

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA
I DEL MEDI NATURAL**



**COMPORTAMIENTO DEL HIDROXIMETILFURFURAL Y DE LA
ACTIVIDAD DIASTÁSICA EN MIELES MONOFLORES
ESPAÑOLAS**

TRABAJO FINAL DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNA: NEUS BURGUILLO CARBÓ

TUTORA: Dra. María Isabel Escriche Roberto

COTUTORA: Dra. María Del Sol Juan Borrás

Curso académico 2019/2020

CONVOCATORIA 2º DICIEMBRE 2019

VALENCIA, NOVIEMBRE DEL 2019

TÍTULO: COMPORTAMIENTO DEL HIDROXIMETILFURFURAL Y DE LA ACTIVIDAD DIASTÁSICA EN MIELES MONOFLORES ESPAÑOLAS

RESUMEN

El hidroximetilfurfural (HMF) y la actividad diastásica son parámetros reconocidos internacionalmente como indicadores de la pérdida de frescura de la miel, por ello sus niveles están establecidos en la legislación española (BOE, Real Decreto 1049/2003). Las mieles frescas, recién recolectadas y no procesadas tienen valores altos de actividad diastásica y bajos de HMF. El origen botánico de las plantas de las que proceden las mieles podría influir en los valores de estos parámetros de calidad. En este sentido, el objetivo de este trabajo es evaluar la influencia del tipo de miel monofloral española en los niveles de actividad diastásica y HMF de mieles frescas. El presente trabajo forma una parte de la segunda anualidad de un estudio que LABMIEL (laboratorio de la miel y los productos apícolas de la UPV) está realizando con el MAPA (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación) (BOE núm.150, 2018). El HMF se ha evaluado por el método oficial (espectrofotometría) y por cromatografía líquida (HPLC) mientras que la actividad diastásica se ha analizado mediante el método Phadebas. Los resultados de HMF solo han mostrado diferencias significativas entre ambos métodos en el caso de la miel de tomillo. Solo para esta variedad se obtuvieron datos anómalos mediante el método espectrofotométrico. Este hecho cuestiona la validez del método oficial para evaluar el HMF en esta variedad de miel. Los valores de actividad diastásica se han encontrado, en general, en el rango de lo que cabría esperar para las mieles estudiadas, mostrando mayores valores en las mieles de girasol seguido de las de cantueso, romero y azahar. Teniendo en cuenta las dos campañas comparadas (2018 y 2019), en general en la de 2019 se observaron mejores valores medios para los dos parámetros estudiados. Este hecho se podría explicar por un mejor manejo en las prácticas apícolas en la cosecha de 2019.

PALABRAS CLAVE: miel monofloral, hidroximetilfurfural, actividad diastásica.

AUTORA: Neus Burguillo Carbó

Valencia, noviembre de 2019

TUTORA: Dra. María Isabel Escriche Roberto

COTUTORA: Dra. María Del Sol Juan Borrás

TITLE: HYDROXYMETHYLFURFURAL AND DIASTASE ACTIVITY BEHAVIOR IN SPANISH MONOFLORAL HONEYS

ABSTRACT

Hydroxymethylfurfural (HMF) and diastatic activity are internationally recognized parameters as indicators of the loss of freshness of honey and their levels are established in the Spanish legislation (BOE, Royal Decree 1049/2003). Raw honey has high values of diastatic activity and low HMF. The botanical origin of the plants visited by beehoneys could influence the values of these quality parameters. In this sense, the objective of this work is to evaluate the influence of the Spanish monofloral type of honey on the levels of diastatic activity and HMF of raw honey. This work is part of the second year of a study that LABMIEL (laboratory of honey and bee products of the UPV) is carrying out together with the MAPA (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación) (BOE No. 150, 2018). The HMF was evaluated by the official method (spectrophotometry) and by liquid chromatography (HPLC), while the diastase activity was analyzed using the Phadebas method. HMF showed only significant differences between both methods in the case of thyme honey. Only for this variety, anomalous data were obtained using the spectrophotometric method. This fact questions the validity of the official method to evaluate the HMF in this type of honey. Generally speaking, the values of diastatic activity were found in the range of what would be expected for the different types of honey studied, showing higher values in sunflower honey followed by cantueso, rosemary and orange blossom. Taking into account the two years studies compared (2018 and 2019), 2019 showed in general terms better average values for the two parameters studied. This fact could be explained by a better management of beekeeping practices in the 2019 harvest.

KAYWORDS: monofloral honey, hidroximetilfurfural, diastase activity.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	La miel y su composición.....	1
1.1.1.	Tipos de miel	1
1.1.2.	Composición de la miel	2
1.2.	La calidad de la miel	5
1.2.1.	Calidad legal	5
1.2.2.	Exigencias comerciales.....	5
1.2.3.	Calidad sanitaria.....	5
1.3.	Parámetros indicadores de la frescura de la miel.....	6
1.3.1.	Hidroximetilfurfural.....	6
1.3.2.	Actividad diastásica	7
2.	OBJETIVO.....	9
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1.	Muestras de miel.....	10
3.2.	Determinaciones analíticas	11
3.2.1.	Hidroximetilfurfural (HMF).....	11
3.2.2.	Actividad diastásica	13
3.3.	Análisis estadístico	13
4.	RESULTADOS	14
4.1.	Estudio del HMF en distintas variedades de miel recolectadas en 2019.....	14
4.2.	Estudio de la actividad diastásica en mieles recolectadas en 2019.....	19
4.3.	Comparación del parámetro HMF y actividad diastásica en mieles recolectadas en 2018 y 2019.....	22
5.	CONCLUSIÓN	26
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Porcentaje mínimo de contenido polínico que deben contener algunas de las mieles para poder catalogarlas como monoflorales (Salinas, 2017).....	2
Tabla 2: Composición nutricional de la miel (Infoagro, 2011).	3
Tabla 3: Mieles monoflorales evaluadas en el presente estudio.....	10
Tabla 4. Valores de HMF (método White y HPLC) obtenidos en las variedades de miel estudiadas en 2019: medias, desviaciones estándar, valores mínimo, máximo, F-ratio, P-valor y grupos homogéneos.....	18
Tabla 5. Valores de actividad diastásica btenidos en las variedades de miel estudiadas en 2019: medias, desviaciones estándar, valores mínimo y máximo, F-ratio, P-valor y grupos homogéneos.....	21
Tabla 6. HMF y actividad diastásica (medias y desviaciones estándar, valores mínimo, máximo, F-ratio y P-valor) obtenidos en la campaña de 2018 y 2019.....	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Miel cristalizada.....	5
Figura 2. Formula HMF.....	6
Figura 3. Reacción diastasa	7
Figura 4. Espectrofotómetro UV-VIS de doble haz (Thermo Helios alpha UV-VIS, Germany).	11
Figura 5. Cromatógrafo líquido (Agilent 1120 Series) acoplada a un detector de ultravioleta (HPLC-UV).....	12
Figura 6. Gráficos de Barras para las distintas variedades analizadas del parámetro HMF en ambos métodos (White y HPLC).	16
Figura 7. . Gráficos de Barras para la variedad de tomillo del parámetro HMF en ambos métodos (White y HPLC).	17
Figura 8. Interacciones entre factores (variedad y método) y su intervalo Tukey.	19
Figura 9. Gráficos de Barras para las distintas variedades analizadas del parámetro actividad diastásica.....	20
Figura 10. Gráficos de Barras para los parámetros HMF y actividad diastásica analizados en las dos campañas.....	23
Figura 11: Gráfico de medias e intervalos de Tukey (95%) resultante del ANOVA.....	25.

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1: Cálculo HMF.....	11
Ecuación 2: Ecuación del índice de diastasa.....	13

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La miel y su composición

La miel es la sustancia natural dulce producida por la abeja *Apis mellifera* a partir del néctar de plantas o de secreciones azucaradas de las partes vivas de plantas o de excreciones de insectos chupadores, que las abejas recolectan, transforman y combinan con sustancias específicas propias, depositan, deshidratan, almacenan y dejan en colmenas para que madure. Está compuesta esencialmente de diferentes azúcares, sobre todo de fructosa y glucosa, y de otras sustancias como ácidos orgánicos, enzimas y partículas sólidas derivadas de su recolección (BOE, Real Decreto 1049/2003). En definitiva, las abejas elaboran la miel recolectando soluciones azucaradas y aportando enzimas producidas por ellas. Es un producto biológico complejo que en función de su origen, época y zona de producción, entre otros factores, posee unas características y una composición diferente.

