

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL  
MEDI NATURAL



**UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA**

***ESTUDIO DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL  
DE MIELES ESPAÑOLAS DE AZAHAR Y  
ROMERO***

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIÈNCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Curso 2019-2020

VALÈNCIA, MARZO 2020

ALUMNO: Jose Lahoz Ortega

TUTORAS: Isabel Escriche Roberto y María del Sol Juan Borrás

# **TÍTULO:** ESTUDIO DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL DE MIELES ESPAÑOLAS DE AZAHAR Y ROMERO

## **RESUMEN**

Las mieles monoflorales son muy apreciadas por sus características organolépticas y, por ello, tienen mayor valor comercial que las de milflores. Disponer de herramientas que autentifiquen inequívocamente su procedencia botánica es una prioridad para la Administración y para el sector apícola. A nivel comercial, las denominaciones específicas para las mieles monoflorales se hace atendiendo al contenido polínico de la especie botánica predominante. Se trata de un procedimiento muy laborioso, que requiere de personal muy entrenado y, por lo tanto, difícil de llevar como método de rutina. Además, no existe ningún criterio legal para relacionar dicho contenido polínico con una determinada variedad de miel. El presente trabajo forma parte de la segunda campaña de un estudio que el LABMIEL (Laboratorio de la miel y los productos apícolas de la UPV) está realizando junto con el MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) con la finalidad de determinar los parámetros que caracterizan las principales mieles monoflorales españolas. Por todo ello, el objetivo del presente trabajo se ha centrado en la caracterización mieles monoflorales de romero y azahar, procedentes de diferentes puntos de la geografía española, en términos de su perfil volátil (analizado por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas), con la finalidad de disponer de información que ayude a la clasificación de estas variedades españolas de miel. Se han identificado 28 compuestos mayoritarios, pertenecientes a 8 familias químicas: 11 alcoholes, 8 aldehídos, 4 cetonas, 2 furanos, 1 compuestos azufrado, 1 terpeno y 1 compuesto nitrogenado. El grupo de los Lilac aldehydes (A, B, C y D) está presente únicamente en la miel de azahar, con una abundancia superior al 20% del total de la fracción volátil de esta variedad de miel. En las mieles de romero se han identificado cuatro compuestos (Isopropyl alcohol; 2-Butenal,2-methyl-; Benzaldehyde; Disulfide,dimethyl) que no estaban en las muestras de azahar, si bien en conjunto representan menos del 3% del total de su fracción volátil. En la variedad de romero, los alcoholes destacan por su abundancia representando más del 43% del total de la fracción volátil (correspondiendo solo al Ethanol el 23% de dicha fracción). En la miel de azahar, los alcoholes, están presentes en menor proporción (aprox el 18% del total). Un análisis multivariante de Componentes Principales (PCA) ha mostrado evidencias claras de que la fracción volátil es capaz de discriminar las mieles por variedad botánica, siendo insignificante la diferencia por procedencia geográfica dentro de una misma variedad. En definitiva, este trabajo pone en evidencia la importancia de la información que proporciona la fracción volátil como una herramienta útil para su clasificación monofloral de las mieles.

**PALABRAS CLAVE:** miel de azahar, miel de romero, monofloralidad, compuestos volátiles, Cromatografía de Gases\_Espectrometría de Masas

AUTOR: Jose Lahoz Ortega

València, marzo de 2020

TUTORES: María Isabel Escriche Roberto y Marisol Juan Borrás

## **TITLE: STUDY OF THE VOLATILE FRACTION OF CITRUS AND ROSEMARY SPANISH HONEY**

### **ABSTRACT**

Monofloral honeys are highly valued for their organoleptic characteristics and, therefore, have greater commercial value than those of mixed flowers. Having tools that unequivocally authenticate its botanical provenance is a priority for the Administration and for the beekeeping sector. At the commercial level, the specific names for monofloral honeys are made according to the pollen content of the predominant botanical species. It is a very laborious procedure, which requires highly trained personnel and, therefore, difficult to carry out as a routine method. Furthermore, there is no legal criterion for relating said pollen content to a certain variety of honey. This work is part of the second campaign of a study that the LABMIEL (Laboratory of honey and apicultural products of the UPV) is conducting together with the MAPA (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food) in order to determine the parameters that characterize the main Spanish monofloral honeys. For all these reasons, the objective of this work has focused on the characterization of monofloral rosemary and orange blossom honeys, coming from different points of the Spanish geography, in terms of their volatile profile (analyzed by Gas Chromatography-Mass Spectrometry), with the purpose of having information that helps the classification of these Spanish varieties of honey. 28 major compounds have been identified, belonging to 8 chemical families: 11 alcohols, 8 aldehydes, 4 ketones, 2 furans, 1 sulfur compounds, 1 terpene and 1 nitrogenous compound. The group of Lilac aldehydes (A, B, C and D) is present only in orange blossom honey, with an abundance of more than 20% of the total volatile fraction of this variety of honey. Four compounds (Isopropyl alcohol; 2-Butenal, 2-methyl-; Benzaldehyde; Disulfide, dimethyl) have been identified in rosemary honeys that were not in the orange blossom samples, although together they represent less than 3% of the total its volatile fraction. In the rosemary variety, alcohols stand out for their abundance, representing more than 43% of the total volatile fraction (only 23% of said fraction corresponds to Ethanol). In orange blossom honey, alcohols are present in a smaller proportion (approximately 18% of the total). A multivariate analysis of Principal Components (PCA) has shown clear evidence that the volatile fraction is capable of discriminating honeys by botanical variety, the difference by geographical origin within the same variety being insignificant. In short, this work highlights the importance of the information provided by the volatile fraction as a useful tool for its monofloral classification of honeys.

**KEYWORDS:** orange blossom honey, rosemary honey, monoflorality, volatile compounds, Gas Chromatography\_ Mass Spectrometry

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado en el marco del proyecto de colaboración entre el Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente y el Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo de la Universitat Politècnica de València (Laboratorio de Control de Calidad de la Miel y los Productos Apícolas), para la caracterización de las principales mieles monoflorales españolas (B.O.E. núm. 150, pp. 63347-63353 de 2018).

# ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
	I.1. La miel y su origen.....	1
	I.2. Composición química de la miel.....	2
	I.3. Tipos de mieles.....	4
	I.4. Mercado y consumo de miel.....	5
	I.5. Técnicas analíticas para la correcta clasificación de las mieles.....	6
<b>II.</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	7
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	7
	III.1. Muestras de miel.....	7
	III.2. Análisis de los compuestos volátiles .....	7
	III.3. Análisis estadístico .....	8
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	8
	IV.1. Efecto de la variedad en la composición de la fracción volátil.....	8
	IV.2. Efecto de la procedencia en la composición de la fracción volátil de cada variedad de miel.....	14
	IV.3. Análisis de componentes principales .....	18
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	20
<b>VI.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	21
<b>VII.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Abejas realizando el operculado.

**Figura 2.** Diagrama Box-whisker para los alcoholes que mostraron diferencias significativas entre variedades.

**Figura 3.** Diagrama Box-whisker para los aldehidos que mostraron diferencias significativas entre variedades.

**Figura 4.** Diagrama Box-whisker para las cetonas, furanos y terpenos que mostraron diferencias significativas entre variedades.

**Figura 5.** Análisis de componentes principales de las 25 muestras de miel analizadas. Eje PC1: primera componente, eje PC2: segunda componente. Variedades: Az=azahar, Ro=romero. Procedencia: An=Andalucía, Cat=Cataluña, CV=Comunidad Valenciana, CM=Castilla-La Mancha.

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Composición de la miel en valores promedio (Belitz et al., 2014).

**Tabla 2.** Compuestos volátiles encontrados en la miel de acacia, girasol y tilo (Juan-Borrás et al., 2014).

**Tabla 3.** Muestras estudiadas según variedad y procedencia.

**Tabla 4.** Abundancia de cada compuesto volátil (expresada como porcentajes de áreas del GC-MS de cada uno con relación al total). Valores medios, desviación estándar (DS), valores máximos y mínimos, así como el resultado del ANOVA para el factor “variedad” (F-ratio y diferencias significativas). Significant level: \*  $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,00001$ .

**Tabla 5.** Abundancia de cada compuesto volátil (expresada como porcentajes de áreas del GC-MS de cada uno con relación al total). Valores medios, desviación estándar (DS), valores máximos y mínimos, así como el resultado del ANOVA para el factor “procedencia” para cada una de las variedades estudiadas (F-ratio y diferencias significativas). Significant level: \*  $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,00001$ .

# I.INTRODUCCIÓN

## I.1. La miel y su origen

La Norma de Calidad relativa a la miel la define como “la sustancia natural dulce producida por la abeja *Apis mellifera* a partir del néctar de plantas o de secreciones de partes vivas de plantas o de excreciones de insectos chupadores presentes en las partes vivas de las plantas, que las abejas recolectan, transforman combinándolas con sustancias específicas propias, depositan, deshidratan, almacenan y dejan en colmenas para que madure” (Real Decreto 1049/2003). El néctar, consiste en una solución de agua y azúcares junto con pequeñas cantidades de otras sustancias tales como aminoácidos, minerales, vitaminas, ácidos orgánicos, enzimas, etc. Es segregado por los nectarios que son órganos especializados de las plantas. El mielato o melaza también es una secreción azucarada, pero esta es emitida por diferentes tipos de insectos o partes de las plantas diferentes de los nectarios (Piana et al., 1989).

La elaboración de la miel por parte de las abejas es un proceso que se puede resumir en 4 etapas (Sáinz y Gómez, 1999; Martínez, 2011). La primera de ellas es la recolección, la abeja pecoreadora absorbe el néctar o el mielato y lo almacena en el buche melario. En esta fase la abeja aporta enzimas como diastasas, invertasas y glucosaoxidadas al néctar, las cuales juegan un papel fundamental en su transformación en miel. La segunda, la aireación que consiste en exponer a la miel “no madura” a corrientes de aire caliente, originadas en el interior de la colmena para reducir así su contenido en humedad hasta alcanzar valores entre el 30 o 40%. La tercera, el almacenamiento, tiene lugar cuando la evaporación se produce dentro de las celdillas de manera indirecta por las corrientes generadas dentro de la colmena por los cambios térmicos de la noche, se reduce el contenido de agua hasta alcanzar el 18 o 19% finalizando así la maduración de la miel. Y la última, el operculado que consiste en la formación de una fina capa de cera que sella la celdilla con la finalidad de impedir el contacto de la miel “madura” con el aire, tal y como se muestra en la Figura 1. De esta forma, se evita la absorción de agua, ya que la miel es un producto altamente higroscópico.



