

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL DE MIELES ESPAÑOLAS APLICANDO MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE
LA SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

ALUMNO/A: GLORIA MUNERA CABAÑERO

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

Curso Académico 2020-2021

VALENCIA, Septiembre 2021

ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL DE MIELES ESPAÑOLAS APLICANDO MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Munera Cabañero, Gloria; Juan Borrás, Marisol; Escriche Roberto, Isabel¹

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo se ha centrado en analizar la fracción volátil de mieles monoflorales españolas con la finalidad de evaluar su efectividad como técnica objetiva diferenciadora de la monofloralidad de una miel. Para ello, por su elevada sensibilidad y reproducibilidad, se ha utilizado la microextracción en fase sólida (SPME) acoplada a cromatografía de gases y espectrofotometría de masas (GC-MS). Las mieles fueron recolectadas en la campaña del 2020 en diferentes puntos de la geografía española y presentan diferente origen botánico. Se analizaron las 5 variedades de las que se disponía un número representativo de muestras (romero, azahar, roble, bosque, y encina). En ellas se identificaron más de 100 compuestos volátiles, de los cuales solo 21 no mostraron diferencias estadísticamente significativas. De los restantes 84 compuestos, el 70.24% de ellos mostraron una diferenciación significativa al mayor nivel de confianza (99.9%). Algunos de estos compuestos se han podido asociar a variedades específicas de miel, como es el caso del camphor a la de romero; los lilacs A, B, C y D, difumaric acid y methyl anthranilate a la de azahar; o el 2-methyl-1-propanol a la de bosque. En el caso de las mieles de mielada (roble, bosque, y encina) destacan por su abundancia ciertos compuestos como acetoin I y el 2,3-butanediol (I y II). En definitiva, del estudio realizado se concluye que la información que proporciona la fracción volátil puede ser útil para la diferenciación de las mieles atendiendo a su monofloralidad y que, por lo tanto, se podría proponer como técnica objetiva para ayudar a su correcta clasificación.

PALABRAS CLAVE: compuestos volátiles, miel monofloral, microextracción-fase-sólida (SPME), cromatografía gases, espectrofotometría masas.

RESUM

L'objectiu del present treball s'ha centrat en analitzar la fracció volàtil de mels monoflorales espanyoles amb la finalitat d'avaluar la seua efectivitat com a tècnica objectiva diferenciadora de la monofloralitat d'una mel. Per a això, per la seua elevada sensibilitat i reproducibilitat, s'ha utilitzat la microextracció en fase sòlida (SPME) acoblada a cromatografia de gasos i espectrofotometria de masses (GC-MS). Les mels van ser recol·lectades en

¹Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IUIAD), Departamento de Tecnología de Alimentos (DTAL), Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera 14, 46022 Valencia, España.

la campanya del 2020 en diferents punts de la geografia espanyola i presenten diferent origen botànic. Es van analitzar les 5 varietats de què es disposava un número representatiu de mostres (romer, tarongina, roure, bosc, i alzina) . En elles es van identificar més de 100 compostos volàtils, dels quals només 21 no van mostrar diferències estadísticament significatives. Dels restants 84 compostos, el 70.24% d'ells van mostrar una diferenciació significativa al major nivell de confiança (99.9%). Alguns d'estos compostos s'han pogut associar a varietats específiques de mel, com és el cas del camphor a la de romer; els lilacs A, B, C i D, difumaric acid i methyl anthranilate a la de tarongina; o el 2-methyl-1-propanol a la de bosc. En el cas de les mels de mielada (roure, bosc, i alzina) destaquen per la seua abundància certs compostos com acetoin I i el 2,3-butanediol (I i II). En definitiva, de l'estudi realitzat es conclou que la informació que proporciona la fracció volàtil pot ser útil per a la diferenciació de les mels atenent a la seua monofloralitat i que, per tant, es podria proposar com a tècnica objectiva per a ajudar a la seua correcta classificació.

PARAULES CLAU: compostos volàtils, mel monofloral, microextracció-fase-sòlida (SPME), cromatografia gasos, espectrofotometria masses.

ABSTRACT

The objective of this work has focused on analyzing the volatile fraction of Spanish monofloral honeys in order to evaluate its effectiveness as an objective technique differentiating the monoflorality of a honey. For this, due to its high sensitivity and reproducibility, solid phase microextraction (SPME) coupled to gas chromatography and mass spectrophotometry (GC-MS) has been used. The honeys were collected in the 2020 campaign in different parts of the Spanish geography and have different botanical origin. The 5 varieties of which a representative number of samples were available (rosemary, orange blossom, oak, forest, and holm oak) were analyzed. In them, more than 100 volatile compounds were identified, of which only 21 did not show statistically significant differences. Of the remaining 84 compounds, 70.24% of them showed a significant differentiation at the highest level of confidence (99.9%). Some of these compounds have been associated with specific varieties of honey such as camphor in rosemary; the lilacs A, B, C and D, difumaric acid and methyl anthranilate in orange blossom; or the 2-methyl-1-propanol in forest. In the case of honeydew honeys (oak, forest, and holm oak), certain compounds such as acetoin I and 2,3-butanediol (I and II) stand out for their abundance. In short, the study carried out concludes that the information provided by the volatile fraction can be useful for the differentiation of honeys according to their monoflorality and that, therefore, it could be proposed as an objective technique to help their correct classification.

KEY WORDS: volatile compounds, monofloral honey, solid-phase-microextraction (SPME), gas chromatography, mass spectrophotometry.