1.1.1. Tipos de miel

La clasificación más común de las mieles es la que se refiere a su origen botánico ya que las abejas visitan diferentes plantas para la recolección del néctar o de las secreciones azucaradas. Atendiendo a este criterio, las mieles se pueden denominar “de flores” o de mielada, respectivamente. Por lo tanto, las visitas que la abeja realiza a una determinada especie botánica determinarán la clasificación de la miel como perteneciente a dicha variedad botánica. El análisis del polen presente en una miel, es el procedimiento que actualmente se realiza para llevar a cabo dicha clasificación. Esto es así ya que la abeja cuando va a visitar la flor/exudados arrastra con su cuerpo el polen/partículas de mielada de dicha especies botánicas, impregnando la miel y demás productos de la colmena.

El análisis polínico se realiza por microscopía óptica en laboratorios especializados. Este análisis consiste en hacer un recuento, en porcentaje, de la cantidad de polen que contiene esa miel de las diferentes especies botánicas que se identifiquen en ella. En este sentido, se puede hablar de mieles monoflorales cuando en ellas se puede identificar un polen predominante, lo que indirectamente significa que se han formado a partir de un néctar mayoritario de una determinada flor; y de mieles milflores cuando proceden de néctar pero no se puede atribuir éste a una especie botánica mayoritaria. Aunque estos porcentajes no están legislados, se han establecido unos valores comerciales a partir de los cuales es considerada una miel como monofloral de una determinada variedad (Tabla 1).

Tabla 1: Porcentaje mínimo de contenido polínico que deben contener algunas de las mieles para poder catalogarlas como monoflorales (Salinas, 2017).

TIPO DE MONOFLORAL	CONTENIDO MÍNIMO POLÍNICO (%)
Acacia	>20%
Almendro	>35%
Azahar	>20%
Cantueso- Lavanda	>12%
Castaño	>75%
Eucalipto	>70%
Níspero	>45%
Romero	>12%
Tomillo	>12%

Todas las mieles, tanto las mieles de milflores como las monoflorales, presenten en general un olor y sabor característico de este alimento. Sin embargo, las mieles monoflorales tiene unas características organolépticas muy valoradas por el consumidor, que se relacionan directamente con su procedencia botánica predominante:

-**Miel de azahar:** Color ámbar claro, perfumada y suave al paladar. Procedente de limoneros, naranjos, mandarinos (especies del género *Citrus*).

-**Miel de romero:** Color ámbar muy claro y blanco cuando está cristalizada; aromática y dulce (especies del género *Rosmarinus*).

-**Miel de eucaliptus:** Color ocre; muy aromática con un sabor característico a madera. (especies del género *Eucalyptus*).

-**Miel de tomillo:** Tonos rojizos y sabor dulce pero intenso que recuerda a la planta de tomillo. Se suele utilizar para cocinar o dar un toque herbal a las infusiones (especies del género *Thymus*).

-**Miel de espliego:** Color ámbar y sabor característico a lavanda (especies del género *Lavandula*).

-**Miel de castaño:** Color marrón muy poco común, de consistencia blanda, casi líquida, por lo que su cristalización es casi nula y mezcla muy bien con el salado (especies del género *Castanea*).

-**Miel de brezo:** De color caoba oscura y sabor ligeramente amargo (especies del género *Calluna*).

1.1.2. Composición de la miel

La miel es básicamente una solución de azúcar invertido que contiene proteínas, minerales y enzimas, además de otros componentes minoritarios (Tabla 2).

Tabla 2: Composición nutricional de la miel (Infoagro, 2011).

Constituyentes	Valor medio (g/100g producto)	Rango (g/100g producto)
Agua	17.0	13.4-26.6
Fructosa	39.3	21.7-53.9
Glucosa	32.2	20.4-44.4
Sacarosa	2.3	0.5-6.0
Otros azúcares	8.8	-
Total ácidos (glucónico)	0.57	0.17-1.17
Minerales	0.17	0.02-1.03
Aminoácidos y proteínas	0.04	0.00-0.13
Enzimas	Trazas	-
Aromas	Trazas	-

-Agua. La miel es un alimento de humedad intermedia, variando aproximadamente entre 13 y 25 g de agua/100 g de miel como se indica en la tabla (Infoagro, 2011)

La humedad es la principal causante de los problemas de fermentación de la miel, por eso se recomienda que no supere el 18%. En este sentido, la ley establece que las mieles comerciales no deben superar el 20% del contenido de humedad (España, BOE núm. 183, 2003).

-Azúcares. Son los componentes mayoritarios de la miel representando entre el 80% y el 82% de la materia total. De ellos dependen las principales características del producto: sabor dulce, viscosidad, granulación, poder rotatorio, etc.

Inicialmente, en el néctar/secreciones, el azúcar mayoritario es la sacarosa, pero durante la maduración se produce su hidrólisis a fructosa y glucosa. Es por ello que en las miel estos dos azúcares sean los más abundantes representando ellos solos el 85-95% de los azúcares totales. La fructosa puede encontrarse entre un 20.4-44.4% y la glucosa 21.7-53.9 (Codex Alimentarius, 2001) El resto de azúcares minoritarios como la sacarosa, se encuentran en menor cantidad (0-7.6%) (Visquert, 2015).

-Ácidos. La miel se considera un producto ácido, su pH se encuentra entre 3.2 y 4.5. Los ácidos aportan aromas, aunque se encuentran enmascarados por los azúcares. En cuanto al ácido glucónico, el principal, es generado a partir de la glucosa por acción enzimática.

-Proteínas y minerales. El contenido de ambos es muy bajo (0-1.3%) y está relacionado con el tipo de miel. En el caso de los minerales, las mieles de mielada, contienen un mayor porcentaje.

-Otros compuestos. La miel contiene compuestos volátiles, como aldehídos, cetonas, alcoholes y éteres, dependiendo fundamentalmente de su origen botánico aunque en ocasiones su presencia puede estar relacionada con de los procesos y del almacenamiento al que es sometido el producto. Por otra parte, también contiene enzimas, las más importantes son la diastasa o amilasa (degradables con el calor y el tiempo), catalasas y fosfatasa. También están presentes pigmentos que influyen en las características sensoriales (Visquert, 2015).

1.2. La calidad de la miel

1.2.1. Calidad legal

La miel debe llegar al consumidor lo más fresca posible, conservando en la medida de lo posible sus propiedades intrínsecas, evitando así la comercialización de mieles viejas. Por ello la legislación establece dos parámetros para el control de la frescura del producto: la actividad diastásica y el hidroximetilfurfural (España, BOE núm.186, 2003). Ambos parámetros pueden reflejar el posible deterioro de la miel desde el momento de recolección.

La legislación también exige, entre otros, el control de la acidez y la humedad para evitar la fermentación del producto, así como los niveles de azúcares reductores para controlar adulteraciones.

1.2.2. Exigencias comerciales

El color es uno de los parámetros más valorados a nivel comercial, sin embargo, no está legislado. Éste puede variar en una miel en función del origen, composición, estado de maduración y otras características. El color es un parámetro muy controlado industrialmente para la conformación de lotes de fabricación con la finalidad de cumplir con las exigencias del cliente.

La cristalización es un fenómeno natural que ocurre en la miel a causa de la precipitación de la glucosa (Figura 1). En absoluto es perjudicial para la salud, pero puede producir rechazo por los consumidores. Para retrasar este proceso la miel debe almacenarse a temperaturas adecuadas (por debajo de 10°C). Además las industrias de envasado, someten la miel a un ligero tratamiento térmico con la finalidad de destruir núcleos de cristalización que ocasionan problemas durante su comercialización.



Figura 1. Miel cristalizada

1.2.3. Calidad sanitaria

La miel no debe contener ni microorganismos, ni sustancias tóxicas que sean nocivas para la salud del consumidor. Sin embargo, en ocasiones presenta residuos químicos procedentes de tratamientos veterinarios (acaricidas, sulfamidas, antibióticos) o agrícola (plaguicidas), por ello su control es obligatorio por ley.

1.3. Parámetros indicadores de la frescura de la miel

1.3.1. Hidroximetilfurfural

El hidroximetilfurfural (HMF) es un producto de la descomposición de azúcares. Su formación puede comenzar durante la maduración del néctar de la colmena cuando las concentraciones de fructosa y ácido son adecuadas. La temperatura y el tiempo incrementan la velocidad de reacción, por ello este parámetro se utiliza como un indicador de la frescura de la miel y de su sobrecalentamiento (Visquert y col., 2013).

1.3.1.1. Estructura química y formación

El HMF es un aldehído cíclico (Figura 2) que se origina espontáneamente a partir de la fructosa en medio ácido (pH cercano a 3,9). El proceso de formación del HMF en la miel no es rápido, pero la temperatura lo acelera y provoca su oscurecimiento por interacciones con aminoácidos y azúcares, sufriendo polimerización y reordenación. Esta reacción tiene lugar tanto en presencia como en ausencia de oxígeno (TANLEQUE-ALEBERTO, 2019).