*Figura 1. Abejas realizando el operculado.*

A lo largo de todos estos pasos se degrada la sacarosa (azúcar mayoritario del néctar y mielatos) en glucosa y fructosa (azúcares mayoritarios en la miel) como consecuencia de las reacciones enzimáticas que tienen lugar desde la primera etapa.

## I.2. Composición química de la miel

La composición química de la miel depende del origen botánico de la planta en la que la abeja pecorea, la zona geográfica y los factores climáticos (Piana et al., 1989; Ruíz, 2011). En la tabla 1 se muestran los valores promedio para los diferentes componentes de la miel.

*Tabla 1. Composición de la miel en valores promedio (Belitz et al., 2014).*

COMPONENTE	VALORES PROMEDIO (g/100g de miel)
Agua	17.20
Fructosa	38.20
Glucosa	31.30
Sacarosa	2.40
Maltosa	7.30
Polisacáridos	1.50
Otros	3.10
Nitrógeno	0.06
Minerales	0.22

El contenido en humedad es uno de los parámetros más importantes de la miel, ya que afecta a su peso específico, viscosidad, sabor y conservación (Piana et al., 1989). La humedad no debe exceder el 20% ya que mieles excesivamente acuosas pueden sufrir fermentaciones a causa de levaduras osmófilas presentes (debidas al manejo), hecho que se minimiza cuando esta es inferior al 17,1% (Belitz et al., 2014).

Los glúcidos suponen cerca del 80% de la miel, siendo los únicos monosacáridos presentes en la miel la fructosa (33-42%) y la glucosa (27-36%). También hay otros azúcares en menores proporciones como la maltosa (7%) y la sacarosa (menos del 3%) (de Lorenzo et al., 2002; Belitz et al., 2014).

El Hidroximetilfurfural (HMF) ó 5-(hidroximetil)-2-furaldehido (hidroximetil-furfural) es un compuesto procedente de la descomposición de los monosacáridos en medio ácido. Su presencia en pequeñas cantidades es normal desde los primeros momentos de recolección de la miel. El nivel de este compuesto se utiliza (al igual que el contenido en enzimas) como índice de frescura y calidad de la miel, ya que su contenido aumenta con su calentamiento y envejecimiento natural.

Los ácidos juegan un papel importante en la miel, tanto desde el punto de vista organoléptico, aportando sabor, como en la estabilidad frente a microorganismos. Hay una gran cantidad de ácidos libres en la miel, sin embargo, el más abundante es el ácido glucónico que se forma por acción de la enzima glucosa oxidasa. Las lactonas actúan como reserva de acidez en la miel, pues pueden liberarse frente a una alcalinización del medio (Piana et al., 1989; Sáinz y Gómez, 1999; Belitz et al., 2014).

El mineral más abundante en la miel es el potasio, que supone cerca del 80% de la materia mineral total. Tanto el suelo donde se asienta la planta como su origen botánico determinan la

proporción de estos. Si bien el contenido de las mieles en minerales es modesto, este es mayor en las provenientes de los mielatos que en las de origen floral (Sáinz y Gómez, 1999; Belitz et al., 2014).

El contenido en proteínas de la miel es escaso. Una parte procede del material vegetal (néctar, mielada, polen) y otra de las abejas (de Lorenzo et al., 2002; Belitz et al., 2014).

Se han llegado a detectar 19 aminoácidos en la miel, siendo el más abundante la prolina que procede de las abejas y se corresponde con el 50-58% de la fracción aminoacídica (de Lorenzo et al., 2002; Belitz et al., 2014).

Las enzimas de la miel proceden principalmente de las glándulas hipofaríngeas de las abejas y son termolábiles, por lo que su presencia es un factor de calidad. Las enzimas más abundantes son la  $\alpha$ -glucosidasa (invertasa o sacarasa),  $\alpha$ - y  $\beta$ -amilasa (diastasa), glucosaoxidasa, catalasa y fosfatasa ácida (Piana et al., 1989; Sáinz y Gómez, 1999; Belitz et al., 2014).

Han sido aislados más de 300 compuestos volátiles pertenecientes a distintas familias químicas: ésteres de ácidos alifáticos y aromáticos, aldehídos, cetonas y alcoholes (Escriche et al., 2017). Todos ellos contribuyen al aroma y al sabor de la miel, junto con los azúcares y los ácidos (de Lorenzo et al., 2002; Belitz et al., 2014). Hay compuestos volátiles característicos de ciertas mieles como el metilantranilato para las mieles de azahar y lavanda (Papotti et al., 2009; Juan-Borrás et al., 2015). Como ejemplo, en la tabla 2 se muestran los compuestos volátiles reportados por algunos autores en las variedades de acacia, girasol y tilo (Juan-Borrás et al., 2014).

*Tabla 2. Compuestos volátiles encontrados en la miel de acacia, girasol y tilo (Juan-Borrás et al., 2014).*

ACIDS	ALCOHOLS	HYDROCARBONS
Ethanoic acid	2-Methyl-2-propanol	Octane
Propanoic acid 2-methyl-	2-Propanol	Nonane
<b>ALDEHYDES</b>	Ethanol	n-Decane
3-Methyl-butenal	2-Butanol	Toluene
2-Pentanal	2-Methyl-3-buten-2-ol	p-Xylene
2-Methyl-2-butenal	2-Methyl-3-buten-1-ol	<b>ESTERS</b>
3-Methyl-2-butenal	2-Methyl-1-propanol	Ethyl acetate
Octanal	3-Methyl-2-butanol	Acetic acid butyl-ester
Nonanal	1-Butanol	<b>SULFUR COMPOUNDS</b>
Decanal	3-Methyl-1-butanol	Dimethyl sulphide
Benzaldehyde	2-Penten-1-ol	Dimethyl disulfide
<b>KETONES</b>	3-Methyl-3-buten-1-ol	<b>TERPENES</b>
Acetone	2-Heptanol	Carvacrol
2-Butanone	2-Methyl-2-buten-1-ol	$\alpha$ -Terpinene
2-Pentanone	1-Hexanol	$\alpha$ -Pinene
3-Hepten-2-one	3-Hexen-1-ol	Borneol
2-Heptanone	<b>FURANES</b>	$\beta$ -Linalool
3-Hydroxy-2-butanone	Furanmethanol	Hotrienol
6-Methyl-5-hepten-2-one	Furfural	
Ethanone-1-4-methyl phenyl		

Los lípidos son prácticamente inexistentes en la miel (Sáinz y Gómez, 1999), al igual que las vitaminas. Estas últimas proceden del néctar y del polen de las plantas. Los grupos más importantes son la C y B, aunque también se han detectado A, D, E. Si la miel está filtrada su contenido se ve reducido hasta el 45% (Piana et al., 1989; Sáinz y Gómez, 1999).

### 1.3. Tipos de mieles

Atendiendo al origen botánico, la miel se puede clasificar en “miel de flores” y “miel de mielada”. Las mieles de flores, a su vez, pueden denominarse como “miel monofloral” o “milflores”, en función del tipo y la cantidad de polen que contienen procedentes de las plantas en la que liban las abejas (Sáinz y Gómez, 1999). Una miel se clasifica como miel monofloral cuando el tipo de polen que la caracteriza está presente en su sedimento en un 45% del total, con algunas excepciones correspondientes a la realidad del sector apícola (Sáinz y Gómez, 1999; Kadar et al., 2011). Una miel es de milflores o multifloral cuando la procedencia del néctar es de diversas especies vegetales y no predomina ninguna sobre las demás. En estas mieles, aunque no hay un predominio polínico de una determinada especie vegetal, el tipo de polen que contienen puede ser característico de una zona geográfica u por lo tanto puede ser indicativo de su origen geográfico (Piana et al., 1989; Sáinz y Gómez, 1999).

Las principales mieles monoflorales españolas son: azahar, biércol, brezo, castaño, espliego, eucalipto, girasol y romero. En el ámbito local se han llegado a considerar hasta 30 tipos mieles (Sáinz y Gómez, 1999, Orantes et al., 2018). Una de las más características del levante español es la miel de azahar, procedente de la flor del Citrus sp. Se caracteriza por un color amarillo claro en estado líquido y blanco amarillento cuando está cristalizada. Su olor es floral recordando a la flor del naranjo al igual que su sabor, que es persistente y característico (Sáinz y Gómez, 1999; Ruíz, 2011). Su cantidad de polen es generalmente baja (10.000 granos/gramo de miel), por ello su clasificación como monofloral se da con entre un 10 y 20% de polen de Citrus sp. En ocasiones el contenido de polen puede ser menor del esperado, atendiendo a sus características organolépticas. En ese caso, para poder catalogar una miel como de naranjo, se exige la presencia en ella del antranilato de metilo (compuesto volátil característico de esta miel) en una cantidad igual o mayor a 2 ppm (Juan-Borrás et al., 2015). Esta baja representación de polen en este tipo de miel se explica a partir del hecho de que muchas de las variedades de naranjo que actualmente se cultivan son estériles, hecho que impide la posibilidad de que la abeja se impregne de polen (Sáinz y Gómez, 1999; Kadar et al., 2011; Orantes et al., 2018).

La miel de biércol o brecina proviene de *Calluna vulgaris*. Tiene un color oscuro con matices rojizos y posee un olor a la flor de brezo intenso y persistente. Su aroma es más delicado que el de la miel de brezo, siendo algo menos amargo y más picante. Debido a su elevado contenido en humedad es una miel que fermenta con rapidez si no se conserva en las condiciones adecuadas. El polen dominante se corresponde con el de *Calluna vulgaris* y para poder considerar a una miel de esta variedad botánica debe contener un mínimo del 8% en su sedimento polínico (Sáinz y Gómez, 1999; Orantes et al., 2018).

Por su parte la miel de brezo se origina a partir de los arbustos de las especies de *Erica: E. tetralix* L. Su color es oscuro y su olor recuerda a flores marchitas o a madera quemada. Posee un sabor delicado algo amargo y debe tener una presencia en el sedimento polínico mínima del 37% (Sáinz y Gómez, 1999; Orantes et al., 2018).

La miel de castaño proviene de *Castanea sativa* Mill. Tiene un color variable desde ámbar hasta ámbar oscuro con matices rojizos. Su olor es fuerte, penetrante, algo rancio a manzana podrida y su sabor es amargo, algo astringente por la presencia de taninos. Es una miel frágil por el exceso de agua que causa la separación en fases. La presencia mínima de polen de *Castanea sativa* Mill debe ser del 75% en el sedimento polínico (Sáinz y Gómez, 1999; Orantes et al., 2018).

