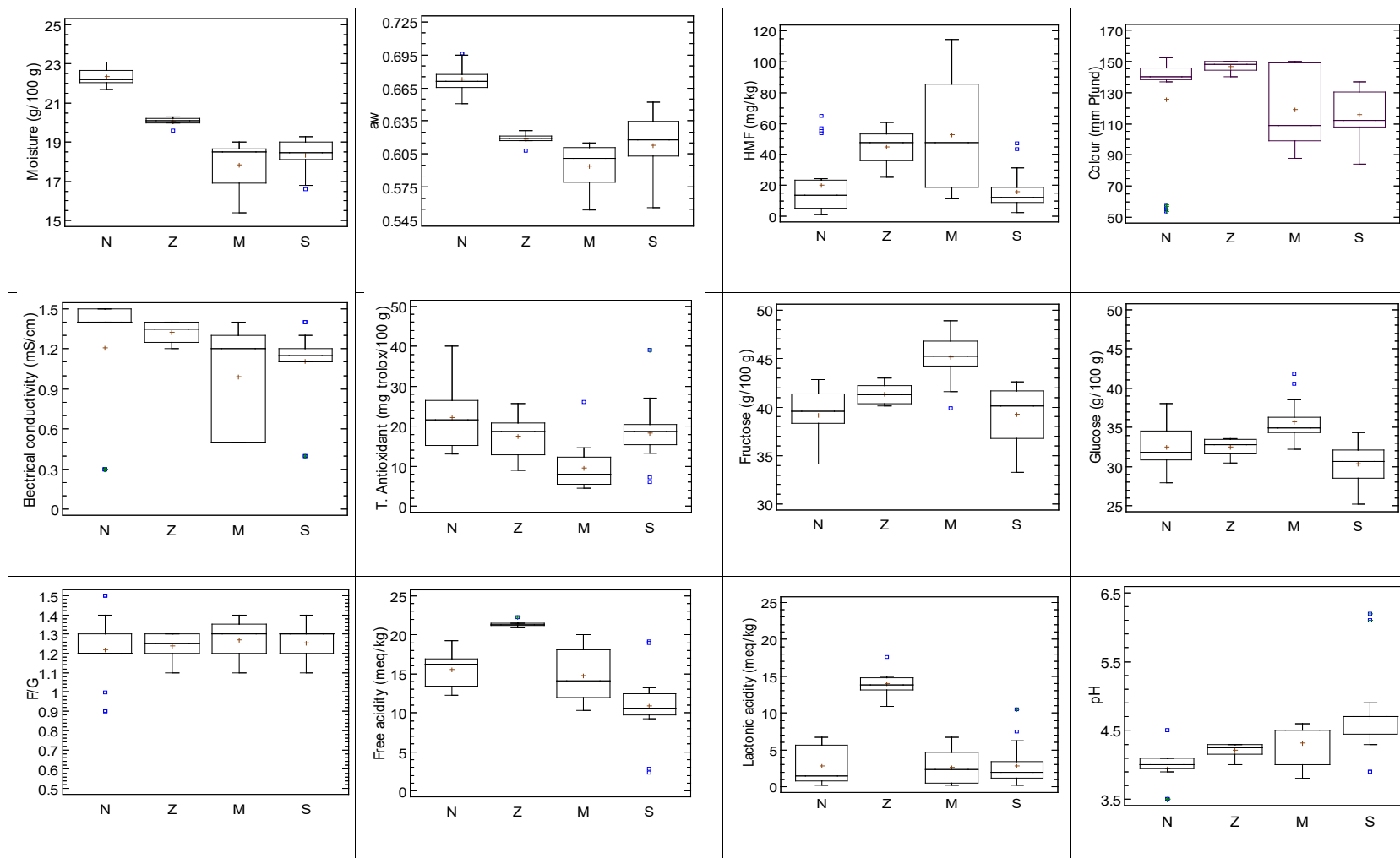
The fructose and glucose ratio (F/G) provides an indication of the capability of crystallisation of honey (Tosi, Lucero, & Bulacio, 2004). Although this characteristic does not affect the healthiness of honey, the consumer tends to reject crystallized honey, hence its importance as a criterion of quality in terms of its commercialisation. Crystallisation presents the additional problem of increasing the  $a_w$ , on the upper layer, which could lead to enzymatic or microbial spoilage through the growth of osmophilic yeasts (Silva, et al., 2016). In the present work, the average values of F/G ratio, around 1.2, were very similar in the four provinces, the most extreme values being in Nampula province which ranged from 0.9 to 1.5. Considering that the lower the ratio, the quicker the crystallisation, this province could have samples that are more susceptible to granulation (Juan-Borrás et al., 2014).

Free acidity is considered, as a quality parameter since its high levels is attributable to fermentation by microorganisms. However, recent studies showed that there is no correlation between yeasts and moulds count and the acidity of honey, but rather this parameter could be more related to the origin of honey such as bee species, flowering, climate or harvest time (Ananias, Melo, & Moura, 2013). In reality, honey is characterized by the presence of organic acids in equilibrium with lactone, internal esters and some inorganic ions such as phosphates, sulphates and chlorides (Silva et al., 2016). In any case, European legislation establishes 50 meq/kg as the maximum limit permitted for marketing (Council Directive 2001/110 relating to honey, 2002). In the present study, significant differences between provinces with respect to this parameter were found, with average total values of: 15.5, 21.5, 14.7 and 10.9 meq/kg in Nampula, Zambezia, Manica and Sofala, respectively, and a maximum of 22.3 meq/kg value in a Zambezia sample. It is noteworthy that the samples studied in this work were far from this maximum level established as the quality criterion. However, in previous studies about honey from Mozambique (in Sofala and Manica provinces) this value sometimes reached to 49.6 meq/kg (Zandamela, 2008). In other African countries the ranges of variability of this parameter were similar to those of the present study. Terrabe, Diez & Heredia (2002) reported between 10.3 to 102.0 meq/kg in honey from Morocco and Nair & Maghraoui (2017) from 10.0 to 25.0 meq/kg in honey from Algeria.

The lactic acidity, considered as the acidity reserve when the honey becomes alkaline, (Baroni et al., 2009), ranged from a minimum of 0.1 meq/kg in one Nampula sample to 17.6 meq/kg in one Zambezia sample. These values are similar to those found in honey samples from Central and South of Mozambique (1.2 to 15.3 meq/kg) (Zandamela, 2008) as well as in honey from other African countries such as Algeria (2.0 to 5.1 meq/kg) (Nair & Maghraoui, 2017); Morocco (0.5 to 18.5 meq/kg) (Terrab et al., 2002). Ethiopia (Belay, Solomon, Bultossa, Adgaba, & Melaku, 2013), Tanzania (Gidamis, Chove, Shayo, Nnko, & Bangu, 2004); and from Burkina Faso (Paul, et al., 2013).

In the present study, in general, pH values ranged from 3.5 to around 4.5. Other authors reported similar pH values in African honeys: 3.50–4.43 from Algeria; 3.80–4.50 Morocco; 3.80–4.50 Tunisia; 3.58–4.84 Burkina Faso and 3.87 to 5.12 from South Africa. However, several samples in Sofala province showed values of around 6.3, which could be considered as characteristic of certain types of honey (Zandamela, 2008).

In summary and despite the different outliers specific values shown in some cases, the variability of the quality parameters evaluated in Mozambiquean honey was within the range reported in other types of African honey.



**Figure 4.1.1.** Box and whisker plots for all the physicochemical parameters considered in this study: moisture, aw, hydroxymethylfurfural (HMF), electrical conductivity, colour Pfund, glucose, fructose, F/G ratio, pH and acidity.

### 3.2. Pollen analysis

There is very little data available about the types of pollen that should be present in honey from Mozambique. For this reason, classifying these honeys according to its botanical origin was a difficult challenge. Considering this circumstance, everything possible was done to reach the maximum classification detail: the taxonomic level (taxa) of identification achieved in this type of honey was always to family, and to genus, specie or pollen type whenever possible. Pollen type includes species and/or genus present in the area, which have the same floral spectra and the same, or similar, pollen morphology (Acebes Ginove's et al., 2001).

In the present study the simplest qualitative analysis was carried out by identifying the most numerous pollen grains and those grains with specific morphologic characteristics (Moar, 1985). The abundance of each taxa (frequency of pollen appearance) was categorized as follows: dominant or predominant pollen (D:> 45%); secondary pollen (S: 16-45%); important minor pollen (I: 3-15%); minor pollen (m: 1-3%) and pollen present (p: <1%) (Louveaux, Maurizio, & Vorwohl, 1978).

A total of 25 taxa were recorded belonging to 16 families (Acanthaceae, Anacardiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Campanulaceae, Caryophyllaceae, Celastraceae, Combrataceae, Convolvulaceae, Cyperaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Myrtaceae, Nymphaeaceae, Pedaliaceae and Poaceae) as well as one taxa unidentified. The most common family that occurred in the samples was Fabaceae (80%), followed by Asteraceae (65%) and Poaceae (60%). The family with the most recorded taxas was Fabaceae with 5 representatives (*Acacia* sp., *Brachystegia* sp., *Astragalus* type, *Vicia* type and *Mimosa* sp.) followed by Asteraceae with 4 (*Vernonia* sp., *Sigesbeckia* sp. and two unidentified). Despite the high conductivities found in these types of honey (which leads to think that those belong to a honeydew honey type), however, honeydew elements were not observed in a significant amount in the microscope. This fact has been observed in Mozambiquean honey as well as in other countries with low levels of humidity (Zandamela, 2008).

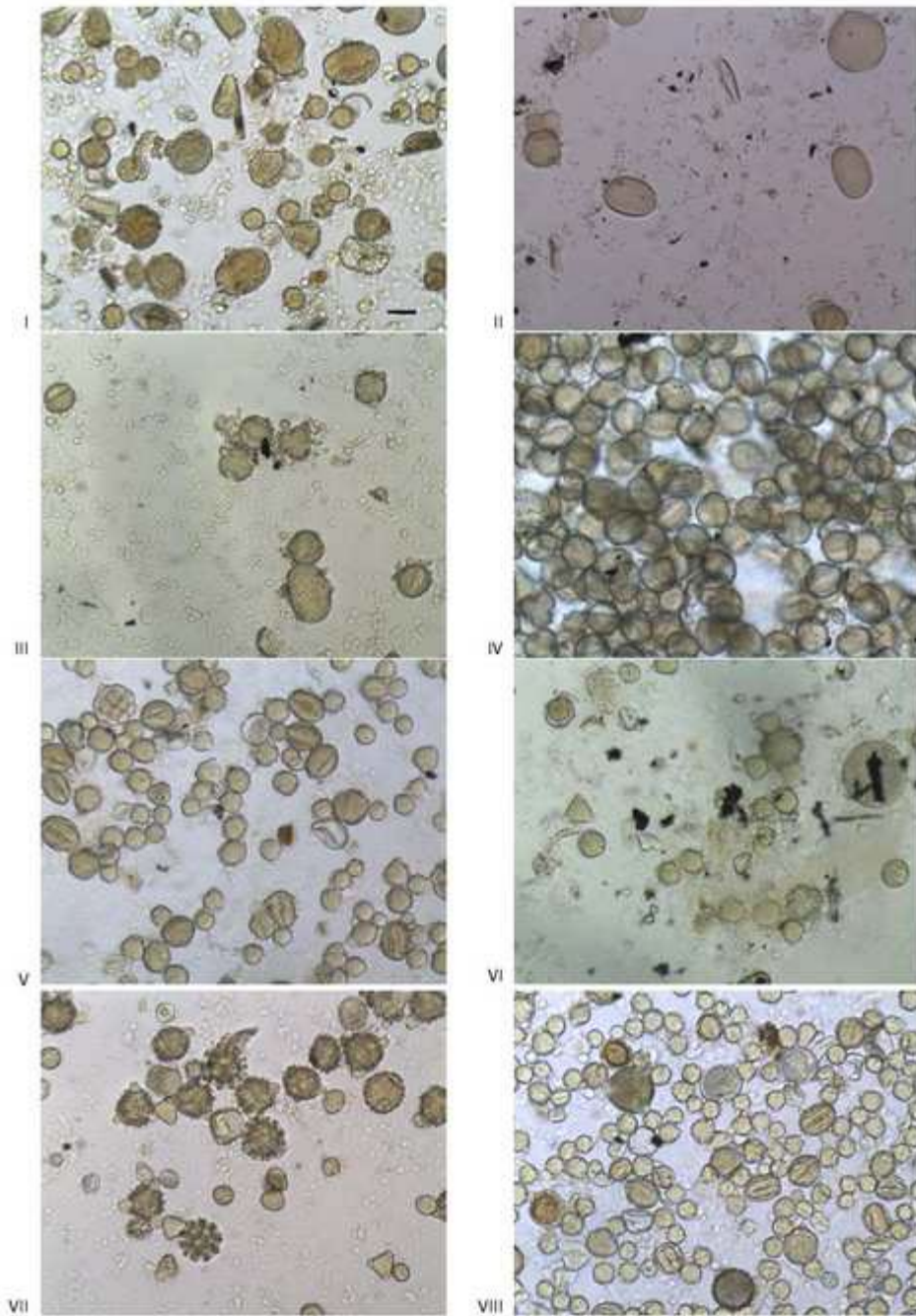
The melissopalynological analysis permitted to classify the honey samples in terms of their geographical and botanical origin. Taking into account the similarity of the pollen spectrum of the honeys analyzed in each region, it was possible to cluster them. In this sense, within the Nampula region (N), the 20 samples analyzed were grouped into four types corresponding to their similarity in floral origin: group I. Predominant pollen,



Astragalus type (samples N-11 to N-20); group II. Predominant pollen, *Acanthus* sp. (samples N-3 to N-6); group III. Predominant pollen, Celastraceae family with a presence greater than 85% (samples N-7 to N-10) and group IV. Predominant pollen, Brassicaceae family with a presence greater than 90% (samples N-1 to N-2). In the Sofala region (S), the 20 samples were clustered into 3 differentiated groups: group V. Predominant pollen, Anacardiaceae family and Astragalus type (samples S-1 to S-14); group VI. Predominant pollen, Astragalus type and Myrtaceae family (samples S-15 and S-16) and group VII. Predominant pollen, Asteraceae family (samples S-17 to S-20). In the Manica region (M), the 15 samples were placed into three different groups: group VIII. Predominant pollen, *unknown 1* (samples M-7 and M-8). The rest of the Manica samples (M-1 to M-4 and M-11, M-14 and M-15) and (M-5, M-6, M-9, M-10, M-12 and M-13) share their pollen spectrum with the previously mentioned groups V and VII respectively. Samples from the Zambezia region (Z) (Z-1 to Z15) also showed similar pollen spectrum of group V.

It is important to mention that the sediment of the sample belonging to Group IV showed an anomaly of high pollen abundance and should be interpreted with caution. This is because the presence of a given pollen type in a honey could be come from not only to the nectar but also to other sources: inclusion of pollens inside the hive; inclusion of pollens during the extraction process of the honey or even aerial contamination. For this reason, in the case of Group IV pollen analysis does not provide any reliable information about botanical source. It was observed in the present study that the honey from Nampula could be classified into four exclusive types (group I to IV) not found in the other regions. This is logical since the area of Nampula presents specific tropical vegetation due to the high level of humidity in this geographical area. The rest of the provinces, located towards the south-central part of the country, share, in a certain way, a characteristic and similar vegetation which is very different from the northern zone (Nampula). This fact implies that the pollen spectrum of honeys from these zones sometimes share similarities.

Table 4.1.1 shows the summarized result of the 8 types of honey according to the similar pollen spectrum (group I to group VIII). Within each group the taxa found have been categorized by their abundance. In short, 4 different types of honey were found in the Nampula region, 3 in Sofala and Manica, and 1 in Zambezia. Figure 4.1.2 shows, as an example, the light microscope photomicrographs (20x magnification) of the eight pollen spectrum found in the Mozambiquean provinces studied.



**Figure 4.1.2.** An example of light microscope photomicrographs (x 20) of the eight pollen spectrum (groups I to VIII) found in the Mozambiquean regions (Nampula, Zambezia, Manica and Sofala). Scale bars = 20  $\mu$ m.

**Table 4.1.1.** Types of honey according to the similar pollen spectrum (group I to group VIII). Taxas were classified by abundance (category).

CATEGORY	POLLEN SPECTRUM CATEGORIZATION							
	Group I	Group II Nampula	Group III	Group IV	Group V Sofala, Manica, Zambezia	Group VI Sofala	Group VII Sofala, Manica	Group VIII Manica
<b>Dominant pollen (&gt;45%)</b>		<i>Acanthus</i> sp. (acantaceae)	Celastraceae	Brassicaceae				Unknown
<b>Secondary pollen (16–45%)</b>	Astragalus type Vicia type				Astragalus type Anacardiaceae	Myrtaceae Astragalus type	Asteraceae ( <i>Vernonia</i> sp., <i>Sigesbeckia</i> sp., 2 unidentified)	
<b>Important minor pollen (3–15%)</b>	Poaceae	<i>Justicia</i> sp. (acantaceae) Asteraceae	Vicia type		Myrtaceae Poaceae	Asteraceae	Myrtaceae Astragalus type	Combretaceae
<b>Minor pollen (&lt;3%)</b>	<i>Acacia</i> sp. Asteraceae Carex type <i>Brachystegia</i> sp. Combretaceae Caryophyllaceae	Poaceae			Combretaceae Asteraceae Euphorbiaceae	Poaceae	<i>Brachystegia</i> sp. Unknown Anacardiaceae	Anacardiaceae Poaceae
<b>Present pollen (&lt;1%)</b>					Carex type <i>Acacia</i> sp. <i>Mimosa</i> sp. <i>Brachystegia</i> sp. <i>Sesamum</i> sp. Nymphaeaceae	Convolvulaceae	Caryophyllaceae Campanulaceae <i>Acacia</i> sp. Poaceae	Cyperaceae

### 3.3. Volatile compounds

Table 4.1.2 shows the maximum and minimum values of the volatile compounds found in the Mozambiquean honeys regarding the province and the pollen spectrum (group I to group VIII). Of the 48 identified compounds, 28 and 29 showed, respectively, significant differences referring these factors. Volatile fraction, as was the case for the physicochemical quality parameters, colour and sugar content, contains potentially usable information for the differentiation of the studied honeys.

Group I (from Nampula) presents outstanding abundance of certain compounds: Alcohols [ethanol (36.9-133.1); propan-2-ol (11.5-41.2); 2-methylpropan-1-ol (9.5/38.2); pentanol-1 (78.0/235.4)]; Aldehydes [acetaldehyde (n.d.-3.3)]; Esters [2-methylpropanoic acid, ethyl ester (0.3/1.7); ethyl acetate (7.7/34.6); 3-methylbutanoic acid, ethyl ester (1.1/4.9); acetic acid, 2-phenyl ethyl ester (0.3/3.2)]; Acids [ethanoic acid (0.84/7.36); 2-methyl propanoic acid (0.3/3.2)]; Terpenes [ $\beta$ -linalool (0.3/1.7)]. The other Nampula groups (group II, III and IV), in general, also showed significant amounts of most of these compounds in relation to the other provinces, but in smaller quantities than group I. The special abundance in groups III and IV of 5 carbon methyl alcohols, such as 3-Methylbutan-1-ol, could contribute to the freshness of the aroma of these honeys (Castro-Vázquez, Díaz-Maroto, & Pérez-Coello, 2007). With the only exception of some samples from Group I, in general honey from Nampula are poor in aldehydes, whereas Sofala and Manica are mainly abundant in butanal, decanal and 2-methyl-butanal. It is important to mention the presence of furan derived compounds largely identified, especially in Sofala and Manica honey (7 and 6 compounds out of the 7 identified, respectively). These compounds could be present as a consequence of inadequate thermal procedures and storage conditions. Also, these furan-derived compounds could be associated with the smoke that beekeepers use to hone the bees and extract the honeycombs from the hive to minimize the aggressiveness of African bees. Therefore, if these practices are not implemented well, they could be a source of contamination to the honey and unpleasant flavours. Tananaki, Gounari, & Thrasyvoulou, (2009), reported in honeys the presence of certain compounds that at the same time were present in the smoke used by beekeepers in the combs. They also observed a direct relationship between the type of fuel used (pine needles, cypress leaves, fungus, sawdust, etc.) and the amount and type of compounds generated. Five of the compounds identified by these authors coincide with those found in the honeys of the

present study: 1-(2-furanyl)-ethanone; 2-methyl dihydro 3(H) furanone, 5-methyl furacarboxaldehyde and 5-ethenyl tetrahydro-5-trimethyl 2-furanmethan

**Table 4.1.2.** Volatile compounds (maximum and minimum expressed as µg/100g of honey) in honey from Mozambique regarding the province and the pollen spectrum (group I to group VIII). ANOVA results (F-ratio and significant differences) obtained for the factors: “province” and “pollen spectrum group”

Volatile compounds µg/100 g (min/max)	KI	PROVINCES				F-ratio	POLLEN SPECTRUM GROUPS								F-ratio
		Nampula	Sofala	Manica	Zambezia		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	
<b>Acids</b>															
Ethanoic acid	1471	0.2/7.3 <sup>b</sup>	0.3/4.4 <sup>a</sup>	0.2/2.4 <sup>a</sup>	0.8/3.0 <sup>a</sup>	3*	0.8/7.4 <sup>c</sup>	0.3/0.4 <sup>a</sup>	0.6/1.2 <sup>bc</sup>	0.2/0.3 <sup>a</sup>	0.3/3.0 <sup>ab</sup>	0.4/0.5 <sup>a</sup>	0.2/4.4 <sup>bc</sup>	0.5/0.7 <sup>b</sup>	8**
2-Methyl propanoic acid	1602	n.d./3.2 <sup>b</sup>	n.d./0.4 <sup>a</sup>	n.d./0.7 <sup>a</sup>	0.2/0.4 <sup>a</sup>	10***	0.3/3.2 <sup>bc</sup>	n.d./0.1 <sup>a</sup>	0.5/1.4 <sup>c</sup>	0.2/0.2 <sup>b</sup>	0.1/0.7 <sup>ab</sup>	0.1/0.2 <sup>ab</sup>	n.d./0.2 <sup>ab</sup>	0.1/0.2 <sup>ab</sup>	14***
3-Methyl butanoic acid	1698	n.d./2.4	n.d./0.7	n.d./3.0	n.d./0.4	ns	n.d.	0.1/0.2 <sup>a</sup>	0.8/2.4 <sup>b</sup>	0.1/0.3 <sup>a</sup>	0.1/3.0 <sup>a</sup>	0.1/0.2 <sup>a</sup>	n.d./0.3 <sup>a</sup>	0.3/0.4 <sup>a</sup>	7***
<b>Alcohols</b>															
Ethanol	951	6.4/133.1 <sup>c</sup>	0.1/31.1 <sup>ab</sup>	0.9/7.0 <sup>a</sup>	11.7/34.6 <sup>b</sup>	14**	36.9/133.1 <sup>d</sup>	6.5/21.8 <sup>c</sup>	16.2/22.2 <sup>c</sup>	18.8/23.6 <sup>c</sup>	0.9/34.6 <sup>bc</sup>	0.1/0.2 <sup>a</sup>	1.7/31.1 <sup>c</sup>	1.4/1.6 <sup>b</sup>	26***
Propan-2-ol	1050	n.d./41.2 <sup>b</sup>	n.d./3.6 <sup>a</sup>	n.d.	n.d./6.9 <sup>a</sup>	7***	11.5/41.2 <sup>b</sup>	0.1/0.3 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	n.d./6.9 <sup>a</sup>	n.d.	n.d./3.6 <sup>a</sup>	n.d.	41***
Butan-2-ol	1063	n.d./1.3 <sup>b</sup>	n.d./0.1 <sup>a</sup>	n.d.	n.d./0.4 <sup>a</sup>	5**	n.d./1.3 <sup>b</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d./0.6 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	8***
2-Methyl 3-buten-2-ol	1069	n.d.	n.d.	n.d./0.1	n.d.	ns	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d./0.1	n.d.	n.d.	n.d.	ns
2-Methylpropan-1-ol	1125	1.1/41.2 <sup>ab</sup>	0.1/3.6 <sup>ab</sup>	0.1/0.9 <sup>a</sup>	1.3/6.9 <sup>b</sup>	10***	9.5/38.2 <sup>c</sup>	1.1/2.7 <sup>a</sup>	2.4/3.5 <sup>ab</sup>	2.7/4.0 <sup>b</sup>	n.d./6.9 <sup>ab</sup>	0.1/0.2 <sup>a</sup>	0.3/3.6 <sup>ab</sup>	0.7/0.8 <sup>a</sup>	38***
Butan-1-ol	1186	n.d./0.6	n.d./1.8	n.d./0.7	0.2/0.4	ns	0.2/0.6 <sup>ab</sup>	n.d./0.1 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	n.d./0.7 <sup>ab</sup>	0.1/0.2 <sup>a</sup>	0.2/1.9 <sup>b</sup>	0.3/0.4 <sup>a</sup>	8***
3-Methylbutan-1-ol	1218	n.d./32.1 <sup>b</sup>	n.d./2.9 <sup>a</sup>	0.4/2.1 <sup>a</sup>	n.d./6.4 <sup>a</sup>	5*	n.d./0.4 <sup>a</sup>	1.6/2.4 <sup>a</sup>	24.1/32.1 <sup>c</sup>	9.6/17.6 <sup>b</sup>	0.5/6.4 <sup>a</sup>	0.1/0.2 <sup>a</sup>	n.d./0.8 <sup>a</sup>	1.6/1.7 <sup>a</sup>	141***
Pentanol-1	1226	n.d./235.1 <sup>b</sup>	n.d./5.4 <sup>a</sup>	n.d.	n.d./160.1 <sup>ab</sup>	8***	78.0/235.4 <sup>b</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d./7.5 <sup>a</sup>	n.d.	n.d./5.5 <sup>a</sup>	n.d.	43***
4-Methyl-3-penten-1-ol	1421	n.d./0.4 <sup>b</sup>	n.d.	n.d.	n.d./0.2 <sup>a</sup>	8***	n.d./0.4 <sup>a</sup>	n.d.	0.1/0.2 <sup>b</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7***
<b>Aldehydes</b>															
Acetaldehyde	756	n.d./3.3 <sup>b</sup>	n.d./0.2 <sup>a</sup>	n.d./0.1 <sup>a</sup>	0.1/0.3 <sup>a</sup>	4**	n.d./3.3 <sup>b</sup>	n.d.	n.d./n.d.	n.d.	n.d./0.3 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	7***
Butanal	881	n.d.	n.d./1.1	0.3/0.2	n.d.	ns	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d./0.2 <sup>ab</sup>	n.d.	0.1/1.0 <sup>b</sup>	0.1/0.2 <sup>a</sup>	3*
2-Methyl butanal	931	n.d.	n.d./0.6 <sup>b</sup>	n.d./0.3 <sup>a</sup>	n.d.	3*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d./0.2 <sup>a</sup>	0.6/0.7 <sup>b</sup>	n.d./0.5 <sup>a</sup>	n.d.	14***