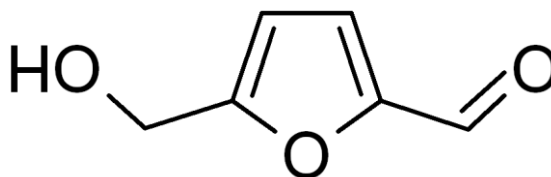


Figura 2. Formula HMF

1.3.1.2. Toxicidad

El HMF no es una sustancia tóxica para los humanos ni altera la miel a no ser que se encuentre en cantidad excesiva, produciendo además cambios en el color de la miel. Sin embargo, se ha demostrado que es tóxico para las abejas, a partir de unos 50 mg HMF/kg miel (TANLEQUE-ALEBERTO, 2019). Es un parámetro legislado como indicador de frescura. La ley establece que su contenido en la miel comercial no debe ser superior a 40 mg HMF/kg miel (excepto miel para uso industrial). En el caso de miel de origen declarado procedente de regiones de clima tropical y mezclas de estas mieles el contenido no debe sobrepasar los 80 mg HMF/kg miel (BOE, Real Decreto 1049/2003).

1.3.1.3. Técnicas analíticas para su determinación

La espectrofotometría es la técnica oficial para determinar la cantidad de HMF que contiene una muestra de miel, tal y como se indica en el BOE (Real Decreto 1049/2003). Se trata de una técnica, basada en la Ley de Beer-Lambert, consistente en leer la absorbancia de una solución,

aprovechando la absorción de radiación electromagnética en la zona del ultravioleta y visible del espectro. En el caso de la lectura del HMF se mide la absorbancia a 284 nm y a 336 nm. Con la primera medida se cuantifica el compuesto químico, y con la segunda se cuantifica la interferencia, para poder restarla posteriormente del valor de la muestra y cuantificar el HMF. Este método, aunque es el oficial se ha observado y demostrado por laboratorios que realizan análisis diarios que produce problemas (posibles interferencias) en la lectura de ciertas mieles.

Otra metodología ampliamente utilizada para el análisis de HMF en mieles es la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) por ser una técnica más robusta y más específica (JUAN-BORRAS, 2015). Presenta el inconveniente de que es menos sencilla, y necesita de técnicos más especializados y equipamiento más costoso. Al parecer, la técnica del HPLC no causa problemas de interferencias en la lectura de ningún tipo de mieles.

1.3.2. Actividad diastásica

La actividad diastásica incluye la acción de dos enzimas presentes en la miel, como es la alfa-amilasa y la beta-amilasa. La función de estas enzimas es hidrolizar el almidón. Primero actúa la alfa-amilasa que hidroliza el almidón y produce dextrinas (cadenas de glucosa) (Figura 3). A medida que se van generando dextrinas, actúa la beta-amilasa sobre los extremos no reductores de las cadenas de glucosa generando maltosa (Belitz y Grosch, 1997).

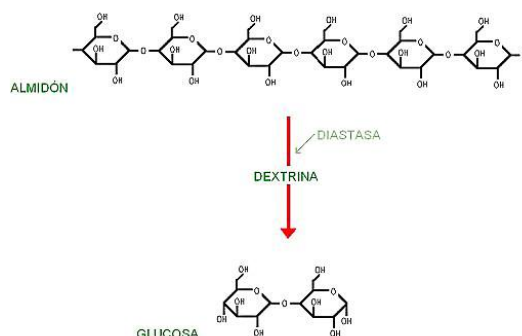


Figura 3. Reacción diastasa

Este parámetro importante en la miel, es un excelente indicador de su calidad en cuanto a su frescura. Se considera que una actividad diastásica baja implica que la miel ha sido sobrecalentada o mal almacenada. Mientras mayor es el contenido de esta enzima, mayor es su calidad. Además, la cantidad de diastasa está relacionada con la variedad botánica procedente (Kadar y col., 2010).

El contenido de estas enzimas y el HMF son dos parámetros dependientes y a medida que aumenta el HMF, la actividad diastásica es menor. Ya que las condiciones que causan un aumento de HMF, también provocan una disminución de estas enzimas.

1.3.2.1. Técnicas analíticas para su determinación

La actividad diastásica que contiene una miel se puede determinar mediante un proceso de hidrólisis de almidón y una lectura espectrofotométrica, ya que las enzimas son digestoras del almidón.

Según establece el BOE (núm. 145, de 18 de junio de 1986, páginas 22195 a 22202), el método para determinar la actividad diastásica consiste en preparar un almidón (con un índice de azul entre 0.50 y 0.55), que en contacto con las enzimas que contiene la miel, en condiciones óptimas (40°C durante 1h) producirá la hidrólisis del almidón. Esta disolución se lee espectrofotométricamente. La elaboración de dicho almidón es un proceso laborioso y muy sensible, ya que con la mínima diferencia en el proceso de preparación del almidón podría variar el resultado. Por ello, se estandarizó un procedimiento basado en la utilización de unas pastillas de almidón ([®] Phadebas) que son utilizadas por todos los laboratorios, aunque no son establecidas como método oficial. Se trata de un polímero que se usa como sustrato y se hidroliza por la alfa-amilasa (presente en la miel), produciendo fragmentos azules solubles en agua, que se leen fotométricamente a 620 nm. De esta manera, la absorbancia es directamente proporcional a la actividad diastásica de la muestra. Este es el método utilizado en LABMIEL (Laboratorio de Control de Calidad de la miel y los productos apícolas de la UPV) en el que se ha realizado el presente trabajo.

2. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo ha sido evaluar la influencia del tipo de miel monofloral española en los niveles de HMF y en la actividad diastásica de mieles frescas. El HMF se ha analizado utilizando el método espectrofotométrico establecido en la legislación así como el método de cromatografía líquida con la finalidad de comparar los resultados obtenidos por ambos, ya que esta metodología se está imponiendo ante el método tradicional espectrofotométrico. Además, se ha comparado la información obtenida para ambos parámetros en la campaña de 2019 con la disponible en el laboratorio de la campaña del 2018.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestras de miel

En el presente estudio se analizaron 47 muestras de miel cruda recolectadas en la campaña del 2019 procedentes de distintas regiones de España (Tabla 3). Estas muestras fueron proporcionadas por el MAPA como parte de un estudio (BOE, num 150, 2018) que LABMIEL está realizando con este ministerio en el marco de un proyecto de colaboración. Además, se analizaron muestras de tomillo procedente de este mismo año, disponible por LABMIEL. Esta tabla también relaciona las muestras de 2018 (ya analizadas por LABMIEL), que se utilizaron para la comparación de la información obtenida en ambos años. En esta comparación se han tenido en cuenta únicamente las variedades de las que se disponían datos en ambas campañas.

Tabla 3: Mielles monoflorales evaluadas en el presente estudio

Variedades	Nº de muestras	Procedencia	Código de laboratorio	Campaña
Azahar	15	Comunidad Valenciana, Andalucía	I-19002, I-19003, I-19007, I-19009, I-19011, I-19013, I-19016, I-19018, I-19023, I-19024, I-19025, I-19026, I-19028, I-19030, I-19032	2019
	6	España	18007, 18008, 18010, 18021, 18022, 18023	2018
Cantueso	4	Andalucía	I-19006, I-19008, I-19010, I-19011	2019
		España	18003, 18012, 18026	2018
Romero	8	Comunidad Valenciana, Andalucía	I-19001, I-19004, I-19014, I-19021, I-19022, I-19027, I-19029, I-19031	2019
	5	España	18006, 18015, 18016, 18019, 18024	2018
Girasol	5	Castilla León	I-19006, I-19012, I-19015, I-19019, I-19020	2019
Tomillo	15	España	Tom 1 al Tom 15	2019

3.2 Determinaciones analíticas

3.2.1 Hidroximetilfurfural (HMF)

En el presente estudio, el hidroximetilfurfural se ha evaluado siguiendo dos procedimientos: 1. Método espectrofotométrico (método White) («BOE» núm. 145, de 18 de junio de 1986) y 2. Método cromatográfico (HPLC) (Escriche y col., 2016). Todas las muestras fueron analizadas por triplicado y con una muestra control en cada análisis.

3.2.1.1. Método White

Se pesaba, con precisión de 1 miligramo, 5 gramos de la muestra de miel en un vaso de precipitados, se disolvía y añadían los reactivos, Carrez I y Carrez II, con el objetivo de eliminar interferentes a la hora de la lectura. Se pipeteaban 5 mL en 2 tubos de ensayo, a los que se adicionaban en un caso bisulfito (blanco) y en el otro agua (muestra). Estas disoluciones fueron leídas a 284 nm y 336 nm, empleando un espectrofotómetro UV-VIS (Figura 4) de doble haz (Thermo Helios alpha UV-VIS, Germany). El cálculo del contenido en HMF se lleva a cabo mediante la ecuación 1.

$$\text{HMF} = \frac{((B1-B2)-(A1-A2)) \times 14.97 \times 5}{M} \quad (\text{mg HMF/kg muestra}) \quad \text{Ecuación 1}$$

- B1: Lectura absorbancia del blanco a 284 nm
- B2: Lectura absorbancia del blanco a 336 nm
- A1: Lectura absorbancia de la muestra a 284 nm
- A2: Lectura absorbancia de la muestra a 336 nm
- M: Masa muestra miel (g)



Figura 4. Espectrofotómetro UV-VIS de doble haz (Thermo Helios alpha UV-VIS, Germany).