La miel de espliego procede de *Lavandula latifolia*. Su color varía desde amarillo claro a dorado, su olor aromático e intenso acompaña al sabor frutal, típico de paja seca de lavanda. El aroma es fuerte, persistente y con una fresca nota floral. Es empalagosa, dulzona, con retrogusto y acidez natural que la caracteriza. El polen de *Lavandula latifolia* y debe encontrarse en un mínimo del 10% de éste en el sedimento polínico para considerar a una miel como de esta variedad (Sáinz y Gómez, 1999; Orantes et al., 2018).

La miel de eucalipto procede de *Eucalyptus camaldulensis* y *E. globulus*. Posee un color oscuro, castaño-pardo con matices de verde ceniza. Su olor recuerda a “perro mojado” o a champiñón seco. El sabor es algo picante, como a cola de pegar vieja. El polen de eucalipto está suprarrepresentado en la miel, pudiendo llegar a ser el 90% del polen dominante dependiendo de la zona, aunque para considerarse de esta variedad debe encontrarse un mínimo del 70% (Sáinz y Gómez, 1999; Orantes et al., 2018).

La miel de girasol procede de *Helianthus annuus* L. Tiene un color amarillo vivo, un olor muy ligero y un sabor refrescante, ligeramente afrutado que recuerda a polen. El polen dominante en el residuo polínico de miel de girasol debe ser de un mínimo del 45% (Sáinz y Gómez, 1999; Orantes et al., 2018).

La miel de romero proviene de *Rosmarinus officinalis* L. Su color es amarillo en estado líquido y blanco cuando cristaliza. Su olor es vegetal, delicado, ligeramente balsámico y poco intenso pero muy perceptible. Su sabor vegetal se asocia con la harina recién molida (Ruíz, 2011; Sáinz y Gómez, 1999). El polen de *Rosmarinus officinalis* no representa más del 15% del sedimento polínico total, ya que el aporte de polen por las abejas es bajo. La infrarrepresentación de polen en esta miel hace que al igual que en el azahar únicamente sea necesario entre un 10 y 20% de este polen. Cabe mencionar que la baja representación del polen en la miel se explica de dos maneras, por la baja producción de polen que tiene la planta y por la morfología de la flor, que dificulta la impregnación de polen en la abeja al recolectar el néctar (Sáinz y Gómez, 1999; Orantes et al., 2018).

La miel de mielada, también denominada miel de bosque no procede del néctar de las flores si no de mielatos. La más frecuente en España son las procedentes de la encina, puesto que es el árbol más común en las zonas donde las abejas liban. Las condiciones climáticas influyen mucho en la producción de este tipo miel y debido a su origen tiene una mayor cantidad de minerales y aminoácidos (Piana et al., 1989; Sáinz y Gómez, 1999).

#### I.4. Mercado y consumo de miel

En la Unión Europea (UE) la producción de miel alcanzó un total de 250.000 toneladas a lo largo de la campaña de 2018. Los países que más contribuyeron son España, Hungría, Alemania y Rumanía. A pesar de ello la producción no es suficiente para satisfacer la demanda interna y la UE es el mayor importador de miel del mundo (Parlamento Europeo, 2018). A lo largo de la campaña 2018, España produjo un total de 29.393 toneladas de miel, observándose un descenso del 5,2% en la producción con respecto a la campaña del año 2017. Esto es achacado a las condiciones climáticas con un exceso de lluvia en la estación primaveral que ha influido negativamente en la campaña apícola (MAPA, 2019). España, comparada con el resto de los países de nuestro entorno, destaca por el elevado grado de profesionalización de los apicultores, considerándose profesional una explotación apícola con más de 150 colmenas, los cuales suponen el 18% del total de productores (MAPA, 2019).

Es importante mencionar el hecho de que conocer el origen botánico e incluso geográfico de la miel aporta un valor añadido y diferencial por el cual el consumidor está dispuesto a pagar. Este hecho se aprecia en los últimos datos ofrecidos por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación para la campaña 2017/2018 donde los precios de las mieles monoflorales a granel

son hasta un 50% más altos que los de las mieles de multiflorales a granel, en el caso de mieles envasadas esta diferencia se reduce hasta el 24% (MAPA, 2019). En definitiva, en el sector apícola las mieles monoflorales tienen una importancia especial, pues al ser más apreciadas por los consumidores, reportan un mayor beneficio económico al apicultor. Por esto y para garantizar una correcta información a los consumidores, una competencia leal entre apicultores y proteger la salud pública es importante una correcta clasificación de las mieles evitando los fraudes tanto en el etiquetado como en el procesado.

### 1.5. Técnicas analíticas para la correcta clasificación de las mieles

La veracidad sobre el origen botánico y geográfico de las mieles es un tema de gran relevancia, tanto para el sector apícola como para la administración y los consumidores. La normativa comunitaria no establece qué características de composición deben reunir las mieles con un origen vegetal determinado, lo que supone un problema en la determinación analítica de si una miel tiene realmente el origen declarado (B.O.E. núm. 150, pp. 63347-63353 de 2018). Esta situación quedó reflejada en la Directiva 2014/63/UE que fijó como prioridad garantizar unas prácticas comerciales leales y proteger el interés de los consumidores. Para ello, es necesario establecer métodos analíticos y legislar de acuerdo con parámetros de calidad que definan la denominación botánica atendiendo a las peculiaridades de los diferentes tipos de mieles. Por lo tanto, es necesaria una amplia base científica que sustente las decisiones políticas.

El método tradicional para la clasificación de las mieles es el análisis polínico. Éste permite, mediante la observación del polen presente en la miel, valorar su procedencia botánica, ya que como anteriormente se ha comentado el porcentaje de polen requerido es función de la especie botánica de la que se trate (de la Cruz et al., 2013). Sin embargo, esta metodología presenta una serie de problemas como la necesidad de personal muy especializado, la hipo y la hiperrepresentación de polen que lleva consigo asociados problemas de clasificación en cuanto al origen botánico de las mieles (Persano Oddo and Piro, 2004; Kadar et al., 2011). De esta manera, en ocasiones con este método mieles españolas genuinamente monoflorales han sido rechazadas como tales en laboratorios europeos al contrastar los resultados analíticos con una base de datos en la que las características propias de las mieles españolas no se encuentran bien representadas (B.O.E. núm. 150, pp. 63347-63353 de 2018).

El análisis sensorial realizado por catadores expertos se usa desde hace tiempo como complemento al análisis polínico (Maurici et al., 2016). Sin embargo, se trata de un método tedioso y no aplicable de forma rutinaria. Hoy en día uno de los métodos que mejores resultados ofrece para complementar el análisis polínico y sensorial es el análisis de compuestos volátiles (Escriche et al., 2009, Juan-Borrás et al., 2013). Todas las mieles tienen un aroma base característico. Sin embargo, algunas mieles por su origen particular presentan un perfil aromático diferenciador. La presencia de ciertos compuestos aromáticos específicos en las mieles que tienen un origen botánico determinado han sido definidos por algunos autores como “huellas dactilares” (fingerprints) para la clasificación de las mismas (Serra, 1988; Radovic et al., 2001; Alissandrakis, 2003; Serra y Ventura, 2003). Por ello hay autores que proponen como método más apropiado para la clasificación de las mieles, la caracterización de la fracción volátil por GC-MS (Verzera et al., 2001; Escriche et al., 2009).

En este contexto, el Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA) firmó en el año 2018 un convenio de colaboración con el Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo de la Universidad Politècnica de València, para la caracterización de las principales mieles monoflorales españolas (B.O.E. núm. 150, pp. 63347-63353 de 2018). El presente trabajo de investigación (TFG), realizado en el contexto de dicho convenio de colaboración, se ha desarrollado en el Laboratorio de la miel y productos apícolas (LABMIEL) de la Universitat Politècnica de València (UPV).

## II.OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo ha sido la caracterización de mieles monoflorales de romero y azahar, procedentes de diferentes puntos de la geografía española, en términos de su perfil volátil, con la finalidad de disponer de información que ayude a la clasificación de estas variedades españolas de miel.

## III.MATERIALES Y MÉTODOS

### III.1. Muestras de miel

En el presente estudio se analizaron 25 muestras de miel cruda de romero y azahar recolectadas en diferentes regiones de la geografía española, pertenecientes a la campaña del 2019. En la tabla 3 se detalla el número de muestras analizadas según variedad y procedencia.

Tabla 3. Muestras estudiadas según variedad y procedencia.

COMUNIDAD AUTÓNOMA	ROMERO ( <i>Rosmarinus officinalis</i> )	AZAHAR ( <i>Citrus sp</i> )
Andalucía	3	5
Cataluña	5	-
Comunidad Valenciana	5	3
Castilla-La Mancha	4	-
<b>TOTAL</b>	17	8

### III.2. Análisis de los compuestos volátiles

El método utilizado para la extracción de la fracción volátil de las muestras fue “purga y trampa” (Escriche et al., 2009).

Se pesaban 20g de miel en un tubo de vidrio con cuello esmerilado y se añadían 100µL de patrón interno (2-Pentanol a 10 ppm). Debido a la variabilidad que presentaban las muestras en cuanto a la humedad se estandarizó el contenido de las mismas mediante la adición de agua bidestilada. Para ello, se consideró el agua que contenía cada muestra y se adicionó la suficiente hasta un total de 20 g de agua/100 g de muestra. De esta manera todas las muestras tenían la misma cantidad de materia seca. Para asegurar una homogeneización completa de la miel con el patrón interno, se sometía el tubo a 2 minutos de agitación mediante vórtex.

La extracción de los compuestos volátiles se realizaba sumergiendo la muestra en un baño a 45°C por encima del nivel de la miel. Una corriente continua de nitrógeno (100 mL/min, medidos con caudalímetro) se usaba como gas de arrastre, atravesaba la muestra facilitando la liberación de los compuestos volátiles. La fracción volátil liberada era retenida en tubo con material adsorbente (100 mg de Tenax TA 20-35 mesh). Tras 20 minutos de paso del gas a través de la muestra, se procedía a la desorción de los compuestos retenidos en la matriz de Tenax mediante el uso de un desorbedor térmico Turbomatrix TD (Perkin Elmer, Wellesley, USA). La desorción

se realizaba bajo un flujo de Helio a 220°C durante 10 minutos. Los compuestos volátiles eran retenidos en la trampa fría a -30°C y se transferían directamente a la cabeza de la columna por calentamiento de la trampa fría hasta los 250°C (rampa de temperatura 99°C/s).