INTRODUCCIÓN

La miel es una sustancia dulce natural producida por la abeja *Apis mellifera* (RD 1049/2003; Codex Stan 12-1981). Su clasificación botánica está basada en su contenido en polen, estableciéndose que la miel monofloral es aquella que contiene un porcentaje de polen dominante mayor al 45% de una especie botánica, y que la multifloral es la que no contiene ningún tipo de polen que predomine frente a los demás (Guadalix et al., 2002; Córdova et al., 2013).

La calidad de este alimento y la inexistencia de fraude es de vital importancia para el sector, la administración y los consumidores. Se debe realizar un control del producto ya que en la miel pueden producirse adulteraciones, generalmente añadiendo soluciones de glucosa o siropes, para conseguir abaratar costes y obtener mayor beneficio (Santander et al., 2014; Rico y Cáceres, 2017; Pintor y Gianni, 2018). Además, la legislación establece que en el etiquetado se debe indicar la procedencia geográfica de la miel, aunque en realidad esta información sigue siendo algo ambigua para el consumidor (RD 1049/2003).

Las diferentes propiedades fisicoquímicas y las características organolépticas de la miel se relacionan directamente con su origen botánico. La fracción volátil actúa como “huella dactilar” para la miel. Aunque todas las mieles tienen compuestos aromáticos comunes, los diferentes néctares libados por las abejas (procedentes de distintas especies botánicas) les confieren la presencia de ciertos compuestos característicos (Bogdanov et al., 2004; Periche, 2011; Kadar et al., 2011; Santander et al., 2014). Estos compuestos pueden llegar a ser marcadores de algunas mieles monoflorales, como es el caso del metil antranilato en la miel de cítrico (Juan-Borrás, 2016).

Así pues, el perfil aromático de las mieles está relacionado tanto con la calidad organoléptica, como con la autenticidad del producto y, por lo tanto, puede ser útil para determinar el tipo de miel monofloral de la que se trata (Santander et al., 2014; Wang et al., 2019).

La industria alimentaria está interesada por conocer nuevas técnicas y métodos que sean capaces de caracterizar fácilmente las mieles según su origen botánico (Soria et al., 2009; Moujanni et al., 2018). En este sentido, la miel monofloral presenta especial interés por su mayor valor comercial. Los consumidores están dispuestos a pagar un precio mayor por ella tanto por sus distintivas características organolépticas, como por sus atribuidas propiedades medicinales (Guadalix et al., 2002; Santander et al., 2014; Wang et al., 2019). Además, su precio es más elevado porque el apicultor debe realizar un mayor esfuerzo en su obtención para que la monofloralidad se mantenga.

Los métodos utilizados tradicionalmente para la diferenciación de las mieles atendiendo a su monofloralidad se basan fundamentalmente en la cuantificación del contenido polínico (análisis melisopolinológico), las propiedades fisicoquímicas, y el análisis sensorial. Sin embargo, la determinación del polen requiere personal muy especializado y es un método que puede presentar problemas si el contenido polínico está infrarrepresentado (Kadar et al., 2011; Juan-Borrás et al., 2015; Párraga, 2018). En el caso del análisis sensorial, se debe disponer de un panel de

expertos que sea capaz de detectar todos los aromas de la miel, siendo una opinión subjetiva (Rojas, 2020).

En la actualidad, se están investigando ampliamente otras técnicas que puedan sustituir o complementar la información que vienen proporcionando los métodos tradicionales, entre las que destaca el análisis de la fracción volátil. En este sentido, la extracción de la fracción volátil mediante microextracción en fase sólida (SPME) seguida de su análisis por cromatografía de gases con espectrómetro de masas (GC-MS) es uno de los procedimientos más consolidados (Piasenzotto et al., 2003; Dekebo et al., 2018; Wang et al., 2019). La efectividad y la mínima preparación de la muestra que requiere el SPME (Revell et al., 2014), así como la selectividad y sensibilidad del GC-MS, hacen de esta combinación un procedimiento idóneo (Soria et al., 2009; Dekebo et al., 2018).

El objetivo del presente trabajo ha sido analizar la fracción volátil de mieles monoflorales españolas mediante microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía de gases y espectrofotometría de masas (SPME-GC-MS) con la finalidad de evaluar su efectividad como técnica objetiva diferenciadora de su monofloralidad. El presente trabajo se ha realizado como parte de un estudio que se está desarrollando para la caracterización de las principales mieles monoflorales españolas, entre el MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) 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 del IIAD de la UPV “LABMIEL”).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de miel

En este estudio se analizaron 42 muestras crudas de miel de la campaña del 2020 procedentes de diferentes puntos de la geografía española y de 9 orígenes botánicos, según información proporcionada por el apicultor en el momento de la recogida de las muestras por el MAPA. Posteriormente, éstas eran enviadas a LABMIEL para su análisis. En la tabla 1 de Anexos se especifica la información de la variedad y el origen de las muestras analizadas.

Extracción de los compuestos volátiles

Para la extracción de la fracción volátil de la muestra, se pesaron 8 g de miel en viales de vidrio y se añadió 1 g de perlas de vidrio para controlar la ebullición en la muestra y facilitar la homogeneización. A continuación, se adicionaron 2 mL de una disolución de cloruro sódico saturada y 1 mL de agua bidestilada. Se agitaron durante aproximadamente 1 minuto en el vórtex. Las muestras se procesaron por duplicado.