*Resutados*

3-Methyl butanal	938	n.d./4.5	n.d./3.4	0.2/1.5	n.d./0.3	ns	0.2/4.5 <sup>b</sup>	n.d.	n.d./0.2 <sup>a</sup>	n.d.	n.d./1.5 <sup>ab</sup>	0.4/0.5 <sup>a</sup>	0.2/3.4 <sup>ab</sup>	1.2/1.3 <sup>b</sup>	3*
Decanal	1535	n.d.	n.d.	n.d./0.1	n.d.	ns	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d./0.1	n.d.	ns
Benzaldehyde	1581	n.d./0.8 <sup>b</sup>	n.d./0.1 <sup>a</sup>	0.1/0.5 <sup>a</sup>	n.d./0.2 <sup>a</sup>	3*	n.d./0.8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d./0.5	0.1/0.2	n.d./0.5	0.1/0.2	ns
<b>Esters</b>															
Acetic acid methyl ester	830	n.d./0.1	n.d./0.4	n.d./0.1	n.d.	ns	n.d./0.1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d./0.1	n.d.	n.d./0.4	n.d.	ns
Ethyl acetate	898	1.3/34.5 <sup>a</sup>	n.d./1.3 <sup>a</sup>	0.1/0.5 <sup>a</sup>	1.4/9.3 <sup>b</sup>	11 <sup>***</sup>	7.7/34.6 <sup>c</sup>	1.4/2.9 <sup>b</sup>	1.4/2.7 <sup>b</sup>	2.7/5.3 <sup>b</sup>	0.1/9.4 <sup>ab</sup>	n.d.	0.1/1.9 <sup>ab</sup>	0.1/0.2 <sup>a</sup>	23 <sup>***</sup>
2-Methyl-1,3-pentanedioic	1054	n.d.	n.d.	n.d.	n.d./0.1	64 <sup>***</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d./0.1	n.d.	n.d.	n.d.	ns
2-Methylbutanoic acid, ethyl ester	1086	n.d./0.7 <sup>b</sup>	n.d.	n.d.	n.d./0.1 <sup>a</sup>	10 <sup>***</sup>	0.2/0.7 <sup>b</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d./0.2 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	26 <sup>***</sup>
3-Methylbutanoic acid, ethyl ester	1090	n.d./4.8 <sup>b</sup>	n.d.	n.d./0.1 <sup>a</sup>	0.1/0.5 <sup>b</sup>	11 <sup>***</sup>	1.1/4.9 <sup>b</sup>	n.d.	0.4/0.7 <sup>a</sup>	0.2/0.3 <sup>a</sup>	n.d./0.5 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	27 <sup>***</sup>
2-Hydroxy propanoic acid ethyl ester	1282	n.d./1.2 <sup>b</sup>	n.d./0.3 <sup>a</sup>	n.d./0.3 <sup>a</sup>	0.2/1.1 <sup>b</sup>	31 <sup>***</sup>	n.d./1.2 <sup>a</sup>	0.3/0.5 <sup>b</sup>	0.1/0.8 <sup>ab</sup>	n.d.	n.d./1.1 <sup>ab</sup>	n.d.	n.d./0.1 <sup>a</sup>	n.d.	3*
Benzeneacetic acid, ethyl ester	1750	n.d.	n.d.	n.d./1.1 <sup>b</sup>	n.d./0.1 <sup>a</sup>	4*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d./0.1	n.d.	n.d./1.1 <sup>b</sup>	n.d.	3*
Acetic acid, 2-phenyl ethyl ester	1847	n.d./3.2 <sup>b</sup>	n.d.	n.d.	n.d./0.4 <sup>a</sup>	8 <sup>**</sup>	0.3/3.2	n.d./0.2 <sup>a</sup>	0.1/0.2 <sup>a</sup>	n.d.	n.d./0.4 <sup>b</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	17 <sup>***</sup>
<b>Furanes</b>															
2,5-dimethylfuran	990	n.d.	n.d./0.3	n.d.	n.d.	ns	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d./0.3	n.d.	n.d.	n.d.	ns
2-Methyl-dihydro-3(H)-Furanone	1252	n.d.	n.d./0.5	n.d./0.2	n.d.	ns	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d./0.5 <sup>ab</sup>	0.3/0.5 <sup>b</sup>	n.d./0.1 <sup>a</sup>	n.d.	8 <sup>***</sup>
Linalool oxide	1464	n.d./10.0 <sup>ab</sup>	n.d./0.8 <sup>a</sup>	0.2/3.6 <sup>ab</sup>	1.0/3.4 <sup>b</sup>	7 <sup>***</sup>	n.d./10.1 <sup>ab</sup>	0.1/0.2 <sup>a</sup>	0.7/1.6 <sup>b</sup>	0.1/0.2 <sup>a</sup>	0.1/3.6 <sup>ab</sup>	0.1/0.2 <sup>a</sup>	n.d./0.7 <sup>ab</sup>	0.3/0.4 <sup>ab</sup>	5 <sup>**</sup>
2-Furaldehyde	1502	n.d./0.2 <sup>a</sup>	n.d./1.3 <sup>a</sup>	0.1/13.4 <sup>b</sup>	n.d./3.9 <sup>a</sup>	13 <sup>***</sup>	n.d.	n.d.	n.d./0.2	0.1/0.2	0.1/13.4	0.5/0.7	n.d./5.0	1.7/2.2	ns
1-(2-Furyl)-ethanone	1547	n.d./0.1 <sup>a</sup>	n.d./0.1 <sup>a</sup>	n.d./0.7 <sup>b</sup>	n.d./0.1 <sup>a</sup>	4*	n.d.	n.d.	n.d./0.1	n.d.	n.d./0.7	0.1/0.2	n.d./0.2	n.d.	ns
2-Furaldehyde, 5-methyl-	1627	n.d./0.1 <sup>a</sup>	n.d./0.4 <sup>ab</sup>	0.1/1.1 <sup>b</sup>	n.d./0.2 <sup>a</sup>	4*	n.d.	n.d.	n.d.	0.1/0.2	n.d./1.2	0.2/0.4	n.d./0.3	0.1/0.2	ns

*Resutados*

2-Furanmethanol	1646	n.d.	n.d./0.2	n.d./1.5	n.d./0.4	ns	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d./1.5	0.1/0.2	n.d./0.3	n.d.	ns
<b>Hydrocarbons</b>															
Octane	796	n.d./0.2	n.d./0.2	n.d./0.1	n.d.	ns	n.d.	n.d.	n.d./0.2	n.d.	n.d./0.1 <sup>a</sup>	0.1/0.2 <sup>b</sup>	n.d./0.1 <sup>a</sup>	0.1/0.2 <sup>b</sup>	5**
Toluene	1060	n.d./1.0 <sup>a</sup>	n.d./0.4 <sup>b</sup>	n.d./0.1 <sup>a</sup>	n.d.	8**	n.d./0.7 <sup>a</sup>	0.8/1.0 <sup>b</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	0.1/0.2 <sup>a</sup>	n.d./0.4 <sup>a</sup>	n.d.	34***
Ethylbenzene	1142	n.d./0.3	n.d.	n.d.	n.d.	ns	n.d.	n.d./0.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4*
<b>Ketones</b>															
Acetone	850	n.d./0.7	n.d./0.8	n.d./0.3	0.1/0.6	ns	n.d./0.7	n.d./0.4	n.d.	n.d.	n.d./0.6	n.d.	n.d./0.8	n.d.	ns
2-Butanone	929	n.d./0.7 <sup>b</sup>	n.d./0.1 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	5*	n.d./0.7 <sup>b</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.1/0.2 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	6**
2-Pentanone	1010	n.d.	n.d./0.1	n.d./0.1	n.d.	ns	n.d./0.4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d./0.1	n.d.	n.d./0.1	n.d.	ns
Limonene	1214	n.d.	n.d.	n.d./0.6	n.d.	ns	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d./0.3	n.d.	n.d.	n.d.	ns
3-Hydroxy 2-Butanone	1261	n.d./1.4	0.1/1.2	0.1/0.2	0.1/0.2	ns	0.3/1.4 <sup>b</sup>	0.2/0.4 <sup>ab</sup>	0.2/0.5 <sup>ab</sup>	n.d.	0.1/0.2 <sup>a</sup>	0.3/0.4 <sup>b</sup>	0.2/1.2 <sup>ab</sup>	0.1/0.2 <sup>a</sup>	4***
1-Hydroxy 2-Propanone	1270	n.d./0.4 <sup>a</sup>	n.d/0.7 <sup>a</sup>	0.1/2.1 <sup>b</sup>	n.d./0.2 <sup>a</sup>	4*	n.d.	n.d.	0.2/0.4	n.d.	n.d/2.1	0.6/0.7	n.d./0.3	0.4/0.5	ns
<b>Nitrogen compounds</b>															
2-Methylpropanenitrile	1040	n.d.	n.d.	n.d./0.1	n.d.	5*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d./0.1	n.d.	n.d./0.1	n.d.	ns
2-Methylbutanenitrile	1153	n.d./0.6	n.d./0.9	n.d./0.3	n.d.	ns	n.d./0.6 <sup>c</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d./0.3 <sup>ab</sup>	n.d.	n.d./1.0 <sup>a</sup>	0.2/0.3 <sup>b</sup>	22***
<b>Sulfur compounds</b>															
Dimethyl sulfide	775	n.d./1.1	n.d./0.4	n.d./0.6	0.1/1.9	ns	n.d./1.1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d./1.9	0.1/0.2	n.d./0.6	0.2/0.3	ns
<b>Terpenes</b>															
Limonene	1214	n.d.	n.d.	n.d./0.6	n.d.	ns	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d./0.3	n.d.	n.d.	n.d.	ns
β-linalool	1695	n.d./1.7	n.d./2.9	n.d./0.7	n.d./0.9	ns	0.3/1.7 <sup>ab</sup>	n.d.	0.2/0.5 <sup>a</sup>	n.d.	n.d./1.0 <sup>a</sup>	n.d.	n.d./2.9 <sup>b</sup>	n.d.	4*

Different letters in the same row indicate significant differences at 95% confidence level as obtained by the LSD test. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001



### *3.4. Effect of province and pollen spectrum on the parameters analysed*

With the aim of evaluating the general effect that the province of harvest and the pollen spectrum has on all the parameters studied (physicochemical quality parameters, colour and sugar content, as well as the volatile compounds), principal component analyses (PCA) were performed considering three different groups of variables: 1. the physicochemical quality parameters, colour and sugar content exclusively; 2. the volatile compounds exclusively and 3. both groups of variables jointly.

The HMF values were not considered in these analyses because, as mentioned before, this parameter is mainly related to the freshness of honey, and therefore is not useful for the differentiation among types of honey.

The PCA score and loadings obtained for the option that achieved the best separation between groups, which correspond to the consideration to all the variables together (physicochemical quality parameters, colour, sugar content and volatile compounds) is shown in Figure 4.1.3. In this figure, the code for each point refers to: province-batch number. In the score plot, samples proximity means a certain similarity among them. The groupings observed by the pollen spectrum are overlapped (from group I to VIII). The group I from Nampula (located on the right side of the plane), is clearly differentiated from the rest of the groups by PC1. The rest of the groups are mainly in the left quadrant. This fact reveals, as previously mentioned, the vast difference between the honey of Nampula from group I and the rest. The general behaviour is that a better grouping is obtained considering the pollen spectrum over the provinces.

The information provided by ANOVA and PCA analyses of the physicochemical parameters and volatile compounds, shows that certain variables contribute more in the differentiation honeys according to the pollen spectrum. A discriminant analyses was applied to identify the variables with the highest discriminant power, considering grouping by pollen spectrum. Table 4.1.3 shows the standardized canonical discriminant function coefficients obtained for the model. In the construction of the two first discriminant functions, 14 variables were used. Considering that the higher the absolute value of a standardized canonical coefficient, the more significant a variable is, that most contributed to the discrimination of honeys according to the groups were: electrical conductivity and moisture followed by the volatile compound 3-Methylbutan-1-ol and the free acidity.

**Table 4.1.3.** Standardized canonical discriminant function coefficients

Variables	Function 1	Function 2
	68%	18%
Butan-2-ol	-0.593	0.286
2-Methyl-1,3-pentanedioic	-0.789	0.862
Toluene	-0.587	-0.071
2-Methylbutanenitrile	0.082	0.867
Pentan-1-ol	0.269	-0.266
3-Methylbutan-1-ol	2.877	-0.977
Decanal	0.070	0.294
Moisture	-3.226	-0.076
Electrical conductivity	5.197	-2.186
Fructose	0.358	1.146
Glucose	-1.289	-1.867
pH	0.527	0.770
Free acidity	-1.319	1.334
Lactonic acidity	-0.680	0.599

The classification results (expressed as percentages) of the discriminant analysis carried out by cross validated procedure, permitted the correct classification of 96.7% of honeys (Table 4.1.4). Within group VII (from Sofala and Manica), 14.3% of samples were incorrectly classified placing them in group VIII (only from Manica). It could be considered that the proximity between both provinces would imply a certain similarity in the flora and therefore very little difference in the characteristics of the harvested honeys. However, as seen in the pollen analysis, these groups (VII and VIII) do not share the pollen spectrum, at all. Therefore, this confusion could be due to exogenous components of honey, such as specific volatile compounds (from the smoking practices) or some physicochemical parameters (moisture, colour, etc.).

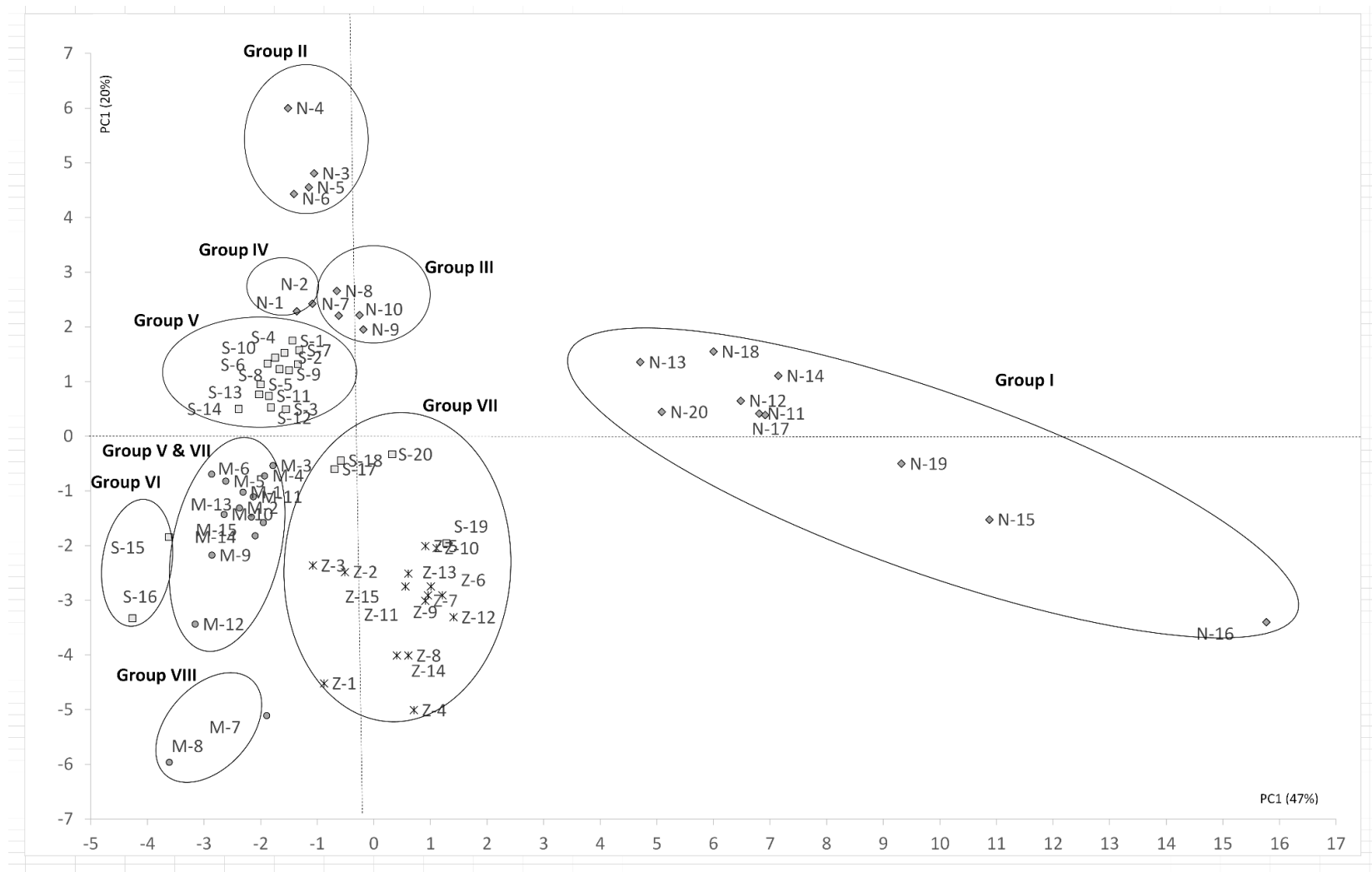


Figure 4.1.3-a. Score of all variables (physicochemical quality parameters, colour, sugar content and volatile compounds).

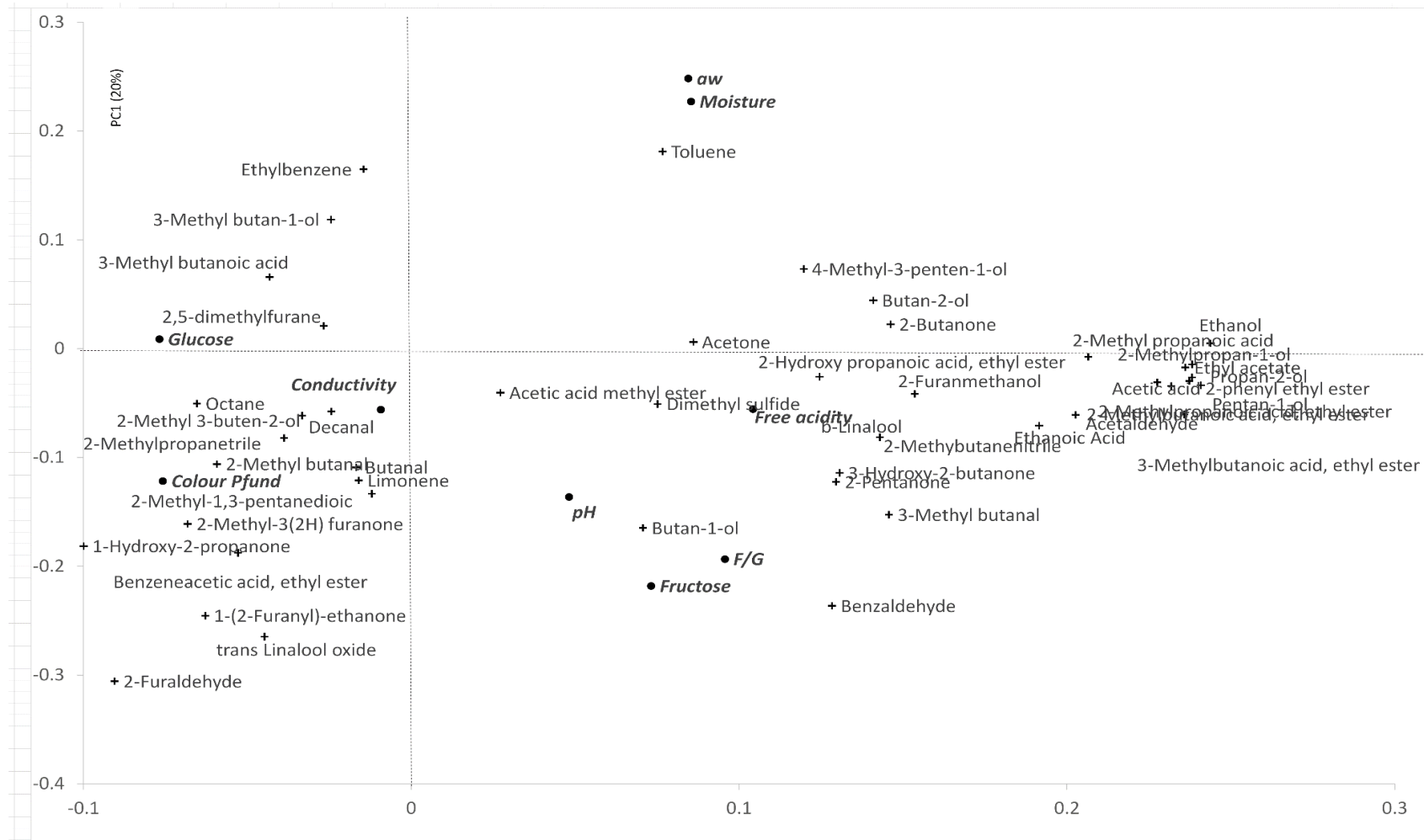


Figure 4.1.3-b. Loadings of all variables (physicochemical quality parameters, colour, sugar content and volatile compounds).

**Table 4.1.4.** Classification results of the discriminant analysis carried out by cross validated procedure. Percentage of samples well classified by the model. (Group I to Group VIII according to the similar pollen spectrum).

	<b>Predicted Group Membership</b>							
	Group I	Group II	Group III	Group IV	Group V	Group VI	Group VII	Group VIII
Group I	100	0	0	0	0	0	0	0
Group II	0	100	0	0	0	0	0	0
Group III	0	0	100	0	0	0	0	0
Group IV	0	0	0	100	0	0	0	0
Group V	0	0	0	0	100	0	0	0
Group VI	0	0	0	0	10	100	0	0
Group VII	0	0	0	0	0	0	85.7	14.3
Group VIII	0	0	0	0	0	0	0	100

#### 4. Conclusion

Pollen spectrum more than geographical origin permits to distinguish different types of honey from Mozambique. Not only vegetation but also the apicultural practices contribute to the variability of the physicochemical quality parameters, compositional and aromatic characteristics. All this, confers a certain singularity to honeys that belong to the same group. High levels of certain quality parameters such as HMF and moisture, as well as the presence of certain characteristic smoke compounds, highlights the importance of beekeeping practices in improving the quality of Mozambiquean honey. Therefore, having a good knowledge of the environmental and human implications belonging to this country, the quality characteristics of honeys is of great help to propose a program of future actions when the apiculture wants to be exploited more thoroughly. These considerations are of great importance when developing beekeeping activities.

#### References

Acebes Ginovés, J. R., del Arco Aguilar, M., Garcia Gallo, A., León Arencibia, M. C., Pérez de Paz, P. L., Rodríguez Delgado, O., & Wildpret de la Torre, W. (2001). División Pteridophyta y División Spermatophyta. In *Lista de especies silvestres de Canarias (hongos, plantas y animales terrestres)*, Edited by: Izquierdo, I, Martín, J. L, Zurita, N and Arechevaleta, Tenerife, La Laguna (Canary Is.), Consejería Política Territorial & Medio Ambiente, Gobierno de Canarias.

Anagnostopoulos, C., & Miliadis, G. E. (2013). Development and validation of an easy multi-residue method for the determination of multiclass pesticide residues using GC–MS/MS and LC–MS/MS in olive oil and olives. *Talanta*, 112, 1–10.

Ananias, K. R., Melo, A. A. M. D., & Moura, C. J. D. (2013). Analysis of moisture content, acidity and contamination by yeast and molds in *Apis mellifera* L. honey from central Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 679-683.

Baroni, M. V., Arrua, C., Nores, M. L., Fayé, P., del Pilar Díaz, M., Chiabrande, G. A., & Wunderlin, D. A. (2009). Composition of honey from Córdoba (Argentina): Assessment of North/South provenance by chemometrics. *Food Chemistry*, 114, 727-733.

Belay, A., Solomon, W. K., Bultossa, G., Adgaba, N., & Melaku, S. (2013). Physicochemical properties of the Harena forest honey, Bale, Ethiopia. *Food Chemistry*, 141, 3386-3392.

Bogdanov, S. (2009). Harmonized methods of the International Honey Commission. Available at: <http://www.bee-hexagon.net/en/network.htm>

Bradbear, N. (2005). *La apicultura y los medios de vida sostenibles, Folleto de la FAO sobre diversificación. Dirección de Sistemas de Apoyo a la Agricultura*. Available at: <http://www.fao.org/docrep/008/y5110s/y5110s00.htm>

Camino-Sánchez, F. J., Zafra-Gómez, A., Oliver-Rodríguez, B., Ruiz-Naranjo, I., Ruiz-García, J., & Vílchez, J. L. (2012). Validation of a method for the determination of tributyltin in seawater by stir bar sorptive extraction–liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1263, 14–20.

Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. C., & Pérez-Coello, M. S. (2007). Aroma composition and new chemical markers of Spanish citrus honeys. *Food Chemistry*, 103, 601–606.

Council Directive 2001/110 relating to honey. (2002). Official Journal of the European Communities L10, 47–52.

Crane, E. (1973). Honey sources of some tropical and subtropical countries. *Bee World*, 54, 177-186.

De Girolamo, A., Ciasca, B., Stroka, J., Bratinova, S., Pascale, M., Visconti, A., & Lattanzio, V. M. (2017). Performance evaluation of LC–MS/MS methods for multi-mycotoxin determination in maize and wheat by means of international Proficiency Testing. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 86, 222–234.

Escriche, I., Oroian, M., Visquert, M., Gras, M. L., & Vidal, D. (2016). Rheological Properties of Honey from Burkina Faso: Loss Modulus and Complex Viscosity Modeling. *International Journal of Food Properties*, 19, 2575-2586.

Escriche, I., Tanleque-Alberto, F., Visquert, M., & Oroian, M. (2017). Physico-chemical and rheological characterization of honey from Mozambique. *LWT - Food Science and Technology*, 86,108-115.

FAO, Governo de Moçambique (2009). Quadro das demandas e propostas de Guiné-Bissau para o desenvolvimento de um programa regional de cooperação entre países da CPLP no domínio da luta contra a desertificação e gestão sustentável das terras. Available at: <http://www.fao.org/tc/cplpunccd/en/>.

FAOSTAT (2016). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistic Division. Available at: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QL/visualize>.

Gidamis, A. B., Chove, B. E., Shayo, N. B., Nnko, S. A., & Bangu, N. T. (2004). Quality evaluation of honey harvested from selected areas in Tanzania with special emphasis on hydroxymethyl furfural (HMF) levels. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59, 129-132.

Gosling, W. D., Miller, C. S., & Livingstone, D. A. 443 (2013). Atlas of the tropical West African pollen flora. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 199, 1-135.

Hyde, M.A., Wursten, B.T., Ballings, P., & Coates Palgrave, M. (2018). Flora of Mozambique: Home page. Available at: <https://www.mozambiqueflora.com/index.php>.

Johannsmeier, M. F. (2016). *Beeplants of South Africa. Sources of nectar, pollen, honeydew and propolis for honeybees*. ISBN: 978-1-928224-17-4. Ed. South African National Biodiversity Institute, Pretoria.

Jooster, A. & Smith, M. (2004). Report on Honey. External Market Study n°.3. Ministerio de Industria e Comercio. Mozambique 3:2-3. Available at: <http://www.gorongosa.org/sites/default/files/research/024-honey.pdf>

Juan-Borrás, M., Domenech, E., Hellebrandova, M., & Escriche, I. (2014). Effect of country origin on physicochemical, sugar and volatile composition of acacia, sunflower and tilia honeys. *Food Research International*, 60, 86-94.

Juan- Borrás, M., Soto, J., Gil- Sánchez, L., Pascual- Maté, A., & Escriche, I. (2017). Antioxidant activity and physico- chemical parameters for the differentiation of honey using a potentiometric electronic tongue. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 2215-2222.

Louveaux, J., Maurizio, A., & Vorwohl, G. (1978). Methods of melissopalynology. *Bee world*, 59, 139-157.

Makawi, S. Z. A., Gadkariem, E. A., & Ayoub, S. M. H. (2009). Determination of antioxidant flavonoids in Sudanese honey samples by solid phase extraction and High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chemistry*, 6, 429–437.