Un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas (Trace GC 2000) se utilizó para la separación de los compuestos retenidos en la columna capilar DBWax (SGE) de 60 m de longitud, 0,35 mm de diámetro interno y 1 µm de espesor de fase estacionaria. Los compuestos eran arrastrados por el gas portador (Helio a 1 mL/min), mientras se realizaba una rampa de temperatura entre 40°C y 240°C. Una vez los compuestos eran separados en la columna cromatográfica, se separaban en el espectrómetro de masas (Finnigan TRACE MS, software Xcalibur). El impacto electrónico se realizó a 70 eV con un rango de masas de m/z 33-433. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

Comparando los espectros de masas obtenidos para cada compuesto con los pertenecientes a la base de datos del equipo (librería NIST, National Institute of Standards and Technology, 2002) se han identificado un total de 28 compuestos entre todas las muestras.

### III.3. Análisis estadístico

Para cada uno de los compuestos identificados, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) en relación con el factor “variedad” con la finalidad de evaluar la existencia de diferencias significativas entre los dos tipos de miel analizadas (romero y azahar). También se realizó un ANOVA factor “procedencia” para evaluar si existían diferencias significativas según la procedencia geográfica de mieles de una misma variedad. En ambos casos, se utilizó el test Tukey con un nivel de significación de  $\alpha=0,05$ . El programa utilizado fue Statgraphics Centurion XVII para Windows (versión 16.1).

Además, con la finalidad de tener una visión global del comportamiento de las variables analizadas (compuestos volátiles) en relación a las mieles analizadas, se aplicó un análisis de componentes principales (PCA) mediante el software Unscrambler X.10.

## IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV.1. Efecto de la variedad en la composición de la fracción volátil

En la fracción volátil de las mieles analizadas se han identificado 28 compuestos mayoritarios, pertenecientes a 8 familias químicas: 11 alcoholes (Isopropyl alcohol; Ethanol; 2-Butanol; 3-Buten-2-ol,2-methyl-; 1-Propanol,2-methyl-; 1-Butanol; 1-Butanol,3-methyl-; 3-Buten-1-ol,3-methyl-; 2-Buten-1-ol,2-methyl-; 1-Hexanol; 3-Hexen-1-ol), 8 aldehídos (2-Butenal,2-methyl-; 2-Butenal,3-methyl-; Nonanal; Benzaldehyde; Lilac aldehyde A; Lilac aldehyde B; Lilac aldehyde C; Lilac aldehyde D), 4 cetonas (Ethyl acetate; 2,3-Butanedione; 3-Hepten-2-one; 5-Hepten-2-one,6-methyl-), 2 furanos (2-Furanmethanol; Furfural), 1 compuesto azufrado (Disulfide, dimethyl), 1 terpeno (Limonene) y 1 compuesto nitrogenado (3-Butenenitrile). La figura 1 de Anexos, muestra como ejemplo un cromatograma correspondiente a cada variedad de miel.

Con la finalidad de evaluar la existencia de diferencias significativas en la fracción volátil de las dos variedades de miel estudiadas, se ha realizado un ANOVA considerando el factor “variedad” para cada uno de los compuestos identificados. En la tabla 4, se muestra (para cada variedad) el valor medio, la desviación estándar (DS) y los valores máximos y mínimos encontrados. La abundancia de cada compuesto volátil se ha expresado como porcentajes de áreas del GC-MS de cada uno con relación al sumatorio del total de áreas. La tabla también muestra el resultado del ANOVA (F-ratio y diferencias significativas) para el factor “variedad”.

De los 28 compuestos volátiles identificados, 17 mostraron diferencias significativas entre ambas variedades de miel.

El grupo de los Lilac aldehídos aparece únicamente en las muestras de azahar, en el que destaca por su abundancia con porcentajes medios de 6,47% (Lilac aldehyde A), 6,04% (Lilac aldehyde B), 4,86% (Lilac aldehyde C) y 3,03% (Lilac aldehyde D). Esto significa que los cuatro compuestos representan el 20,4% de la fracción volátil de la miel de azahar. Estos valores son muy similares a los reportados por otros autores, que encontraron niveles de Lilac aldehídos próximos al 20% y 18% de la fracción volátil total, respectivamente (Alissandrakis et al., 2007; Kadar et al., 2011). La presencia de estos compuestos exclusivamente en la miel de azahar se debe a que proceden del néctar de esta flor y por ello se pueden considerar marcadores específicos de esta variedad de miel (de la Fuente et al., 2005; Kadar et al., 2011).

Otro compuesto volátil de gran importancia en la miel de azahar es el Methyl anthranilate, que también procede del néctar de esta variedad botánica. Este es un compuesto característico del néctar de la flor de azahar, por ello ha sido reportado por algunos autores como un marcador de la fracción volátil de esta variedad de miel (Serra-Bonvehí, 1988). Sin embargo, en este trabajo el Methyl anthranilate no fue identificado debido para determinarlo se requiere de un protocolo específico para el y aplicar una técnica analítica (HPLC-UV) distinta a la utilizada en el presente estudio (Juan-Borrás et al., 2015).

El Limonene es un compuesto de la familia de los terpenos que está presente en grandes cantidades en el aceite esencial de la piel de los cítricos y contribuye en gran medida al aroma de éstos. En este trabajo se han encontrado diferencias significativas para este compuesto entre ambas variedades, suponiendo el 0,63% de la fracción volátil en azahar y el 0,12% de la fracción volátil en romero. Cabría esperar que este compuesto también fuera un indicador para la miel de azahar, pero su presencia es habitual en casi todas las variedades de mieles, por ello, no sirve como indicador para la clasificación de miel de acuerdo a su origen botánico (Alissandrakis et al., 2007).

El porcentaje medio del 2,3-Butanedione para la variedad de azahar fue del 2,96% mientras que en la de romero fue del 1,59%. Esta diferencia es mayor para el 3-Hepten-2-one, con valores medios de 2,24% y 0,07%, respectivamente.

De los 28 compuestos identificados, 4 aparecen únicamente en las muestras de romero: Isopropyl alcohol; 2-Butenal,2-methyl-; Benzaldehyde; Disulfide,dimethyl. Estos han supuesto el 0,23%, 0,52%, 0,99% y 0,58%, respectivamente de la fracción volátil total de esta variedad.

La miel de romero destaca por el elevado peso que la familia de los alcoholes tiene en su fracción volátil, suponiendo el 43,36% del total, frente al 18,44% en la miel de azahar. El más importante de ellos fue el Ethanol, ya que él solo representa el 23% de la fracción volátil total de esta variedad.

Los derivados del furano tales como Furfural y 2-Furanmethanol no son útiles para la clasificación botánica de las mieles, pues son compuestos que reflejan un tratamiento térmico o unas condiciones de almacenamiento prolongadas e inadecuadas (Kadar et al., 2011). Las cantidades encontradas de 2-Furanmethanol (2,50% en azahar y 0,04% para romero) en el estudio fueron bajas, indicando la frescura de las muestras. Otros autores han reportado valores similares, 2,26% para la variedad de azahar (Kadar et al., 2011) y 1,33 para la variedad de romero (de la Fuente et al., 2005).

Tabla 4. Abundancia de cada compuesto volátil (expresada como porcentajes de áreas del GC-MS de cada uno con relación al total). Valores medios, desviación estándar (DS), valores máximos y mínimos, así como el resultado del ANOVA para el factor “variedad” (F-ratio y diferencias significativas). Significant level: \*  $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,00001$ .

COMPUESTOS VOLÁTILES	KI	AZAHAR	ROMERO	F-ratio
		Media (DS) (mín.-máx.)	Media (DS) (mín.-máx.)	
<b>ALCOHOLS</b>				
Isopropyl alcohol		nd (nd) <sup>a</sup>	0,23 (0,37) <sup>b</sup>	4,82*
		nd	nd-1,37	
Ethanol	928	10,11 (10,84) <sup>a</sup>	22,87 (14,94) <sup>b</sup>	7,84**
		nd-39,68	0,53-49,51	
2-Butanol	1190	0,10 (0,37) <sup>a</sup>	0,86 (0,66) <sup>b</sup>	15,50***
		nd-1,33	nd-2,48	
3-Buten-2-ol,2-methyl-	1081	1,39 (1,26) <sup>a</sup>	4,74 (2,59) <sup>b</sup>	19,74***
		nd-4,73	nd-12,82	
1-Propanol,2-methyl-	1139	1,28 (3,98) <sup>a</sup>	3,26 (3,96) <sup>a</sup>	ns
		nd-14,47	nd-14,08	
1-Butanol	1190	0,57 (0,87) <sup>a</sup>	0,54 (2,15) <sup>a</sup>	ns
		nd-2,45	nd-12,33	
1-Butanol, 3-methyl-	1234	2,87 (3,94) <sup>a</sup>	4,64 (4,09) <sup>a</sup>	ns
		nd-15,44	0,88-16,99	
3-Buten-1-ol, 3-methyl-	1266	1,39 (3,70) <sup>a</sup>	3,70 (2,25) <sup>b</sup>	12,96***
		0,40-2,53	1,13-10,45	
2-Buten-1-ol, 2-methyl-	1327	0,65 (0,37) <sup>a</sup>	2,35 (1,78) <sup>b</sup>	11,37**
		0,20-1,500	0,27-7,48	
1-Hexanol	1361	0,05 (0,07) <sup>a</sup>	0,05 (0,13) <sup>a</sup>	ns
		nd-0,19	nd-0,51	
3-Hexen-1-ol	1397	0,03 (0,09) <sup>a</sup>	0,12 (0,34) <sup>a</sup>	ns
		nd-0,34	nd-1,52	
<b>ALDEHYDES</b>				
2-Butenal,2-methyl-	1146	nd (nd) <sup>a</sup>	0,52 (0,65) <sup>b</sup>	8,18**
		nd	nd-2,01	
2-Butenal,3-methyl-	938	0,20 (0,23) <sup>a</sup>	0,66 (0,60) <sup>b</sup>	7,21*
		nd-0,65	nd-1,82	
Nonanal	1413	1,06 (0,25) <sup>a</sup>	0,91 (0,86) <sup>a</sup>	ns
		0,71-1,42	nd-2,87	
Benzaldehyde	1564	nd (nd) <sup>a</sup>	0,99 (1,35) <sup>b</sup>	6,89*
		nd	nd-4,81	
Lilac aldehyde A	1573	6,47 (3,28) <sup>b</sup>	nd (nd) <sup>a</sup>	136,88****
		1,10-10,94	nd	
Lilac aldehyde B	1589	6,04 (3,24) <sup>b</sup>	nd (nd) <sup>a</sup>	122,53****
		0,80-10,82	nd	
Lilac aldehyde C	1597	4,86 (2,58) <sup>b</sup>	nd (nd) <sup>a</sup>	124,87****
		0,59-8,64	nd	