Para la extracción de los compuestos volátiles se utilizó la técnica SPME con una fibra con recubrimiento de DVB/CAR/PDMS (divinyl benzene/carboxen/polydimethylsiloxane) y un tamaño de 50/30 μm . Con una temperatura de extracción de 50°C y agitación constante de 250 rpm durante

3 minutos. Para conseguir la desorción de los compuestos volátiles de la fibra, y ser transferidos a la columna del GC, se utilizó una temperatura en el inyector, en modo splitless, de 250°C durante 3 minutos.

Análisis GC-MS

La separación e identificación de los compuestos volátiles se realizó en un cromatógrafo de gases (Intuvo 9000 GC) acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent 7000D GC/TQ). La columna utilizada fue una DB WAX (30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interior, 0,25 μm de espesor de película). El gas portador utilizado fue helio con un caudal de flujo constante de 1 mL min^{-1} . La rampa de temperatura utilizada en el horno fue: de 35°C con un tiempo de espera de 3 minutos, aumentando 5°C min^{-1} hasta 215°C, y, por último, aumentando 30°C min^{-1} hasta alcanzar 250°C. La detección de masas se realizó mediante la ionización por impacto a 70 eV con un rango de masas de m/z 40-280.

La identificación de cada compuesto se realizó comparando sus espectros de masas con la base de datos proporcionada por la librería del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología 2002 (NIST) (siempre considerando un factor de coincidencia (Match Factor) $\geq 80\%$), así como los índices de retención de Kovats y los datos publicados en la literatura ([Shimoda et al., 1996](#); [Bianchi et al., 2007](#); [Goodner, 2008](#)). Los índices de Kovats de todos los compuestos se obtuvieron inyectando una mezcla de una serie homogénea de alcanos (C8-C20, Fluka Buchs, Schwiez, Suiza) en las mismas condiciones cromatográficas descritas anteriormente para las muestras. Para estimar la abundancia de cada compuesto, se consideró el área del pico base (Base Peak Deconvoluted Area) (valor promedio para dos repeticiones) ([Verzera et al. 2014](#)).

Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de un factor para todas las variables (compuestos volátiles) con la finalidad de evaluar la existencia de diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre monofloralidad utilizando el programa Statgraphics Centurion XIX. Asimismo, con la finalidad de evaluar el efecto conjunto de todas las variables sobre la monofloralidad, se llevó a cabo un Análisis de Componentes Principales (PCA) con el programa XLSTAT (2021).

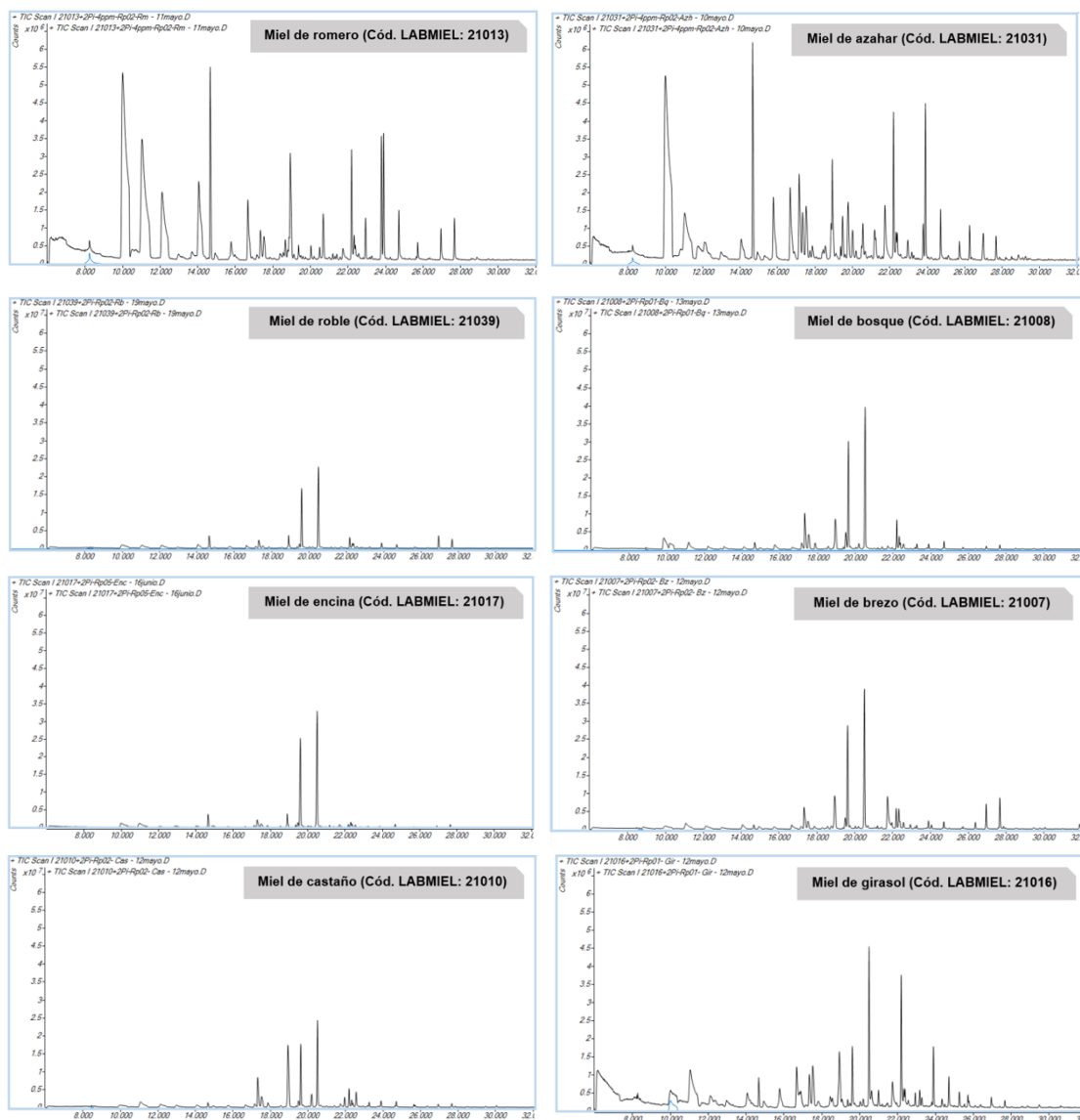
El análisis estadístico se realizó para las variedades de romero, azahar, roble, bosque y encina ya que para las restantes (brezo, castaño, girasol y cantueso), el número de muestras de miel fue muy escaso para ser estadísticamente significativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de compuestos significativos de la fracción volátil de las mieles