Reactivos:

-Carrez I. Hexacianoferrato(II) de potasio trihidrato ($K_4[Fe(CN)_6] \times 3H_2O$), a una concentración de 15 g/100 mL.

-Carrez II. Sulfato de cinc heptahidrato ($ZnSO_4 \times 7H_2O$), a una concentración de 30 g/100 mL.

- Bisulfito sódico ($NaHSO_3$). 0.1817 g/ en 100 mL de agua destilada.

-Tampón de sodio acetato trihidrato: 13.6 g de sodio acetato trihidrato en 1 litro de agua, ajustando el pH a 5.2.

3.2.1.2. Método HPLC

El HMF se analizaba mediante un cromatógrafo líquido (Agilent 1120 Series) (Figura 5) acoplado a un detector de ultravioleta (HPLC-UV). Se utilizaba una columna ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6 x 150 mm, tamaño de partícula 5 μ m) (Agilent Technologies, USA). Se usaba como fase móvil agua: metanol (90:10, v: v). El detector se ajustaba a 285 nm. El software del sistema EZChrom Elite se usaba para el procesamiento de los datos.

El proceso de preparación de la muestra fue el mismo ya explicado en el método anterior. A partir del filtrado se cogió una alícuota se pasaba a través de un filtro de nylon de 0.45 μ m, y se inyectaban 5 μ L. La cuantificación de HMF se realizaba utilizando el método de estándar externo, para ello se construía una curva de calibración con un rango de 0.1-10.0 mg/kg.



Figura 5. Cromatógrafo líquido (Agilent 1120 Series) acoplado a un detector de ultravioleta (HPLC-UV).

3.2.2 Actividad diastásica

La actividad diastásica se determinaba siguiendo el método de las pastillas Phadebas. El proceso consistía en pesar 1 g de miel y disolver en 100 mL de tampón de acetato. Se transferían 5 mL a un tubo de ensayo, que se le añadía una pastilla Phadebas (almidón teñido de azul), se dejaba actuar 30 minutos en un baño a 40 °C. Igualmente se preparaba un blanco, solo con tampón sin muestra de miel. A continuación, se medía la absorbancia en cubetas de 1 cm a 620 nm, la absorbancia del blanco se restaba a la absorbancia de la muestra (se utilizaba un espectrofotómetro UV-VIS de doble haz, Thermo Helios Alpha). Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y con una muestra control en cada análisis.

La actividad diastasa se expresa como Índice de Diastasa en unidades Schade y se calcula de acuerdo a la ecuación 2.

$$ID (U. Schade) = 28.2 \times \Delta A_{620} + 2.64 \quad \text{Ecuación 2}$$

ID: Índice Diastasa

ΔA : (Absorbancia a 620 nm de la muestra) – (Absorbancia a 620 nm del blanco)

3.3 Análisis estadístico

Para los datos de HMF obtenidos en la campaña de 2019 se aplicó un ANOVA multifactor con la finalidad de evaluar el efecto del método analítico aplicado y de la variedad de miel. Además para los datos de actividad diastásica del mismo año se realizó un ANOVA para el factor variedad de miel.

Se realizó un análisis de la varianza para el parámetro actividad diastásica para evaluar si había significación entre variedades.

Además, se realizó un análisis de la varianza (para las variedades de miel de las que se disponían datos en ambas campañas) en relación al factor año con la finalidad de evaluar la significatividad de la variabilidad observada entre la campaña del 2018 y 2019. En ambos casos, se utilizó el test TUKEY con un nivel de significación de $\alpha = 0.05$. El programa utilizado fue Statgraphics Centurión XVI versión 16.1.15.

4 RESULTADOS

4.2 Estudio del HMF en distintas variedades de miel recolectadas en 2019

Con el objetivo de visualizar la variabilidad de los resultados obtenidos para el HMF en la campaña del 2019, se ha realizado una representación descriptiva mediante diagramas de barras. En la figura 6 se muestran cuatro gráficos, uno de cada variedad (azahar, cantueso, girasol y romero), comparando en cada muestra analizada el valor de HMF por ambos métodos (White y HPLC). En estos gráficos se muestra con barras el valor medio resultante de tres repeticiones realizadas a cada muestra y la desviación estándar de las medidas realizadas. En dicha figura se observa que para las cuatro variedades el valor de HMF de las muestras, en general, se encuentra dentro del marco legal, es decir, menor de 40 mg/kg muestra (BOE, Real Decreto 1049/2003). La única excepción corresponde a una muestra de azahar (I-19002) y otra de cantueso (I-19006), cuyos valores fueron de 56,0 mg HMF/ kg y 41,2 mg HMF/ kg respectivamente por lo tanto se encontraban fuera del límite legal. Este hecho puede ser debido a que estas muestras sufrieron un tratamiento inadecuado, por malas prácticas apícolas. Como se ha dicho anteriormente el HMF aumenta según sus condiciones de recolección y almacenamiento, por el tiempo y la temperatura. En cuanto a la relación entre métodos no se observan grandes diferencias entre ellos, aunque se puede ver en general que el método White da valores ligeramente superiores al método de HPLC en todas las variedades.

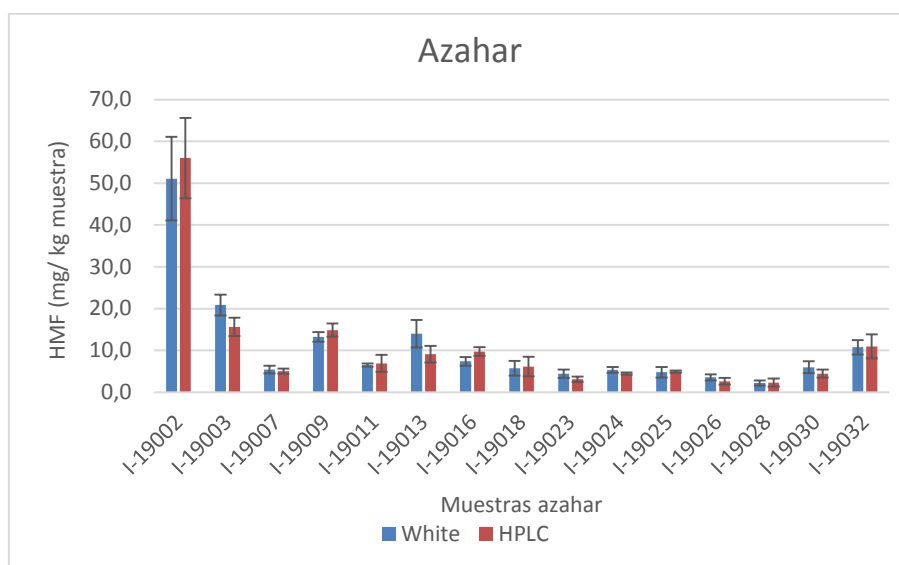


Figura 6. Gráficos de Barras para las distintas variedades analizadas del parámetro HMF en ambos métodos (White y HPLC).