Lilac aldehyde D	1624	3,03 (2,34) <sup>b</sup>	nd (nd) <sup>a</sup>	59,09****
		0,03-6,12	nd	
<b>KETONES</b>				
Ethyl acetate	918	2,21 (2,00) <sup>a</sup>	3,13 (3,52) <sup>a</sup>	ns
		nd-8,04	nd-13,08	
2,3-Butanedione	1000	2,96 (1,65) <sup>b</sup>	1,59 (1,13) <sup>a</sup>	10,56**
		nd-6,49	nd-3,94	
3-Hepten-2-one	1301	2,24 (0,79) <sup>b</sup>	0,07 (0,20) <sup>a</sup>	227,68****
		0,26-3,37	nd-0,72	
5-Hepten-2-one, 6-methyl-	1351	0,34 (0,23) <sup>a</sup>	0,51 (0,41) <sup>a</sup>	ns
		nd-0,73	nd-1,56	
<b>FURANES</b>				
2-Furanmethanol	1552	2,50 (0) <sup>b</sup>	0,04 (0,12) <sup>a</sup>	5075,28****
		2,30-2,50	nd-0,54	
Furfural	1489	2,02 (1,43) <sup>a</sup>	1,62 (1,52) <sup>a</sup>	ns
		nd-4,03	nd-6,09	
<b>SULFUR COMPOUNDS</b>				
Disulfide,dimethyl	1072	nd (nd) <sup>a</sup>	0,58 (1,18) <sup>a</sup>	ns
		nd	nd-4,48	
<b>TERPENES</b>				
Limonene	1167	0,63 (0,66) <sup>b</sup>	0,12 (0,35) <sup>a</sup>	12,12**
		nd-1,65	nd-1,49	
<b>NITROGEN COMPOUNDS</b>				
3-Butenenitrile	1241	0,50 (0,72) <sup>a</sup>	2,03 (4,55) <sup>a</sup>	ns
		nd-1,78	nd-20,04	

Con el fin de facilitar la visualización de la variabilidad entre los tipos de miel estudiados, las figuras 2, 3 y 4 muestran los diagramas “Box-whisker” (obtenidos del análisis ANOVA) de aquellos compuestos que han mostrado diferencias significativas entre variedades. Estas figuras dan una visión descriptiva de la dispersión que presentan los datos para un determinado compuesto. La información viene presentada en cuartiles: el segundo y tercer cuartil (zona en gris, representa el 50% de los datos) mientras que el primer y cuarto cuartil son los bigotes inferior y superior. La línea horizontal que atraviesa la caja es la mediana, el punto dentro de la caja la media y los puntos que se encuentran fuera de los bigotes son datos anómalos.

La figura 2 muestra el grupo de los alcoholes (Isopropyl alcohol; Ethanol; 2-Butanol; 3-Buten-2-ol,2-methyl-; 3-Buten-1-ol,3-methyl-; 2-Buten-1-ol,2-methyl-). Se aprecia una mayor dispersión en los porcentajes de todos estos compuestos en la miel de romero (nd-1,37; 0,53-49,51; nd-2,48; nd-12,82; 1,13-10,45; 0,27-7,48) con respecto a la de azahar (nd-nd; nd-39,68; nd-1,33; nd-4,73; 0,40-2,53; 0,20-1,5).

En la figura 3 están representados los aldehídos. Esta familia destaca por el grupo de los Lilac aldehydes y su exclusividad en la miel de azahar. Sus porcentajes presentan un rango de dispersión elevado: Lilac aldehyde A (1,10-10,94), Lilac aldehyde B (0,80-10,82), Lilac aldehyde C (0,59-8,64) y Lilac aldehyde D (0,03-6,12). Es de destacar el 2-Butenal,2methyl- y el Benzaldehyde por aparecer únicamente en la miel de romero (nd-2,01 y 0-4,81, respectivamente). El 2-Butenal,3-methyl- está presente en ambas variedades, pero muestra una mayor variabilidad en la miel de romero (nd-1,82) que en la de azahar (nd-0,65).

La figura 4 muestra las cetonas (2,3-Butanedione y 3-Hepten-2-one), furanos (2-Furanmethanol) y terpenos (Limonene). El 2,3-Butanedione y el 2-Furanmethanol presentan un rango de variabilidad muy similar para ambas mieles, si bien la cantidad reportada en azahar (nd-6,49 y 2,30-2,50) es mayor que en romero (nd-3,94 y nd-0,54), respectivamente. Tanto el 3-Hepten-2-one como el Limonene son más abundantes en la miel de azahar y presentan una mayor dispersión en los porcentajes (0,26-3,37 y nd-1,65) frente a los del romero (nd-0,72 y nd-1,49).

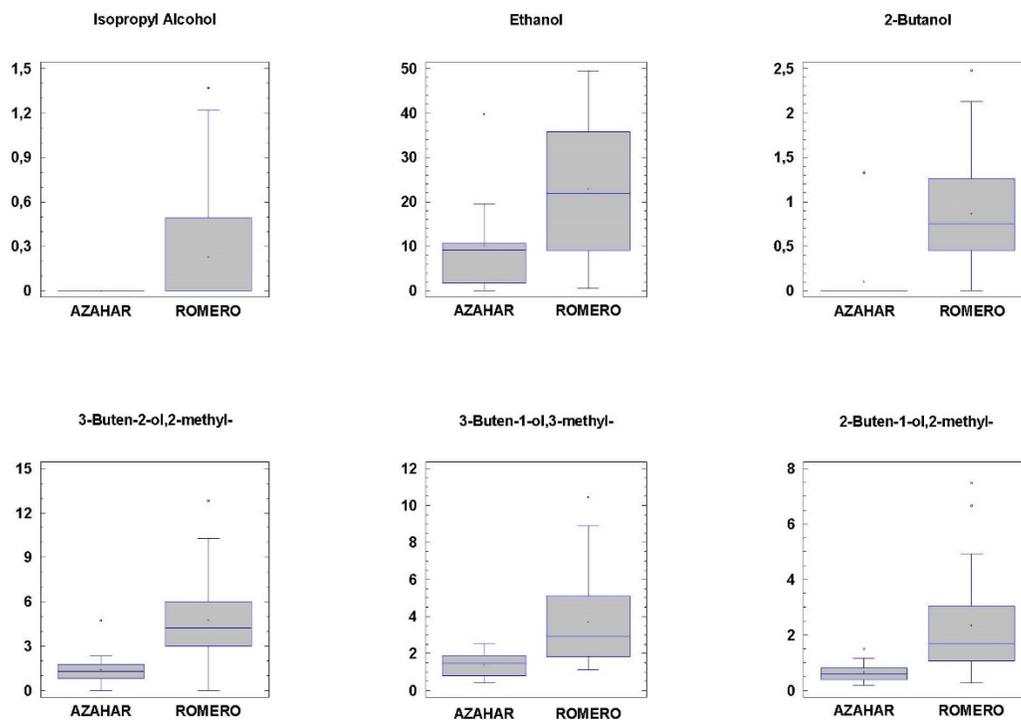


Figura 2. Diagrama Box-whisker para los alcoholes que mostraron diferencias significativas entre variedades.

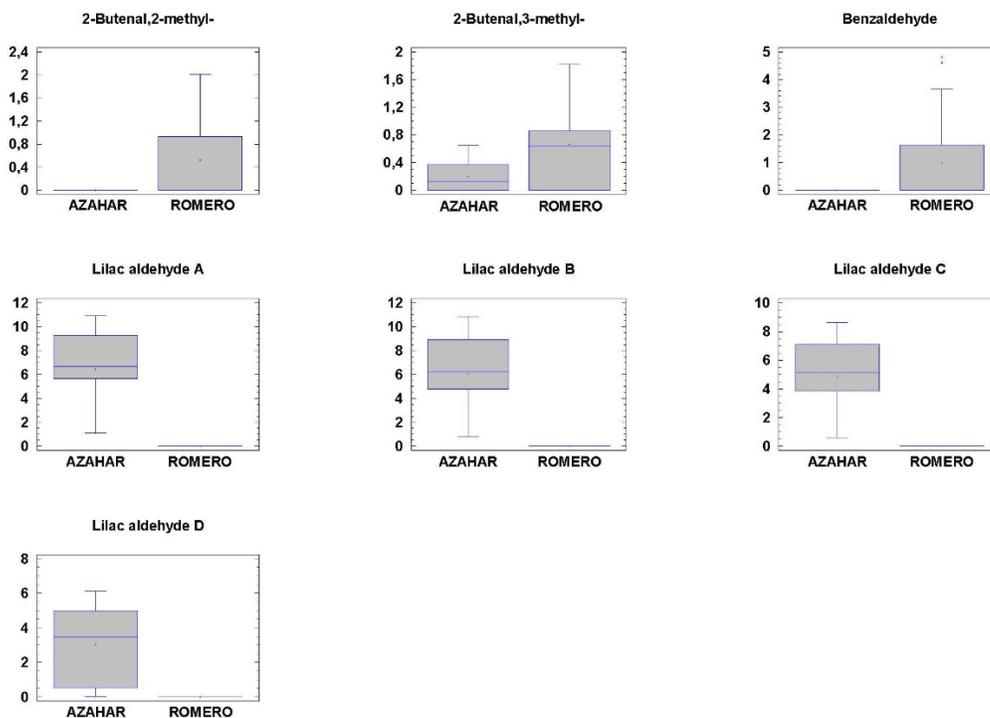


Figura 3. Diagrama Box-whisker para los aldehidos que mostraron diferencias significativas entre variedades.