En las muestras estudiadas, se han identificado más de 100 compuestos volátiles (relacionados en la tabla 2 de Anexos) tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos. No se tuvieron en cuenta aquellos picos que por su tamaño de área y resolución se consideraron ruido del sistema.

La figura 1 muestra, como ejemplo, distintos cromatogramas (SPME-GC-MS) de la fracción volátil de los diferentes tipos de miel (romero, azahar, roble, bosque, encina, brezo, castaño, girasol y cantueso) estudiados. Se puede observar, a simple vista, que el perfil volátil varía con el tipo de miel y que, por lo tanto, existen claros indicios de que la información que proporcionan los distintos compuestos que constituyen dicha fracción podría ser útil para la diferenciación de tipos de miel.



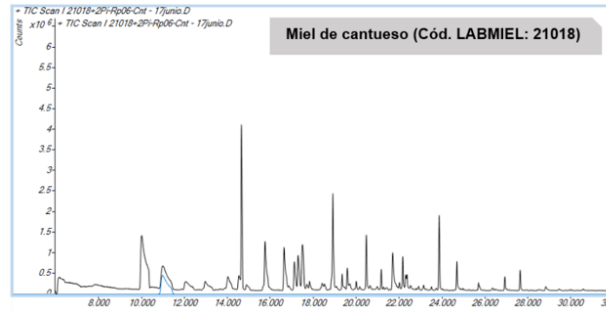


FIGURA 1. Ejemplos de cromatogramas de la fracción volátil de las mieles monoflorales estudiadas.

El estudio de los diferentes perfiles volátiles puso de manifiesto que algunas de las muestras (21015, 21027 y 21030) podrían estar mal catalogadas según la información proporcionada por el apicultor. Este hecho fue corroborado con los datos de los parámetros fisicoquímicos obtenidos en un trabajo que se realizó en paralelo sobre las mismas mieles empleadas en el estudio de [Marta \(2021\)](#). Por ejemplo, la figura 2 muestra los cromatogramas de dos muestras etiquetadas en recepción de LABMIEL como miel de azahar, 21031 y 21030. Mientras que la primera presenta un perfil típico de la miel de azahar, la segunda no. Es por ello que algunas de las muestras se desecharon en el estudio estadístico.

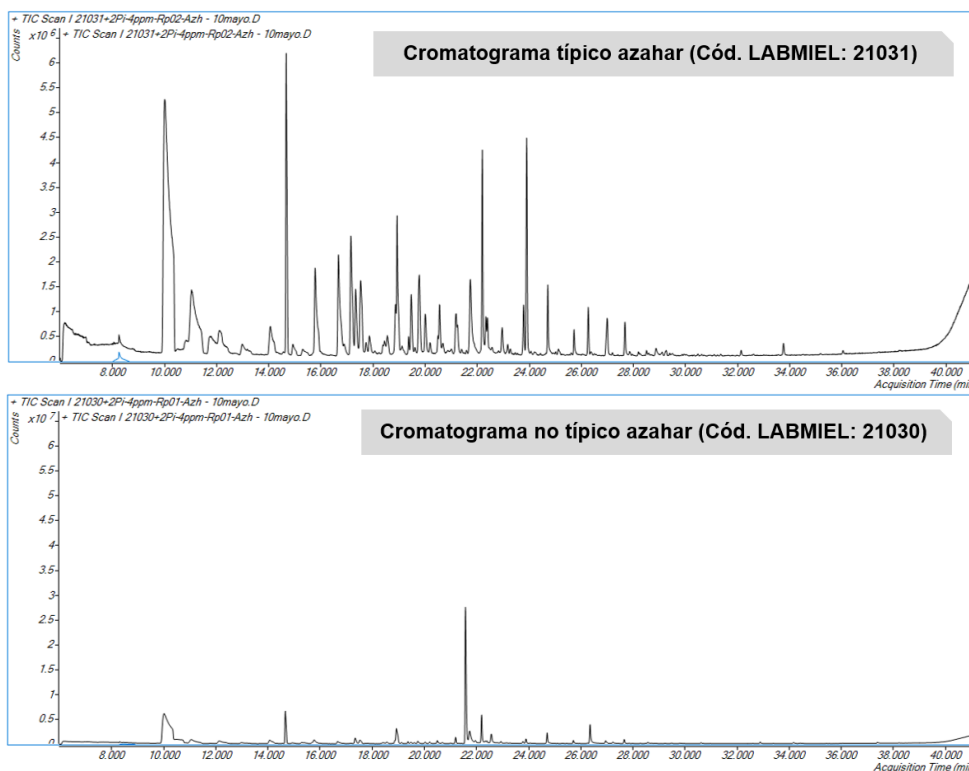


FIGURA 2. Ejemplo de cromatogramas de la fracción volátil de dos muestras etiquetadas en la recepción de LABMIEL como miel de azahar: 21031 (Presenta cromatograma típico de miel azahar) y 21030 (No presenta cromatograma típico de miel azahar).