Malika, N., Mohamed, F., & Chakib, E. A. (2005). Microbiological and physico-chemical properties of Moroccan honey. *International Journal of Agricultural Biology*, 5, 773–776.

Martos, S., Cossentini, M., Ferreres, F., & Toma-466 Barbera, F. A. (1997). Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2824–282.

Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J., & Nacoulma, O. G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91, 571-577.

Moar, N. T. (1985) Pollen analysis of New Zealand honey. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 28, 39-70.

Nair, S., & Maghraoui, N. B. (2017). Physicochemical Properties of Honeys Produced in North-West of Algeria. *Advances in Food Science and Engineering*, 1, 123-128.

Nombré, I., Schweitzer, P., Boussim, J. I., & Rasolodimby, J. M. (2010). Impacts of storage conditions on physicochemical characteristics of honey samples from Burkina Faso. *African Journal of Food Science*, 4, 458-463.

Palynological Database on line, Available at: <https://www.palдат.org/info>



Paul, S., Issa, N., Kwamé, A., & Joseph, B. (2013). Physico-Chemical and Labeling Control of Imported Honeys in Burkina Faso. *Food and Nutrition Sciences, 12*, 1266-1270.

Oddo, L. P., Piro, R., Bruneau, É., Guyot-Declerck, C., Ivanov, T., Piskulová, J., & Von der Ohe, W. (2004). Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie, 35*, 38-81.

Schüler, L., & Hemp, A. (2016). Atlas of pollen and spores and their parent taxa of Mt Kilimanjaro and tropical East Africa. *Quaternary International, 425*, 301-386.

Serem, J., & Bester M.J. (2012). Physicochemical properties, antioxidant activity and cellular protective effects of honeys from southern Africa. *Food Chemistry, 133*, 1544-1550.

Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry, 196*, 309-323.

Sime, D., Atlabachew M., Redi-Abshiroand M., & 489 Zewde T., (2015). Total phenols and antioxidant activities of natural honeys and propolis collected from different geographical regions of Ethiopia, *Chemical Society of Ethiopia 29*, 163-172.

Tananaki, C., Gounari, S., & Thrasyvoulou, A. (2009). The effect of smoke on the volatile characteristics of honey. *Journal of Apicultural Research, 48*, 142-144.

Terrab, A., M. J., & Heredia, F. J. (2002). Characterisation of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. *Food Chemistry, 73*73-379.

Tornuk, F., Karaman, S., Ozturk, I., Toker, O. S., Tastemur, B., Sagdic, O., Doganb, M., & Kayacier, A. (2013). Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. *Industrial Crops and Products, 46*, 124–131.

Tosi, E. A., Ré, E., Lucero, H., & Bulacio, L. (2004). Effect of honey high-temperature short-time heating on parameters related to quality, crystallisation phenomena and fungal inhibition. *LWT Food Science and Technology, 37*, 669-678

Visquert, M., Vargas, M., & Escriche, I. (2014). Effect of postharvest storage conditions on the colour and freshness parameters of raw honey. *International Journal of Food Science and Technology, 49*, 181-187.

Zandamela, E. M. F. (2008). *Caracterización Físicoquímica y Evaluación Sanitaria de la miel de Mozambique* (Doctoral dissertation). Universitat Autònoma de Barcelona.(Spain).

## **4.2. Antioxidant characteristics of honey from Mozambique based on specific compounds**

Fernando Tanleque-Alberto, Marisol Juan-Borrás, Isabel Escriche

**Journal of Food Composition and Analysis**

**(En revision)**



### **Abstract**

For the first time, honey from different provinces of North (Nampula) and Central Mozambique (Sofala, Manica and Zambezia) was analysed considering specific flavonoids and phenolic acid profiles, and the total antioxidant activity. Seven phenolic acids (chlorogenic, caffeic, ellagic, ferulic, gallic, p-coumaric and synapic) and eight flavonoids (catechin, chrysin, kaempferol, luteolin, naringenin, pinocembrin, quercetin and rutin) were found in the samples. Honey from Nampula had a higher content of the most phenolic acids and flavonoids compared to the other provinces, highlighting chlorogenic acid (5.22 mg/100 g), which was significantly higher than the other provinces (1.24, 1.11 and 0.81 mg/100 g). Unlike in other African honeys, luteolin (with average values of 12.48; 13.10; 6.68 and 8.92 mg/100 g, respectively) had the greatest impact in the flavonoid content, representing alone more than 50% of this family. The mean value of total antioxidant activity was also higher for the Nampula samples (22.1 mg TE/100 g), even reaching up to 40 mg TE/100 g in some cases. The specific flavonoids: pinocembrin, kaempferol, rutin, catechin and catequin; followed by the chlorogenic phenolic acid were the most important variables that distinguishes Nampula from the other provinces as resulted from a discriminant analysis. This work underlines the importance of Mozambiquean honey as a source of natural antioxidants both of which concern the health benefits and its exploitation as a viable and sustainable income for the local population.

**Keywords:** Mozambique, honey, phenolic-acids-compounds, flavonoids-compounds, antioxidant-activity.

### **1. Introduction**

Honey production could be considered among one of the potential means to support the creation of sustainable livelihoods in rural African communities (Bradbear, 2005; Serem & Bester, 2012). Several regions of Mozambique have favourable conditions (climate, melliferous flora, and vast forest areas) for exploiting apiculture. However, despite its potential, beekeeping has not reached its full capacity, estimated at 3,600 tonnes a year, considering the current resources (Jooster & Smith, 2004). According to FAOSTAT, (2016), the honey production in this country stands at 600 tonnes/year but a positive trend has been observed in the last years. Apiculture may produce more benefits to the rural communities of Mozambique than just the actual beekeeping, because it generates other

economic revenues related with the assets and resources necessary for this practice (commerce, carpenters, garment makers, packaging processors, among others).

Western societies market trends are directed to the search of healthy foodstuff with antioxidant properties. The requirement for natural antioxidants is growing as they play an important role in human health: evading damage produced by oxidising agents and having anti-inflammatory, anti-carcinogenic or anti-atherosclerotic effects, just to cite a few. Among the most important groups of compounds with antioxidant activity (vitamins, carotenoids and polyphenols), honey is especially rich in polyphenols, and more specifically in flavonoids and phenolic acids (Oroian & Escriche, 2015). Hence, honey is highly valued for its therapeutic characteristics underscoring the importance of the presence of antioxidant compounds which is widely dispersed throughout the plant kingdom (Silici, Sagdic, & Ekici, 2010). These compounds could be transferred to honey when bees collect nectar of blossoms or plants and trees exudates. It is well known that botanical, geographical and climatic conditions have an important influence in the composition of flavonoids and phenolic acids of honey (Tomás-Barberán, Martos, Ferreres, Radovic, & Anklam, 2001; Gheldof, Wang, & Engeseth, 2002; Sime, Atlabachew, Abshiro, & Zewde, 2015; Escriche, Kadar, Juan-Borrás, & Domenech, 2014). Consequently, specific compounds or relevant content could be found in some type of honey: naringenin, caffeic acid and hesperetin, in citrus blossom honey (Escriche, Kadar, Juan-Borrás, & Domenech, 2011); kaempferol in rosemary honey; quercetin in sunflower honey (Tomás-Barberán et al., 2001) ellagic acid in heather honey (Antony, Han, Rieck, & Dawson, 2000); and caffeic acid, p-coumaric and ferulic in chestnut honey (Merken & Beecher, 2000), among others.

Abundant information has been published about polyphenols identified and quantified in different types of honey and countries. However, this information is scarce when it refers to African honeys; and when there is, it almost only deals with the total antioxidant capacity (mainly due to the inexpensive spectrophotometric methods, accessible chemical reagents and they do not require sophisticated equipment or highly trained personnel and protocols) (Granato, Santos, Maciel, & Nunes, 2016). As an example, it could be mentioned several studies of honey from: Ethiopia (Sime et al., 2015), Burkina Faso (Beretta et al., 2005; Meda et al., 2005) and South Africa (Serem & Bester, 2012). There are a few exceptions since some flavonoids and other specific antioxidant compounds in

honey from Tunisia and Sudan, have been reported (Martos, Cossentini, Ferreres, & Tomás-Barberán, 1997; Makawi, Gadkariem, & Ayoub, 2009).

Turning the focus on Mozambiquean honey, there is very little scientific data (Escriche, Tanleque-Alberto, Visquert & Oroian, 2017) and absolutely nothing about its antioxidant characteristics, neither specific compounds nor total antioxidant capacity.

Therefore, a better understanding of the properties of this uncommon honey focusing on its antioxidant characterization is now more than ever of the utmost importance. With this in mind and with the purpose of obtaining the most comprehensive information, it is recommended to analyse specific compounds of the antioxidant fraction, in line with the most recent statements of IUPAC (Apak et al., 2013), together with nonspecific analytical methods since the majority of the available data refers to them.

Taking all these factors into consideration, the aim of this work was to determine the specific flavonoids and phenolic acids profiles and the total antioxidant activity in honey from the different provinces of Mozambique.

## **2. Material and Methods**

### *2.1 Collection of samples*

Honey from Mozambique, collected in 2014 and 2015 was analysed in this study: 20 samples from Nampula in the North (districts of Moma, Angoche and Ribáuè) and, 15 from Zambezia, 20 from Manica, and 20 from Sofala, in the Centre. Local resources and traditional beehives were used in Nampula and Zambezia along with other harvesting methods while Sofala and Manica used more modern methods.

### *2.2. Standard and reactive compounds*

All the target standards (purity higher than 98%): gallic acid, chlorogenic acid, catechin, caffeic acid, rutin, ellagic acid, p-coumaric acid, synapic acid, ferulic acid, luteolin, quercetin, naringenin, kaempferol, chrysin, galangin and pinocembrin, as well as the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Ethanol (analytical grade), ammonium acetate and Trolox [(6-hydroxy acid) - 2, 5, 7, 8 - tetramethylchroman-2-carboxylic acid], were acquired from Scharlab (Barcelona, Spain). Acetonitrile and methanol HPLC grade were purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). MilliQ deionized water (Millipore Corp., Bedford, MA) was used throughout the procedure.

Stock standard solutions of each flavonoid and phenolic acid were obtained at a concentration of 1 mg/mL in methanol. The working standard solutions were prepared by diluting the corresponding stock solution up to a concentration of 100 ng/mL in water. The stock standard solution was stored at -20°C and the working standard solution at +4°C.

### *2.3. Specific phenolic acids and flavonoid compounds analysis*

The phenolic acids and flavonoid compounds were determined by using the method of Bertonecelj, Polak, Kropf, Korošec, & Golob, (2011) with some modifications. Honey samples (3 g of each) were mixed with 15 mL of acidified water (HCl 1M) until they were completely dissolved. These honey solutions were then loaded into the previously conditioned Strata-X SPE cartridges (3 mL of methanol and 3 mL of water). After, the cartridges were washed with 5 mL of acidified water and 15 mL of ultrapure water, to remove sugars and other polar constituents. This cleaning step is necessary to eliminate interfering compounds before the chromatographic analysis. Then, cartridges were vacuum dried for 3 min. The phenolic fractions retained in the cartridges were eluted with 3 mL of methanol: acetonitrile (2:1, v:v).

The extracts were analyzed using a HPLC-Alliance 2695, with a 2996 photodiode array detector (Waters, USA). Phenolic acids and flavonoids compounds were separated on a Brisa-LC, C18 column (250 x 4,6 mm x 5 µm) (Teknokroma, Spain). The binary mobile phase consisted of solvent A (ACN) and solvent B (water and formic acid, 99:1). Binary gradient conditions were used: initial, 90% B, linear gradient to 40% B for 25 min and then to 20% B for 26 min, holding up to 30 min, followed by a linear gradient to initial condition at 35 min and a final hold at this composition up to 40 min. The column was maintained at 30 °C. The flow-rate and the injection volume were 0.5 mL/min and 10 µL, respectively. Chromatograms were recorded at a range of wavelengths from 200 to 400 nm). All compounds were identified by comparison of chromatographic retention times and UV spectral characteristics of unknown analytes with authentic standards and the available literature (Merken & Beecher, 2000; Escriche et al., 2011). Calibration curves were constructed via least squares linear regression analyses of the peak area of each representative compound versus their respective concentration. These curves obtained from standard solutions (0.5-30 ng/mL) were used to perform the quantification.



With the aim of avoiding the matrix effect on the quantification of the compounds, the calibration curves were constructed adding to the sample a mix of all the standards at different concentrations. The quantitative results were expressed in mg of compound per 100 g of honey. To check the stability of the method a standard solution was injected at the beginning of each working session.

All determinations were carried out in triplicate.

#### *2.4 Determination of the total antioxidant capacity*

The antioxidant activity of the samples and standard (Trolox) was determined by way of the radical scavenging activity method using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) described by Scherer & Godoy, (2009). Therefore, 0.1 mL of the sample diluted in methanol: water (80:20) was mixed with 3.9 mL of a methanolic solution of DPPH [0.025 mg/mL prepared in methanol/water (80:20)]. This solution was stirred and after 30 minutes, the absorbance of the sample was measured at 515 nm using methanol as a blank. The quantification was calculated with the standard Trolox curve (0.01-0.80 mg/mL). The results were expressed in mg of Trolox equivalent (TE) per 100 g of honey. All analyses were performed in triplicate.

#### *2.5. Statistical analysis*

A one-factor analysis of variance (ANOVA) (using Statgraphics Centurion XVII for Windows) was carried out to evaluate the effect of the provinces of Mozambique (when honey was collected) on the flavonoids and phenolic acids compounds. LSD (least significant difference) test and  $\alpha=0.05$  were applied. Moreover, a Principal Component Analysis (PCA) by means of the software Unscrambler (X.10.5 CAMO) was also applied to evaluate the relationship between the quantified compound and the different provinces. Furthermore, a Stepwise Linear Discriminant Analyses (SLDA) using “forward” procedure (SPSS 16.0) was used to select the variables that allow differentiation between provinces based on their honey. The classification functions corresponding to each group of honeys were calculated. The predictive capacity of the discriminant models was studied by leave-one-out cross-validation.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant activity

Table 4.2.1. shows the 7 phenolic acids (chlorogenic, caffeic, ellagic, ferulic gallic, *p*-coumaric and synapic) and 8 flavonoids (catechin, chrysin, kaempferol, luteolin, naringenin, pinocembrin, quercetin and rutin) found in the honey samples analysed, as well as the different wavelengths used for their identification and quantification. Nine of these compounds (*p*-coumaric, gallic, caffeic, ferulic, chrysin, luteolin, pinocembrin kaempferol and quercetin) were also reported in North African honey (Algeria) (Ouchemoukh et al., 2017). These authors found an additional flavonoid (galangin) that was not detected in any Mozambiquean samples, although this was one of the target compounds of the present work.

This table also shows the quantitative results of these compounds: average values (expressed as mg of compound per 100 g of honey) with the corresponding standard deviation and the minimum and maximum values for every compound and province. Also included is the total antioxidant activity (expressed as mg TE/100 g honey). In all cases the ANOVA results (with homogeneous groups, F-ratio and significant level) are described.

In a first step, the goodness of the analytical method was checked. In order to do so, the linearity, repeatability and reproducibility were calculated. A good linearity was obtained, with  $R^2$  values ranging from 0.9948 for ellagic acid to 0.9996 for synapic acid, kaempferol and rutin. The RSD of the repeatability for all compounds was less than 6% and its reproducibility was always less than 10%.

Honey from Nampula had a total average content (10.61 mg/100 g) of phenolic acids; quite high if compared to other provinces: 6.85, 6.83 and 5.76 mg/100 g for Sofala, Manica and Zambezia. This is mainly due to the quantity of chlorogenic acid (average of 5.22 mg/100 g) present in Nampula honey, which is significantly greater than in the other provinces: with average values of 1.24, 1.11 and 0.81 mg/100 g, respectively. The synapic was the other phenolic acid with significant differences among provinces, but in this case, the level of this compound was slightly higher in Zambezia. Despite the high content of chlorogenic acid found in this study, it was not reported in any other African honey (Martos et al., 1997; Makawi et al., 2009) nor in other origins such as Turkey (Can et al., 2015), Europe (Escriche et al., 2014) or American tropical honey (do Nascimento et al., 2018).

In general, the levels of other phenolic acids compounds quantified in the honey from Mozambique differ considerably with honey from other countries, even with tropical climates. For instance, gallic acid, was reported in higher levels in American tropical honey (from n.d to 36.18 mg/100 g) than in the present work (up to 1.6 mg/100 g). In other African honey, it was not even detected (Martos et al., 1997; Makawi et al., 2009). Intermediate values for gallic acid, were determined in honey from Turkey, ranging from n.d. to 8.2 mg/100 g, depending on the type of honey (Can et al., 2015). Another example could affect the p-coumaric acid, where the contents in Mozambiquean honey varied from 0.21 to 1.92 mg/100 g, in a similar order to what was found in European (0.12-0.81 mg/100 g) or Turkish (n.d.-15.95 mg/100 g) honey, but greater than Brazilian honey (0.05-0.20 mg/100 g) (Escriche et al., 2014; Can et al., 2015; do Nascimento et al., 2018).

Regarding the flavonoids, the total average content had similar behaviour as phenolic acids since the highest level corresponded to samples from Nampula with a value of 27.14 mg/100 g, followed by Sofala (19.59 mg/100 g), Zambezia (15.32 mg/100 g) and Manica (13.08 mg/100 g). In general, in all the provinces the flavonoid content was higher than the phenolic content. However, in tropical honey from Brazil the situation was exactly the opposite, phenolic acids were higher than flavonoids (Bueno-Costa et al., 2016).

Four out of seven flavonoid compounds (catequin, kaempferol, pinocembrin and rutin) were significantly higher in Nampula province, whereas the differences were not so remarkable among the other provinces. Luteolin was the major flavonoid in the 4 provinces with average values of 12.48; 13.10; 6.68 and 8.92 mg/100 g in Nampula, Sofala, Manica and Zambezia, respectively. It is noteworthy to mention the high values found for this compound in some samples from Nampula and Sofala reaching a maximum value up to 72.10 mg/100 g and 21.70 mg/100 g, respectively. However, the minimum value for this compound was around 6 mg/100 g in all the provinces. Luteolin had the greatest impact in the average total flavonoid content in these two provinces since, in some cases, it represented more than 50% of this value. Nevertheless, this compound was found in very low concentration in honey from other origins such as: Tunez (up to 0.011 mg/100g) (Martos et al., 1997), Europe (average value of 0.063 mg/100 g) (Escriche et al., 2011) and it was not even detected in Turkish honey (Can et al., 2015).

Among the other flavonoids quantified in Mozambique honey, catechin is noteworthy since it was present in all samples with average values from 3.54 mg/100 g in Zambezia to 6.56 mg/100 g in Nampula. However, this flavonoid was not reported in other African honey (Makawi et al., 2009), although in different varieties of Turkish honeys it reached the level of 23.0 mg/100 g (Can et al., 2015). The concentration of quercetin and kaempferol, was of a similar order as in the present study compared to what was determined in honey from Sudan with different botanical origin (average values 0.54 mg/100 g and 0.32 mg/100 g respectively) (Makawi et al., 2009). Only in some samples from Nampula the values were up to 2.38 mg/ 100 g and 5.55 mg/100 g respectively. Lower contents were reported in honey from Tunisia (quercetin 0.013-0.123 mg/100 g and kaempferol 0.009-0.136 mg/100 g) (Martos et al., 1997).

Considering the pattern of the total antioxidant activity in its quantitative form, in the present study, the same trend was observed for the flavonoids. The mean value of antioxidant activity was also higher for the Nampula samples (22.1 mg TE/100 g). However, in this case it did not show significant differences with those from Sofala (18.3 mg TE/100 g). It was followed by Zambezia and Manica with mean values of 16.1 and 9.5 mg TE/100 g. The value of total antioxidant activity ranged from 4.3 mg TE/100 g, in a Manica sample to 40.0 mg TE/100 g in a Nampula sample.

In general, certain similarities are observed among the antioxidant characteristics of Sofala, Manica and Zambezia provinces, in contraposition to Nampula, which may be due to the similarity of the flora and clima characteristics of these three provinces (Zandamela, 2008; FAO-Governo de Moçambique, 2009).

The comparison of the total antioxidant activity values among the samples analysed in the present study was valid since the method (DPPH) and the analytical conditions were always the same. Notwithstanding, it is not appropriate to compare the total antioxidant values with other studies because it could have been obtained with other nonspecific analytical methods (ABTS, FRAP, ORAC, TEAC, among others.) based on different mechanisms. Furthermore, even when using the same analytical method, other condition-based factors (pH, solvent, and sample matrix) could have a significant influence in the variability of the results (Apak et al., 2013; AOAC SMPR 2011.011). It is noteworthy to mention the study performed by Serem & Bester, (2012) because its analytical procedure is comparable to this present work. These authors found 1.74  $\mu\text{mol TE/g}$  in South African honey, in the same other as Mozambiquean honey. Other valid examples are the studies

conducted by Attanzio, Tesoriere, Allegra, & Livrea, (2016) in European honeys (with average values from 8.5 to 238.4  $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ ) or by Rosa et al., (2011) in Italian honey with a total antioxidant activity average value of 4.8 mmol TE/kg

*Resultados*

**Table 4.2.1.** Mean (and standard deviation), minimum and maximum values of the phenolic acids, flavonoids and total antioxidant, compounds of the honey samples from different provinces of Mozambique (Nampula, Sofala, Manica and Zambezia), and ANOVA F-ratio for the factor “province”.

Phenolic acids (mg/100g of honey)	UV	UV	NAMPULA		SOFALA		MANICA		ZAMBEZIA		ANOVA
	Identify- cation $\lambda$ (nm)	quanti- fycation $\lambda$ (nm)	Mean (SD)	Min/Max	Mean (SD)	Min/Max	Mean (SD)	Min/Max	Mean (SD)	Min/Max	Region F-ratio
Caffeic acid	288; 298; 318	320	0.83 (0.18) <sup>a</sup>	0.60/1.13	0.88 (0.49) <sup>a</sup>	0.49/1.90	1.20 (0.71) <sup>a</sup>	0.60/2.53	0.50 (0.04) <sup>a</sup>	0.46/0.55	ns
Chlorogenic acid	219; 241; 315	320	5.22 (2.28) <sup>b</sup>	0.72/7.07	1.24 (1.25) <sup>a</sup>	0.57/4.92	1.11 (0.42) <sup>a</sup>	0.63/1.88	0.81 (0.02) <sup>a</sup>	0.78/0.84	13.8***
Ellagic ácid	205; 235; 280	290	1.98 (0.39) <sup>a</sup>	1.59/2.79	2.32 (1.30) <sup>a</sup>	1.17/5.22	2.13 (0.54) <sup>a</sup>	1.49/2.97	1.92 (0.25) <sup>a</sup>	1.67/2.17	ns
Ferulic acid	318	320	0.61 (0.22) <sup>a</sup>	0.31/0.94	0.71 (0.42) <sup>a</sup>	0.03/1.21	0.51 (0.18) <sup>a</sup>	0.23/0.86	0.56 (0.11) <sup>a</sup>	0.44/0.67	ns
Gallic acid	220; 271	290	0.53 (0.11) <sup>a</sup>	0.34/0.63	0.59 (0.34) <sup>a</sup>	0.34/1.40	0.83 (0.38) <sup>a</sup>	0.47/1.60	0.49 (0.04) <sup>a</sup>	0.44/0.54	ns
p-coumaric acid	207; 260	320	1.14 (0.52) <sup>a</sup>	0.21/1.92	0.74 (0.37) <sup>a</sup>	0.21/1.20	0.69 (0.27) <sup>a</sup>	0.32/0.99	0.90 (0.21) <sup>a</sup>	0.68/1.11	ns
Synapic acid	220; 280	320	0.30 (0.03) <sup>a</sup>	0.27/0.37	0.37 (0.08) <sup>a</sup>	0.27/0.53	0.36 (0.06) <sup>a</sup>	0.27/0.48	0.58 (0.30) <sup>b</sup>	0.27/0.88	3.8*
<b>Total average of phenolic acids and SD</b>			<b>10.61 (1.85)<sup>c</sup></b>		<b>6.85 (0.97)<sup>b</sup></b>		<b>6.83 (0.70)<sup>b</sup></b>		<b>5.76 (0.48)<sup>a</sup></b>		

*Resultados*

**Flavonoids**

**(mg/100g of honey)**

Catequin	220; 289	290	6.56 (1.94) <sup>b</sup>	2.95/9.34	3.35 (1.29) <sup>a</sup>	2.08/6.74	2.62 (0.51) <sup>a</sup>	2.08/3.55	3.54 (0.80) <sup>a</sup>	2.74/4.35	12.5***
Chrysin	313	320	0.48 (0.18) <sup>a</sup>	0.33/0.86	0.35 (0.03) <sup>a</sup>	0.33/0.43	0.46 (0.12) <sup>a</sup>	0.33/0.75	0.44 (0.04) <sup>a</sup>	0.39/0.48	ns
Kaempferol	265; 318	360	1.93 (1.56) <sup>b</sup>	0.57/5.55	0.55 (0.27) <sup>a</sup>	0.15/1.01	0.61 (0.23) <sup>a</sup>	0.38/1.21	0.67 (0.15) <sup>ab</sup>	0.51/0.82	4.1*
Luteolin	268	320	12.48 (21.10) <sup>b</sup>	6.46/72.10	13.10 (5.70) <sup>a</sup>	6.61/21.70	6.68 (0.14) <sup>a</sup>	6.49/6.95	8.92 (2.16) <sup>a</sup>	6.75/11.00	ns
Naringenin	289	290	1.22 (1.22) <sup>a</sup>	0.35/4.06	0.64 (0.20) <sup>a</sup>	0.35/0.93	0.69 (0.39) <sup>a</sup>	0.39/1.46	0.436 (0.004) <sup>a</sup>	0.43/0.44	ns
Pinocembrin	290	290	0.90 (0.38) <sup>b</sup>	0.45/1.59	0.36 (0.05) <sup>a</sup>	0.32/0.51	0.51 (0.13) <sup>a</sup>	0.36/0.76	0.39 (0.04) <sup>a</sup>	0.35/0.43	8.6***
Quercetin	226; 350	360	0.86 (0.79) <sup>a</sup>	0.12/2.38	0.31 (0.36) <sup>a</sup>	0.10/0.92	0.30 (0.25) <sup>a</sup>	0.008/0.70	0.41 (0.12) <sup>a</sup>	0.29/0.54	ns
Rutin	260; 355	360	2.71 (1.29) <sup>b</sup>	0.89/4.4	0.79 (0.39) <sup>a</sup>	0.23/1.47	1.18 (0.43) <sup>a</sup>	0.60/1.84	0.76 (0.11) <sup>a</sup>	0.64/0.88	9.4***
<b>Total average of flavo- noids and SD</b>			<b>27.14 (11.67)</b>		<b>19.59 (4.68)</b>		<b>13.08 (2.05)</b>		<b>15.32 (2.75)</b>		
<b>Total antioxidant capacity</b>			22.1 (6.9) <sup>b</sup>	13.0/40.0	18.3 (6.7) <sup>b</sup>	6.03/39.0	9.5 (5.4) <sup>a</sup>	4.3/26.1	16.1 (6.8) <sup>ba</sup>	8.9/25.7	11.9***

**(mg TE/100 g honey)**

Different letters in the same row indicate significant differences at 95% confidence level as obtained by the LSD test. ns: Non significant; \* p<0.05; \*\* p<0.01;

\*\*\*p<0.001

### *3.2. Relationship among antioxidant characteristics*

To determine the possibility of a correlation between the different antioxidant data, a Pearson correlation coefficient was obtained for each pair of variables (Table 4.2. 2.). This table shows the correlation matrix obtained together with the corresponding P-value (number in brackets), which indicates the statistical significance of the estimated correlations at 95.0% confidence level. Although the correlations between total antioxidant activity and some specific compounds were significant (since P-values were below 0.05), the linear relationship between each pair of variables is weak as the values are far from +1 or -1. This is the case of 3 phenolic acids: ferulic, chlorogenic, and p-coumaric with values of 0.458, 0.448 and 0.436, respectively and the flavonoid catequin (0.478). Authors do Nascimento et al., (2018) showed in Brazilian honey that the total antioxidant activity (analysed by DPPH) was also positively correlated with p-coumaric (0.415) similar to the present study. As for gallic acid, the same behaviour (no good linear relationship and negative sign) was observed both by these authors and the present study (-0.399 and -0.284, respectively).