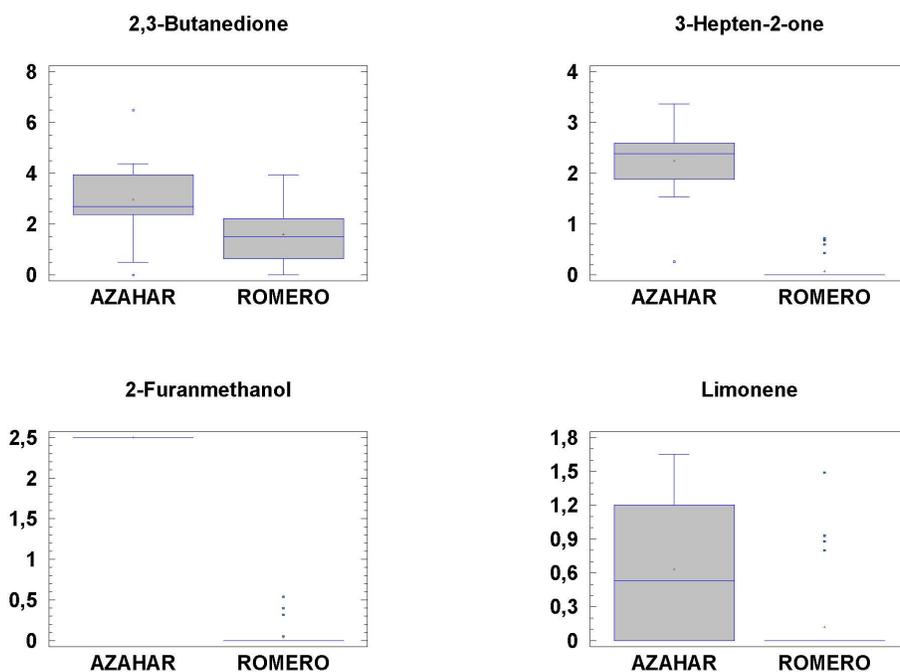


Figura 4. Diagrama Box-whisker para las cetonas, furanos y terpenos que mostraron diferencias significativas entre variedades.

## IV.2. Efecto de la procedencia en la composición de la fracción volátil de cada variedad de miel

Con la finalidad de evaluar si la comunidad autónoma de la que procedían las muestras tenía alguna influencia en el perfil volátil de las mieles estudiadas, para cada uno de los compuestos identificados y para cada variedad, se realizó un ANOVA atendiendo al factor “procedencia”. En la tabla 5, se muestra (diferenciando entre procedencias y variedades) el valor medio, la desviación estándar (DS) y los valores máximos y mínimos encontrados. También, se muestra para un compuesto el resultado del ANOVA indicando la existencia o no diferencias significativas.

En general son muy escasas las diferencias observadas entre procedencias para cada variedad de miel.

De los 28 compuestos identificados, para la variedad de romero 6 mostraron diferencias significativas en cuanto a la procedencia (Ethanol, 2-Butanol, 3-Hexen-1-ol, 2-Butenal, 2-methyl, Ethyl Acetate y Limonene), mientras que para la variedad de azahar solamente 1 compuesto mostró diferencias significativas (3-Hepten-2-one).

Como se puede apreciar, el número de compuestos que muestran diferencias significativas con respecto al factor “procedencia” es mucho menor que respecto al factor “variedad”. Esto es algo de esperar, pues las propiedades que otorga el origen botánico a una miel son las que mayoritariamente la definen. Si bien las mieles de una misma variedad, pero con distinta procedencia muestran diferencias en su fracción volátil, estas son únicamente en la cantidad en la que aparecen ciertos compuestos. Un estudio, realizado también en el Laboratorio de la miel y productos apícolas de la UPV, que comparaba el efecto de la procedencia entre distintos países para mieles de acacia, girasol y tilo llegó a una conclusión muy similar a la observada en el presente estudio. En él se afirmaba que el factor variedad, más que el país de origen diferenciaba la fracción volátil de las mieles, tanto por la diferente abundancia entre compuestos, por la presencia de marcadores específicos en ellas (Juan-Borras et al., 2013).

Tabla 5. Abundancia de cada compuesto volátil (expresada como porcentajes de áreas del GC-MS de cada uno con relación al total). Valores medios, desviación estándar (DS), valores máximos y mínimos, así como el resultado del ANOVA para el factor “procedencia” para cada una de las variedades estudiadas (F-ratio y diferencias significativas). Significant level: \*  $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,00001$ .

COMPUESTOS VOLÁTILES	AZAHAR			ROMERO				F-ratio
	ANDALUCÍA	COMUNIDAD VALENCIANA	F-ratio	ANDALUCÍA	CASTILLA-LA MANCHA	COMUNIDAD VALENCIANA	CATALUÑA	
	MEDIA (DS) (mín.-máx.)	MEDIA (DS) (mín.-máx.)		MEDIA (DS) (mín.-máx.)	MEDIA (DS) (mín.-máx.)	MEDIA (DS) (mín.-máx.)	MEDIA (DS) (mín.-máx.)	
<b>ALCOHOLS</b>								
Isopropyl alcohol	nd	nd		0,41 (0,32) <sup>a</sup>	0,24 (0,47) <sup>a</sup>	0,18 (0,43) <sup>a</sup>	0,14 (0,23) <sup>a</sup>	ns
	nd	nd		nd-0,71	nd-1,22	nd-1,37	nd-0,58	
Ethanol	7,32 (7,12) <sup>a</sup>	19,41 (17,55) <sup>a</sup>	ns	21,89 (15,63) <sup>ab</sup>	12,85 (5,47) <sup>a</sup>	21,11 (18,64) <sup>ab</sup>	33,23 (10,01) <sup>b</sup>	3,50*
	nd-19,63	9,18-39,68		0,53-36,53	5,28-19,88	1,05-41,66	21,9-49,51	
2-Butanol	0,13 (0,42) <sup>a</sup>	nd (nd) <sup>a</sup>	ns	0,51 (0,49) <sup>a</sup>	1,4 (0,78) <sup>b</sup>	0,64 (0,66) <sup>a</sup>	0,87 (0,38) <sup>ab</sup>	3,25*
	nd-1,33	nd		nd-1,32	nd-2,48	nd-2,12	nd-1,32	
3-Buten-2-ol,2-methyl-	1,13 (0,75) <sup>a</sup>	2,26 (2,37) <sup>a</sup>	ns	3,15 (1,11) <sup>a</sup>	4,99 (1,79) <sup>a</sup>	4,45 (3,51) <sup>a</sup>	5,81 (2,45) <sup>a</sup>	ns
	nd-2,34	nd-4,73		1,91-4,54	1,87-7	nd-12,82	3-10,27	
1-Propanol,2-methyl-	0,21 (0,45) <sup>a</sup>	4,82 (8,35) <sup>a</sup>	ns	1,76 (1,23) <sup>a</sup>	1,88 (1,91) <sup>a</sup>	5,74 (6,43) <sup>b</sup>	2,78 (1,43) <sup>ab</sup>	ns
	nd-1,16	nd-14,47		nd-3,17	nd-5,96	nd-14,08	nd-4,64	
1-Butanol	0,61 (0,98) <sup>a</sup>	0,44 (0,48) <sup>a</sup>	ns	2,47 (4,93) <sup>b</sup>	0,32 (0,60) <sup>ab</sup>	0,08 (0,14) <sup>a</sup>	nd (nd) <sup>a</sup>	ns
	nd-2,45	nd-0,95		nd-12,33	nd-1,44	nd-0,29	nd	
1-Butanol, 3-methyl-	2,19 (0,89) <sup>a</sup>	5,14 (8,91) <sup>a</sup>	ns	2,95 (1,31) <sup>a</sup>	3,62 (2,16) <sup>a</sup>	7,04 (6,60) <sup>a</sup>	4,09 (1,91) <sup>a</sup>	ns
	0,71-3,85	nd-15,44		1,16-4,43	2,01-7,98	0,88-16,99	1,64-7,76	
3-Buten-1-ol, 3-methyl-	1,35 (0,62) <sup>a</sup>	1,52 (1,07) <sup>a</sup>	ns	4,46 (4,11) <sup>ab</sup>	4,77 (1,68) <sup>b</sup>	2,55 (1,32) <sup>a</sup>	3,53 (1,54) <sup>ab</sup>	ns
	0,59-2,23	0,40-2,53		1,31-10,45	2,16-7,42	1,13-5,36	1,65-6,25	
2-Buten-1-ol, 2-methyl-	0,56 (0,21) <sup>a</sup>	0,95 (0,67) <sup>a</sup>	ns	2,97 (3,21) <sup>ab</sup>	3,18 (1,53) <sup>b</sup>	1,34 (0,89) <sup>a</sup>	2,30 (1,15) <sup>ab</sup>	ns
	0,23-0,82	0,20-1,50		0,32-7,48	0,98-4,92	0,27-3,04	1,09-4,52	