Diferenciación de mieles en base a su fracción volátil

La información de los compuestos identificados en cada tipo de miel (valores medios, desviaciones estándar, valores mínimos y máximos), así como el resultado del ANOVA obtenido para cada compuesto para el factor variedad se detalla en la tabla 2 de Anexos. Únicamente 21 compuestos no mostraron diferencias significativas entre tipos de miel. De los restantes 84 obtenidos como significativos, 12 lo fueron con un nivel de confianza del 95%, 13 al 99% y 59 al 99.9%. Por tanto, de los 84 compuestos, el 70.24% de ellos mostraron una diferenciación significativa al mayor nivel de confianza (99.9%).

Atendiendo al valor de la razón-F, (cuanto mayor es, más importante es el efecto de dicho compuesto), se observa que hay determinados compuestos que contribuyen de manera importante en la diferenciación de variedades. Valores especialmente altos (aprox 85) se han obtenido para la butyrolactone y el 2,3 butanediol. Sin embargo, hay que destacar por su importancia aquellos compuestos que se han identificado en variedades específicas (o son mucho más abundantes en algunas) como es el caso del camphor, (en romero) tal y como reportó [Soria et al. \(2005\)](#) y de los lilacs aldehyde A, B, C y D, difumaric acid y el methyl anthranilate (en azahar), así como en [Soria et al. \(2009\)](#), [Kadar et al. \(2011\)](#) y [Escriche et al. \(2011\)](#). En el presente estudio, además se detectó un quinto lilac, pero no se consideró importante porque solo apareció esporádicamente en algunas muestras de miel de azahar.

La figura 3 muestra diagramas Box-Whisker (resultantes del análisis de ANOVA) para alguno de estos compuestos característicos de la miel de azahar. Los 4 lilacs en conjunto se consideran característicos de las mieles de azahar, aunque esporádicamente algunos aparezcan en las de romero. Esto se puede deber bien a que las plantas comparten hábitat botánico y las abejas liben en ellas indistintamente, o bien a que el apicultor no trabaje de forma adecuada y combine las zonas de cosecha.

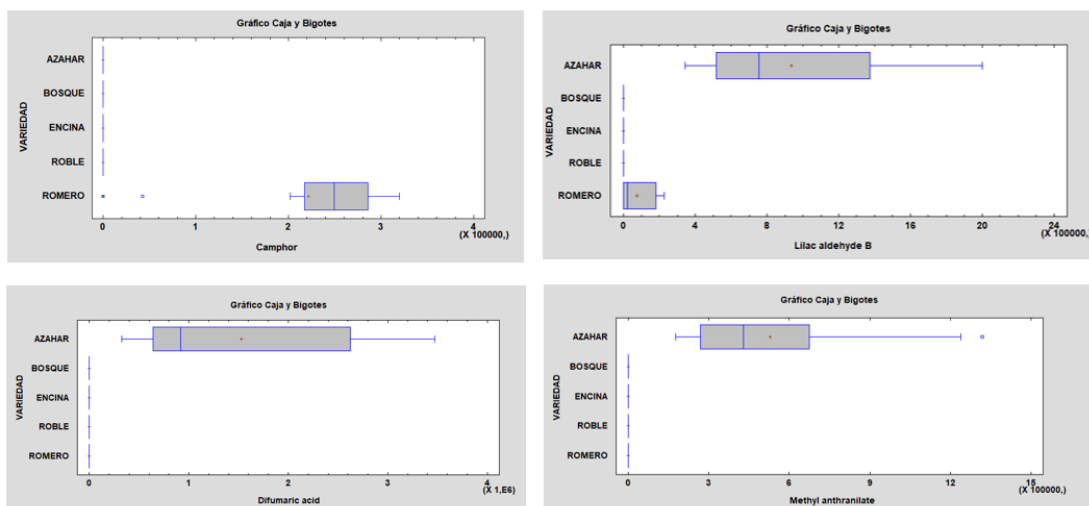


FIGURA 3. Diagramas Box-Whisker de los compuestos camphor, lilac aldehyde B, difumaric acid y methyl anthranilate.

En la miel de bosque destaca el 2-methyl-1-propanol porque solo se ha identificado en esta variedad. Otros compuestos también han sido especialmente abundantes en este tipo de miel, aunque también aparecen en las restantes mieladas, como: 5-methyl-2-furancarboxaldehyde, butyrolactone, acetophenone, p-mentha-1,5-dien-8-ol, trans-linalool 3,7-oxide, phenol, (E)-cinnamaldehyde, y butyrolactone (con elevada razón-F de 86).

Las variedades de roble, bosque y encina presentan compuestos característicos semejantes, debido a que todas ellas son mieladas, es decir, proceden de secreciones de partes vivas de plantas que las abejas liban y transforman del bosque. Principalmente, proceden de las coníferas y de los árboles forestales de cada variedad mencionada, pero contienen polen de diferentes especies botánicas, aunque una de ellas sea la más representativa (Sancho et al., 1991; Jean-Prost, 2007). En las tres variedades de mieladas aparecieron con altos valores de razón-F (53, 69 y 85 respectivamente) y en gran abundancia el acetoin I, el 2,3-butanediol I y el 2,3-butanediol II. La figura 4 muestra algunos ejemplos del diagrama Box-Whisker de estos compuestos.