In Mozambiquean honey the best correlations are shown for some specific compounds. For instance, chlorogenic acid was positively correlated with 4 flavonoids: catequin (0.939), kaemferol (0.639), luteolin (0.473) and rutin (0.364). It is worth mentioning the strong correlation between chlorogenic acid and catequin (0.939), the best among all variables. Other good correlations were obtained between luteolin/kaemferol (0.901), rutin/pinocembrin (0.816) and luteolin/quercetin (0.790). In general, terms, with the only exception of the chlorogenic phenolic acid, the greatest correlations are observed between specific flavonoids.



*Resultados*

**Table 4.2.2.** Correlation matrix (Pearson correlation coefficients) among specific phenolic acids and flavonoids compounds, and total antioxidant capacity. Numbers in brackets = P-value

	Caffeic	Chloro.	Ellagic	Ferulic	Gallic	p.coum.	Synapic	Cateq.	Chrysin	Kaemp.	Luteolin	Narin.	Pinoce.	Quercet	Rutin
Chlorogenic acid	-0.091 (0.615)														
Ellágic ácid	0.262 (0.142)	-0.131 (0.466)													
Ferulic acid	-0.150 (0.405)	0.105 (0.560)	<b>0.535**</b> (0.001)												
Gallic acid	<b>0.626**</b> (0.000)	-0.024 (0.894)	0.030 (0.866)	-0.244 (0.170)											
p-coumaric acid	-0.228 (0.202)	0.226 (0.206)	0.115 (0.524)	0.282 (0.112)	-0.187 (0.298)										
Synapic acid	0.079 (0.661)	-0.316 (0.073)	0.140 (0.438)	0.161 (0.371)	0.059 (0.742)	-0.051 (0.778)									
Catequin	-0.136 (0.451)	<b>0.939**</b> (0.000)	-0.101 (0.576)	0.174 (0.333)	-0.140 (0.436)	0.179 (0.320)	-0.262 (0.140)								
Chrysin	0.168 (0.349)	-0.181 (0.314)	-0.119 (0.508)	-0.316 (0.073)	0.021 (0.910)	0.155 (0.390)	-0.073 (0.686)	-0.214 (0.232)							
Kaempferol	0.014 (0.940)	<b>0.639**</b> (0.000)	0.078 (0.666)	0.156 (0.386)	-0.019 (0.918)	-0.036 (0.842)	-0.068 (0.708)	<b>0.637**</b> (0.000)	-0.179 (0.320)						
Luteolin	-0.028 (0.879)	<b>0.473**</b> (0.005)	0.278 (0.118)	0.340 (0.053)	-0.038 (0.834)	-0.099 (0.584)	-0.015 (0.935)	<b>0.521**</b> (0.002)	-0.319 (0.071)	<b>0.901**</b> (0.000)					

*Resultados*

Naringenin	0.290 (0.102)	0.302 (0.088)	0.138 (0.443)	0.145 (0.421)	0.115 (0.522)	-0.016 (0.931)	-0.125 (0.488)	<b>0.380*</b> (0.029)	0.158 (0.380)	0.216 (0.228)	0.059 (0.743)				
Pinocembrin	-0.071 (0.694)	0.234 (0.191)	-0.158 (0.379)	-0.230 (0.197)	-0.230 (0.198)	<b>0.460**</b> (0.007)	-0.340** (0.053)	0.155 (0.390)	<b>0.708**</b> (0.000)	0.037 (0.839)	-0.168 (0.351)	0.100 (0.578)			
Quercetin	-0.084 (0.642)	0.286 (0.107)	0.223 (0.213)	0.233 (0.192)	-0.148 (0.411)	0.240 (0.179)	-0.075 (0.680)	0.286 (0.106)	0.068 (0.709)	<b>0.722**</b> (0.000)	<b>0.790**</b> (0.000)	-0.092 (0.610)	0.229 (0.200)		
Rutin	-0.049 (0.787)	<b>0.364*</b> (0.037)	-0.093 (0.607)	0.009 (0.961)	-0.221 (0.216)	0.653 (0.000)	-0.347 (0.048)	0.267 (0.133)	<b>0.533**</b> (0.001)	-0.017 (0.926)	-0.198 (0.269)	0.232 (0.195)	<b>0.816**</b> (0.000)	0.224 (0.209)	
TOTAL	-0.201 (0.263)	<b>0.448**</b> (0.009)	0.325 (0.065)	<b>0.458**</b> (0.007)	-0.284 (0.109)	<b>0.436*</b> (0.011)	-0.100 (0.579)	<b>0.478**</b> (0.0059)	-0.206 (0.250)	0.267 (0.133)	0.327 (0.063)	0.121 (0.5019)	0.157 (0.381)	0.320 (0.069)	0.296 (0.094)

Significant level: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

Publications about correlation between specific antioxidant compounds in honey are practically non-existing which makes the comparison between the data hereby obtained with previous studies difficult. The only example that could be used for this purpose is the aforementioned study of do Nascimento et al., (2018). They only considered gallic acid, p-coumaric acid and quercetin compounds, and as in the present study, no significant correlation was reported. However, there is abundant information, in honey from different geographical and botanical origin, referring to the good correlation observed between total antioxidant activity (obtained with different nonspecific analytical methods) and total phenolic/total flavonoid contents (Meda et al., 2005; Alvarez-Suarez et al., 2010; Serem & Bester, 2012; Escuredo et al., 2012, Gül & Pehlivanb, 2018). This correlation is the logical consequence since the latter parameters contribute to the antioxidant capacity of honey but are not solely responsible for it (Gheldof et al., 2002).

A PCA was carried out to evaluate the global effect that the province of Mozambique has considering the total antioxidant variables of honey based on specific compounds and total antioxidant activity. In this analysis the average values from the three repetitions for each sample of honey were used. Figure 4.2.1 shows the PCA biplot obtained (scores and loadings for the two principal components) considering all the antioxidant variables and the different provinces. It was found that three principal components explained 73% of the variations in the data set: PC1 37% of the variability, PC2 23% and PC3 13%. The first principal component clearly differentiates Nampula honey (left quadrant) from the other provinces (right quadrant), whereas the second principal component slightly separates Manica (upper quadrants) from Sofala and Zambezia (lower quadrants), without noticeable differences between these last two provinces. The loading plot shows that certain compounds are to some extent responsible for this differentiation.

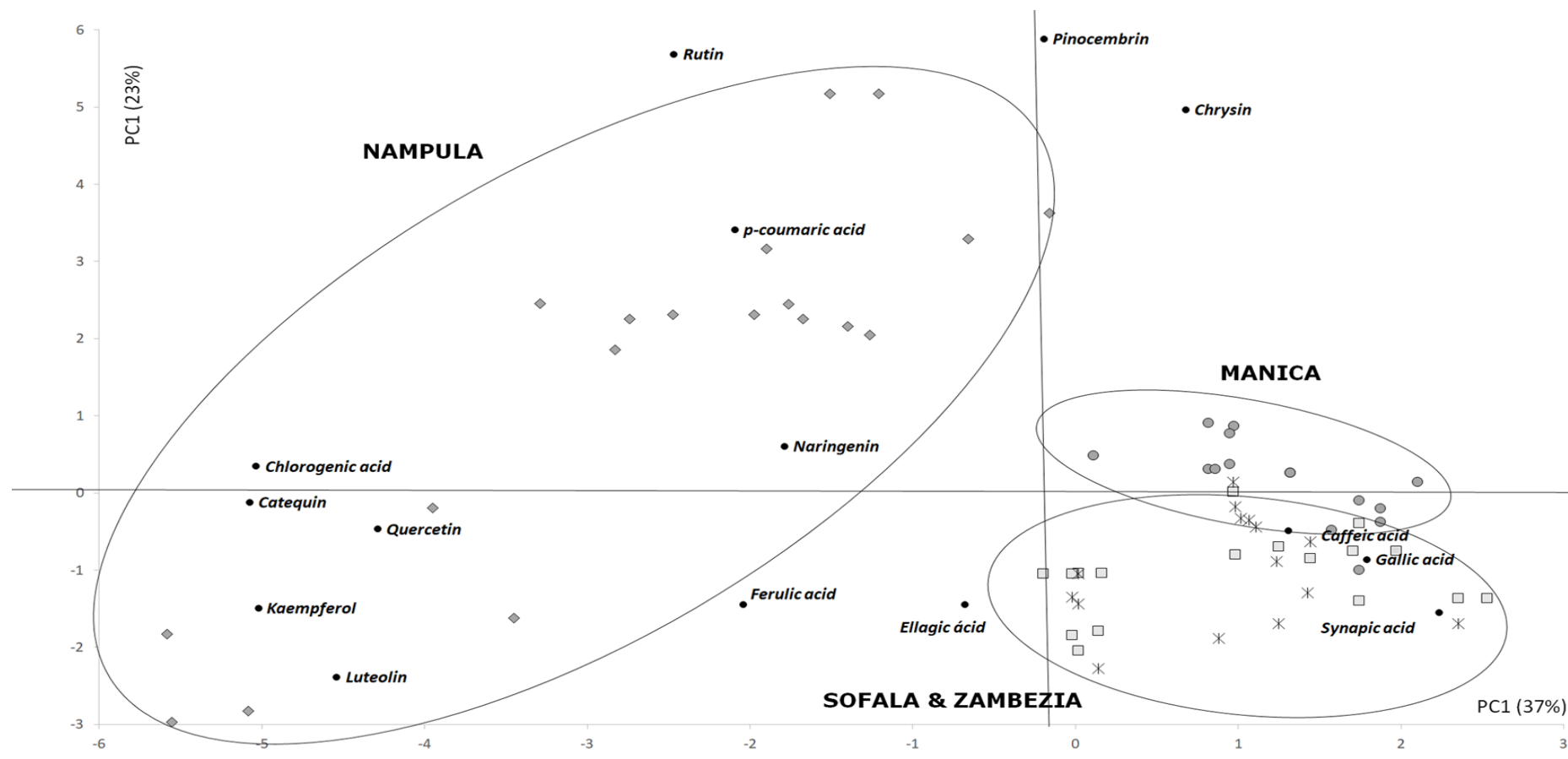
The information provided by both ANOVA and PCA for all the antioxidant variables indicates (as mentioned above), that some of them are more relevant than others for the differentiation of honeys. To discern which variables contribute the most to this difference, a discriminant analysis was applied. This model was obtained by using the specific antioxidant compounds and the total antioxidant capacity, permitting the classification of 99.9% of the cross-validated cases.

Table 4.2.3. shows the standardized canonical discriminant function coefficients obtained. In the construction of the two first discriminant functions, five variables (one phenolic acid and four flavonoids) were used. The most important variables in function 1 (which separates Nampula from the other provinces) were the flavonoids: pinocembrin, kaempferol, rutin and catequin showing small differences among them (1.488, 1.441, 1.258 and 1.104, respectively). In the second discriminant function the most important variables were catequin followed by chlorogenic acid.

**Table 4.2.3.** Standardized canonical discriminant function coefficients

<b>Variables</b>	<b>Function 1</b>	<b>Function 2</b>
	<b>98.5%</b>	<b>1.4%</b>
Pinocembrin	1.488	-0.087
Kaempferol	1.441	-0.069
Rutin	1.258	0.102
Catequin	1.104	2.261
Chlorogenic acid	0.439	-1.995

Table 4.2.4. shows the classification results (expressed as percentages) of the discriminant analysis, demonstrating a correct classification for Nampula honey (100%). However, 40% of honey from Sofala was incorrectly classified (20% coming from Manica and 20% coming from Zambezia). In the same way honey from Manica was correctly classified with 75%, however, 25% of honey from this province was inaccurately classified as coming from Sofala. The percentage of Zambezia honey (20%) was mistaken for honey from Sofala. The wrong classification always takes place involving the three provinces of Central Mozambique (Manica, Sofala and Zambezia). Although there are three different provinces, they share similar botanical and climate conditions. However, Nampula is located in the North of the country where its higher pluviosity lead to the existence of a peculiar melliferous flora different from to the rest of the country. This different vegetation seems to give to the honey originated in this province a certain singularity with respect to its antioxidant properties. In the same way that in other African countries that diverse climatic conditions and flora lead to the existence of different types of honey containing a wide range of total phenols and antioxidant activities (Sime et al., 2015).



**Figure 4.2.1.** PCA biplot of score [samples honey from different provinces of Mozambique: Nampula (◆), Sofala (■), Manica (●) and Zambezia (⋈)] and loading (specific flavonoids and phenolic compounds and total antioxidant capacity).

**Table 4.2.4.** Classification results of the discriminant analysis carried out by cross validated procedure. Percentage of samples well classified by the model.

Province	Predicted Group Membership			
	Nampula	Sofala	Manica	Zambezia
Nampula	100	0	0	0
Sofala	0	60	20	20
Manica	0	25	75	0
Zambezia	0	20	0	80

#### 4. Conclusion

This research study has set a precedent dealing with the antioxidant characteristics of honey from Northern and Central Mozambique, focusing on specific flavonoid and phenolic compounds. In general, flavonoid was higher than phenolic content in honey from all provinces studied. Honey from Nampula (in the North) showed significant higher values of phenolic acids and flavonoid compounds compared to the other three provinces located in the Centre of the country (Sofala, Manica and Zambezia), where the differences among them were not so remarkable. Therefore, the climatic and consequently botanical conditions have a decisive influence on the profile of the compounds studied. Luteolin was the most important flavonoid from the quantitative point of view, representing more than 50% of the specific flavonoids in the 4 provinces, being especially abundant in some samples from Nampula. The most important variables, which distinguish Nampula from the other provinces, were the flavonoids in this consecutive order: pinocembrin, kaempferol, rutin, catequin and catequin; followed by chlorogenic phenolic acid.

This study offers the opportunity increase the lack of knowledge of Mozambiquean honey. The specific flavonoid and phenolic compounds analysed could become a powerful tool to put in value a totally unknown African honey, due to the health implications of its antioxidant properties. This research could be useful in supporting decision makers when it comes time to successfully market this type of honey.

## References

Alvarez-Suarez, J. M., Tulipani, S., Díaz, D., Estevez, Y., Romandini, S., Giamperi, F., & Battino, M. (2010). Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8-9), 2490-2499.

Antony, S. M., Han, I. Y., Rieck, J. R., & Dawson, P. L. (2000). Antioxidative effect of Maillard reaction products formed from honey at different reaction times. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3985-3989.

AOAC SMPR 2011.011, (2011). Association of Analytical Communities (AOAC) International Expert Review Panel on Antioxidants. SMPR 2011.11. Standard method performance requirements for in vitro determination of total antioxidant activity in foods, beverages, Food ingredients, and dietary supplements. [https://www.aoac.org/AOAC\\_Prod\\_Imis/AOAC](https://www.aoac.org/AOAC_Prod_Imis/AOAC). Accessed 02 October 2018.

Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M., & Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 85(5), 957-998.

Attanzio, A., Tesoriere, L., Allegra, M., & Livrea, M. A. (2016). Monofloral honeys by Sicilian black honeybee (*Apis mellifera* ssp. sicula) have high reducing power and antioxidant capacity. *Heliyon*, 2(11). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00193>. Accessed 10 October 2018.

Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., & Facino, R. M. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 533(2), 185-191.

Bertoncelj, J., Polak, T., Kropf, U., Korošec, M., & Golob, T. (2011). LC-DAD-ESI/MS analysis of flavonoids and abscisic acid with chemometric approach for the classification of Slovenian honey. *Food Chemistry*, 127(1), 296-302.

Bradbear, N., 2005. *La apicultura y los medios de Vidas sostenibles. Folheto de la FAO sobre diversificación. Roma*. <http://www.fao.org/docrep/008/y5110s/y5110s00>. Accessed 02 October 2018.

Bueno-Costa, F. M., Zambiazzi, R. C., Bohmer, B. W., Chaves, F. C., da Silva, W. P., Zanusso, J. T., & 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.

do Nascimento, K. S., Sattler, J. A. G., Macedo, L. F. L., González, C. V. S., de Melo, I. L. P., da Silva Araújo, E., & de Almeida-Muradian, L. B. (2018). Phenolic compounds, antioxidant capacity and physicochemical properties of Brazilian *Apis mellifera* honeys. *LWT-Food Science and Technology*, 91, 85-94.

Escriche, I., Kadar, M., Juan-Borrás, M., & Domenech, E. (2011). Using flavonoids, phenolic compounds and headspace volatile profile for botanical authentication of lemon and orange honeys. *Food Research International*, 44(5), 1504-1513.

Escriche, I., Kadar, M., Juan-Borrás, M., & Domenech, E. (2014). Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment. *Food Chemistry*, 142, 135-143.

Escriche, I., Tanleque-Alberto, F., Visquert, M., & Oroian, M. (2017). Physico-chemical and rheological characterization of honey from Mozambique. *LWT-Food Science and Technology*, 86, 108-115.

Escuredo O., Silva L., Valentao P., Seijo M.C. & Andrade P. (2012). Assessing *Rubus* honey value: pollen and phenolic compounds content and antibacterial capacity. *Food Chemistry*, 130 (3), 671–678.

FAO-Governo de Moçambique (2009). Quadro das demandas e propostas de Guiné-Bissau para o desenvolvimento de um programa regional de cooperação entre países da CPLP no domínio da luta contra a desertificação e gestão sustentável das terras. <http://www.fao.org/fileadmin/templates/cplpunccd/Biblioteca/Relatorios/MOZ>. Accessed 02 October 2018.

FAOSTAT. (2016). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistic Division <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QL>. Accessed 02 October 2018.

Gheldof, N., Wang, X. H., & Engeseth, N. J. (2002). Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5870-5877.



Granato, D., Santos, J. S., Maciel, L. G., & Nunes, D. S. (2016). Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds in food matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *80*, 266-279.

Gül, A. & Pehlivanb, P. (2018). Antioxidant activities of some monofloral honey types produced across Turkey. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *25*, 1056-1065.

Jooster, A. & Smith, M. (2004). Report on Honey. External Market Study n°.3. *Ministerio de Industria e Comercio*. Mozambique. 3:2-3.

Makawi, S. Z. A., Gadkariem, E. A., & Ayoub, S. M. H. (2009). Determination of antioxidant flavonoids in Sudanese honey samples by solid phase extraction and High Performance Liquid Chromatography. *E-Journal of Chemistry*, *1*, 429-437. <http://dx.doi.org/10.1155/2009/382504>\_Accessed 10 October 2018

Martos, S., Cossentini, M., Ferreres, F., & Tomás-Barberán, F. A. (1997). Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 2824-2829.

Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J., & Nacoulma, O. G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, *91*(3), 571-577.

Merken, H. M., & Beecher, G. R. (2000). Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(3), 577-599.

Oroian, M., & Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, *74*, 10-36.

Ouchemoukh, S., Amessis-Ouchemoukh, N., Gómez-Romero, M., Aboud, F., Giuseppe, A., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2017). Characterisation of phenolic compounds in Algerian honeys by RP-HPLC coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry. *LWT-Food Science and Technology*, *85*, 460-469.

Rosa, A., Tuberoso, C. I. G., Atzeri, A., Melis, M. P., Bifulco, E., & Dessì, M. A. (2011). Antioxidant profile of strawberry tree honey and its marker homogentisic acid in several models of oxidative stress. *Food Chemistry*, *129*(3), 1045-1053.

Scherer, R., & Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, *112*(3), 654-658.

Serem, J. C., & Bester, M. J. (2012). Physicochemical properties, antioxidant activity and cellular protective effects of honeys from southern Africa. *Food Chemistry*, *133*(4), 1544-1550.

Silici, S., Sagdic, O., & Ekici, L. (2010). Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of Rhododendron honeys. *Food Chemistry*, *121*(1), 238-243.

Sime, D., Atlabachew, M., Abshiro, M. R., & Zewde, T. (2015). Total phenols and antioxidant activities of natural honeys and propolis collected from different geographical regions of Ethiopia. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, *29*(2), 163-172.

Tomás-Barberán, F. A., Martos, I., Ferreres, F., Radovic, B. S., & Anklam, E. (2001). HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *81*(5), 485-496.

Zandamela, E. M. F. (2008). *Caracterización Fisicoquímica y Evaluación Sanitaria de la miel de Mozambique* (Doctoral dissertation). Universitat Autònoma de Barcelona.(Spain). Accessed 02 October 2018.

### **4.3. Physicochemical and rheological characterization of honey from Mozambique**

Isabel Escriche, Fernando Tanleque-Alberto, Mario Visquert, Mircea Oroian

*LWT - Food Science and Technology*

*86, 108-115 (2017)*



## **Abstract**

Obtaining information about honey from Mozambique is the first step towards the economic and nutritional exploitation of this natural resource. The aim of this study was to evaluate physicochemical (moisture, hydroxymethylfurfural “HMF”, electrical conductivity, Pfund colour, CIE L\*a\*b\* colour and sugars) and rheological parameters elastic modulus G', loss modulus G" and complex viscosity  $\eta^*$ ) obtained at different temperatures (from 10 to 40 °C). All the physicochemical parameters were in agreement with the international regulations. Most of the honey samples were classed as honeydew honey since they were dark and had conductivity values above 0.800 mS/cm. The moduli G', G" and  $\eta^*$  decreased with increasing temperature. G' and G" were strongly influenced by the applied frequency, whereas  $\eta^*$  did not depend on this parameter, demonstrating Newtonian behaviour. An artificial neural network (ANN) was applied to predict the rheological parameters as a function of temperature, frequency and chemical composition. A multilayer perceptron (MLP) was found to be the best model for G" and  $\eta^*$  ( $r^2 > 0.950$ ), while probabilistic neural network (PNN) was the best for G' ( $r^2 = 0.758$ ). Sensitivity testing showed that in the case of G" and G' frequency and moisture were the most important factors whereas for  $\eta^*$  they were moisture and temperature.

**Keywords:** African honey, colour, elastic-modulus, loss-modulus, complex-viscosity, Artificial-Neural-Network

### **1. Introduction**

Mozambique, located on the east coast of Africa, is a developing country with great potential in terms of the availability of agro-ecological resources. It has a great diversity of climate, vegetation and geographic regions. This results in a variety of melliferous flora that can be exploited throughout the year by transhumance (Alcobia, 1995). Mozambique produces around 600 tonnes of honey a year (FAOSTAT, 2014) increasing by 100 tonnes in the last five years. However, given the availability of agro-ecological resources, Jooster & Smith (2004) state that there is a potential to produce 3.600 tonnes a year.

Apicultural development is a valuable human activity that plays an important role in the preservation of biodiversity due to its involvement in the pollination of both wild and cultivated plants. In Mozambique, 78% of the territory is suitable for carrying out this activity; however, the contribution of beekeeping to agricultural is non-existent (Zandamela, 2008). Therefore, it would be of great interest to implement policies to develop

beekeeping in this country. This would meet the needs of the domestic market and avoid dependence on imports. All of this would reduce the price of honey and encourage the population to increase the consumption of this nutritious food. Better exploitation of this resource by rural people would mean a significant source of income and therefore a decrease in poverty. For Mozambique, moreover, it would contribute to the improvement of its economy, with the indirect benefit of protecting the environment and biodiversity.

In other developing African countries such as Burkina Faso, beekeeping activities have increased in recent years thanks in part to beekeeping promotion centres installed by beekeeper organizations (Nombré, Schweitzer, Boussim, & Rasolodimby, 2010). These activities are aiding in the production of honey and are playing an important role by creating sustainable livelihoods. Current development in Burkina honey is reflected in the number of scientific papers published in recent years. For example, those focused on the impact of storage conditions on the physicochemical characteristics of Burkina Faso honey (Nombré et al., 2010; Schweitzer, Nombré, Aidoo, & Boussim, 2013a); the impact of climatic changes on nectar considering honey production by honeybee colonies (Schweitzer, Nombré, Aidoo, & Boussim, 2013b); the rheological properties of Honey Burkina Faso (Escriche, Oroian, Visquert, Gras, & Vidal, 2016). However, there is an almost total lack of both scientific and non-scientific information concerning the honey from Mozambique. Due to the importance of the rheological properties of honey as a consequence of their implications in organoleptic perception by the consumer and the quality control of raw material and process control, the aim of the present study is to evaluate the physicochemical parameters and the rheological behaviour of Mozambique honey.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Collection and preparation of samples*

Thirty (30) honey samples harvested in 2014 from the three provinces in Mozambique with the highest production of honey were used in this study: 10 from Nampula, 10 from Sofala and 10 from Zambezia. Honey samples were obtained from traditional beehives built with local materials (hollow trunks, bark cylinders, or interwoven twigs) and placed in trees or other places beyond the reach of predators. The honey was extracted by hand from these hives by pressure, hand-pressed or with wooden presses. Approximately 1 kg of each honey sample was purchased directly from the collectors to carry out the present study.

## 2.2. *Physicochemical analyses*

The harmonised methods of the international honey commission were followed to analyse the physicochemical parameters (hydroxymethylfurfural “HMF”, moisture and electrical conductivity), and colour Pfund (Bogdanov, 2002). In addition, colour CIE  $L^*a^*b^*$  (parameters of the *Commission Internationale d’Eclairage*) and water activity ( $a_w$ ) were determined.

Moisture content was analysed by refractrometry (Abbe-type model T1 Atago, Bellevue, Washington, USA) and the Chataway table. HPLC-UV chromatographic methodology using water-methanol (in a proportion of 90 parts of water per 10 parts of methanol) as the mobile phase for this analysis was chosen to quantify the HMF level. The column used was a ZORBAX (Eclipse Plus C18, 4.6 x 150 mm, 5  $\mu$ m particle size), from Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) and the detector was set to 285 nm (Escriche, et al., 2016).

Electrical conductivity was determined by conductimetry (Crison Instrument, Barcelona, Spain, model C830). Colour Pfund was obtained with a millimeter Pfund scale C 221 Honey Colour Analyzer (Hanna Instruments, Eibar, Spain). Colour CIE  $L^*a^*b^*$  was obtained using a spectrophotometer Minolta CM-3600d (Minolta, Osaka, Japan). The samples were placed in 20-mm-thick holders and measured against a black-and-white background. Translucency was determined by applying the Kubelka–Munk theory for multiple scattering of the reflection spectra. Colour coordinates CIE  $L^* a^* b^*$  were obtained from  $R_\infty$  between 400 and 700 nm for D65 illuminant and 2° observer (CIE, 1986; Visquert, Vargas, & Escriche, 2014).

Water activity was measured using an electronic dew-point water activity meter (25 °C  $\pm$  0.2 °C), Aqualab Series 4 model TE (Decagon Devices, Pullman, Washington, USA), with a temperature-controlled system (Chirife, Zamora, & Motto, 2006). All analyses were performed in triplicate.