1-Hexanol	0,04 (0,07) <sup>a</sup> nd-0,17	0,06 (0,07) <sup>a</sup> nd-0,19	ns	0,05 (0,13) <sup>a</sup> nd-0,33	0,12 (0,22) <sup>a</sup> nd-0,51	0,03 (0,06) <sup>a</sup> nd-0,17	0,01 (0,04) <sup>a</sup> nd-0,14	ns
3-Hexen-1-ol	nd (0,01) <sup>a</sup> nd-0,34	nd (nd) <sup>a</sup> nd	ns	0,45 (0,71) <sup>b</sup> nd-1,52	0,13 (0,24) <sup>ab</sup> nd-0,56	0,01 (0,03) <sup>a</sup> nd-0,09	0,01 (0,02) <sup>a</sup> nd-0,08	3,08*
<b>ALDEHYDES</b>								
2-Butenal,2-methyl-	nd nd	nd nd		0,6 (0,75) <sup>ab</sup> nd-1,81	1,14 (0,67) <sup>b</sup> nd-2,01	0,25 (0,32) <sup>a</sup> nd-0,69	0,26 (0,55) <sup>a</sup> nd-1,42	4,73**
2-Butenal,3-methyl-	0,14 (0,18) <sup>a</sup> nd-0,43	0,38 (0,34) <sup>a</sup> nd-0,65	ns	0,78 (0,78) <sup>a</sup> nd-1,82	0,89 (0,55) <sup>a</sup> nd-1,63	0,46 (0,48) <sup>a</sup> nd-1,44	0,60 (0,65) <sup>a</sup> nd-1,81	ns
Nonanal	1,10 (0,23) <sup>a</sup> 0,73-1,42	0,92 (0,29) <sup>a</sup> 0,71-1,26	ns	0,87 (0,48) <sup>a</sup> nd-1,35	1,06 (1,03) <sup>a</sup> nd-2,54	1,18 (1,11) <sup>a</sup> nd-2,87	0,53 (0,53) <sup>a</sup> nd-1,44	ns
Benzaldehyde	nd nd	nd nd		1,63 (1,84) <sup>a</sup> nd-4,81	0,82 (0,90) <sup>a</sup> nd-1,94	0,52 (0,85) <sup>a</sup> nd-2,05	1,21 (1,69) <sup>a</sup> nd-4,62	ns
Lilac aldehyde A	7,00 (3,42) <sup>a</sup> 1,10-10,94	4,71 (2,41) <sup>a</sup> 1,92-6,18	ns	nd nd	nd nd	nd nd	nd nd	
Lilac aldehyde B	6,52 (3,40) <sup>a</sup> 0,80-10,82	4,42 (2,42) <sup>a</sup> 1,68-6,26	ns	nd nd	nd nd	nd nd	nd nd	
Lilac aldehyde C	5,23 (2,71) <sup>a</sup> 0,59-8,64	3,64 (2,01) <sup>a</sup> 1,35-5,13	ns	nd nd	nd nd	nd nd	nd nd	
Lilac aldehyde D	3,47 (2,38) <sup>a</sup> 0,03-6,12	1,55 (1,74) <sup>a</sup> 0,07-3,47	ns	nd nd	nd nd	nd nd	nd nd	
<b>KETONES</b>								
Ethyl acetate	1,79 (1,10) <sup>a</sup> nd-2,96	3,63 (3,83) <sup>a</sup> 1,03-8,04	ns	1,03 (0,96) <sup>a</sup> nd-2,25	2,21 (2,49) <sup>a</sup> nd-7,37	5,63 (5,28) <sup>b</sup> 0,8-13,08	2,62 (1,11) <sup>a</sup> 0,91-4,77	3,17*
2,3-Butanedione	3,28 (1,68) <sup>a</sup> nd-6,49	1,91 (1,22) <sup>a</sup> 0,50-2,69	ns	1,62 (0,58) <sup>ab</sup> 0,95-2,35	2,42 (1,57) <sup>b</sup> nd-3,94	1,15 (1,02) <sup>a</sup> nd-2,98	1,35 (0,79) <sup>a</sup> nd-2,73	ns
3-Hepten-2-one	2,5 (0,53) <sup>b</sup> 1,54-3,37	1,39 (1,02) <sup>a</sup> 0,26-2,25	6,76*	nd (nd) <sup>a</sup> nd	0,17 (0,32) <sup>a</sup> nd-0,72	0,10 (0,22) <sup>a</sup> nd-0,6	nd (nd) <sup>a</sup> nd	ns
5-Hepten-2-one, 6-methyl-	0,33 (0,20) <sup>a</sup> nd-0,68	0,39 (0,37) <sup>a</sup> nd-0,06	ns	0,55 (0,49) <sup>a</sup> nd-1,19	0,70 (0,53) <sup>a</sup> nd-1,56	0,45 (0,34) <sup>a</sup> nd-1,01	0,39 (0,28) <sup>a</sup> nd-0,91	ns
<b>FURANES</b>								
2-Furanmethanol	nd nd	nd nd		nd (nd) <sup>a</sup> nd	0,07 (0,19) <sup>a</sup> nd-0,54	0,04 (0,10) <sup>a</sup> nd-0,32	0,04 (0,12) <sup>a</sup> nd-0,4	ns

Furfural	2,07 (1,42) <sup>a</sup> nd-4,03	1,84 (1,81) <sup>a</sup> nd-3,61	ns	2,43 (0,60) <sup>a</sup> 1,64-3,06	1,62 (1,47) <sup>a</sup> nd-4,25	1,60 (1,92) <sup>a</sup> nd-6,09	1,14 (1,49) <sup>a</sup> nd-4,19	ns
<b>SULFUR COMPOUNDS</b>								
Disulfide,dimethyl	nd nd	nd nd		0,26 (0,41) <sup>a</sup> nd-0,85	0,80 (1,48) <sup>a</sup> nd-3,51	0,40 (0,51) <sup>a</sup> nd-1,24	0,79 (1,67) <sup>a</sup> nd-4,48	ns
<b>TERPENES</b>								
Limonene	0,46 (0,58) <sup>a</sup> nd-1,61	1,21 (0,67) <sup>a</sup> 0,44-1,65	ns	nd (nd) <sup>a</sup> nd	0,51 (0,58) <sup>b</sup> nd-1,49	nd (nd) <sup>a</sup> nd	nd (nd) <sup>a</sup> nd	6,70**
<b>NITROGEN COMPOUNDS</b>								
3-Butenenitrile	0,37 (0,66) <sup>a</sup> nd--1,63	0,94 (0,89) <sup>a</sup> nd-1,78	ns	nd (nd) <sup>a</sup> nd	0,30 (0,55) <sup>a</sup> nd-1,32	4,12 (7,68) <sup>a</sup> nd-20,04	2,56 (2,44) <sup>a</sup> nd-7	ns

### IV.3. Análisis de componentes principales

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) con la finalidad de apreciar el efecto de la variedad de la miel y de la procedencia (dentro de cada variedad), considerando la totalidad de compuestos de la fracción volátil. La figura 5 muestra la primera y segunda componente del correspondiente biplot: en color azul los “scores” (muestras de miel) y en color rojo los “loading” (compuestos volátiles). La primera componente (PC1) explica el 30% de la variabilidad total mientras que la segunda componente (PC2) explica el 20%.

La proximidad entre muestras indica similitud entre ellas y la proximidad entre variables (compuestos volátiles) revela correlación entre ellos y similar comportamiento. En la figura se observa que la PC1 diferencia claramente ambas variedades de miel, situándose todas las muestras de azahar en el cuadrante izquierdo y todas las de romero, en el derecho. No se observa agrupación por procedencia para ninguna de las dos variedades de miel.

Los compuestos que más influyen en la diferenciación de la miel de azahar son el grupo de los cuatro Lilac aldehydes, el 3-Hepten-2-one y el 2-Furanmethanol. En el caso de la miel de romero, se observa la participación de los alcoholes en su diferenciación, con una especial abundancia en esta variedad en comparación con la de azahar.

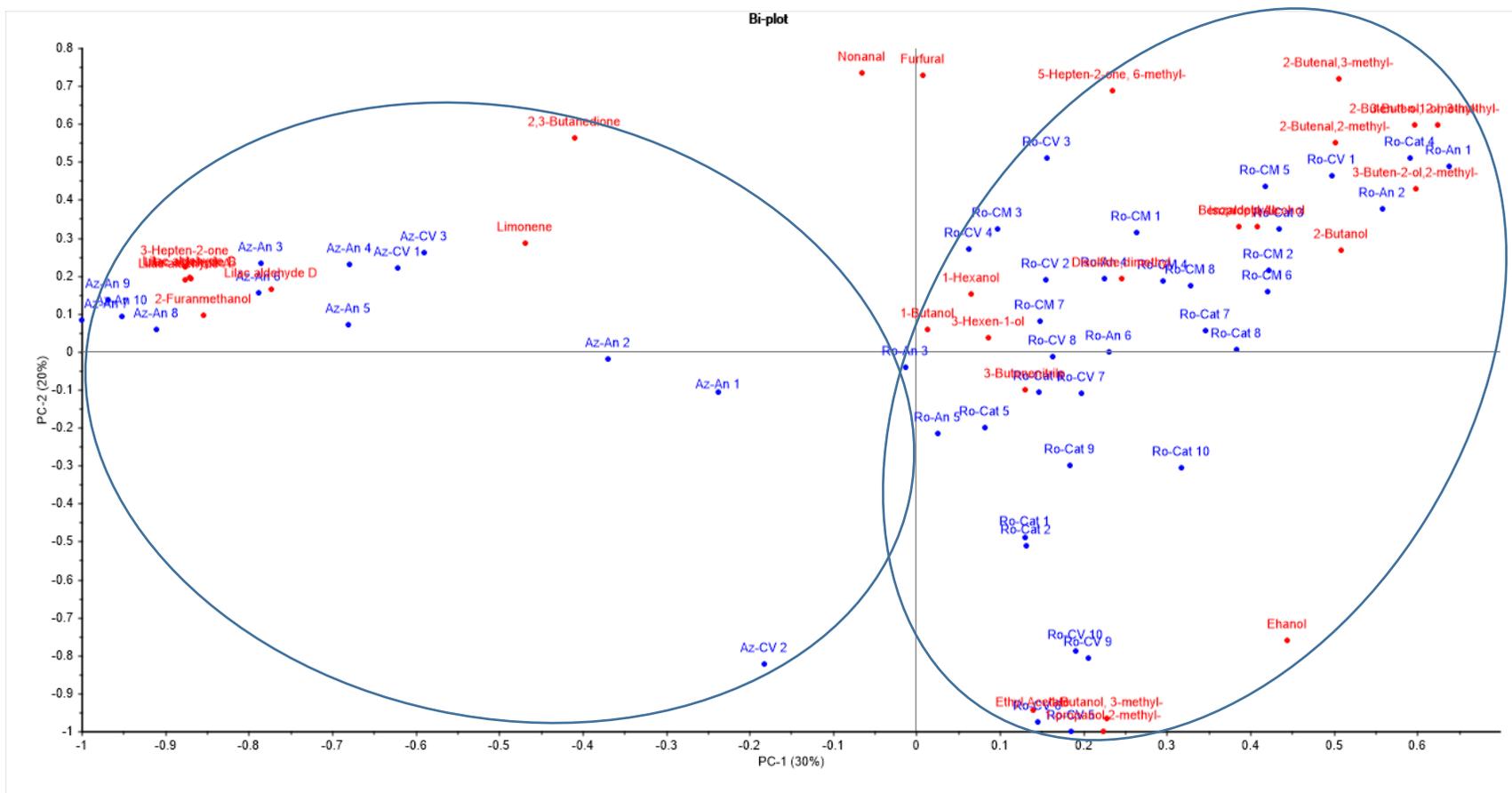


Figura 5. Análisis de componentes principales de las 25 muestras de miel analizadas. Eje PC1: primera componente, eje PC2: segunda componente. Variedades: Az=azahar, Ro=romero. Procedencia: An=Andalucía, Cat=Cataluña, CV=Comunidad Valenciana, CM=Castilla-La Mancha

## V.CONCLUSIONES

En la fracción volátil de las mieles de azahar y romero, analizadas mediante Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS), se han identificado 28 compuestos mayoritarios, pertenecientes a 8 familias químicas: 11 alcoholes, 8 aldehídos, 4 cetonas, 2 furanos, 1 compuesto azufrado, 1 terpeno y 1 compuesto nitrogenado. De todos ellos 17 mostraron diferencias significativas entre ambas variedades de miel.

El grupo de los Lilac aldehydes (A, B, C y D) se ha identificado únicamente en las muestras de azahar, destacando en esta variedad por su abundancia ya que solo estos cuatros compuestos representan más del 20% del total de la fracción volátil de la miel de azahar.