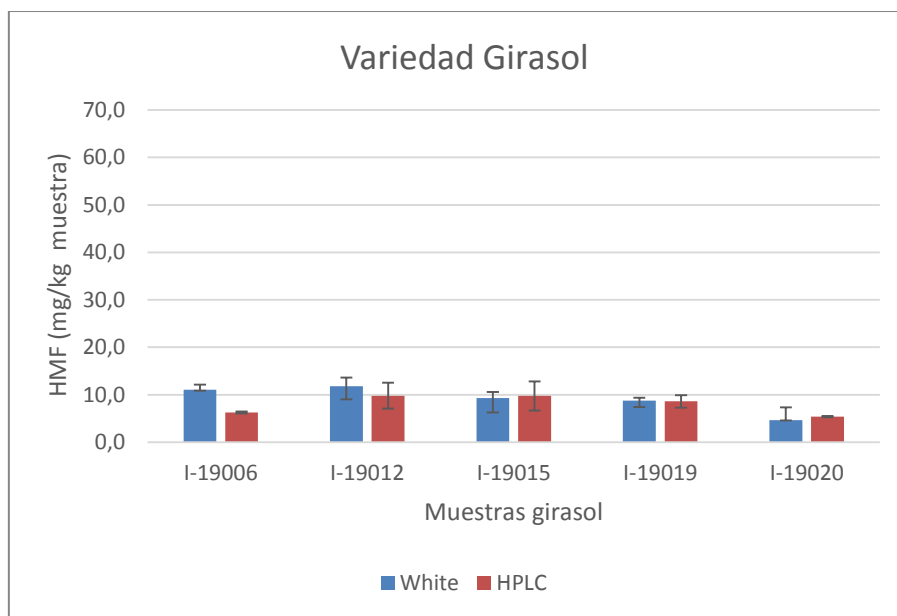
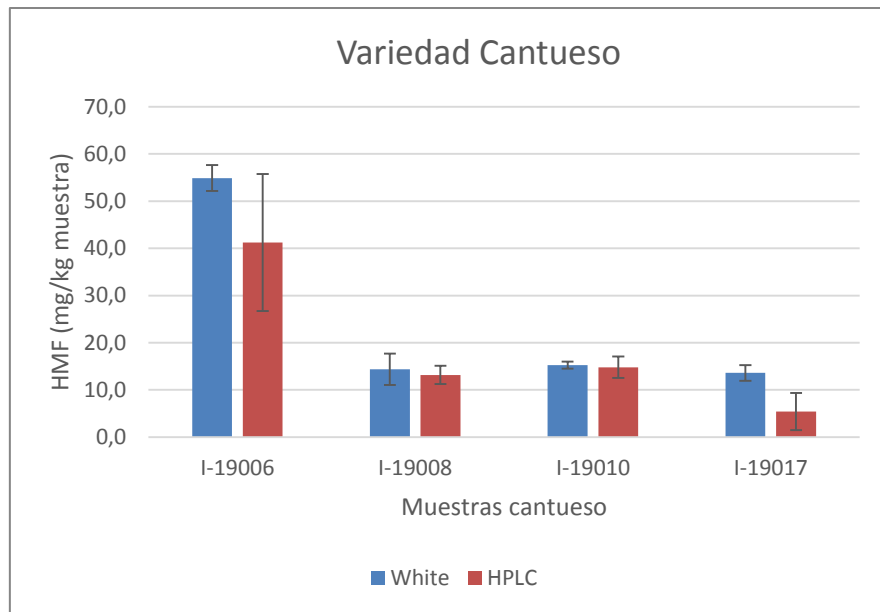


Figura 6 (Continuación). Gráficos de Barras para las distintas variedades analizadas del parámetro HMF en ambos métodos (White y HPLC). (Continuación)

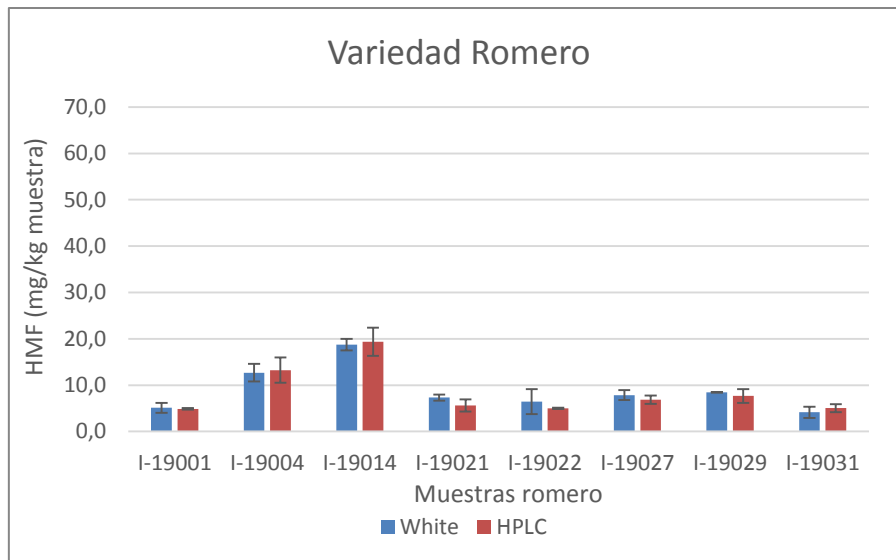


Figura 6 (Continuación). Gráficos de Barras para las distintas variedades analizadas del parámetro HMF en ambos métodos (White y HPLC). (Continuación)

Se ha realizado el mismo tipo de gráfico para la variedad de tomillo (Figura 7). En este caso, lo primero que se puede observar es la gran disparidad de los datos obtenidos por ambos métodos. Mientras que en el método de HPLC se observan datos coherentes (oscilando entre 2.7 y 8.3) por el método White no son válidos. Esto es así ya que por este procedimiento se obtuvieron valores negativos en muchos de los casos, lo que lo inhabilita como técnica apropiada para la determinación de HMF en la variedad de tomillo. La causa del error de este método puede ser debido posiblemente a la existencia de interferencias en la longitud de onda a la que se lee el HMF. Este hecho puede distorsionar la lectura espectrofotométrica. Este motivo plantea la utilización del método HPLC en la lectura del HMF ya que se ha observado en laboratorios de miel que el tomillo no es la única variedad en la que el método White da errores en los resultados de HMF.

Observando en detalle los valores de HPLC se observa que en todos los casos las muestras de tomillo cumplían el límite legal, menor de 40 mg HMF/ kg muestra.

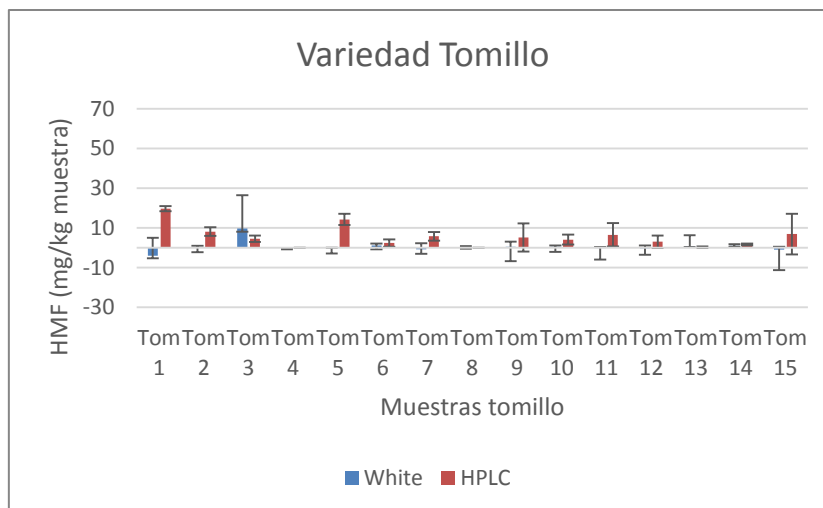


Figura 7. Gráfico de Barra para la variedad de tomillo del parámetro HMF en ambos métodos (White y HPLC).

Una vez observados los datos desde un punto de vista descriptivo, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) multifactor, con la finalidad de estudiar la influencia de la variedad de miel y del método utilizado para el análisis de HMF. La tabla 4 detalla para las 5 variedades de miel estudiadas, el resultado del HMF: el valor medio, la desviación estándar y el valor máximo y mínimo, así como el resultado ANOVA (F-Ratio, P-Value y Grupos Homogéneos) para los factores variedad de miel, método analítico y su interacción.

Se observa que el valor de HMF varía significativamente entre la variedad de miel y no entre el método analítico, ya que en el primer caso el P-Value fue menor de 0.05 (significativo al 99.99%) mientras que tanto para el método analítico como para la interacción el valor fue mayor de 0.05. Se observan 3 grupos homogéneos: uno correspondiente al tomillo (con un valor medio de 1.2 mg HMF/kg muestra), otro al que pertenece el romero, girasol y azahar (con medias de 9.0, 9.1, 10.8 mg HMF/ kg muestra), y por último el grupo correspondiente al cantueso (24.5 mg HMF/ kg muestra). A pesar de haber sido significativo el efecto de la variedad, esto no debería haber sido así, ya que al tratarse de mieles crudas, los valores de HMF deberían haber sido muy bajos. Pero como se ha visto anteriormente para una muestra de azahar y otra de cantueso el contenido de HMF fue muy elevado debido probablemente a unas malas prácticas apícolas.