Sugar content (glucose, fructose, and sucrose) was analysed in a Compact LC, model 1120 (Agilent Technologies, Ratigen, Germany), coupled to an Evaporative Light Scattering detector (Agilent Technologies model 1200 Series, Ratigen, Germany) and using EZ Chrom Elite software. A Waters Carbohydrate 4.6 x 250 mm, 4  $\mu$ m chromatographic column was used. The mobile phase was water/acetonitrile (25:75) in isocratic

mode at a flow of 0.8 mL/min. Quantification of sugars was realized using external standards constructing the corresponding calibration curves.

All analyses were performed in triplicate.

### 2.3. *Dynamic rheological properties*

The dynamic rheological properties of honey samples were obtained with a RheoStress 1 rheometer (Thermo Haake, Karlsruhe, Germany) at different temperatures (10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40 °C), using a parallel plate system (Ø 60 mm) with a gap of 500 µm (Oroian et al., 2013a,b, Oroian 2015, Escriche, et al., 2016). Measurements were made in triplicate for each sample and condition. After loading the sample, a waiting period of 5 min was used to allow the sample to reach the desired temperature. In order to determine the linear viscoelastic region, stress sweeps were run at 1 Hz first. Then, the frequency sweeps were performed over the range  $f = 0.1-10$  Hz at 1 Pa stress. The 1 Pa stress was in the linear viscoelastic region. Rheowin Job software (v.2.93, Haake) was used to obtain the experimental data and to calculate storage (or elastic) modulus ( $G'$ ), loss (viscous) modulus ( $G''$ ), and complex viscosity ( $\eta^*$ ). The complex viscosity  $\eta^*$  represents the total resistance of the material to flow (Marangoni et al., 2012) and is defined as the ratio of the maximum resulting stress amplitude ( $\tau^*$ ) over the maximum applied strain amplitude ( $\gamma^*$ ) times the angular velocity ( $\omega$ ), as follows:

$$\eta^* = \frac{\tau^*}{\omega \cdot \gamma^*}$$

### 2.4. *Statistical analysis*

An analysis of variance (ANOVA) (using Statgraphics Centurion for Windows, Warrenton, Virginia, USA) was carried out to study the influence of the province of origin on the physicochemical and colour parameters (Juan-Borrás, Escriche, Hellebrandova, & Domenech, 2014). The method used for multiple comparisons was the LSD test (least significant difference) with a significance level  $\alpha = 0.05$ .

The ANNs (artificial neural networks) were developed using the Neurosolutions 6 trial version (NeuroDimension Inc., Gainesville, USA). The system is composed of five inputs (temperature, frequency, moisture content, fructose and glucose content) and three outputs (complex viscosity, loss modulus and elastic modulus). Each model applied to predict the viscoelastic parameters of the samples was checked to discern its suitability using the mean squared error (MSE) and mean absolute error (MAE). The viscoelastic



data (complex viscosity, loss modulus and storage modulus) were divided into three groups: one group for training (33.3 per cent of the data), one group for cross-validation (33.3 per cent of the data) and the last one for testing (33.4 per cent of the data) (Ramzi, Kashaninejad, Salehi, Mahoonak, & Mohamma, 2015; Oroian, 2015).

### **3. Results and Discussion**

#### *3.1. Physicochemical and colour characterization*

Table 4.3.1 shows the average (and standard deviation), minimum and maximum values of the moisture, HMF, electrical conductivity,  $a_w$ , colour (CIE  $L^*a^*b^*$  and Pfund) and sugar content (glucose, fructose and sucrose) of the honey samples from the three provinces of Mozambique: Nampula, Sofala and Zambezia. In addition, the ANOVA result (F-ratio and significant differences) obtained for the factor “province” for each the variable analysed is shown. Bearing in mind that the higher the F-ratio, the greater the effect that a factor has on a variable, moisture was the parameter most affected by the origin followed by  $a_w$ , whereas the sugars and CIE  $L^*a^*b^*$  coordinates were the least affected.

All the physicochemical parameters analysed showed significant differences between groups. Nampula honey samples presented the highest average moisture level of 22.1 g/100 g (between 21.7 to 23.3 g/100 g) and the lowest average HMF content of 15.5 mg/kg (ranged between 8.1 and 24.5 mg/kg). The opposite behaviour was found in Sofala honeys for both parameters, showing the lowest average moisture level of 17.7 g/100 g (between 16.6 and 19.2 g/100 g) and the highest average HMF content of 37.0 mg/kg (between 26.1 and 47.2 mg/kg). Zambezia honeys had an intermediate level of these parameters with means values of 20.5 g/100 g and 28.4 mg/kg, respectively.

The moisture content is an important quality factor of honey, not only because it influences the organoleptic characteristics (viscosity, palatability and taste), but also because it determines shelf-life (Bogdanov, 2002). Moisture content above 20 g/100 g facilitates the growth of osmophilic yeasts, while moisture content less than 14 per cent makes honey extraction difficult due to the high viscosity. According to the criteria of the Council Directive (2002), (maximum permitted limit of 20 g/100g), only the Sofala samples fulfilled this criteria since all the honey samples from Nampula and Zambezia exceeded this value. High moisture values may be associated with inadequate extraction and storage conditions of honey, as most producers do not have appropriate training.

However, they may also be related to the humid climate of some subtropical areas of Mozambique. The moisture values obtained in the present study are similar to those found in South African honey: from 15.3 to 21.7 g/100 g (Zandamela, 2008; Serem & Bester, 2012) and in North African honey (from 14.6 to 21.8 g/100 g) (Malika, Mohamed & Chakib, 2005; Ouchemoukh, Louaileche, & Schweitzer, 2007; Saxena, Gautam, & Sharma, 2010). In general, in European honey the average moisture values are comparable to those of the present study, exceeding the limit of 20 g/100 g in very few occasions (Escriche, Visquert, Juan-Borrás, & Fito, 2009; Kadar, Escriche, Juan-Borrás, Carot, & Domenech, 2011; Juan-Borrás, Domenech, Conchado, & Escriche, 2015).

HMF is an important quality parameter whose speed of formation is favoured by time and temperature of storage and/or heating (Escriche, et al., 2009). Some of the samples had values of HMF higher than the maximum limit of 40mg/kg permitted by European standards (Council Directive, 2002), however, none of them exceeded 80mg/kg, the acceptable limit for honey from regions with a Tropical climate, as is the case in Mozambique (Codex Standard for Honey, 2001).

In honey from central and southern regions of Mozambique and from Burkina Faso similar values of HMF to those in the present study were reported, between 2.84 to 44.83 mg/kg and 1.02 to 35.60 mg/kg, respectively (Zandamela, 2008; Escriche et al., 2016).

Honey is a hygroscopic substance due to its low water activity ( $a_w$ ), which is usually found below 0.630. Some authors consider this value as a limit for good quality honey (Gleiter, Horn, & Isengard, 2006). Most of the samples of the present study showed higher values than this level, not exceeding in any case the value of 0.700 considered the limit of acceptance (Mossel, Bhandari, D'Arcy, & Caffin, 2003). The highest  $a_w$  average values of 0.666 were found in Nampula honey (ranged from 0.650 to 0.680) whereas non-significant differences were found for this parameter between Sofala (0.560-0.620) and Zambezia (0.610-0.620). This indicates that the honeys of this region have less water in the free state and therefore are more stable in the development of microorganisms, enzymatic and chemical reactions dependent on water. These values were similar to those reported in other African honeys (Escriche et al., 2016).

Non-significant differences were found between provinces for the CIE  $L^*a^*b^*$  colour parameters. Higher values and a greater range of variability for luminosity were found in Nampula samples (25.2 to 44.6) than Sofala (28.8 to 30.0) and Zambezia (23.9 to 26.6).

Positive values of both  $a^*$  and  $b^*$  coordinates indicate that all samples had shades of colour between red and yellow (first quadrant of CIEL  $a^*b^*$  space). In general, the low values of  $a^*$  and  $b^*$  reflect the low colour purity of the samples, especially in Zambezia honey.

Regarding the colour measured by the Pfund scale, it is worth noting the existence of statistically significant differences between geographical areas ( $p < 0.001$ ). The Pfund colour values were similar in Nampula (137 to 142 mm) and Zambezia (140 to 143 mm). The Sofala honey values were lower (84 to 125 mm) than the before mention regions. This result is consistent with the observed differences between regions for conductivity values: the lowest conductivity level was shown in Sofala honeys (average: 0.871 mS/cm, and range: 0.391 to 1.372) and the highest in Nampula y Zambezia, with average values of 1.300 and 1.281 mS/cm, respectively. The conductivity values were in the same range as those reported by other authors in Burkina Faso honey (Nombré, et al., 2010; Schweitzer et al., 2013a, Escriche et al., 2016). In general, colour and conductivity are parameters that are inter-correlated and also with the mineral content and the botanical and geographic origin of honey. The darker the honey, the higher the mineral content and the conductivity (Visquert, et al., 2014; Juan-Borrás, et al., 2014). The colour of the honey is related to certain pigments such as carotenes, and xanthophylls, as well as the mineral content found in the nectar of flowers or secretions of plants. According to the European Directive about the quality of honey, conductivity values above 0.800 mS/cm are required to consider a honey as honeydew-honey. Considering this criterion, in the present study, 87% analysed samples could be considered as such.

The sugar values were as expected for pure honey. The levels of glucose (from 27.8 to 31.9 g/100 g), fructose (38.3 and 42.7 g/100 g) and sucrose (less than 1 g/100 g) did not vary significantly between regions. The low content of sucrose indicates that these honeys were properly matured before harvesting (Juan-Borrás et al., 2014). Values of sucrose between 1 and 2 g/100 g were previously reported in African (Escriche et al., 2016) and European honey (Persano-Oddo & Piro, 2004).

*Resultados*

**Table 4.3.1.** Mean (and standard deviation), minimum and maximum values of the moisture, HMF, electrical conductivity,  $a_w$ , colour colour (CIEL\*a\*b\* and mm Pfund) and sugars of the honey samples from three provinces of Mozambique (Nampula, Sofala and Zambezia). ANOVA results (F-ratio and significant differences) obtained for the factor “province” for each variable.

Physicochemical Parameters	NAMPULA			SOFALA			ZAMBEZIA			ANOVA
	Mean (SD)	Min	Max	Mean (SD)	Min	Max	Mean (SD)	Min	Max	F-ratio
Moisture (g/100 g)	22.1(0.3) <sup>a</sup>	21.7	23.3	17.7(1.2) <sup>b</sup>	16.6	19.2	20.5(0.2) <sup>c</sup>	20.30	20.60	47.06 <sup>***</sup>
HMF (mg/kg)	15.5(5.6) <sup>b</sup>	8.1	24.5	37.0(9.9) <sup>a</sup>	26.1	47.2	28.4(4.2) <sup>a</sup>	25.33	31.28	15.22 <sup>***</sup>
Electrical conductivity (mS/cm)	1.300(0.020) <sup>a</sup>	1.351	1.402	0.871(0.621) <sup>b</sup>	0.391	1.372	1.281(0.017) <sup>a</sup>	1.212	1.315	4.77 <sup>*</sup>
$a_w$	0.660(0.010) <sup>b</sup>	0.650	0.680	0.599(0.030) <sup>a</sup>	0.560	0.620	0.612(0.010) <sup>a</sup>	0.610	0.620	29.54 <sup>***</sup>
<b>Colour CIEL* a*b*</b>										
L	32.4(7.4) <sup>a</sup>	25.2	44.6	29.5(0.9) <sup>a</sup>	28.8	30.0	25.6(2.6) <sup>a</sup>	23.9	26.6	1.16 <sup>ns</sup>
a*	6.0(3.9) <sup>a</sup>	1.1	10.7	4.5(0.2) <sup>a</sup>	4.2	4.6	1.4(0.1) <sup>a</sup>	1.3	1.5	1.82 <sup>ns</sup>
b*	10.7(8.9) <sup>a</sup>	1.5	24.8	6.7(0.4) <sup>a</sup>	6.4	7.1	2.2(0.4) <sup>a</sup>	1.9	2.3	1.26 <sup>ns</sup>
<b>Colour (mm Pfund scale)</b>	140 (1) <sup>a</sup>	137	142	104.(22) <sup>b</sup>	84.0	125	141(2) <sup>a</sup>	140	143	17.89 <sup>***</sup>
<b>Sugars (g/100g)</b>										
Glucose	30.4(1.4) <sup>a</sup>	27.8	31.9	30.0(0.7) <sup>a</sup>	29.4	30.9	30.8 (0.4) <sup>a</sup>	30.6	31.1	0.23 <sup>ns</sup>
Fructose	40.8(1.5) <sup>a</sup>	38.3	42.7	41.0 (0.6) <sup>a</sup>	40.4	41.7	40.1(0.1) <sup>a</sup>	40.1	40.2	0.36 <sup>ns</sup>
Sucrose	<1.0			<1.0			<1.0			
Fructose/Glucose	1.34(0.10) <sup>a</sup>	1.24	1.52	1.35(0.03) <sup>a</sup>	1.32	1.39	1.25(0.02) <sup>a</sup>	1.28	1.31	0.35 <sup>ns</sup>

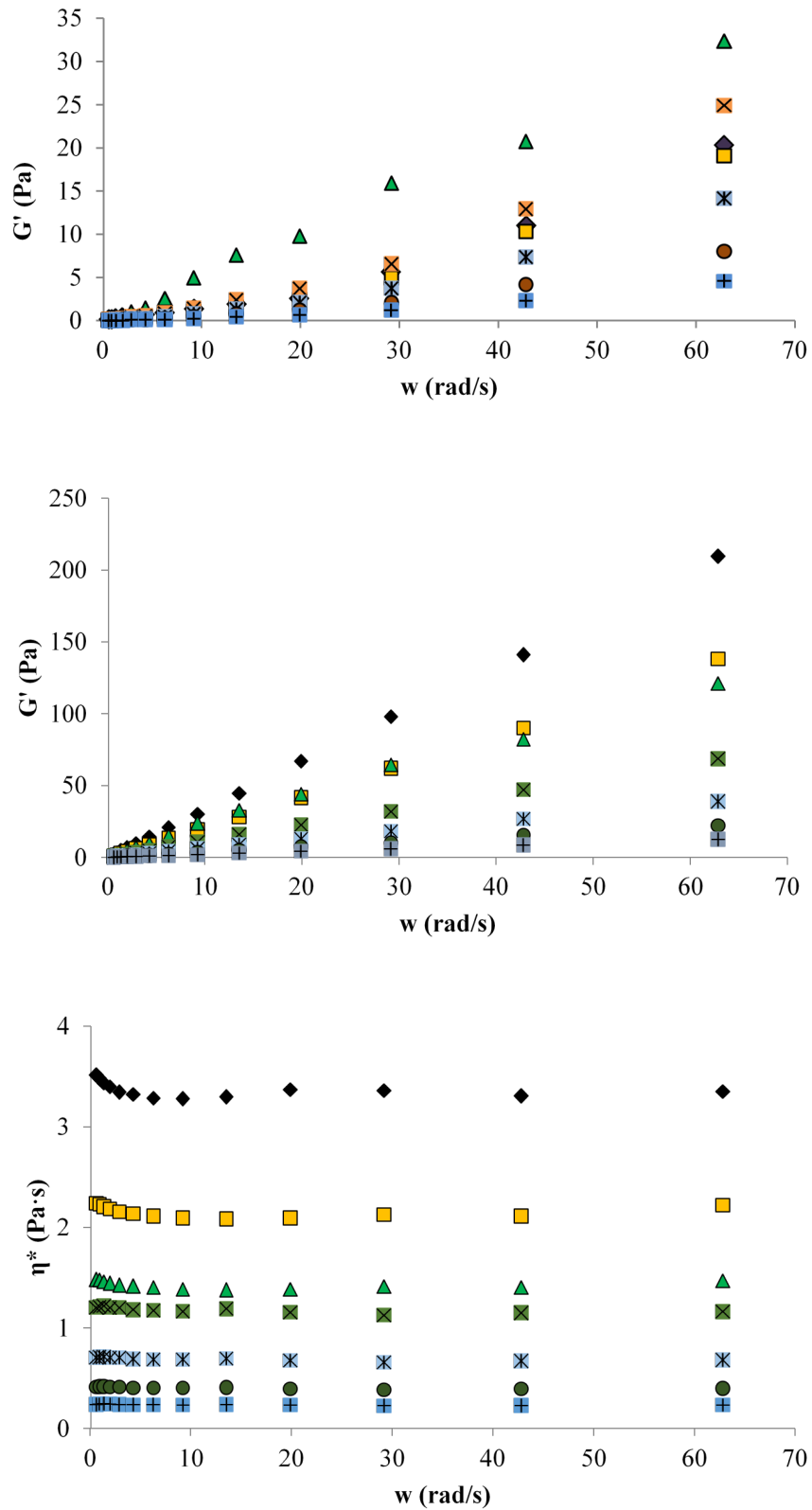
\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . For each factor, different letters in the rows indicate homogeneous groups (significant differences at 95% confidence level as obtained by the LSD test)

All samples exhibited a F/G ratio higher than 1.20, which reflects their low possibility of crystallization. Other authors such as Venir, Spaziani & Maltini (2010) or Nayik, Dar & Nanda (2016) stated that an F/G ratio of 1.14 or less would indicate fast crystallization, while values over 1.58 are associated with no tendency to crystallize.

### *3.2. Rheology characterization*

Since there were no significant differences between regions in relation to the physicochemical parameters, the rheological study of Mozambiquean honey was carried out without differentiating the samples by origin. Figure 4.3.1 shows a typical rheogram for this type of honey. It can be observed that the magnitudes of elastic modulus ( $G'$ ), loss modulus ( $G''$ ) and complex viscosity ( $\eta^*$ ) decrease temperature increases. The decrease in the magnitude of the rheological parameters is due to a decrease in the molecular friction and hydrodynamic forces (Patil & Muskan, 2009, Al-Mahasneh., Rababah, Amer, & Al-Omouh, 2014).

The elastic modulus and loss modulus are strongly influenced by the frequency applied, while the complex viscosity is not influenced by this parameter. Complex viscosity can be used for the characterization of the honey as a Newtonian or non-Newtonian fluid (Oroian, Amariei, Escriche, & Gutt, 2013a). According to Figure 4.3.1, complex viscosity has the same magnitude at a certain temperature irrespective of the frequency applied; this behaviour is normal for a Newtonian honey. The Newtonian behaviour of honey has been observed in the case of honey from other African countries such as Burkina Faso (Escriche et al., 2016) and Ethiopia (Belay et al., 2017); European countries such as Spain (Oroian et al., 2013a), Romania (Oroian, 2012) and Poland (Juszczak & Fortuna, 2006) and Middle Eastern countries such as Israel (Cohen & Weihs, 2010) or Turkey (Karaman, Yilmaz, & Kayacier, 2011).



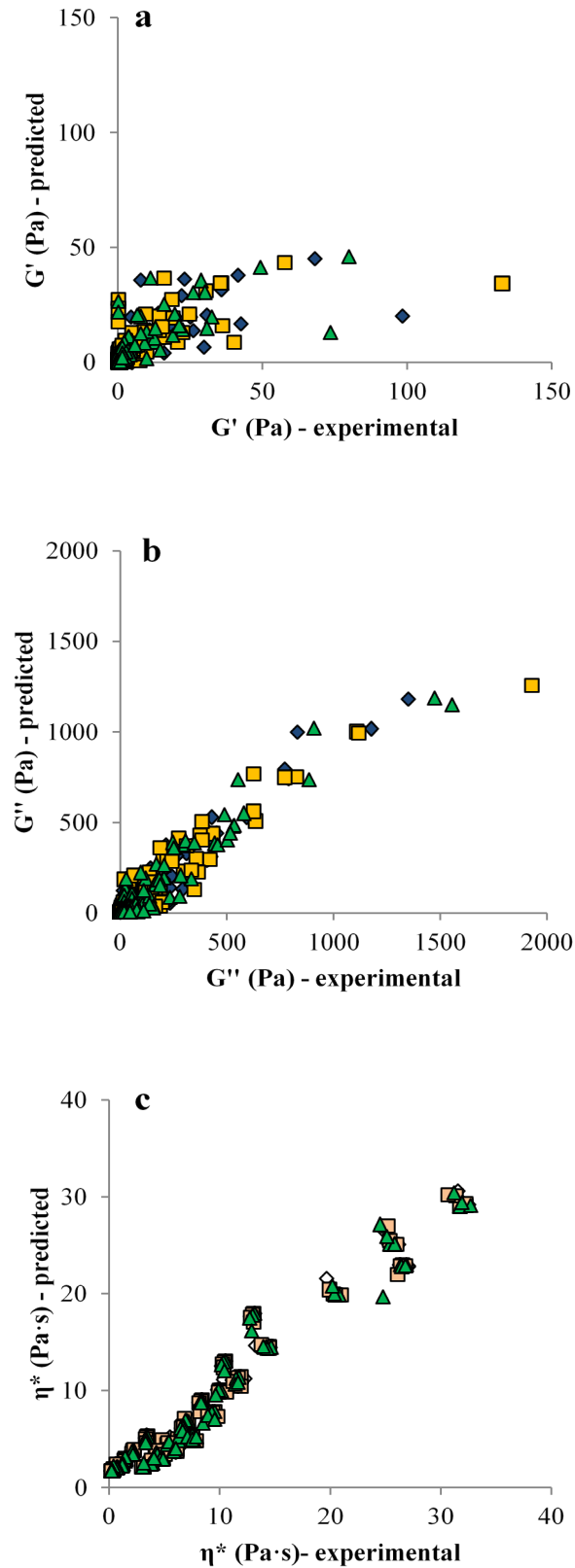
**Figure 4.3.1.** Typical rheograms for honey from Mozambique:  $G'$  (elastic modulus,);  $G''$  (loss modulus,);  $\eta^*$  (complex viscosity) at different temperatures: rhombus (10 °C); square (15 °C); triangle (20 °C); cross (25 °C); star (30 °C); circle (35 °C)

### *3.3. Artificial neural network prediction of rheological parameters*

In order to predict the rheological parameters, an ANN was used in this study. Therefore, three output parameters (elastic modulus, loss modulus and complex viscosity) and five input parameters (temperature, moisture, frequency, fructose, and glucose) were considered. To achieve the best ANN for the prediction of the rheological parameters four methodologies were used: multilayer perceptron (MLP), probabilistic neural network (PNN), recurrent neural network (RNN) and modular neural network (MNN). The suitability of the model was checked using statistical parameters such as: MSE, MAE and coefficient of regression ( $R^2$ ). The best model must have the lowest values for MSE and MAE and maximum  $R^2$ . The data for each model was analyzed as follows: training (33.3 per cent of the experimental data), cross validation (33.3 per cent of the experimental data) and testing (33.4 per cent of the experimental data).

In order to enhance the capabilities of their neural networks, different numbers (from 1 to 3) of hidden layers (intermediate layer between the input and output layer) were used, for each model. There were a total number of 364 experimental data. In the Tables 4.3.2 to 4.3.4 the MAE, MSE and  $R^2$  values for each model are presented. Even if the number of the experimental data were equal for training, testing and cross validation, great differences between the statistical parameters can be observed. Increasing the number of hidden layers did not increase the suitability of the model. According to the data presented in Table 4.3.2, the best model for predicting the elastic modulus values was PNN with 1 hidden layer ( $R^2=0.758$ ). The determination of the elastic modulus can be influenced by the presence of unmelted sugar crystals (Oroian, Amariei, Escriche, & Gutt, 2013b). In the case of loss modulus (Table 4.3.3) and complex viscosity (Table 4.3.4) higher values for the regression coefficients than in the case of elastic modulus can be observed, with  $R^2$  values of 0.961 and 0.990, respectively.

The suitable model for predicting the loss modulus and complex viscosity was MLP with 1 hidden layer. Figure 4.3.2 shows the evolution of experimental and predicted data for the suitable models for the three rheological parameters.



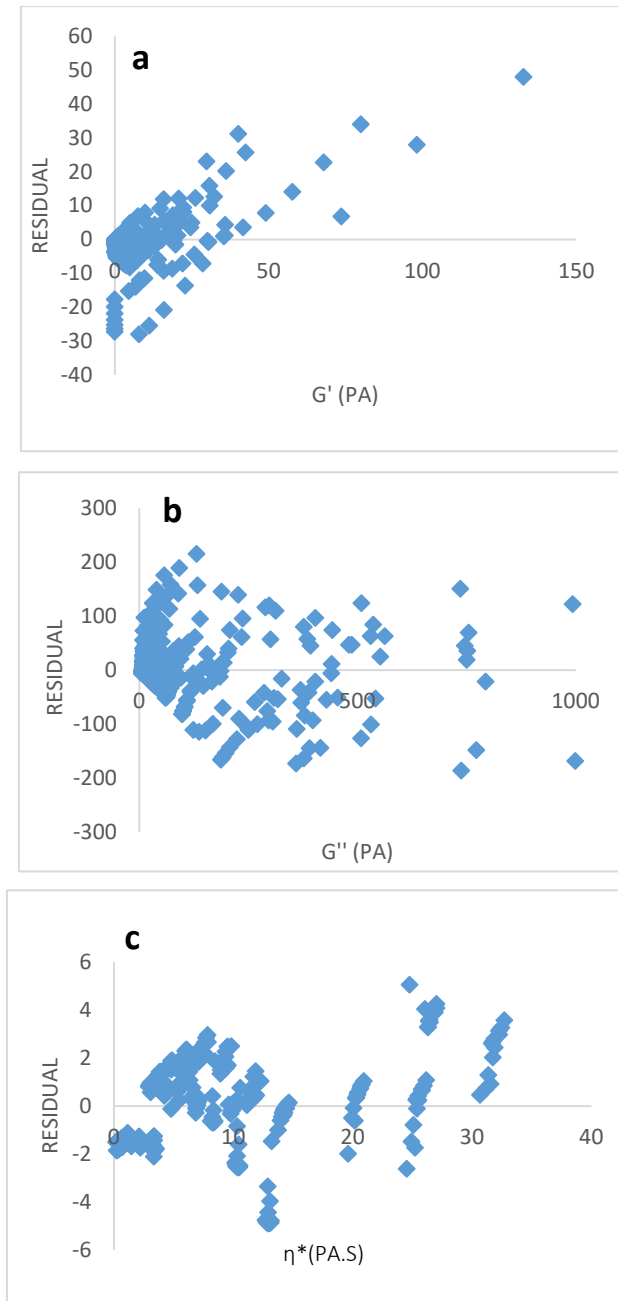
**Figure 4.3.2.** Experimental data vs. predicted data using artificial neural network prediction: a [elastic modulus ( $G'$ ), probabilistic neural network (PNN) with 1 hidden layer prediction]; b [loss modulus ( $G''$ ), multilayer perceptron (MLP) with 1 hidden layer predict c [complex viscosity ( $\eta^*$ ), multilayer perceptron (MLP) with 1 hidden layer prediction]; rhombus (training), square (cross validation) and triangle (testing).



A chaotic distribution can be observed in the case of the elastic modulus, while for the complex viscosity the points are placed on a straight line. With the aim of better explaining the suitability of the model proposed using the ANN, Figure 4.3.3 shows the residual vs measured values for  $G'$ ,  $G''$  and  $\eta^*$ . Considering the distribution of the points, a worse behaviour of the residual values is deduced in the case of  $G'$  compared to  $G''$  and  $\eta^*$ . The parameter  $G'$  cannot be modelled with high regression coefficients in function of different parameters (temperature, fructose, glucose, moisture content, frequency). This could be due to the fact that the elastic part of the honey ( $G'$ ) is very sensitive to the presence of any particles in suspension (e.g. pollen grains, sugar, glucose crystals) which may interfere with the rheological testing. However, this is not a problem because in these types of honey the viscous part is more important than the elastic part ( $G'' \gg G'$ ) (Oroian 2015).