Castro et al. (2006), en mieles de roble, bosque y encina encontraron compuestos derivados del furfural, tal y como se ha obtenido en este estudio (5-methyl-2-furancarboxaldehyde). Estos compuestos proceden de la degradación de los azúcares y las reacciones de Maillard. En este mismo estudio se describió el butyrolactone como un compuesto que confiere un olor a caramelo y dulce a este tipo de mieles, y el acetophenone por aportar notas frescas y florales. Soria et al. (2005) y Castro et al. (2006) también destacaron el 2,3-butanediol por su elevada concentración en estas mieles. Sin embargo, en Castro et al. (2006) se identificaron algunos compuestos, como bencenos y compuestos fenólicos, que en el presente estudio no se han encontrado.

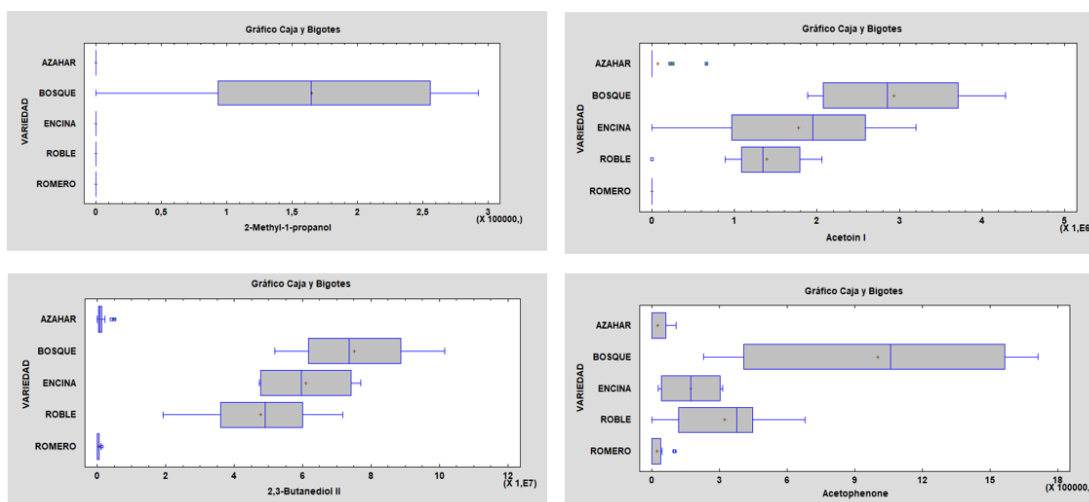


FIGURA 4. Diagramas Box-Whisker de los compuestos 2-methyl-1-propanol, acetoin I, 2,3-butanediol II y acetophenone detectados en las variedades de mielada.

El benzaldehyde apareció abundantemente en todos los tipos de mieles estudiados, aunque en niveles mucho mayores en la miel de bosque, en la

que triplicó su valor. Numerosos autores coinciden en que este compuesto es característico del aroma a miel y, por tanto, suele aparecer en todas (Castro et al., 2003; Soria et al., 2005; Castro et al., 2006).

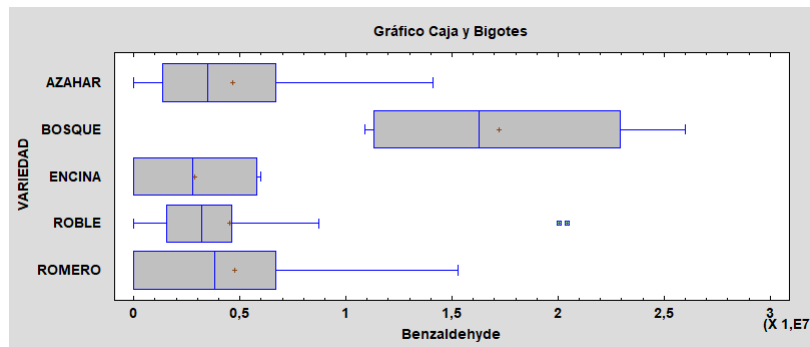


FIGURA 5. Diagramas Box-Whisker del compuesto benzaldehído.

Con la finalidad de reducir el número de variables y sintetizar la información proporcionada por todos los compuestos, se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA). De este modo, se puede describir el efecto global de los compuestos volátiles sobre el tipo de miel. La figura 6 muestra las dos primeras componentes, en ella la proximidad entre muestras indica similitud entre las mismas. En este caso, las mieles más diferenciadas son azahar, y bosque, quedando en la zona central las restantes. Los mielatos correspondientes a bosque y encina del cuadrante derecho, están mayormente asociados a la componente 1. En cambio, la miel de azahar está asociada a la componente 2, situada en el cuadrante izquierdo. Sin embargo, no existe demasiada diferenciación entre roble y romero.