En las mieles de romero se han identificado cuatro compuestos (Isopropyl alcohol; 2-Butenal,2-methyl-; Benzaldehyde; Disulfide,dimethyl) que no estaban en las muestras de azahar. Estos compuestos en conjunto representan menos del 3% del total de su fracción volátil.

La miel de romero destaca por el elevado peso de la familia de los alcoholes, que suponen más del 43% del total frente al 18% de la miel de azahar. El más importante de ellos es el Ethanol, ya que él solo representa el 23% de la fracción volátil total de esta variedad.

Un análisis multivariante de Componentes Principales (PCA) realizado para evaluar el efecto global de la totalidad de compuestos de la fracción volátil ha mostrado diferencias evidentes entre las dos variedades de miel estudiadas.

En definitiva, este trabajo pone en evidencia la importancia de la información que proporciona la fracción volátiles de las mieles como una herramienta útil para su clasificación monofloral según el origen botánico.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

- ALISSANDRAKIS, E.; DAFERERA, D.; TARNTILIS, P.A.; POLISSIOU, M.; HARIZANIS, P.C. (2003). Ultrasound assisted extraction of volatile compounds from citrus flowers and citrus honey. *Food Chemistry*, 82, 575-582.
- ALISSANDRAKIS, E.; TARANTILIS, P.A.; HARIZANIS, P.C.; POLISSIOU, M. (2007). Aroma investigation of unifloral Greek citrus honey using solid-phase microextraction coupled to gas chromatographic mass spectrometric analysis. *Food Chemistry*, 100, 396-404.
- BELITZ, H., GROSCH, W. AND SCHIEBERLE, P. (2014). *Food Chemistry*. 4th ed. Berlin: Springer-Verlag.
- B.O.E. núm. 150, pp. 63347-63353 (2018), España. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Resolución de 4 de junio de 2018, de la Dirección General de la Industria Alimentaria, por la que se publica el 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.
- DE LA CRUZ, D.; REYES, E.; DURAN, S.; SÁNCHEZ, J. (2013). Análisis palinológico de mieles comerciales monoflorales. *Botanica Complutensis*, 37, 171-180.
- 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., GONZÁLEZ, M., NAVARRO, T., IGLESIAS, M., PÉREZ, R., SANZ, M., MATÍNEZ-CASTRO, I., PUEYO, E., POLO, M., SORIA, A., SANZ, J. (2002 a). Los azúcares de la miel, en: *La Miel de Madrid*. Edita: Consejería de Economía e Innovación Tecnológica. Madrid, 95-108.
- DE LORENZO, C., GUADALIX, M., GONZÁLEZ, M., NAVARRO, T., IGLESIAS, M., PÉREZ, R., SANZ, M., MATÍNEZ-CASTRO, I., PUEYO, E., POLO, M. y SORIA, A., SANZ, J. (2002 b). Los componentes nitrogenados, en: *La Miel de Madrid*. Edita: Consejería de Economía e Innovación Tecnológica. Madrid, 109-120.
- ESCRICHE, I.; VISQUERT, M.; CAROT, J.M.; DOMENECH, E.; FITO, P. (2008). Effect of honey thermal conditions on hydroxymethylfurfural content prior to pasteurization. *Food Science and Technology International*, 14, 29.
- 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, 329- 338.
- ESCRICHE, I.; SOBRINO-GREGORIO, L.; CONCHADO, A.; JUAN-BORRÁS, M. (2017). Volatile profile in the accurate labelling of monofloral honey. The case of lavender and thyme honey. *Food Chemistry*, 226, 61-68.
- 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 and Technology*, 50, 1690-1696.

KANDAR, 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. *Wiley Online Library*.

MAPA (MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA, Y ALIMENTACIÓN), (2019). "EL SECTOR APÍCOLA EN CIFRAS: Principales Indicadores Económicos", Subdirección General de Productos Ganaderos, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. [https://www.mapa.gob.es/ganaderia/estadisticas/indicadoreseconomicossectordelamiel2018comentarios\\_tcm30-419675.pdf](https://www.mapa.gob.es/ganaderia/estadisticas/indicadoreseconomicossectordelamiel2018comentarios_tcm30-419675.pdf)

MAURICI, B.; POZZO, L.; RECANATI, G. (2016). Descripción sensorial cuantitativa de la miel de acacia. *Revista Tecnología y Ciencia*, 32, 244-249.

ORANTES, J.; GONELL, F.; TORRES, C.; GÓMEZ-PAJUELO, A. (2018). Guía de mieles monoflorales ibéricas. <https://www.pajueloapicultura.com/wp-content/uploads/2018/11/Gui%CC%81a-de-mieles-monoflorales-ibe%CC%81ricas-Apinevada-Pajuelo-2018.pdf>

PARLAMENTO EUROPEO, 2018. El mercado de la miel en Europa (infografía). <https://www.europarl.europa.eu/news/es/headlines/economy/20180222STO98435/el-mercado-de-la-miel-en-europa-infografia>

PAPOTTI, G.; BEERTELLI-BORRÁS, D.; LOLLI, M.; SABATINI, A.G.; PLESSI, M. (2009). Contenido de antranilato de metilo en las mieles de cítricos italianos, extraído por HS-SPME-GC. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1933-1938.

PÉREZ, RA.; SANCHEZ-BRUNETE, R.; CALVO, RM.; TADEO, JL. (2002). Analysis of volatiles from Spanish honeys by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Agric Food Chem*, 50, 2633-2637.

PERSANO ODDO, L.; PIRO, R. (2004). Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie* 35(1), 38-81.

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

RADOVIC, BS.; 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.

Real Decreto 1049/2003, de 1 de agosto por el que se aprueba la Norma de calidad relativa a la miel (2003). *Boletín Oficial del Estado*, 5 de agosto de 2003, núm. 186, pp. 30181-30183.

RUÍZ ABAD, L. (2011). *Momentos Miel*. Ed. Alcandora Publicidad. Madrid. 62 pp.

SÁINZ LAÍN, C.; GÓMEZ FERRERAS, C. (1999). *Mieles Españolas*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 163 pp.

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

SERRA BONHEVI, J.; VENTURA COLL, F. (2003). Flavour index and aroma profiles of fresh and processed honeys. *Journal of the Science of food Agriculture*, 83, 275-282.

Unión Europea. Directiva 2014/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de mayo de 2014, por la que se modifica la Directiva 2001/110/CE relativa a la miel. *Diario Oficial de la Unión Europea* L 164, 3 de junio de 2014, pp. 1-5.

VERZERA, A.; CAMPISI, S.; ZAPPALÁ, M.; BONACCORSI, I. (2001). SPME-GC-MS analysis of honey volatile components for the characterization of different floral origin. *American laboratory News*, 18-21.

## VII.ANEXOS

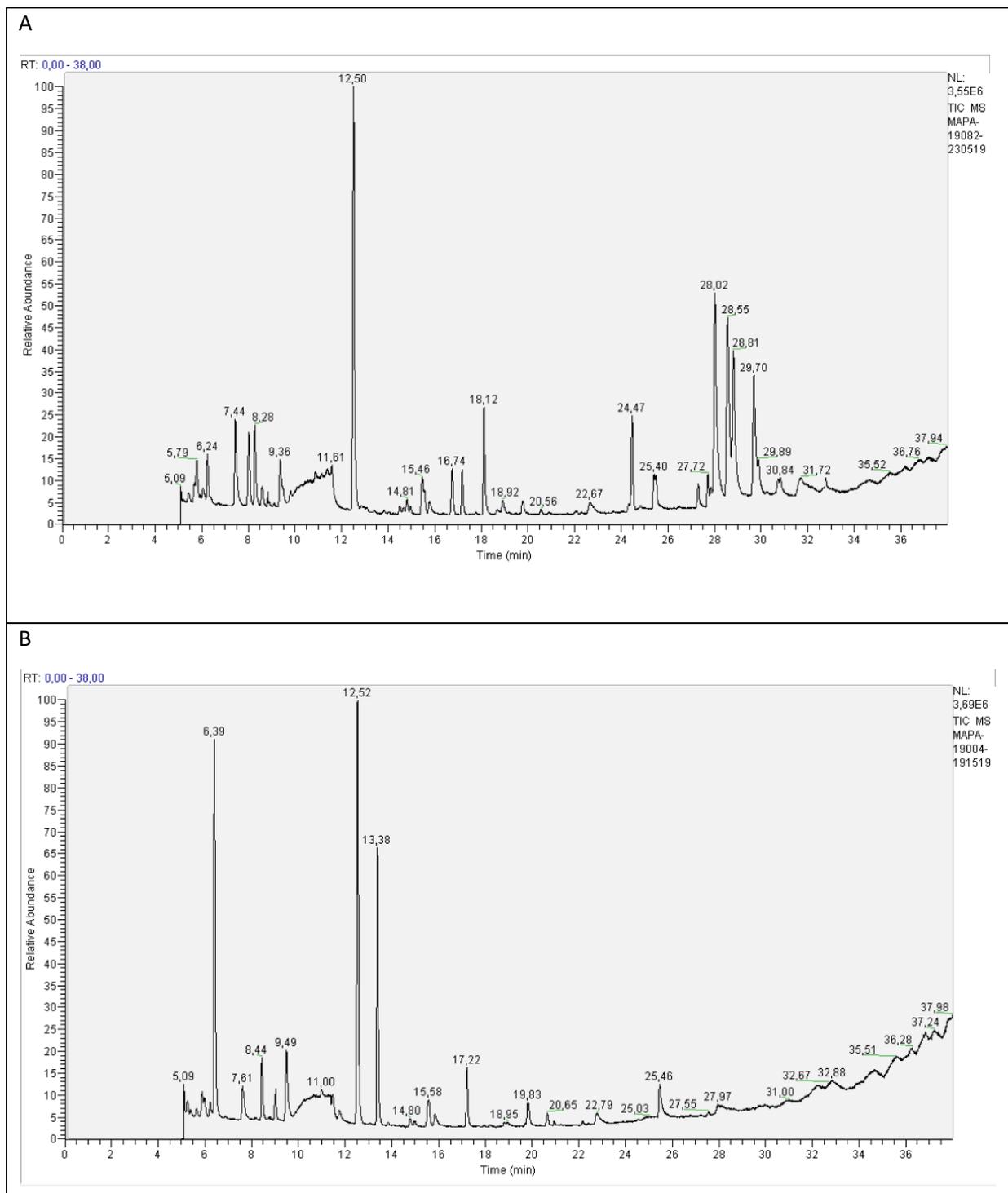


Figura 1. Ejemplo de cromatogramas de la fracción volátil de miel de azahar (A) y miel de romero (B) obtenidos en este estudio mediante el método GC-MS.