Tabla 4. Valores de HMF (método White y HPLC) obtenidos en las variedades de miel estudiadas en 2019: medias, desviaciones estándar, valores mínimo, máximo, F-ratio, P-valor y grupos homogéneos. (NS= factor no significativo)

VARIEDADES	HMF MÉTODO WHITE (mg/ kg muestra) Media (Desv. estándar) Min - Máx	HMF MÉTODO HPLC (mg/ kg muestra) Media (Desv. estándar) Min - Máx	GRUPOS HOMOGÉNEOS
AZAHAR	10.8 (1.4) 7.9-13.5	10.4 (1.4) 7.7-13.5	B
CANTUESO	24.5 (2.7) 19.1-29.9	18.7 (2.7) 13.3-24.0	C
GIRASOL	9.1 (2.4) 4.3-13.9	7.9 (2.4) 3.1-12.7	B
ROMERO	9.0 (1.9) 5.3-12.7	8.5 (1.9) 4.6-12.3	B
TOMILLO	1.2 (1.4) (-1.5)- 4	5.5 (1.4) 2.7- 8.3	A
	F-RATIO	P-VALUE	
ANOVA FACTOR VARIEDAD	19.21	0.0000	
ANOVA FACTOR MÉTODO	0.32	0.5747 (NS)	
ANOVA FACTOR INTERACCIÓN	1.70	0.1492 (NS)	

En la figura 8 se representan las interacciones entre factores (variedad y método) y su intervalo Tukey. Se aprecia que la interacción no es significativa, ya que el resultado para las variedades de tomillo sí que es importante el método analítico utilizado. Este hecho es debido al amplio rango del intervalo de Tukey.

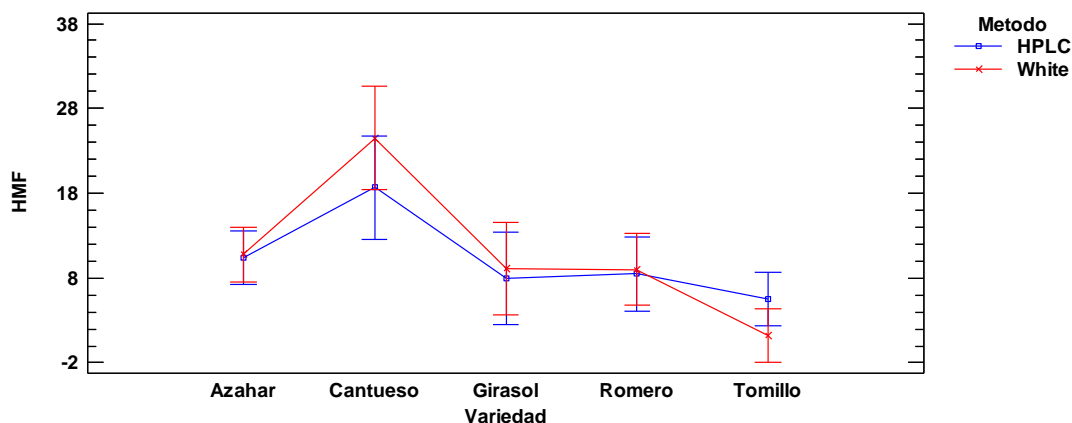


Figura 8. Interacciones entre factores (variedad y método) y su intervalo Tukey, resultante del ANOVA.

4.3 Estudio de la actividad diastásica en mieles recolectadas en 2019

Se ha representado mediante gráficos de barras (Figura 9) (uno para cada variedad recolectada en 2019), el valor de actividad diastásica de cada muestra y sus desviaciones estándar. Se observa que entre variedades existen diferencias. Para estudiar si estas diferencias son significativas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) simple para el factor variedad de miel. La tabla 5 detalla para este parámetro el valor medio, la desviación estándar, el valor máximo y mínimo obtenido para cada variedad de miel, así como el resultado del ANOVA (F-Ratio, P-Value y Grupos Homogéneos). Se observa que los valores medios obtenidos en las variedades estudiadas son algo superiores a los reportados en un estudio realizado con variedades de mieles europeas entre las que se encuentran las analizadas en este estudio (Persano Oddo, 2004). Comparando con este estudio y observando los grupos homogéneos, el valor más alto ha correspondido a la miel de girasol (con 20.8 ± 5.6 en mieles europeas y 25.9 ± 1.6 en las mieles del presente estudio), con valores intermedios está la miel de cantueso (con 14.1 ± 2.4 en mieles europeas y 17.9 ± 1.8 en las mieles de este trabajo). Los valores más bajos en ambos estudios han sido las mieles de romero y azahar (con 9.7 ± 3.2 y 9.6 ± 2.5 respectivamente en mieles europeas y 15.6 ± 1.2 y 14.7 ± 0.9 en las mieles del presente trabajo). Se observa que la significación entre variedades se debe fundamentalmente a la miel de girasol por el elevado contenido en esta enzima. Sin embargo, habría sido de esperar observar diferencias significativas entre el resto de las variedades, aunque no se hayan observado. Esto es así ya que este parámetro está relacionado con el origen botánico de las mieles. Es también de destacar que los valores mayores encontrados en el presente trabajo para una misma variedad de miel, puede ser debido a que las mieles aquí estudiadas eran algo más frescas a las del estudio europeo.

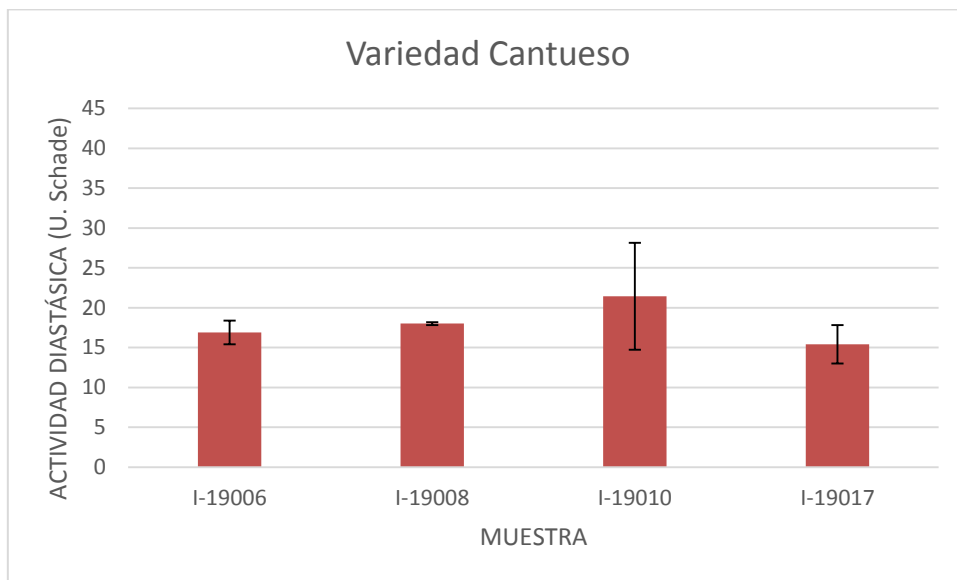
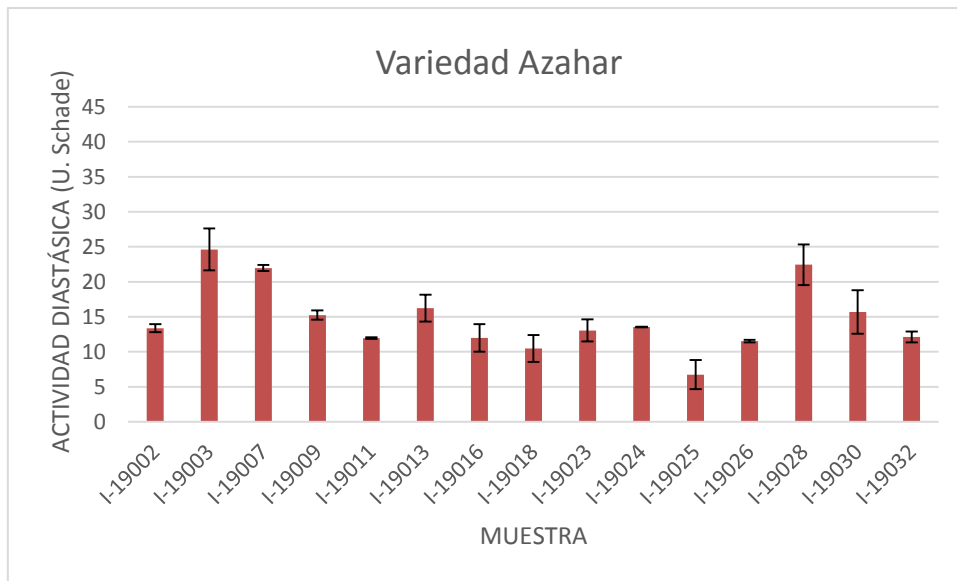


Figura 9. Gráficos de Barras para las distintas variedades analizadas del parámetro actividad diastásica.