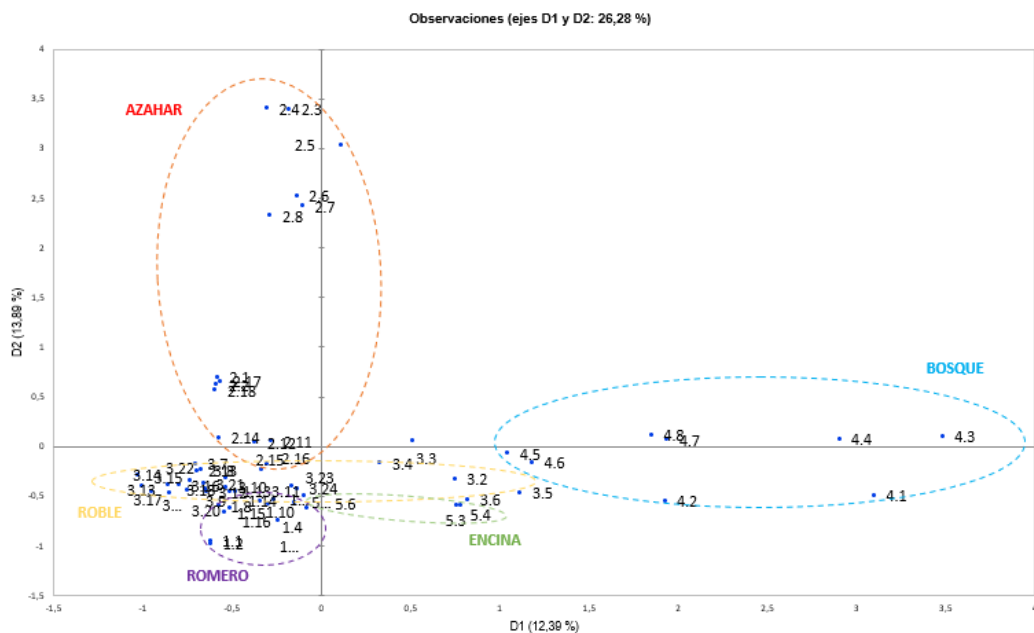


FIGURA 6. Representación gráfica del Análisis de Componentes Principales (PCA) de todas las muestras analizadas.

Los resultados de la correlación tras la rotación Varimax entre los compuestos volátiles y los dos primeros factores se recogen en la tabla 1. Los compuestos volátiles están asociados a los factores, por lo tanto, cuanto mayor es el valor, más asociación presenta con la componente correspondiente. Los valores positivos de la PC1 están asociados principalmente a la miel de bosque, mientras que los negativos a romero y roble. En cambio, los valores positivos de la PC2 están asociados a la miel de azahar, y los negativos a romero y roble.

La tabla 1 muestra que el 5-methyl-2-furancarboxaldehyde, el benzaldehyde, el 2(5H)-furanone II, el 2-methyl-1-propanol, el phenol, el acetophenone, y el butyrolactone se correlacionan mayormente con la miel de bosque. El difumaric acid, los lilacs, y el methyl anthranilate se asocian a la miel de azahar por estar situado en la zona positiva de la PC2. Algunos compuestos se correlacionan con la miel de romero y roble por estar asociados a los valores negativos, éstos son: el (2,4-ditert-butylphenyl)-5-hydroxypentanoic acid, el benzeneacetic acid ethyl ester, el 1-octanol, o el 2,3-butanediol, entre otros.

TABLA 1. Correlaciones entre los compuestos volátiles y los factores para las componentes PC1 y PC2 del Análisis de Componentes Principales (PCA).

PC1 POSITIVO		
t_R	NOMBRE DEL COMPUESTO	VALOR PCA
20.178	5-Methyl-2-furancarboxaldehyde	8.960
18.935	Benzaldehyde	8.328
24.197	2(5H)-Furanone II	7.900
08.870	2-Methyl-1-propanol	7.822
29.487	Phenol	7.777
21.952	Acetophenone	7.293
21.404	Butyrolactone	7.279
PC1 NEGATIVO		
t_R	NOMBRE DEL COMPUESTO	VALOR PCA
35.135	(2,4-ditert-butylphenyl)-5-hydroxypentanoic acid	-3.638
25.005	Benzeneacetic acid ethyl ester	-3.165
18.378	2-Ethyl-1-hexanol	-2.811
10.493	4-Methyl-2,3-dihydrofuran	-2.203
29.170	1,2-Dimethylnaphthalene	-2.148
30.279	3-Phenylpropanol	-2.093
PC2 POSITIVO		
t_R	NOMBRE DEL COMPUESTO	VALOR PCA
21.174	Difumaric acid	9.716
20.556	Lilac aldehyde D	9.287
19.778	Lilac aldehyde B	9.127
22.936	8-Methyl-tricyclo[3.3.0.0(2,8)]octan-3-one	9.106

19.470	Lilac aldehyde A	9.063
33.746	Methyl anthranilate	8.967
21.164	Propoxybenzene	8.942
20.003	Lilac aldehyde C	8.769
16.895	1,3,8-p-Menthatriene	8.455
18.813	Dill ether I	8.419
16.824	3,4-Dimethylstyrene	7.757
32.101	Lilac aldehyde E	7.725
PC2 NEGATIVO		
t_R	NOMBRE DEL COMPUESTO	VALOR PCA
20.029	1-Octanol	-3.922
20.490	2,3-Butanediol II	-3.249
19.603	2,3-Butanediol I	-3.217
18.793	Camphor	-2.903
21.404	Butyrolactone	-2.902
19.743	Linalool	-2.551
35.135	(2,4-ditert-butylphenyl)-5-hydroxypentanoic acid	-2.409
23.271	endo-Borneol	-2.399
12.974	Acetoin I	-2.390