There are no other studies in the literature regarding the prediction of honey rheological parameters using ANN based on temperature, moisture, frequency, fructose, and glucose. To the authors knowledge there are some papers on the modelling of rheological behaviour using ANN based on water content, temperature and shear rate (Al-Mahasneh, Rababah, & Ma'Abreh, 2013, Ramzi, Kashaninejad, Salehi, Mahoonak, & Mohamma, 2015) and the modelling of rheological parameters using ANN based on temperature, frequency and moisture content (Oroian, 2015). In both cases, higher regression coefficients for predicting the dynamic viscosity ( $R^2=0.999$ ) using genetic algorithm-artificial neural network (Ramzi et al., 2015), and viscoelastic parameters ( $R^2 > 0.998$ ) using the MLP were observed (Oroian, 2015).

Each input variable was analysed to estimate the weighting in the model design. This step can be useful before designing the model and will serve as a screening tool to omit unimportant inputs in order to reduce model complexity. This can be of special importance in the presence of highly colinear inputs. The presence of high colinearity means that some model inputs are not really helping to improve model performance, the higher is the colinearity the lower is the model performance (Oroian, 2015).



**Figure 4.3.3.** Measured values of the rheological parameters versus residual values: a [elastic modulus ( $G'$ ), probabilistic neural network (PNN) with 1 hidden layer prediction]; b [loss modulus ( $G''$ ), multilayer perceptron (MLP) with 1 hidden layer prediction]; c [complex viscosity ( $\eta^*$ ), multilayer perceptron (MLP) with 1 hidden layer prediction].

A sensitivity analysis was performed to investigate the effect of each input parameter on the output in terms of magnitude and direction (Table 4.3.5). In this way, it was possible to determine to what extent the models can be affected by changes in the values of the input parameters (Matignon, 2005; Shojaeefard, Akbari, Tahani, & Farhani, 2013). Frequency was the most sensitive in the case of the elastic and loss modulus followed by moisture, which implies that both parameters are critical to the models (PNN in the case

of elastic modulus and MLP for the loss modulus). On the contrary, the low sensitivity of sugars and temperature suggests their low importance in these models. In the case of the MLP model of complex viscosity, moisture and temperature have the highest sensitivity; which is normal since frequency does not have a great influence on this rheological parameter taking into account the Newtonian behaviour of Mozambican honey.

The impact of the chemical parameters on the honey rheological parameters ( $G'$ ,  $G''$  and  $\eta^*$ ) can be estimated quite well based on the sensitivity analysis. It can be observed that all the parameters are influenced primarily by the frequency, followed by the moisture content. This fact is in agreement with other studies, which revealed the high influence of moisture content on the rheological parameters (Özcan, Arslan, & Ceylan, 2006, Oroian 2015, Patil & Muskan, 2009). In the case of glucose and fructose, they had less influence on the rheological parameters than the moisture content .

**Table 4.3.2.** ANN statistical parameters for elastic modulus G'

No	Model Name*	Hidden layers	Training			Cross Validation			Testing		
			MSE	R <sup>2</sup>	MAE	MSE	R <sup>2</sup>	MAE	MSE	R <sup>2</sup>	MAE
1	MLP	1	82.050	0.730	3.690	143.291	0.600	4.141	70.427	0.757	3.59
2	MLP	2	87.611	0.708	4.204	144.092	0.599	4.623	73.420	0.718	4.11
3	MLP	3	101.792	0.669	5.510	163.713	0.534	5.887	88.20	0.671	5.59
4	PNN	1	77.588	0.747	3.678	124.124	0.667	4.026	64.354	0.758	3.59
5	PNN	2	142.471	0.444	6.640	195.192	0.362	6.786	118.550	0.473	6.44
6	PNN	3	176.162	0.053	7.298	224.242	0.011	7.344	150.386	0.095	6.94
7	RNN	1	116.911	0.634	5.617	117.690	0.707	5.538	95.340	0.677	5.33
8	RNN	2	125.242	0.564	5.714	181.991	0.469	6.076	102.21	0.596	5.68
9	RNN	3	125.424	0.575	6.329	190.750	0.435	6.715	98.877	0.624	6.15
10	MNN	1	93.573	0.689	3.941	104.598	0.766	1.687	72.890	0.720	3.85
11	MNN	2	93.285	0.690	3.988	124.600	0.668	4.130	93.285	0.690	3.98
12	MNN	3	145.506	0.601	8.204	193.368	0.523	8.314	119.98	0.660	7.93

\*MLP (multilayer perceptron), PNN (probabilistic neural network), RNN (recurrent neural network), MNN (modular neural network).

**Table 4.3.3.** ANN statistical parameters for loss modulus G''

No	Model Name*	Hidden layers	Training			Cross Validation			Testing	
			MSE	R <sup>2</sup>	MAE	MSE	R <sup>2</sup>	MAE	MSE	R <sup>2</sup>
1	MLP	1	3805.021	0.963	40.764	7018.581	0.953	49.594	6400.079	0.961
2	MLP	2	3754.833	0.964	39.660	8535.952	0.943	48.662	6547.131	0.948
3	MLP	3	12365.674	0.929	74.451	22979.894	0.883	81.955	18127.852	0.900
4	PNN	1	4766.861	0.954	43.411	10558.402	0.924	51.459	7530.804	0.938
5	PNN	2	22323.752	0.766	100.350	30111.400	0.767	103.063	27586.721	0.794
6	PNN	3	53095.026	0.116	153.583	69119.294	0.121	158.734	61810.667	0.125
7	RNN	1	14554.271	0.881	85.448	16015.331	0.882	87.611	14702.995	0.883
8	RNN	2	9652.978	0.912	5.714	12841.700	0.904	63.237	10659.961	0.911
9	RNN	3	12463.684	0.889	82.569	177728.716	0.871	90.958	16265.986	0.867
10	MNN	1	6980.765	0.934	58.067	11156.754	0.921	64.429	8971.344	0.927
11	MNN	2	4948.064	0.953	48.154	9497.002	0.932	55.461	4948.068	0.953
12	MNN	3	33642.771	0.710	124.073	44517.051	0.726	128.858	37984.631	0.749

\*MLP (multilayer perceptron), PNN (probabilistic neural network), RNN (recurrent neural network), MNN (modular neural network)

**Table 4.3.4.** ANN statistical parameters for complex viscosity  $h^*$ .

No	Model Name*	Hidden layers	Training			Cross Validation			Testing		
			MSE	R <sup>2</sup>	MAE	MSE	R <sup>2</sup>	MAE	MSE	R <sup>2</sup>	MAE
1	MLP	1	1.248	0.990	0.764	1.191	0.991	49.594	1.307	0.990	0.796
2	MLP	2	0.024	0.988	0.907	1.335	0.990	0.863	1.481	0.989	0.880
3	MLP	3	4.404	0.974	1.567	4.933	0.973	1.661	4.667	0.975	1.625
4	PNN	1	1.971	0.984	0.876	0.863	0.985	0.863	1.977	0.985	0.857
5	PNN	2	7.723	0.938	1.863	7.451	0.943	1.833	7.457	0.943	1.864
6	PNN	3	63.658	0.204	5.978	66.421	0.212	6.044	66.689	0.200	6.073
7	RNN	1	11.344	0.910	2.264	10.826	0.918	2.303	10.487	0.922	2.316
8	RNN	2	11.160	0.915	2.287	11.008	0.920	2.285	10.684	0.924	2.252
9	RNN	3	16.770	0.914	2.840	16.884	0.921	2.880	17.457	0.914	2.870
10	MNN	1	1.639	0.965	1.639	4.598	0.966	1.687	4.535	0.967	1.668
11	MNN	2	2.933	0.977	1.212	2.658	0.981	1.192	2.933	0.977	1.212
12	MNN	3	43.436	0.771	4.874	45.838	0.756	4.937	45.507	0.764	4.966

\*MLP (multilayer perceptron), PNN (probabilistic neural network), RNN (recurrent neural network), MNN (modular neural network)

**Table 4.3.5.** Sensitivity testing (percentage) of the input parameters (frequency, moisture, glucose content, fructose content, and temperature) on artificial neural networks (ANN) output models [probabilistic neural network (PNN)-1 hidden layer for  $G'$  and multilayer perceptron (MLP)-1 hidden layer for  $G''$  and  $\eta^*$ ] to predict the rheological parameters.

INPUT PARAMETERS	$G'$			$G''$			$\eta^*$		
	Training	Testing	Cross validation	Training	Testing	Cross validation	Training	Testing	Cross validation
<b>Frequency</b>	47.51	48.19	47.83	41.28	40.64	40.66	1.28	1.18	1.19
<b>Moisture</b>	22.29	21.99	22.16	31.47	31.78	31.82	48.22	48.08	48.11
<b>Glucose</b>	14.25	13.90	14.13	7.49	7.69	7.71	6.17	6.61	6.63
<b>Fructose</b>	10.81	10.84	10.74	8.74	8.81	8.83	1.29	1.11	1.13
<b>Temperature</b>	5.13	5.08	5.14	11.02	11.07	11.09	43.04	43.03	43.07

#### 4. Conclusion

The physicochemical parameters and Newtonian behaviour of Mozambican honey are similar to those of other types of honey commercialized in parts of the world such as Africa, Europe and Middle East. In general, following the criteria of colour and conductivity, the majority of honey from Mozambique can be classed as honeydew honey. Rheological parameters, applying an artificial neural network (ANN), can be predicted as a function of temperature, frequency and chemical composition. The multilayer perceptron (MLP) is the best model for loss modulus ( $G''$ ) and complex viscosity ( $\eta^*$ ), while the probabilistic neural network (PNN) is apt for elastic modulus ( $G'$ ).

#### References

Alcobia, J.J.F. (1995). *Apicultura*. Cooperativa de Apicultores de Moçambique e CIDAC-organização não governamental para o Desenvolvimento. Maputo, Mozambique.

Al-Mahasneh, M.A., Rababah, T.M., Ma'Abreh, A.S. (2013). Evaluating the combined effect of temperature, shear rate and water content on wild-flower honey viscosity using adaptive neural fuzzy inference system and artificial neural networks. *Journal of Food Process Engineering*, 36, 510-520.

Al-Mahasneh, M. A., Rababah, T. M., Amer, M., & Al-Omoush, M. (2014). Modeling physical and rheological behavior of minimally processed wild flowers honey. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38, 21-30.

Belay, A., Haki, G. D., Birringer, M., Borck, H., Addi, A., Baye, K., & Melaku, S. (2017). Rheology and botanical origin of Ethiopian monofloral honey. *LWT-Food Science and Technology*, 75, 393-401.

Bogdanov, S., (2002). Harmonized Methods of the International Honey Commission. <http://www.ihc-platform.net/ihcmethods2009.pdf>, Available 06.06.17.

Chirife, J., Zamora, M.C., & Motto, A. (2006). The correlation between water activity and moisture in honey. Fundamental aspects and application to argentine honeys. *Journal of Food Engineering*, 72, 287–292.

Codex Standard for Honey (2001). Codex Stan 12-1981, Adopted in 1981. Revisions 1987 and 2001. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh>



[proxy/ar/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fwork-space.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCO-DEX%252FBSTAN%252FB12-1981%252Fcxs\\_012e.pdf](https://www.fao.org/sites/codex/standards/CO-DEX/BSTAN/B12-1981/cxs_012e.pdf) Available 06.06.17.

Cohen, I., & Weihs, D. (2010). Rheology and micro-rheology of natural and reduced-calorie Israeli honeys as a model for high-viscosity Newtonian liquids. *Journal of Food Engineering*, 100, 366-371.

Council Directive 2001/110 Relating to Honey (2002). Official Journal of the European Communities L10 2002, 47-52.

Escriche, I., Visquert, M., Juan-Borrás M., & Fito P. (2009). Influence of simulated Industrial thermal treatments on volatile fractions of different varieties of honey. *Food Chemistry*, 112, 329-338.

Escriche, I., Oroian, M., Visquert, M., Gras, M. L., & Vidal, D. (2016). Rheological Properties of Honey from Burkina Faso: Loss Modulus and Complex Viscosity Modeling. *International Journal of Food Properties*, 19, 2575-2586.

FAOSTAT (2014). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistic Division. Available at: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QL>.

Gleiter, R.A., Horn, H., & Isengard, H.D. (2006). Influence of type and state of crystallisation on the water activity of honey. *Food Chemistry*, 96, 441-445.

Jooster, A. & Smith. (2004). Report on Honey. External Market Study nº.3. *Ministerio de Industria e Comercio. Mozambique*, 3, 2-3.

Juan-Borrás, M., Escriche I. Hellebrandova, M., & Domenech, E. (2014). Effect of country origin on physicochemical, sugar and volatile composition of acacia, sunflower and tithonia honeys. *Food Research International*, 60, 86-9.

Juan-Borrás, M., E. Domenech, Conchado, A., & Escriche, I. (2015). Physicochemical, quality parameters at the of the honey packaging process: Influence of type of honey, year of harvest and beekeeper. *Journal of Chemistry* <http://dx.doi.org/10.1155/2015/929658>. Available 06.06.17.

Juszczak, L., & Fortuna, T. (2006). Rheology of selected Polish honeys. *Journal of Food Engineering*, 75, 43-49.

Kadar, M.A., Escriche I., Juan-Borrás M., Carot J.M., & Domenech E. (2011). Volatiles fraction composition and physicochemical as tools for differential of lemon blossom honey and orange blossom honey. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 91, 2768-2776.

Karaman, S., Yilmaz, M. T., & Kayacier, A. (2011). Simplex lattice mixture design approach on the rheological behavior of glucomannan based salep-honey drink mixtures: An optimization study based on the sensory properties. *Food Hydrocolloids*, 25, 1319-1326.

Malika, N., Mohamed, F., & Chakib, E.A. (2005). Microbiological and physico-chemical properties of Moroccan honey. *International Journal of Agricultural Biology*, 5, 773-776.

Marangoni, A. G., & Wesdorp, L. H. (2012). *Structure and properties of fat crystal networks*. CRC Press, p. 500.

Matignon, R., (2005), *Neural Network Modeling using SAS Enterprise Miner*, ISBN 1-4184-6675-1.

Mossel, B., Bhandari, B., D'Arcy, B., & Caffin, N. (2003). Determination of viscosity of some Australian honeys based on composition. *International Journal of Food Properties*, 6, 87-97.

Nayik, G.A., Dar, B.N., & Nanda, V. (2016). Physico-chemical, rheological and sugar profile of different unifloral honeys from Kashmir valley of India. *Arabian Journal of Chemistry* <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.08.017>. Available 04.07.2017.

Nombré, I., Schweitzer, P., Boussim, J.I., & Rasolodimby, J.M. (2010). Impacts of Storage Conditions on Physicochemical Characteristics of Honey Samples from Burkina Faso. *African Journal of Food Science*, 4, 458–463.

Oroian, M. (2012). Physicochemical and rheological properties of Romanian honeys. *Food Biophysics*, 7(4), 296-307.

Oroian, M., Amariei, S., Escriche, I., & Gutt, G. (2013a). Rheological aspects of Spanish honeys. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 228-241.

Oroian, M., Amariei, S., Escriche, I., & Gutt, G. (2013b). A viscoelastic model for honeys using the time–temperature Superposition Principle (TTSP). *Food and Bioprocess Technology*, 6(9), 2251-2260.

Oroian, M. (2015). Influence of temperature, frequency and moisture content on honey viscoelastic parameters—Neural networks and adaptive neuro-fuzzy inference system prediction. *LWT-Food Science and Technology*, 63, 1309-1316.

Ouchemoukh, S., Louaileche, H., & Schweitzer, P. (2007). Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys, *Food Control*, 18, 52–58.

Özcan, M., Arslan, D., & Ceylan, D. A. (2006). Effect of inverted saccharose on some properties of honey. *Food Chemistry*, 99, 24-29.

Persano-Oddo, L., & Piro, R. (2004). Main European unifloral honeys: Descriptive sheets. *Apidologie*, 35, 38–81.

Patil, U. K., & Muskan, K. (2009). *Essentials of biotechnology*. (1st ed.) New Delhi (India): IK International Publishing House Pvt Ltd., pages 397.

Ramzi, M., Mahdi Kashaninejad, M., Salehi, F., Mahoonak, A.R.S., Mohamma, S., & Razavi, S.A. (2015). Modeling of rheological behavior of honey using genetic algorithm—artificial neural network and adaptive neuro-fuzzy inference system, *Food Bioscience*, 9, 60-67.

Saxena, S., Gautam, S., & Sharma, A. (2010). Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food Chemistry*, 118, 391-397.

Schweitzer, P., Nombéré, I., Kwamé, A., & Boussim, J. (2013a). Physico-Chemical and Labeling Control of Imported Honeys in Burkina Faso. *Food and Nutrition Sciences*, 4, 1266–1270.

Schweitzer, P., Nombéré, I., Aidoo, K., & Boussim I.J. (2013b). Plants used in traditional beekeeping in Burkina Faso. *Open Journal of Ecology*, 3, 354-358.

Serem, J.C., & Bester, M.J. (2012). Physicochemical properties, antioxidant activity and cellular protective effects of honeys from southern Africa, *Food Chemistry*, 133, 1544-1550.

Shojaeefard, M. H., Akbari, M., Tahani, M., & Farhani, F. (2013). *Sensitivity Analysis of the Artificial Neural Network Outputs in Friction Stir Lap Joining of Aluminum to Brass*. *Advances in Materials Science and Engineering*. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/574914> Available06.06.17.

Venir, E., Spaziani, M. Maltini, E. (2010). Crystallization in “Tarassaco” Italian honey studied by DSC. *Food Chemistry*, 122, 410-415.

Visquert, M.; Vargas, M., & Escriche, I. (2014). Effect of postharvest storage conditions on the colour and freshness parameters of raw honey. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 181–187.

Zandamela, E.M.F. (2008). Caracterización Fisicoquímica y Evaluación Sanitaria de la miel de Mozambique (Doctoral dissertation). Universitat Autònoma de Barcelona. Available 06.06.17.

#### **4.4 Thermal properties and hydrocarbon composition of beeswax from Mozambique and other geographical origins**

Fernando Tanleque-Alberto, María Vargas, Marisol Juan-Borrás, Isabel Escriche

**Industrial Crops and Products**

*(En revision)*



## **Abstract**

This work focuses on the characterization of beeswax from Mozambique (Nampula, Zambezia, Sofala and Manica provinces) in terms of saturated hydrocarbon profile (by HT-GC/FID) and thermal properties (by DSC) and compare them with others from different origins (Spain, Honduras and “reference”). A total of 15 hydrocarbons ranging from C<sub>21</sub>H<sub>44</sub> to C<sub>35</sub>H<sub>72</sub> (typical components of pure beeswax), identifying a much higher amount of odd than even carbon numbers, being the most abundant: C<sub>27</sub>H<sub>56</sub> (average values 4.18-5.25 g/100 g) followed by C<sub>29</sub>H<sub>60</sub> (2.15-4.10 g/100 g) and C<sub>31</sub>H<sub>64</sub> (2.69-3.42 g/100 g), regardless of the origin. Generally, hydrocarbons do not contain enough useful information for differentiation of beeswax. However, melting and cooling enthalpies together with all the temperatures associated with the different lipid polymorphic forms permitted the differentiation of Mozambique provinces from the other origins. A higher melting enthalpy values obtained in Mozambique samples (average values 203-234 J/g) and Honduras (231 J/g) indicates more energy is required to melt these beeswaxes than those from Spain (193 J/g) and “reference” (168 J/g). This might be linked to the tropical temperatures where the bees produce specific wax with. These results are a significant step towards characterizing Mozambiquean beeswax and to better understand its peculiar characteristics.

**Keywords:** Beeswax, Mozambique, Saturated-Hydrocarbon-Profile, Differential-Scanning-Calorimetry, Thermal-Properties

## **1. Introduction**

Beeswax is an abdominal gland secretion from worker-bees. It is a natural fatty product in high demand in the global market due to its multiple applications in the pharmaceutical, cosmetic and food industries, and overall as foundation beeswax in apiculture (Bogdanov, 2016; Waś, Szczęśna, & Rybak-Chmielewska, 2014a; Reis et al., 2018). These sectors require the highest quality of pure beeswax. The recycling of the empty combs after the extraction of honey (obtaining foundation beeswax), gradually concentrate foreign substances to the wax. For this reason, synthetic paraffins (added as adulterants) or residues from veterinary treatments (e.g. acaricides or antibiotics) are becoming more and more present in commercial beeswax. The process of melting, pressing and the subsequent step of treatment with activate carbon, aluminum or magnesium silicates or diatomaceous earth, does not completely eliminate these substances (Bonvehi & Bermejo,

2012). Although there have been many efforts in developing new techniques for cleaning beeswax, to date, none of them have obtained beeswax that is 100% free of foreign substances (Schroeder & Wallner, 2003; Bogdanov, 2016). Therefore, the great necessity in the market for waste-free beeswax suggests the importance of exploring new sources, such as less known geographical origins/bee-breeds, that due to their specific characteristics could avoid residue-related problems. In this context, African beeswax is a good option to consider for the near future since it is well known that it is free of some veterinary residues such as acaricides since African bees (*Apis mellifera scutellata*) are not attacked by *Varroa destructor* (Bogdanov & Gallmann, 2008). Since African beeswax is relatively unknown, it is important to expand the scientific knowledge in terms of its properties.

The evaluation of certain physicochemical parameters such as melting point, saponification number, density, etc. has been widely accepted to establish the purity of beeswax (United States Pharmacopeial Convention, 2000; European pharmacopoeia, 2008). However, there is not a general consensus as to the levels of these parameters and sometimes these norms are considered obsolete (Bernal, Jiménez, del Nozal, Toribio, & Martín, 2005; Jiménez, Bernal, del Nozal, Martín, & Bernal, 2006; Jiménez, Bernal, del Nozal, Toribio, & Bernal, 2007). Therefore, in order to be more aware of intrinsic characteristics of pure beeswaxes, the support of other more advanced methodologies are required (Bonvehi & Bermejo, 2012). Among the possible techniques that allow for a more complete characterization of pure beeswax it can be highlighted those based on the evaluation of hydrocarbons by means of high-temperature gas chromatography with flame ionization detection (HT-GC/FID), and on the thermal properties using the Differential Scanning Calorimetry (DSC) (Ritter, Schulte, Schulte, Thier, 2001; Buchwald, Breed & Greenberg, 2008; Attama, & Müller-Goymann, 2008; Gaillard et al., 2011; Cavallaro, Lazzara, Milioto, Parisi, & Sparacino, 2015).

Hydrocarbons being one of the main components of beeswax (together with monoesters, free fatty acids, free fatty alcohols, etc.) provide valuable information, both in the scientific world and in the analytical laboratories, for the characterization of beeswax and detection of adulterants. It is considered the best routine technique since the percentage of specific hydrocarbon compounds in this product could vary with climatic circumstances, type of honey-bees (European, African and Asian) and when other waxes or paraffins have been added (Bonvehi & Bermejo, 2012).



Differential Scanning Calorimetry (DSC) is a technique that allows for obtaining the thermal fingerprint of a material such as beeswax through the quantitative characterization of the phase transitions that occur during its heating-cooling. Fusion/crystallization represents a first-order phase transition in materials with a crystalline fraction such as beeswax. DSC allows for the measurement of the temperature range over which the phase transition occurs, as well as the associated enthalpy (Turi, 1997; Aboul-Gheit, Abdel-Moghny, Al-Eseimi, 1997; Buchwald et al., 2008). The melting point of beeswax varies slightly with its origin, 61-65 °C being the range more frequently reported (FAO, 1992; British Pharmacopeia, 1993; United States Pharmacopeial Convention, 2000; United States Code of Federal Regulations, 2004). Nevertheless, it is possible to detect by changing the cooling/heating rate the melting and crystallization peaks that are associated with lipid polymorphisms (Gaillard et al., 2011), which in turn provide the thermal fingerprint of the material. In this sense, DSC appears as an interesting tool to distinguish different origins of beeswax. As far as the authors know, there are no previous studies where this technique was used for this purpose.

Therefore, the objective of this work was to characterize beeswax from Mozambique regions in terms of hydrocarbon profile and thermal properties, and to compare this African beeswax with others from different origins.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Samples of beeswax*

Forty-six beeswax samples from northern (12 from Nampula) and central (10 from Zambezia, 12 from Sofala, 12 from Manica) Mozambique with higher production of bee products were analysed. Nampula and Zambezia samples were directly obtained from traditional beehives (made with locally available resources) while those from the provinces of Sofala and Manica were commercialized from the Mozambique honey Company. In parallel, 6 beeswax samples from Spain (company Melazahar Cooperativa Valenciana, Spain), 4 from Honduras (Lenca Community of Siguatepeque, Departamento de Comayagua, Honduras) and 4 from commercial pure beeswaxes considered as “reference” in this work (Fluka, Buchs, Switzerland) were analysed.

### *2.2. Hydrocarbon chromatographic analysis*

A gas chromatograph CE Instruments (CG 8000 TOP), coupled with flame ionization detector (FID) and capillary column (SGE) (25 m x 0.32 mm ID HT5 x 0.1 micrometer),

with helium as the carrier gas (flow of 1 mL/min) were used to analyse the saturated hydrocarbons of beeswax samples. The temperatures of the injector and detector were 275 °C and 330 °C, respectively. The oven temperature was programmed as follows: initial temperature of 70 °C for 2 minutes, a ramp of 5 °C/min until 310 °C for 5 minutes, and finally a ramp of 10 °C/min until 330 °C and then kept at this temperature for 35 min. Identification of the different hydrocarbons was carried out by comparing the retention times obtained in the sample chromatograms with those of the hydrocarbon standards (C17-C35, commercial house), analysed under the same conditions.

Quantification of each compound in the samples was done by comparing peak areas with those of a reference external standard (squalene) as described by Bonvehi & Bermejo, 2012. The preparation of the samples was as follows: a beeswax sample (0.025 g) placed in flask (5 mL) was dissolved (approximately 15 min) in chloroform (Scharlau 99%) (Jimenez et al., 2006). For each sample, 2 µL in splitless mode was injected in triplicate.

### *2.3 Differential Scanning Calorimetry (DSC)*

Thermal properties of beeswax samples were analysed by means of a Differential Scanning Calorimeter (Mettler Toledo, DSC1, Switzerland) equipped with an intra-cooler. Nitrogen (99.99% purity at 20 mL/min) was the purge gas used. The equipment was calibrated with indium and zinc. Samples (between 9 and 12 mg) were set into aluminum pans (40 µL, ME-26763, Al-Crucibles), covered, hermetically sealed and weighed (Mettler Toledo XS205 analytical scale, Switzerland). An empty pan was considered as the reference sample. In order to obtain the melting and crystallization enthalpy ( $\Delta H_m$  and  $\Delta H_c$ ) and melting and crystallization temperature ( $T_m$  and  $T_c$ ), the samples were subjected to the following conditions (from now on referred to as fast condition): cooling from 25 °C to 5 °C at a rate of 5 °C/min and held for 5 min; heating from 5 °C to 65 °C at a rate of 5 °C/min and held for 5 min; heating from 65 °C to 85 °C and cooling from 85 °C to 5 °C at a rate of 5 °C/min. (Based on Buchwald et al., 2008).