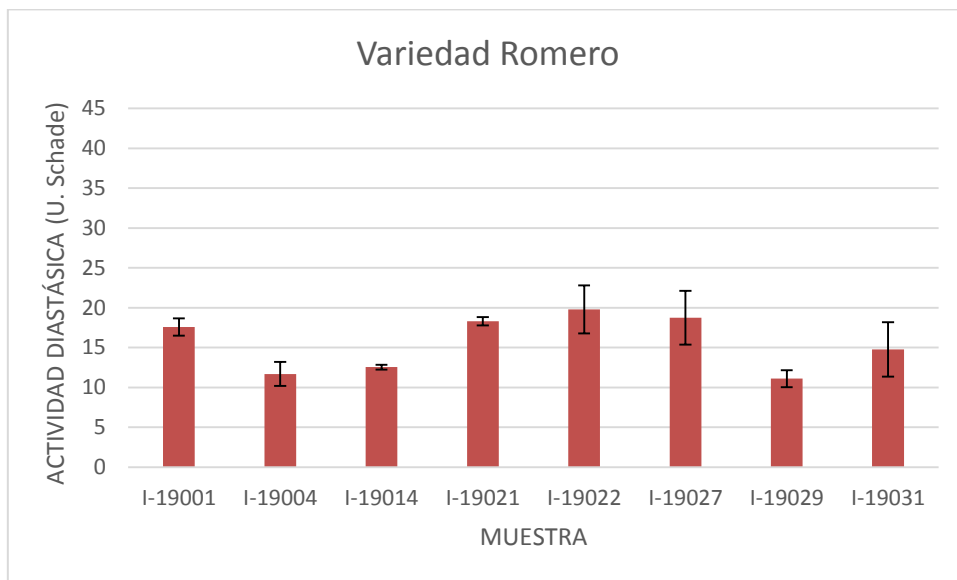
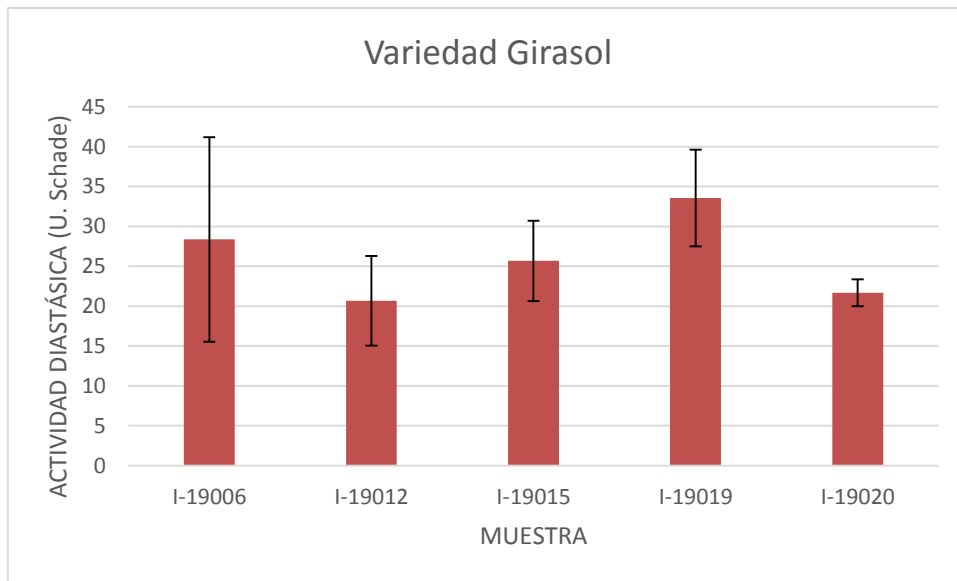


Figura 9 (Continuación). Gráficos de Barras para las distintas variedades analizadas del parámetro actividad diastásica. (Continuación)

Tabla 5. Valores de actividad diastásica obtenidos en las variedades de miel estudiadas en 2019: medias, desviaciones estándar, valores mínimo y máximo, F-ratio, P-valor y grupos homogéneos.

VARIETADES	DIASTASA (U. Schade)	GRUPOS HOMOGENEOS
	Media (Desv. Estándar)	
	Min – Máx	
AZAHAR	14.7 (0.9) 13.4-16.0	A
CANTUESO	17.9 (1.8) 15.5-20.4	A
GIRASOL	25.9 (1.6) 23.8-28.2	B
ROMERO	15.6 (1.2) 13.8-17.3	A
ANOVA	0.0000	
F-RATIO	13.44	

4.3 Comparación del parámetro HMF y actividad diastásica en mieles recolectadas en 2018 y 2019

En el laboratorio de la miel ya se disponía de datos para ambos parámetros correspondientes a la campaña de 2018, por ello, una vez evaluada la información de 2019 tal y como anteriormente se ha expuesto, se decidió comparar los resultados de las variedades en común entre las dos campañas (azahar, cantueso, romero). No se consideró la miel de girasol porque ésta no se había analizado en la campaña del 2018 de las muestras proporcionadas por el MAPA.

Puesto que anteriormente se ha demostrado que el método HPLC es más fiable que el método White, para esta comparación únicamente se han utilizado los valores del primero.

La figura 10 muestra la representación de los valores medios y desviaciones estándar de HMF y actividad diastásica para ambas campañas. De la misma manera la tabla 6 muestra junto a estos valores, el resultado del ANOVA. Se observan diferencias significativas en la variedad para el HMF y no para la actividad diastásica. Por el contrario, el año ha sido significativo para la actividad diastásica y no para el HMF. Este comportamiento parece extraño ya que es la actividad diastásica la que debería haber mostrado significación entre variedades y no el HMF porque es un parámetro que no depende del tipo de miel. Además se observa que no hay

interacción significativa entre los factores variedad y año. Viendo en detalle las figuras resultantes del ANOVA (Figura 11) para la media y el intervalo Tukey (para determinar diferencias significativas) queda patente que para el factor año los resultados fueron mejores en 2019 para ambos parámetros. Sin embargo, en el caso del HMF, aunque los valores medios de 2019 fueron mejores (más bajos), el amplio rango de variabilidad de los datos hace que no sean significativas las diferencias entre años.

Con respecto al factor variedad, para el caso del HMF las diferencias significativas observadas entre variedades no se debe atribuir a la variedad (aunque el resultado del ANOVA así lo determine), sino como anteriormente se ha explicado a las prácticas apícolas. Para la actividad diastasa, no han sido significativas las diferencias entre variedades debido fundamentalmente a que las variedades comparadas tienen la actividad diastática bastante semejante, especialmente azahar y romero. Además, en este caso el rango de intervalo de Tukey ha sido amplio.

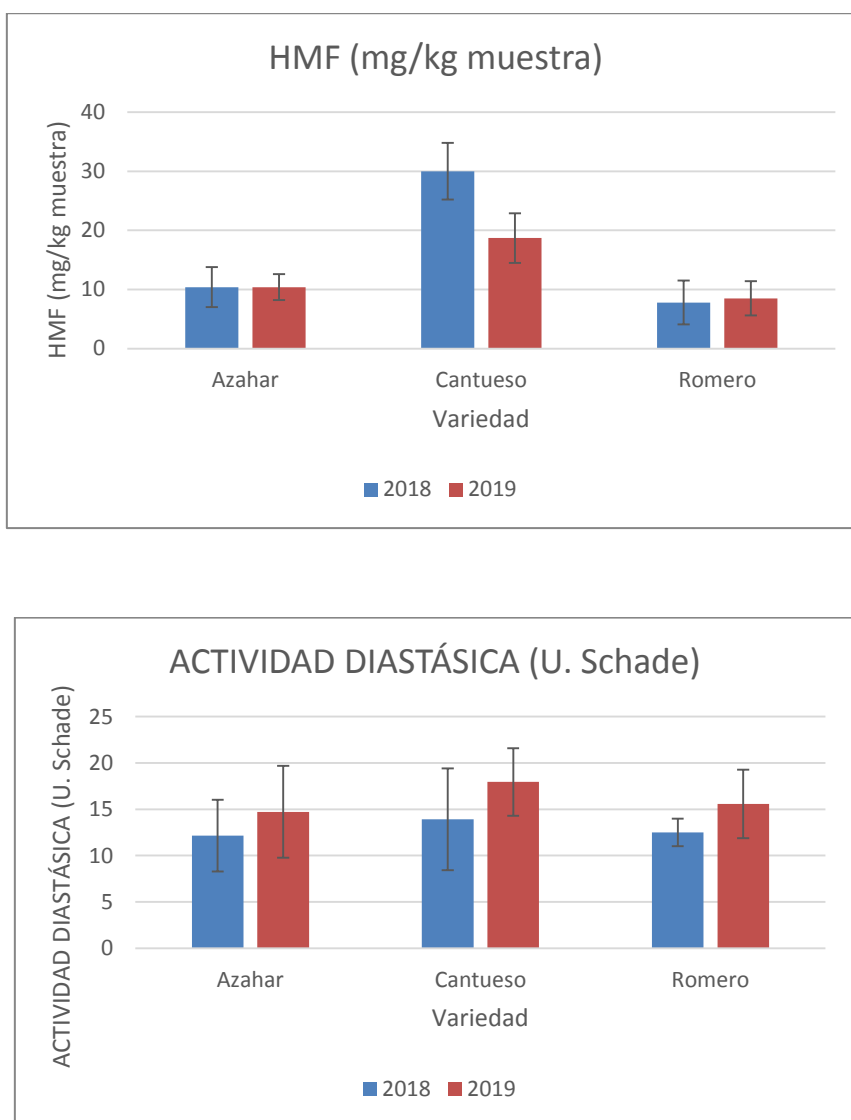


Figura 10. Gráficos de Barras para los parámetros HMF y actividad diastásica analizados en las dos campañas.