Furthermore, with the aim of obtaining all possible melting and crystallization temperatures associated to lipid polymorphic forms of beeswax, samples were also subjected to the following conditions (from now on referred to as slow condition): heating from 20 °C to 75 °C at a rate of 1 °C/min; cooling from 75 °C to 20 °C at a rate of 1 °C/min (slow scan) (Based on Gaillard et al., 2011).

The melting temperature together with melting and crystallization enthalpy were obtained using Mettler Toledo DSC STARe SW 12.00 evaluation software. The analysis of each sample was carried out in triplicate.

#### *2.4. Statistical analysis*

The influence of beeswax origin on the hydrocarbon profile and thermal properties were evaluated by means of an ANOVA (LSD for multiple comparisons, and  $\alpha=0.05$  as significance level) using the Statgraphics Centurion for Windows XVII. In addition, data were analysed using a principal component analysis (PCA) applying the software Unscrambler X.10.5

### **3. Results and Discussion**

#### *3.1. Saturated hydrocarbons profile*

Table 4.4.1. shows the mean and standard deviation values of the hydrocarbons quantified in the beeswax from the four provinces of Mozambique (Nampula, Zambezia, Sofala, Manica), as well as from other origins (Spain, Honduras and “reference”). This table also shows the ANOVA results with the statistical significance and the corresponding homogeneous groups.

A total of 15 saturated hydrocarbons ranging from  $C_{21}H_{44}$  to  $C_{35}H_{72}$  were identified with a much higher amount of odd than even carbon number hydrocarbons. All these can be considered as typical components of pure beeswax (Aichholz & Lorbeer, 1999; Aichholz & Lorbeer, 2000; Jimenez et al., 2004; Maia & Nunes, 2013; Waś, Szczęśna, & Rybak-Chmielewska, 2014b). The presence of alkanes containing over 35 atoms of carbon is not a characteristic of pure beeswax (Waś, Szczęśna, & Rybak-Chmielewska, 2014a). In this present work the most abundant hydrocarbon in all samples was  $C_{27}H_{56}$  (with average values from 4.18 to 5.25 g/100 g) followed by  $C_{29}H_{60}$  (from 2.15 to 4.10 g/100 g) and  $C_{31}H_{64}$  (from 2.69 to 3.42 g/100 g). These three compounds being approximately 60% of the total amount of hydrocarbons; which is a common pattern in pure beeswax independently of the geographical origin (Bonvehi & Bermejo, 2012; Waś, Szczęśna, & Rybak-Chmielewska, 2014a). Bonvehi & Bermejo, (2012) in pure Spanish beeswax reported: 3.10-5.42 g/100 g; 1.42-3.78 g/100 g and 1.97-3.37 g/100 g, for  $C_{27}H_{56}$ ,  $C_{29}H_{60}$  and  $C_{31}H_{64}$ , respectively; these values representing almost 70% of the total of hydrocarbons. Similar compositions were described in Polish beeswax, where for these three compounds it was found: 3.23, 2.23 and 1.93 as well as 3.03, 2.30 and 1.88 g/100 g

in light and dark combs, respectively (Waś, Szczęsna, & Rybak-Chmielewska, 2014a; Waś, Szczęsna, & Rybak-Chmielewska, 2014b). In the same way, in Portuguese virgin beeswax the relative abundance of these three main even hydrocarbons was in accordance with the values found in this study (Maia, Barros & Nunes, 2013).

In the present work, statistically significant differences among origins were found for seven out of fifteen compounds:  $C_{21}H_{44}$ ,  $C_{22}H_{46}$ ,  $C_{23}H_{48}$ ,  $C_{26}H_{54}$ ,  $C_{29}H_{60}$ ,  $C_{34}H_{70}$  and  $C_{35}H_{72}$  (Table 4.4.1.). In some cases like  $C_{29}H_{60}$ , value from specific origin, like Spanish were much higher than other.

Occasionally, several hydrocarbons were not identified in specific origins such as Honduran ( $C_{22}H_{46}$ ,  $C_{24}H_{50}$ ,  $C_{26}H_{54}$ ,  $C_{28}H_{58}$ ), “reference” samples ( $C_{22}H_{46}$ ,  $C_{24}H_{50}$ ,  $C_{32}H_{66}$ ,  $C_{34}H_{70}$ ,  $C_{35}H_{72}$ ) or Sofala and Manica ( $C_{22}H_{46}$ ).

The greater number of total hydrocarbons (average of 19.7 g/100 g), both even (average of 1.54 g/100 g) and odd (average of 18.16 g/100 g) were observed in Spanish samples; whereas the smallest corresponded to the “reference” beeswax (average of 0.84 g/100 g and 15.83 g/100 g, for even and odd, respectively). The remaining samples showed intermediate quantities of total hydrocarbons, being the Hondurans samples those that showed the lowest amount of total odd hydrocarbons (15.72 g/100 g), but the highest of total even hydrocarbons (1.35 g/100 g). Despite the differences observed in the mean values of the total odd hydrocarbons, the ANOVA analysis does not show differences possibly because of the ample range of data variability of some origins, like the Spanish samples.

Bonvehi & Bermejo, (2012) in Spanish beeswax reported a total hydrocarbon value close to 18%, whereas Koster-Keunen, (2010) 15-18% in African beeswax. In both studies, the reported data are comparable with the results found in the present study. However, it seems that these values are not in line with the International Honey Commission (IHC), that has fixed a limit of 14.5% for the total hydrocarbons in beeswax and 13.8% in the case of African and Africanized bees (Bogdanov, 2016).

**Table 4.4.1.** Mean and standard deviation values of the saturated hydrocarbons profile (g/100 g) found in beeswax from Mozambique (Nampula, Sofala, Manica and Zambezia), Spain, Honduras and “reference” (analytical reagent of pure beeswax) and ANOVA results (F-ratio and significant differences).

Saturated hydrocarbons	MOZAMBIQUE				OTHER ORIGINS			ANOVA
	Nampula	Zambezia	Sofala	Manica	Spain	Honduras	“Reference	F-ratio
C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>	0.44(0.35) <sup>ab</sup>	0.29(0.27) <sup>a</sup>	0.77(0.71) <sup>b</sup>	0.32(0.35) <sup>a</sup>	0.22(0.25) <sup>a</sup>	0.20(0.42) <sup>a</sup>	0.65(0.12) <sup>ab</sup>	2.6*
C <sub>22</sub> H <sub>46</sub>	0.13(0.13) <sup>b</sup>	0.03(0.08) <sup>a</sup>	0.00(0.00) <sup>a</sup>	0.00(0.00) <sup>a</sup>	0.47(0.12) <sup>a</sup>	0.00(0.00) <sup>a</sup>	0.00(0.00) <sup>a</sup>	4.3*
C <sub>23</sub> H <sub>48</sub>	0.47(0.19) <sup>ab</sup>	0.73(0.28) <sup>bc</sup>	0.71(0.42) <sup>a</sup>	0.53(0.22) <sup>ab</sup>	1.02(0.31) <sup>c</sup>	0.73(0.32) <sup>bc</sup>	0.31(0.12) <sup>a</sup>	4.1*
C <sub>24</sub> H <sub>50</sub>	0.06(0.14)	0.06(0.10)	0.05(0.06)	0.06(0.14)	0.029(0.07)	0.00(0.00)	0.00(0.00)	ns
C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>	1.63(0.58)	2.13(0.32)	2.12(0.42)	1.97(0.18)	2.06(0.63)	1.89(1.35)	1.46(0.076)	ns
C <sub>26</sub> H <sub>54</sub>	0.11(0.09) <sup>b</sup>	0.10(0.07) <sup>bc</sup>	0.02(0.04) <sup>ab</sup>	0.06(0.08) <sup>bc</sup>	0.27(0.09) <sup>b</sup>	0.00(0.00) <sup>a</sup>	0.25(0.01) <sup>b</sup>	12.6***
C <sub>27</sub> H <sub>56</sub>	5.24(0.66)	4.72(1.10)	4.18(1.26)	4.75(0.45)	5.2(1.4)	4.41(1.24)	5.25(0.33)	ns
C <sub>28</sub> H <sub>58</sub>	0.23(0.22)	0.13(0.14)	0.28(0.26)	0.29(0.38)	0.24(0.13)	0.00(0.00)	0.21(0.02)	ns
C <sub>29</sub> H <sub>60</sub>	2.7(0.40) <sup>b</sup>	2.55(0.29) <sup>b</sup>	2.88(0.36) <sup>a</sup>	2.15(0.66) <sup>b</sup>	4.10(1.38) <sup>c</sup>	2.41(0.61) <sup>b</sup>	2.92(0.22) <sup>b</sup>	8.1***
C <sub>30</sub> H <sub>62</sub>	0.25(0.20)	0.27(0.14)	0.15(0.18)	0.16(0.13)	0.24(0.13)	0.30(0.11)	0.38(0.11)	ns
C <sub>31</sub> H <sub>64</sub>	3.40(0.77)	3.14(0.55)	2.71(0.70)	3.08(0.37)	3.42(1.02)	3.00(1.06)	2.69(0.34)	ns
C <sub>32</sub> H <sub>66</sub>	0.14(0.11)	0.14(0.16)	0.16(0.12)	0.27(0.28)	0.23(0.25)	0.11(0.09)	0.00(0.00)	ns
C <sub>33</sub> H <sub>68</sub>	3.04(0.40)	2.89(0.49)	2.42(0.89)	2.51(0.79)	2.13(1.02)	2.14(0.77)	2.56(0.20)	ns

*Resultados*

C <sub>34</sub> H <sub>70</sub>	0.24(0.19) <sup>b</sup>	0.13(0.16) <sup>ab</sup>	0.22(0.13) <sup>ab</sup>	0.09(0.16) <sup>ab</sup>	0.06(0.14) <sup>a</sup>	0.94(0.12) <sup>ab</sup>	0.00(0.00) <sup>a</sup>	2.3*
C <sub>35</sub> H <sub>72</sub>	0.75(0.33) <sup>ab</sup>	1.01(0.87) <sup>ab</sup>	1.23(0.91) <sup>b</sup>	1.42(1.58) <sup>b</sup>	0.01(0.03) <sup>a</sup>	0.94(0.33) <sup>ab</sup>	0.00(0.00) <sup>a</sup>	2.8*
Σ of even	1.16(0.23) <sup>bc</sup>	0.86(0.36) <sup>ab</sup>	0.88(0.24) <sup>ab</sup>	0.93(0.31) <sup>ab</sup>	1.54(0.99) <sup>c</sup>	1.35(0.14) <sup>b</sup>	0.84(0.11) <sup>a</sup>	2.3*
Σ of odd	17.67(1.9)	17.46(1.32)	16.52(1.56)	16.73(1.00)	18.16(5.4)	15.72(1.6)	15.83(1.18)	ns
Σ of even and odd	18.83(2.02) <sup>ab</sup>	18.32(1.30) <sup>ab</sup>	17.40(1.56) <sup>ab</sup>	17.66(1.19) <sup>ab</sup>	19.70(4.7) <sup>b</sup>	17.7(1.28) <sup>ab</sup>	16.67(1.27) <sup>a</sup>	3.5*
Carbon Preference Index (CPI)	0.06(0.01)	0.05(0.02)	0.05(0.01)	0.05(0.01)	0.08(0.07)	0.031(0.006)	0.052(0.003)	ns

Different letters in the same row indicate significant differences at 95% confidence level as obtained by the LSD test. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$

It is evident that the beeswax composition may vary depending on the bee melliferous subspecies, from the time it was collected and the weather condition during production, among others. However, all these considerations do not justify the difference of values suggested by IHC (Koster-Keunen, 2010; Bonvehi & Bermejo, 2012). These discrepancies might be caused by the different analytical methodology used to calculate the percentages: gravimetry by IHC and chromatography in the present and the above mentioned studies.

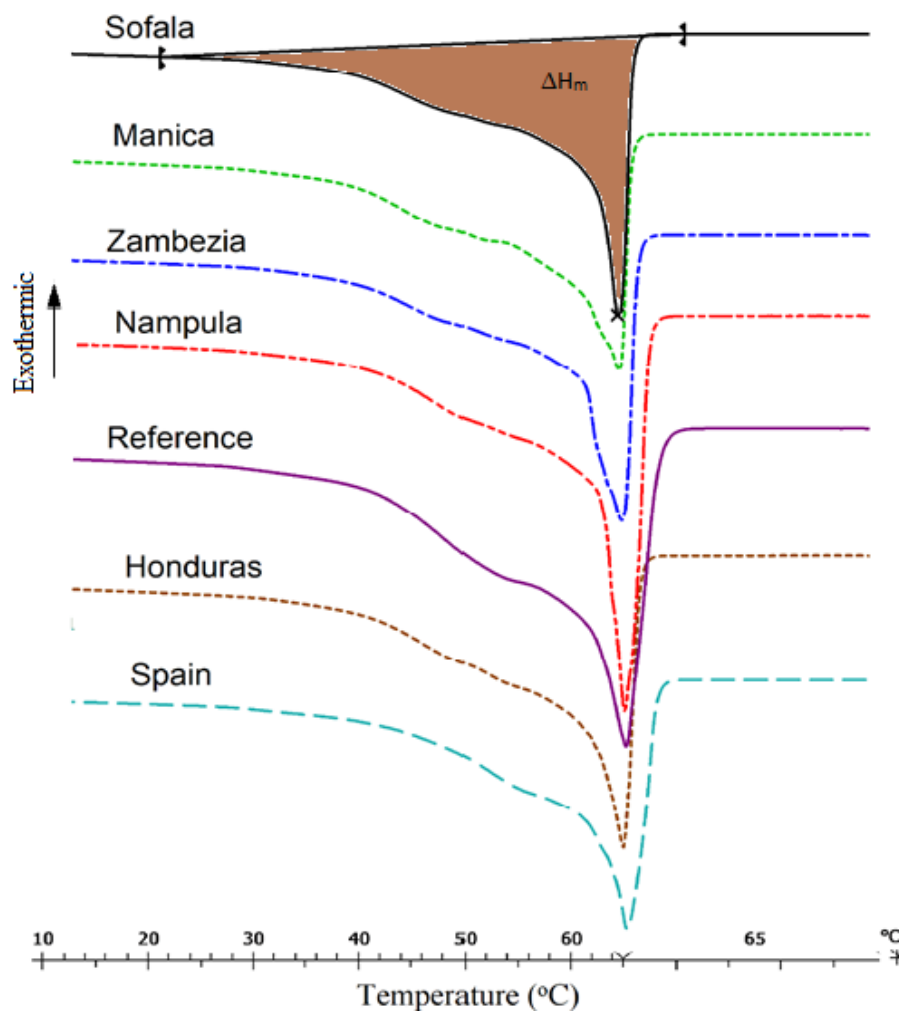
Beeswax is characterised by a number of hydrocarbons balanced between even and odd. Thus, this ratio is expressed as “Carbon Preference Index” ( $CPI = \frac{\sum \text{even hydrocarbons}}{\sum \text{odd hydrocarbons}}$ ) and widely accepted as quality criteria (Jiménez, Bernal, del Nozal, Martín, Toribio, 2009; Bonvehi & Bermejo, 2012; Maia & Nunes, 2013; Waś, Szczęśna, & Rybak-Chmielewska, 2014a; Waś, Szczęśna, & Rybak-Chmielewska, 2014b). In this sense, a CPI value between 0.02 and 0.09 indicates beeswax of good quality (without foreign substances); and a CPI between 0.10 and 0.16 could be a sign of adulteration higher than 5%. According to this criterion, with the only exception of two samples from Spain, all the rest comply with this quality standard. These two samples could contain small quantities of external elements such as paraffins since these provoke the increase of even hydrocarbons and therefore a higher CPI value. It is worth mentioning the lowest CPI values of the samples from Honduras (average=0.031) and the similarity of all CPI values of the samples from Mozambique (average=0.05-0.06) with the “reference” (average=0.05).

A principal component analysis (PCA) was performed to evaluate from a descriptive point of view the global effect of the beeswax origin on the saturated hydrocarbons profile. This PCA (figure not shown) reflects that there is no spontaneous classification of the samples whatsoever; which demonstrates that the saturated hydrocarbons do not contain usable information for differentiation of the studied beeswax according to their origin.

### *3.2 Thermal analysis*

The melting and crystallization enthalpy ( $\Delta H_m$  and  $\Delta H_c$ ) and melting and crystallization temperature ( $T_m$  and  $T_c$ ), were obtained applying the quick conditions at a rate of 5 °C/min. Figure 4.4.1 shows examples of DSC thermograms obtained applying these conditions to beeswax samples of the different geographical origins. In this figure, the

melting enthalpy is shown as a shaded area whereas the melting temperature is indicated as an  $x$  in the lower peak of the line. These thermograms show a typical pure beeswax behavior, similar to what was observed in other African beeswax (Basson & Reynhardt, 1988) and from other origins such as USA, Indonesia, China and the Philippines, and Costa Rica, among others (Buchwald et al., 2008).

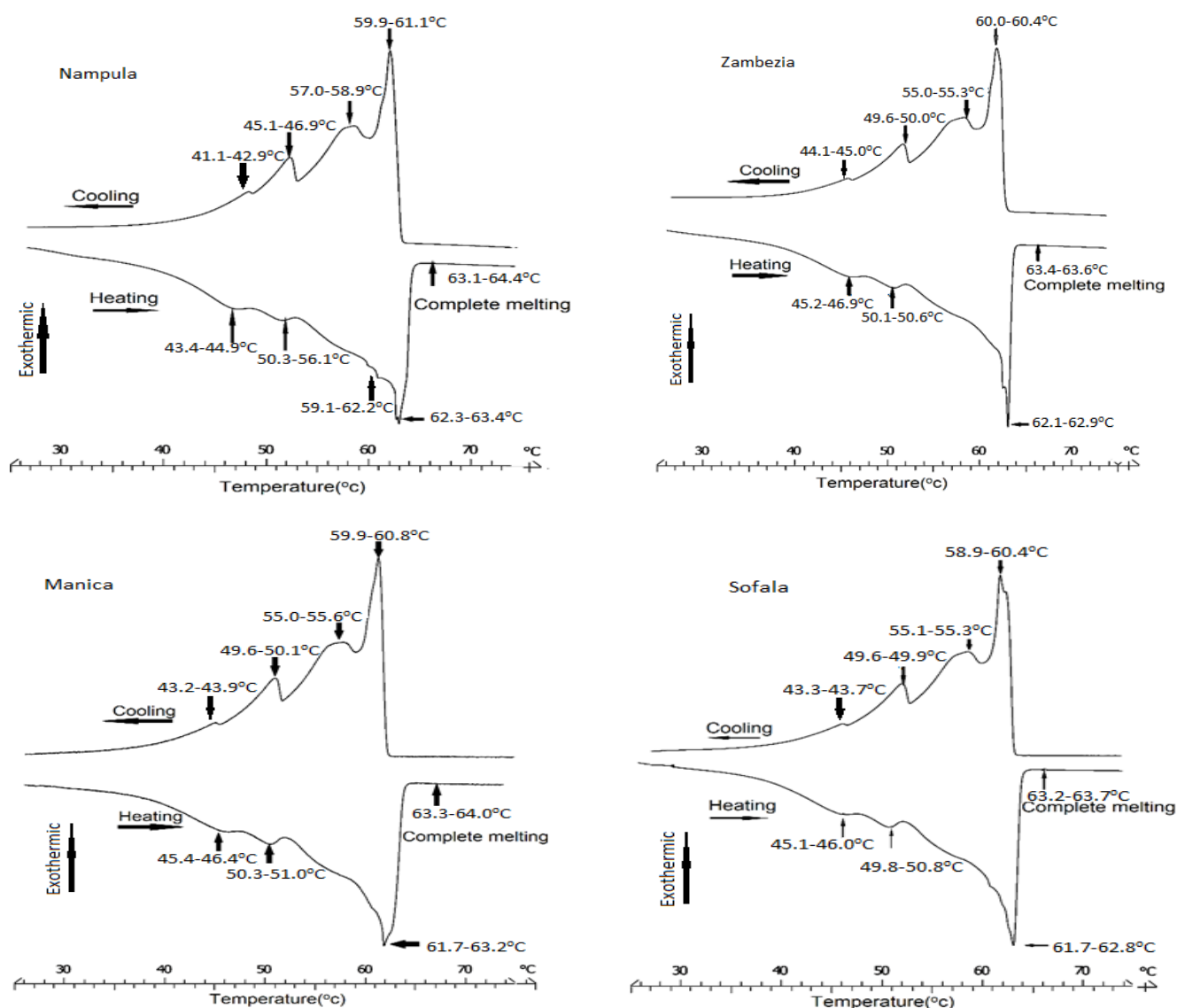


**Figure 4.4.1.** DSC thermograms (5 °C/min with 5 min isotherm step at 65 °C) of beeswax samples from four provinces of Mozambique (Nampula, Zambezia, Sofala and Manica), Spain, Honduras and “Reference” sample

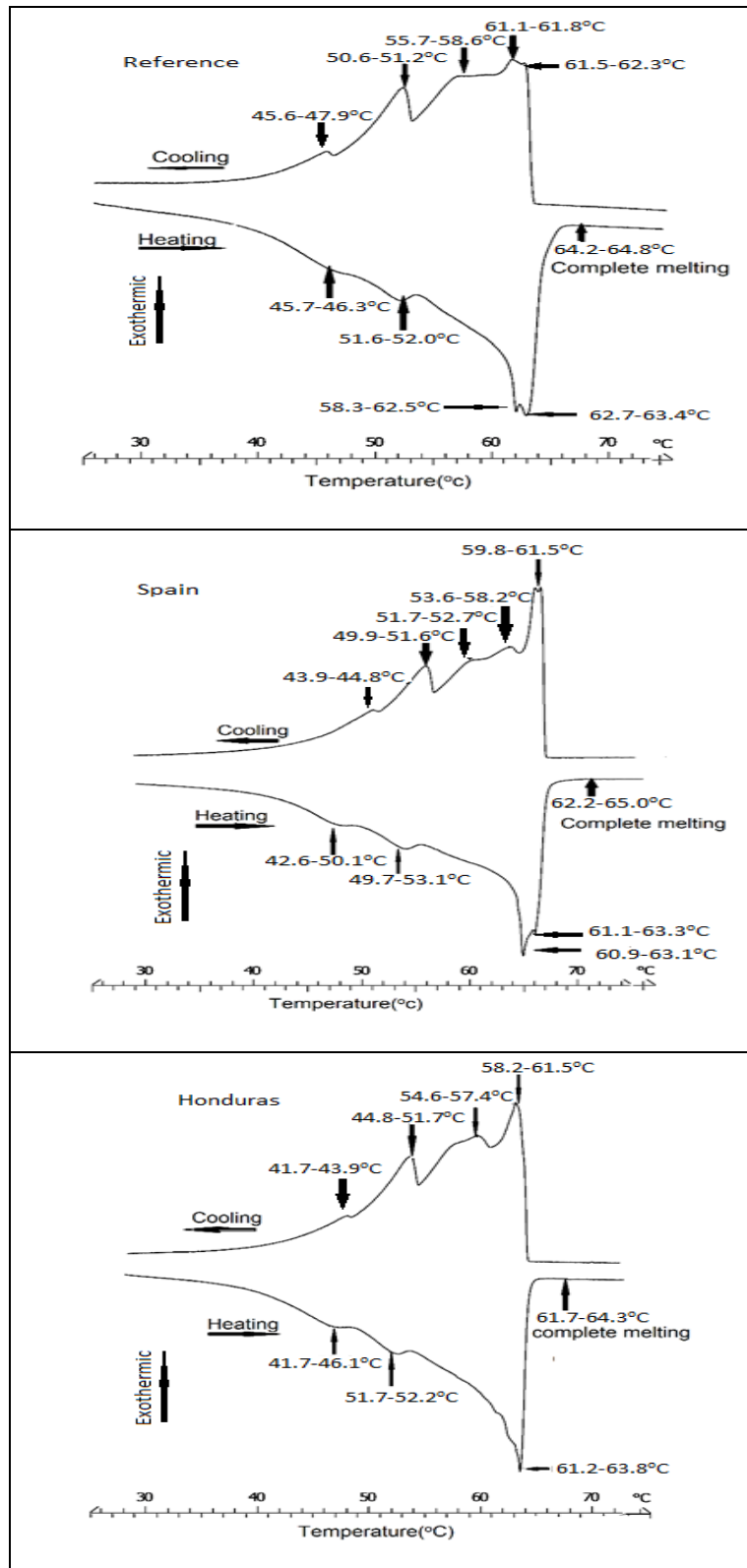
The application of the slow conditions (at 1 °C/min) heating-cooling scan allowed for the observation of all possible melting and crystallization temperatures associated to lipid polymorphic forms of beeswax. Examples of DSC thermograms obtained under these conditions are shown in Figure 4.4.2 (4 provinces of Mozambique) and Figure 4.4.3 (Honduras, Spain and “reference”). The complete melting ranged between 63.1 °C and



64.4 °C, which is coherent with the values reported in other works (66.2 °C Gaillard et al., (2011)). It can be observed that in all cases the heating and cooling thermograms are quite similar, although some differences could be detected. In general, during the heating scan (lower part of the figures), three polymorphic transitions can be confirmed since three melting temperatures were detected ( $T_{m1}$ ,  $T_{m2}$ ,  $T_{m3}$ ). However, in the cooling scan (upper part of the figures) four melting temperatures appeared ( $T_{c1}$ ,  $T_{c2}$ ,  $T_{c3}$ ,  $T_{c4}$ ). The last peak is not detected on the heating scan or might be masked by the width of the melting peak which is much wider than the correspondent to crystallization. This same performance was also observed by Gaillard et al. (2011) in beeswax samples from France.



**Figure 4.4.2.** DSC thermograms of beeswax samples from four provinces of Mozambique (Nampula, Zambezia, Sofala and Manica) at a rate of 1 °C min<sup>-1</sup>.



**Figure 4.4.3.** DSC thermograms of beeswax samples from Spain, Honduras and “Reference” sample at a rate of  $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ .

The results (average and standard deviation) for all thermal properties, obtained from the thermograms carried out in all the samples analyzed are shown in Table 4.4.2. This table also indicates the ANOVA results (F-ratio and significant differences) for the

factor origin. All these parameters were significantly affected by beeswax origin to a different extent depending on the parameter considered. As was expected, the beeswax of the Mozambique regions showed quite similar thermal behavior since 10 of the 11 parameters studied were not significantly different among the 4 provinces (same homogeneous group of the ANOVA).

Taking into account all samples,  $T_m$  varied from 63.8 °C to 64.49 °C being within the range of the values reported in previous studies in beeswax produced by *Apis Mellifera* specie. Knuutinen & Norrman (2000) reported 64.4 °C as average values of  $T_m$  and Buchwald, Breed & Greenberg (2008) 64.6 °C±0.67. In both cases, beeswax was from the same bee specie and  $T_m$  was obtained also by DSC.

Considering that beeswax it is not a single-phase material; it is not appropriate to base its characterization almost exclusively in terms of  $T_m$  which provides incomplete information. In addition, the procedure proposed in the European legislation and pharmacopoeia is also obsolete since it presents the inconvenience of the subjective visual observation of the analyst, which is the main cause for a wide range of variability. Applying thi capillary classical procedure, the values found were: 62-65 °C (Utermark & Schicke, 1963); 60-65 °C (Tulloch, 1980); 61-65 °C, Bogdanov, 2016).