Tabla 6. HMF y actividad diastásica (medias y desviaciones estándar, valores mínimo, máximo, F-ratio y P-valor) obtenidos en la campaña de 2018 y 2019.

VARIEDAD	HMF MÉTODO HPLC		ACTIVIDAD DIASTÁSICA	
	(mg / kg muestra)		(U. Schade)	
	Media (Desv. estándar)		Media (Desv. estándar)	
	Min - Máx		Min - Máx	
	2018	2019	2018	2019
AZAHAR	10.4 (3.4)	10.4 (2.2)	12.2 (0.9)	14.7 (0.8)
	3.7-17.1	6.2-14.7	10.2-14.1	13.2-16.2
CATUESO	30.0 (4.8)	18.7 (4.2)	13.9 (1.4)	17.9(1.5)
	20.5-39.5	10.4-26.9	11.2-16.7	15.0-20.9
ROMERO	7.8 (3.7)	8.5 (2.9)	12.5(1.1)	15.6 (1.0)
	0.4-15.2	2.6-14.3	10.4-14.6	13.5-17.6
ANOVA FACTOR VARIEDAD				
F-RATIO	9.12		2.22	
P-VALUE	0.002		0.1143	
ANOVA FACTOR AÑO				
F-RATIO	1.43		12.02	
P-VALUE	0.2344		0.0008	
ANOVA FACTOR INTERACCIÓN				
F-RATIO	0.36		0.19	
P-VALUE	0.2595		0.8236	

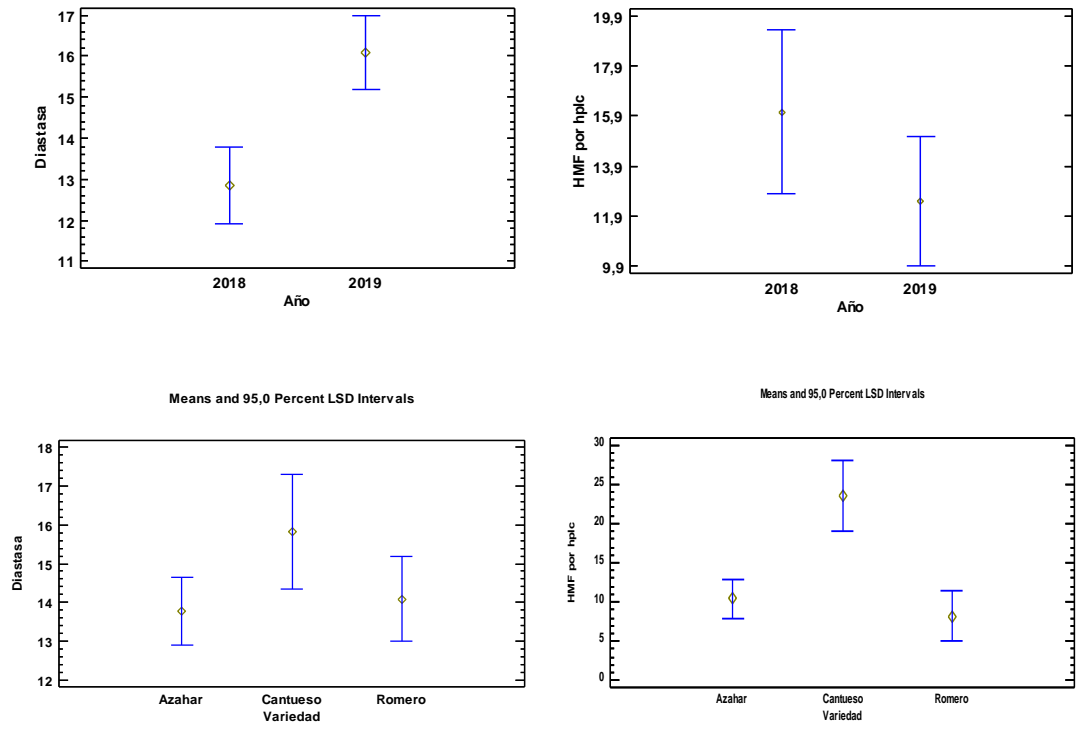


Figura 11: Gráfico de medias e intervalos de Tukey (95%) resultante del ANOVA.

5 CONCLUSIÓN

Los resultados de HMF no han mostrado diferencias significativas entre los métodos de análisis utilizados (método espectrofotométrico y método cromatográfico) a excepción de la miel de tomillo para la que se obtuvieron datos anómalos mediante el método espectrofotométrico. Por tanto, se debería cuestionar la validez del método oficial (espectrofotométrico) para la terminación del HMF, ya que los laboratorios que se dedican al análisis de miel vienen observando posibles interferencias cuando éste se aplica en algunas variedades.

Los niveles de HMF, han resultado significativamente distintos entre las variedades de miel analizadas. Sin embargo, dichas diferencias no se deben atribuir a la variedad, sino más bien a las malas prácticas apícolas llevadas en algunos casos ya que al tratarse de mieles crudas los valores de este parámetro deberían haber sido bajos en todos los casos.

Los valores de actividad diastásica se han encontrado, en general, en el rango de lo que cabría esperar para las mieles estudiadas, siendo en la mayoría de los casos mejores a los reportados en otros estudios. El mayor valor de actividad diastásica se observó en las mieles de girasol seguido de las de cantueso, romero y azahar, sin diferencias significativas entre estas tres últimas (probablemente por la amplia variabilidad de datos que existen entre ellas).

Considerando las dos campañas estudiadas, en general se observan mejores valores medios en 2019 para la actividad diastásica en las tres variedades comparadas (azahar, cantueso y romero) y para el HMF en el caso del cantueso. Este hecho se podría explicar por un mejor manejo en las prácticas apícolas en la cosecha de 2019.

6 BIBLIOGRAFÍA

BELITZ H, GROSCH W, SCHIEBERLE P. Química de los alimentos., 1997 Zaragoza, España: Editorial Acribia.

B.O.E. (BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO)., 1986. Métodos oficiales para el análisis de la miel, nº 145, p. 22195-22202.

B.O.E. (BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO)., 2003., Norma de Calidad relativa a la miel, núm. 186, p. 22384-22392.

B.O.E. (BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO)., 2018. Convenio con el Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo de la Universidad Politécnica de Valencia, para la caracterización de las principales mieles monoflorales españolas, nº 150: 63347, Madrid, España.

CODEX ALIMENTARIUS 2001A. Revised Codex Standard for Honey. Codex Stan 12-1981, Rev. 1 (1987), Rev.2 Codex Alimentarius Roma.

ESCRICHE, I.; VISQUERT, M.; CAROT, J.M.; DOMENECH, E. y FITO, P., 2008. Effect of Honey Thermal Conditions on Hydroxymethylfurfural Content Prior to Pasteurization. Food Science and Technology International., Vol 14: 29-36.

INFOAGRO, 2011. https://www.infoagro.com/noticias/hemeroteca_anual.asp?y=2011

JUAN-BORRAS M, DOMENECH E, CONCHADO A, ESCRICHE I., 2015 Physicochemical Quality Parameters at the Reception of the Honey Packaging Process: Influence of Type of Honey, Year of Harvest, and Beekeeper. Journal of Chemistry 1-6

JUAN-BORRÁS, M.; PERICHE, A.; DOMENECH, E. y ESCRICHE, I., 2015. Correlation between methyl anthranilate level and percentage of pollen in Spanish citrus honey. International Journal of Food Science and Technology., 50: 1690-1696.

KADAR M, JUAN-BORRAS M, CAROT J, DOMENECH E, ESCRICHE I., 2011 Volatile fraction composition and physicochemical parameters as tools for the differentiation of lemon blossom honey and orange blossom honey. J Sci Food Agric

PERSANO ODDO L, PIRO R., 2004 Main European unifloral honeys: descriptive sheets. INRA/DIB-AGIB/ EDP Sciences:S38–S81.

SALINAS, J.C., 2017. "Análisis polínico de la miel a partir de muestras obtenidas en el módulo de Apicultura de FES-Cuautitlán". Tesis licenciatura.

TANLEQUE-ALBERTO F, JUAN-BORRAS M, ESCRICHE I., 2019 Quality parameters, pollen and volatile profiles of honey from North and Central Mozambique. Food Chemistry

VISQUERT M, VARGAS M, ESCRICHE I., 2013 Effect of postharvest storage conditions on the colour and freshness parameters of raw honey. International Journal of Food Science and Technology

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