The complexity of this multi-component material; due to its chemical composition (hydrocarbons, esters and fatty acids, among others) is qualitatively always the same. However, from a quantitative point of view it varies depending on its geographical origin, among other factors (Aichholz & Lorbeer, 1999, Bogdanov, 2016). Therefore, the measurement of all temperatures associated to the different lipid polymorphic forms provides a more robust basis for comparisons of beeswax from different origin (Buchwald, Breed, & Greenberg, 2008). This is the main reason why the present study is providing the information about the different melting ( $T_{m1}$ ,  $T_{m2}$ ,  $T_{m3}$ ) and crystallization ( $T_{c1}$ ,  $T_{c2}$ ,  $T_{c3}$ ,  $T_{c4}$ ) temperatures detected during the slow heating and cooling steps. All these parameters varied significantly considering the origin although these differences were not found among the samples of the provinces of Mozambique. Only  $T_{c1}$  from Nampula was different from the other provinces.

**Table 4.4.2.** Thermal properties of beeswax samples from four provinces of Mozambique (Nampula, Sofala, Manica and Zambezia), Spain, Honduras and “Reference” samples. Mean values and standard deviation, in brackets

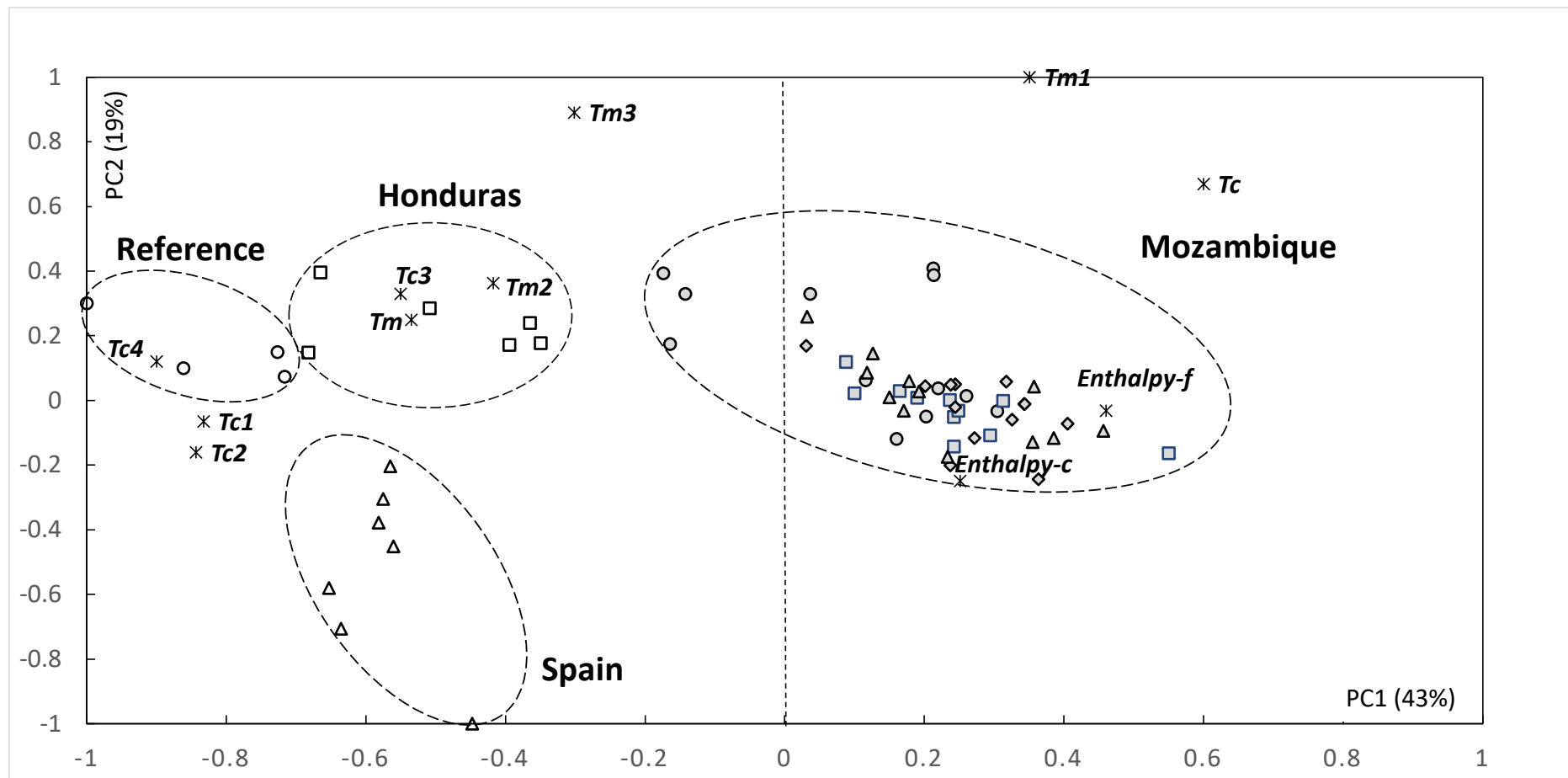
	MOZAMBIQUE				OTHER ORIGINS			ANOVA F-ratio
	Nampula	Zambezia	Sofala	Manica	Spain	Honduras	“Reference”	
<b>Thermal properties</b>								
$\Delta H_m$ (J/g)	203 (30) <sup>bc</sup>	216 (22) <sup>bc</sup>	234 (27) <sup>c</sup>	230 (21) <sup>c</sup>	193 (21) <sup>ab</sup>	231 (16) <sup>c</sup>	168 (8) <sup>a</sup>	6.47***
T <sub>m</sub> (°C)	64.26 (0.19) <sup>a</sup>	64.1 (0.3) <sup>a</sup>	64.21 (0.17) <sup>a</sup>	63.8(0.3) <sup>a</sup>	64.1 (0.7) <sup>a</sup>	64.43 (0.06) <sup>b</sup>	64.49 (0.12) <sup>b</sup>	4.6*
T <sub>m1</sub> (°C)	46 (0.5) <sup>b</sup>	45.6 (0.2) <sup>b</sup>	45.7 (0.3) <sup>b</sup>	46 (0.3) <sup>b</sup>	44.08 (1.09) <sup>a</sup>	45.0(1.6) <sup>b</sup>	45.88 (0.18) <sup>b</sup>	13.86***
T <sub>m2</sub> (°C)	50.49 (0.13) <sup>a</sup>	50.42 (0.15) <sup>a</sup>	50.55 (0.06) <sup>a</sup>	50.6 (0.2) <sup>a</sup>	51.3 (1.2) <sup>b</sup>	51.9(0.1) <sup>c</sup>	51.84 (0.12) <sup>c</sup>	19.04***
T <sub>m3</sub> (°C)	62.8 (0.4) <sup>b</sup>	62.6 (0.2) <sup>b</sup>	62.6 (0.3) <sup>b</sup>	62.6 (0.4) <sup>b</sup>	61.9 (0.6) <sup>a</sup>	63.5 (0.3) <sup>c</sup>	62.98 (0.15) <sup>b</sup>	9.8***
$\Delta H_C$ (J/g)	151 (15) <sup>b</sup>	152 (14) <sup>b</sup>	160 (5) <sup>b</sup>	156 (9) <sup>b</sup>	150 (4) <sup>b</sup>	163 (12) <sup>b</sup>	132 (17) <sup>a</sup>	7.1**
T <sub>c</sub>	58.9 (0.3) <sup>b</sup>	58.94 (0.16) <sup>b</sup>	58.77 (0.16) <sup>b</sup>	58.9 (0.2) <sup>b</sup>	54 (4) <sup>a</sup>	59.4 (0.5) <sup>b</sup>	54.4(0.9) <sup>a</sup>	20.82***
T <sub>c1</sub> (°C)	44.6 (1.2) <sup>b</sup>	43.7 (0.2) <sup>a</sup>	43.5 (0.2) <sup>a</sup>	43.66(0.17) <sup>a</sup>	46.2 (0.3) <sup>c</sup>	45.8 (0.9) <sup>c</sup>	45.1 (0.9) <sup>bc</sup>	18.28***
T <sub>c2</sub> (°C)	49.6 (0.7) <sup>a</sup>	49.84 (0.12) <sup>a</sup>	49.71 (0.06) <sup>a</sup>	49.89 (0.19) <sup>a</sup>	51.1 (0.6) <sup>b</sup>	51.59 (0.15) <sup>b</sup>	51.2 (0.1) <sup>b</sup>	32.08***
T <sub>c3</sub> (°C)	55.19 (0.09) <sup>a</sup>	55.19 (0.08) <sup>a</sup>	55.18 (0.03) <sup>a</sup>	55.31 (0.19) <sup>a</sup>	55.4(1.3) <sup>a</sup>	55.59 (0.08) <sup>a</sup>	56.5 (1.5) <sup>b</sup>	7.41***
T <sub>c4</sub> (°C)	60.3 (0.3) <sup>a</sup>	60.18 (0.12) <sup>a</sup>	60.17 (0.13) <sup>a</sup>	60.4 (0.2) <sup>a</sup>	60.9 (0.6) <sup>ab</sup>	61.38 (0.12) <sup>c</sup>	61.78 (0.12) <sup>c</sup>	39.1***

Different letters in the same row indicate significant differences at 95% confidence level as obtained by the LSD test. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001

Regarding melting enthalpy ( $\Delta H_m$ ), samples from Mozambique (average values from 203 to 234 J/g) were not significantly different from those of Honduras ( $231 \pm 16$  J/g). However, the differences were more relevant compared to Spain ( $193 \pm 21$  J/g) and “reference” ( $168 \pm 8$  J/g). These last melting enthalpy values are comparable with those reported by Ritter et al., (2001) in white beeswax (165 J/g); Buchwald, Breed, Greenberg, (2008) in beeswax from EEUU ( $170.7 \pm 4.48$  J/g); Gaillard et al. (2011) in beeswax from France (155 J/g); Attama & Müller-Goymann in cera alba (189 J/g)

Higher melting enthalpy values indicates that more energy is required to melt the beeswax. This fact could be linked to the higher temperatures found in tropical countries. Hence, bees could produce a wax with specific characteristics because of these higher ambient temperatures in Mozambique and some areas of Honduras (Tulloch, 1980; Bogdanov, 2016; Bonvehi & Bermejo, 2012).

A Principal Component Analysis (PCA) was carried out using the information obtained from all thermal properties of beeswax samples and using the average values of the three repetitions for each sample. Figure 4.4.4. shows the PCA biplot (scores and loadings) of this analysis. Two components explained 62% of the total variance (PC1=43% and PC2=19%). An acceptable difference between types of beeswax can be observed. PC1 promotes the discrimination of Mozambiquean samples. However, samples from the different provinces of Mozambique did not show any noticeable separation among them. The widest separation was observed between beeswax from samples from Mozambique and the other origins. Taking into account the PC2, there is a bigger separation of the Spanish samples, from the rest, although this axis explains less than PC1.



**Figure 4.4.4.** PCA biplot (scores and loadings) of the two principal components from the thermal properties of beeswax samples from four provinces of Mozambique (Nampula (●), Sofala (◆), Manica(▲) and Zambezia (■), Spain (Δ), Honduras (□) and Reference sample

#### 4. Conclusion

This work has revealed that the DSC technique could be suitable for differentiation of beeswax according to their geographical origin. On the contrary, saturated hydrocarbons do not contain enough useful information for this goal, despite being a well consolidated procedure for the detection of adulterants in this product.

The application of the heating-cooling scan both in fast (5 °C/min) and slow (at 1 °C/min) condition permits a more complete characterization of the thermal behavior of beeswax. In this way, the melting and cooling enthalpies together with all the temperatures associated to the different lipid polymorphic forms could be obtained. Under these conditions, the beeswax samples from the four provinces of Mozambique (Nampula, Zambezia, Sofala and Manica) were correctly differentiated from the other origins considered (Spain Honduras and “reference”).

The tropical temperatures found in Mozambique could be the reason for the higher melting enthalpy values obtained in the beeswax for this country since more energy is required to melt this product. These findings are an important contribution in characterizing Mozambiquean beeswax and to better understand its special characteristics.

#### References

- Aboul-Gheit, A. K., Abd-el-Moghny, T., Al-Eseimi, M. M. (1997). Characterization of oils by differential scanning calorimetry. *Thermochemica Acta* 306,127-130.
- Aichholz R., & Lorbeer E. (1999). Investigation of combwax of honeybees with high-temperature gas chromatography and high-temperature gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. I – High-temperature gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 855: 601-615.
- Aichholz R., & Lorbeer E. (2000). Investigation of combwax of honeybees with high-temperature gas chromatography and high-temperature gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. II – High-temperature gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 883: 75-88.
- Attama, A. A., & Müller-Goymann, C. C. (2008). Effect of beeswax modification on the lipid matrix and solid lipid nanoparticle crystallinity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 315(1-3), 189-195.

Basson, I., & Reynhardt, E. C. (1988). An investigation of the structures and molecular dynamics of natural waxes. I. Beeswax. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 21(9), 1421.

Bernal, J. L., Jiménez, J. J., del Nozal, M. J., Toribio, L., & Martín, M. T. (2005). Physico-chemical parameters for the characterization of pure beeswax and detection of adulterations. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107(3), 158-166.

Bogdanov, S. (2004). Quality and standards of pollen and beeswax. *Apiacta*, 38, 334-341.

Bogdanov, S. (2016). *Beeswax: Production, Properties Composition and Control*. Switzerland (Chapter 1). Bee Product Science, [www.bee-hexagon.net](http://www.bee-hexagon.net) Accessed 30.10.2018.

Bogdanov, S., & Gallmann, P. (2008). *Authenticity of honey and other bee products state of the art*. Bern (Switzerland): Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP,

British Pharmacopeia, (1993). *The British Pharmacopeia Commission Secretariat*. London: HMSO Publications Centre.

Buchwald, R., Breed, M. D., & Greenberg, A. R. (2008). The thermal properties of beeswaxes: unexpected findings. *Journal of Experimental Biology*, 211(1), 121-127

Cavallaro, G., Lazzara, G., Milioto, S., Parisi, F., Sparacino, V. (2015). Thermal and dynamic mechanical properties of beeswax-halloysite nanocomposites for consolidating waterlogged archaeological woods. *Polymer Degradation and Stability*, 120, 220-225.

European pharmacopoeia, (2008). *Council of Europe Strassbourg* (6. edition)

FAO, (1992). Expert Committee on Food Additives. Beeswax. In *Compendium of Food Additive Specifications: Combined Specifications from 1<sup>st</sup> Through the 37<sup>th</sup> Meetings, 1956-1990*. Rome: FAO. <http://www.who.int/iris/handle/10665/37961> , Accessed 30.10.2018.

Gaillard, Y., Mija, A., Burr, A., Darque-Ceretti, E., Felder, E., & Sbirrazzuoli, N. (2011). Green material composites from renewable resources: Polymorphic transitions and phase diagram of beeswax/rosin resin. *Thermochimica acta*, 521(1-2), 90-97.



Jiménez, J. J., Bernal, J. L., Aumente, S., del Nozal, M. J., Martín, M. T., Bernal Jr., J. (2004). Quality assurance of commercial beeswax: Part I. Gas chromatography–electron impact ionization mass spectrometry of hydrocarbons and monoesters. *Journal of Chromatography A*, 1024(1-2), 147-154.

Jiménez, J. J., Bernal, J. L., del Nozal, M. J., Martín, M. T., & Bernal, J. (2006). Sample preparation methods for beeswax characterization by gas chromatography with flame ionization detection. *Journal of Chromatography A*, 1129(2), 262-272.

Jiménez, J. J., Bernal, J. L., del Nozal, M. J., Martín, M. T., & Toribio, L. (2009). Identification of adulterants added to beeswax: Estimation of detectable minimum percentages. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(9), 902-911.

Jiménez, J. J., Bernal, J. L., del Nozal, M. J., Toribio, L., & Bernal, J. (2007). Detection of beeswax adulterations using concentration guide-values. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(7), 682-690.

Knuutinen, U., & Norrman, A. (2000). Wax analysis in conservation objects by solubility studies, FTIR and DSC. In *Proceedings of the 15th World Conference on Non-destructive Testing*.

Koster-Keunen, L. L. C. (2010). *Waxes, beeswax, natural wax. Bladel*. Netherlands: Koster Keunen Holland BV

Maia, M., & Nunes, F. M. (2013). Authentication of beeswax (*Apis mellifera*) by high-temperature gas chromatography and chemometric analysis. *Food Chemistry*, 136(2), 961-968.

Maia, M., Barros, A. I., Nunes, F. M. (2013). A novel, direct, reagent-free method for the detection of beeswax adulteration by single-reflection attenuated total reflectance mid-infrared spectroscopy. *Talanta*, 107, 74-80.

Reis, M. O., Olivato, J. B., Bilck, A. P., Zanela, J., Grossmann, M. V. E., Yamashita, F. (2018). Biodegradable trays of thermoplastic starch/poly (lactic acid) coated with beeswax. *Industrial Crops and Products*, 112, 481-487.

Ritter, B., Schulte, J., Schulte, E., Thier, H. P. (2001). Detection of coating waxes on apples by differential scanning calorimetry. *European Food Research and Technology*, 212(5), 603-607.

Schroeder, A., Wallner, K. (2003). The actual situation of varroacides in beeswax: An international comparison. *Apidologie*, 34(5), 1-3.

Bonvehi, J. S., & Bermejo, F. O. (2012). Detection of adulterated commercial Spanish beeswax. *Food Chemistry*, 132(1), 642-648.

Tulloch, A. P. (1980). Beeswax: composition and analysis. *Bee World*, 61(2), 47-62.

Turi, E. A., (1997). *Thermal Characterization of Polymeric Materials (2nd edn)*. San Diego: Academic Press.

United States Code of Federal Regulations, (2004). *Beeswax (yellow and white)*. Title 21, Section 184.1973. Washington: US Government Printing Office <https://www.fda.gov/AboutFDA/EnEspanol/default.htm>. Accessed 30.10.2018.

United States Pharmacopeia 1 Convention, I. (2000). *USP 24. The United States pharmacopeia. NF 19. The national formulary*. Rockville: United States Pharmacopeial Convention Inc. <http://catalogosuba.sisbi.uba.ar/vufind/Record/201603220240061990/Details>. Accessed 30.10.2018.

Utermark, W., & Schicke, W. (1963). *Melting Point Tables of Organic Compounds*. New York: Interscience.

Waś, E., Szczęsna, T., & Rybak-Chmielewska, H. (2014)a. Hydrocarbon composition of beeswax (*Apis mellifera*) collected from light and dark coloured combs. *Journal of Apicultural Science*, 58(2), 99-106.

Waś, E., Szczęsna, T., & Rybak-Chmielewska, H. (2014)b. Determination of beeswax hydrocarbons by gas chromatography with a mass detector (GC-MS) technique. *Journal of Apicultural Science*, 58(1), 145-157.

## **5. CONCLUSIONES**



## 5. CONCLUSIONES

### 5.1. Conclusiones del objetivo específico 1

**Aportación:** *Food Chemistry* 277, 543-553 (2019)

**5.1.1.** La flora que rodea las colmenas y las prácticas apícolas influyen en la variabilidad de los parámetros fisicoquímicos de calidad, composición, color, así como en las características aromáticas de la miel del norte y centro de Mozambique.

**5.1.2.** Con alguna excepción, los parámetros fisicoquímicos de las muestras analizadas estaban en concordancia con la normativa internacional. Atendiendo a los criterios de color y conductividad, la mayoría de las muestras de miel podían ser clasificadas como mielada.

**5.1.3.** El espectro polínico, más que el origen geográfico, ha permitido distinguir ocho tipos de miel en las cuatro provincias estudiadas (Nampula, Zambezia, Manica y Sofala). El polen predominante de estos grupos ha sido: I-*Astragalus* type; II-*Acanthus* sp.; III-Celastraceae; IV-Brassicaceae; V-Anacardiaceae and *Astragalus* type; VI-*Astragalus* type and Myrtaceae; VII-Asteraceae and VIII-unknown.

**5.1.4.** La miel de la región de Nampula (en el norte) se diferencia considerablemente de las demás, constituyendo ella sola el grupo polínico I, caracterizado por su abundancia en ciertos compuestos volátiles: alcoholes, aldehídos, ésteres, ácidos y terpenos.

**5.1.5.** La miel de las regiones de Sofala y Manica se caracteriza por la presencia de compuestos derivados del furano que podrían relacionarse con temperaturas y/o condiciones de almacenamiento inadecuados, o bien estar asociados con el humo que aplican los apicultores para minimizar la agresividad de las abejas cuando extraen la miel de los panales.

**5.1.6.** Un análisis discriminante clasificó correctamente el 96.7% de los grupos, resultando que la conductividad eléctrica y la humedad, seguido por el compuesto volátil 3-Metilbutan-1-ol y la acidez libre han sido las variables que más contribuyeron en la miel de Nampula del resto.

## 5.2. Conclusiones del objetivo específico 2

**Aportación:** Journal of Food Composition and Analysis (*En revision*)

**5.2.1.** Se han analizado las características antioxidantes de mieles del norte y centro de Mozambique, poniendo en evidencia que las condiciones climáticas y, por lo tanto, botánicas tienen una influencia decisiva en el perfil antioxidante de dichas mieles.

**5.2.2.** En las mieles estudiadas se han cuantificado siete ácidos fenólicos específicos (*chlorogenic, caffeic, ellagic, ferulic, gallic, p-coumaric* y *synapic*) y ocho flavonoides (*catechin, chrysin, kaempferol, luteolin, naringenin, pinocembrin, quercetin* y *rutin*), siendo en general, el contenido de flavonoides mayor al de ácidos fenólicos para todas las provincias estudiadas.

**5.2.3.** La miel de Nampula (en el norte) mostró los valores más elevados de ambos tipos de compuestos, en comparación con las otras tres provincias ubicadas en el centro del país (Sofala, Manica y Zambezia). El valor medio de la actividad antioxidante total también fue mayor para las muestras de Nampula.

**5.2.4.** A diferencia de otras mieles africanas, *luteolin* tuvo el mayor impacto en el contenido de flavonoides, representando solo él más del 50% de esta familia.

**5.2.5.** Los flavonoides *pinocembrin, kaempferol, rutin*, y *catequin*; seguido del ácido fenólico *chlorogenic* fueron las variables más importantes en la diferenciación de Nampula de las otras provincias, según se reflejó en el análisis discriminante.

## 5.3. Conclusiones del objetivo específico 3

**Aportación:** LWT - Food Science and Technology 86, 108-115 (2017)

**5.3.1.** El comportamiento reológico de la miel de las provincias de Mozambique estudiadas es similar al de la gran mayoría de las mieles comercializadas en otras zonas de África y en otras partes del mundo. En este sentido, el módulo elástico ( $G'$ ), el módulo de pérdida ( $G''$ ) y la viscosidad compleja ( $\eta^*$ ) disminuyen con el incremento de la temperatura. Aunque estas dos primeras magnitudes están fuertemente influenciadas por la frecuencia aplicada a la miel, la viscosidad compleja no lo está, con lo que queda demostrado el comportamiento Newtoniano de las mieles estudiadas.

**5.3.2.** La aplicación de una red neuronal artificial (ANN) ha permitido predecir los parámetros reológicos en función de la temperatura, la frecuencia y la composición química. Se encontró que un perceptrón multicapa (MLP) es el mejor modelo para  $G''$  y  $\eta^*$ , mientras que la red neural probabilística (PNN) fue mejor para  $G'$ .

#### **5.4. Conclusiones del objetivo específico 4**

**Aportación:** Industrial Crops and Products (En revision)

**5.4.1.** La cera de abeja de las cuatro provincias de Mozambique objeto de la presente tesis doctoral ha sido caracterizada en términos del perfil de hidrocarburos saturados (por HT-GC/FID) y de las propiedades térmicas (por DSC), comparando dichas características con las de ceras de otras procedencias [España, Honduras, y una "referencia", (reactivo analítico)].

**5.4.2.** Un total de 15 hidrocarburos comprendidos entre  $C_{21}H_{44}$  y  $C_{35}H_{72}$  se han encontrado en las muestras de cera de todas las procedencias, con un contenido mucho mayor de números de carbono impares que de pares (siendo el más abundante el  $C_{27}H_{56}$ , seguido del  $C_{29}H_{60}$  y del  $C_{31}H_{64}$  independientemente del origen). Esta composición en hidrocarburos (con escasas variaciones) es típica de la cera de abeja pura, por ello, estos compuestos no han aportado suficiente información útil para la diferenciación de las ceras según su origen.

**5.4.3.** Sin embargo, la técnica DSC podría ser adecuada para la diferenciación de la cera de abeja según su origen geográfico, ya que la información proporcionada por las entalpías de fusión y cristalización, junto con la de las temperaturas asociadas a las diferentes formas polimórficas lipídicas permitieron la diferenciación de las ceras de las provincias de Mozambique de las de los otros orígenes.

**5.4.4.** Mayores valores de las entalpías de fusión se han obtenido en las muestras de Mozambique y Honduras, en comparación a las de las otras procedencias, lo que puede ser lógico ya que se trata de ceras de países tropicales.





### **Conclusión general de la tesis**

Este trabajo contribuye a difundir el conocimiento de dos productos apícolas prácticamente desconocidos como son la miel y la cera de abeja de Mozambique. Siempre y cuando las prácticas apícolas se lleven a cabo correctamente, la miel puede tener las características fisicoquímicas de calidad requeridas internacionalmente. El hecho de que la miel de Mozambique sea una importante fuente de antioxidantes naturales, puede ser aprovechado por la población local no solo por los beneficios que implica para la salud, sino también por las posibilidades económicas que conllevaría su explotación. La cera de abeja, por otro lado, posee las características típicas que se requieren para la comercialización de este producto, motivo por el cual puede plantearse como una buena opción para ser introducida en un futuro próximo en los mercados, ya que se sabe que está prácticamente libre de residuos veterinarios. En definitiva, esta tesis doctoral puede constituir un primer paso para promover la comercialización de los productos apícolas de Mozambique en los mercados locales e internacionales y apoyar y desarrollar la apicultura en este país.



## **6. ANEXOS**



**Encuesta sobre las prácticas apícolas asociadas a los sistemas de extracción, producción y comercialización de los productos apícolas (miel y cera) de las zonas norte y centro de Mozambique**

Nombre del Apicultor .....

Zona de recogidas .....

Localidad .....Provincia.....

Numero de Apicultores por zona .....

Nombre de la asociación.....

Vegetación visitadas por la abejas.....

**Sistema utilizado para la extracción de la miel:**

*centrifugación*

*prensado*

*manual*

**Tipo de explotación:**

*familiar*

*industrial*

**Numero de colmenas:**

**Tipo de colmenas usadas:**

*colmena tradicional de corteza*

*colmena moderna*

**Produccion de miel:**

¿Cuántas cosechas de miel hace por año ?.....

¿Cuántos kg de miel produce por cada cosecha?.....

¿Sabría decirme cuantos kg de miel produce cada colmena?.....

¿Cuál es el destino de su producción de miel?

*consumo familiar*

*venta en el mercado local o nacional*

*exportación*

**Producción de cera:**

¿Cuántos kg de cera produce por cada cosecha?.....

¿Sabría decirme cuantos kg de cera produce cada una de sus colmenas?.....

¿Cuál es el destino de su producción de cera:

*consumo familiar*

*venta en el mercado local o nacional*

*exportación*

**Otra información de interés**

¿Extrae otros productos de sus colmenas además de miel y cera?.....

¿Tiene identificada alguna enfermedad en sus colmenas?.....

¿Has recibido alguna formación para manejar tus colmenas?.....