CONCLUSIONES

El análisis de la fracción volátil de las mieles mediante SPME-GC-MS, según se ha desarrollado en el presente estudio, se puede considerar una técnica objetiva idónea para determinar su monofloralidad. Además de que la preparación de la muestra es sencilla y la extracción de los compuestos volátiles resulta repetitiva, se ha puesto de manifiesto que la información que proporciona la fracción volátil puede ser útil para diferenciar tipos de miel atendiendo a su origen botánico. El 80% de los compuestos identificados en las mieles mostraron diferencias significativas entre tipos de miel, observando que algunos de estos compuestos, se podrían asociar a determinadas variedades, como es el caso del camphor en la miel de romero; los lilacs A, B, C y D, el difumaric acid y el methyl anthranilate en la de azahar; o el 2-methyl-1-propanol en la de bosque. En las mieles de mielada (roble, bosque, y encina) han destacado por su abundancia ciertos compuestos como el acetoin I y el 2,3-butanediol (I y II).

AGRADECIMIENTOS

El presente Trabajo final de Máster se ha realizado en el contexto del Proyecto PID2019- 106800RB-I00 financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación y la Agencia Estatal de investigación, en el marco de los programas estatales de generación de conocimiento y fortalecimiento científico y tecnológico del SISTEMA de I+D+i ORIENTADA A LOS RETOS DE LA SOCIEDAD, convocatoria 2019.

REFERENCIAS

- Bianchi, F.; Careri, M.; Mangia, A.; Musci, M. 2007. Retention indices in the analysis of food aroma volatile compounds in temperature-programmed gas chromatography: Database creation and evaluation of precision and robustness. *Journal of separation science*, **30(4)**, 563-572.
- Blanco-Pérez, M. 2021. Estudio de parámetros fisicoquímicos de mieles monoflorales españolas de la campaña 2020. Trabajo fin de máster. Universidad Politécnica de Valencia.
- Bogdanov, S.; Ruoff, K.; Oddo, L. P. 2004. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie*, **35(1)**, S4-S17.
- Castro-Vázquez, L.; Díaz-Maroto, M. C.; González-Viñas, M. A.; Pérez-Coello, M. S. 2009. Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis. *Food Chemistry*, **112(4)**, 1022-1030.
- Castro-Vázquez, L.; Díaz-Maroto, M. C.; Pérez-Coello, M. S. 2006. Volatile composition and contribution to the aroma of Spanish honeydew honeys. Identification of a new chemical marker. *Journal of agricultural and food chemistry*, **54(13)**, 4809-4813.
- Castro-Vázquez, L.; Pérez-Coello, M. S.; Cabezudo, M. D. 2003. Analysis of volatile compounds of rosemary honey. Comparison of different extraction techniques. *Chromatographia*, **57(3)**, 227-233.
- Codex Stan. 1987. Norma del Codex para la miel. Codex Stan 12-1981.
- Córdova-Córdova, C. I.; Ramírez-Arriaga, E.; Martínez-Hernández, E.; Zaldívar-Cruz, J. M. 2013. Caracterización botánica de miel de abeja (*Apis mellifera* L.) de cuatro regiones del estado de Tabasco, México, mediante técnicas melisopalinológicas. *Universidad y ciencia*, **29(2)**, 163-178.
- Dekebo, A.; Kwon, S. Y.; Kim, D. H.; Jung, C. 2018. Volatiles analysis of honey by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS): Comparison of SPME volatiles extraction methods. *Journal of Apiculture*, **33(2)**, 117-128.
- Escriche, I.; Kadar, M.; Juan-Borrás, M.; Domenech, E. 2011. Using flavonoids, phenolic compounds and headspace volatile profile for botanical authentication of lemon and orange honeys. *Food Research International*, **44(5)**, 1504-1513.
- Goodner, K. L. 2008. Practical retention index models of OV-101, DB-1, DB-5, and DB-Wax for flavor and fragrance compounds. *LWT-Food Science and Technology*, **41(6)**, 951-958.
- Guadalix, M.; De Lorenzo, C.; González, M. M.; Navarro, T.; Iglesias, M. T.; Pérez, R. A.; Sanz, M. L.; Martínez-Castro, I.; Pueyo, E.; Polo, M. C.; Soria, A. C.; Sanz, J. 2002. La miel de Madrid. Consejería de Economía e Innovación Tecnológica, Madrid.
- Jean-Prost, P. 2007. Apicultura: conocimiento de la abeja. Manejo de la colmena. Mundi-Prensa Libros.
- Juan-Borrás, M. 2016. Herramientas analíticas en la clasificación de mieles en base a criterios de calidad e inocuidad. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Juan-Borrás, M.; Periche, A.; Domenech, E.; Escriche, I. 2015. Correlation between methyl anthranilate level and percentage of pollen in Spanish citrus honey. *International Journal of Food Science & Technology*, **50(7)**, 1690-1696.
- Kadar, M.; Juan-Borrás, M.; Carot, J. M.; Domenech, E.; Escriche, I. 2011. Volatile fraction composition and physicochemical parameters as tools for the differentiation of lemon blossom honey and orange blossom honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **91(15)**, 2768-2776.
- Moujanni, A.; Partida, L.; Essamadi, A. K.; Hernanz, D.; Heredia, F. J.; Terrab, A. 2018. Physicochemical characterization of unique unifloral honey: *Euphorbia resinifera*. *CyTA-Journal of Food*, **16(1)**, 27-35.
- Párraga-Melgarejo, N. 2018. Plomo en flora apícola y su transferencia a productos de la colmena en Tarma. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Centro de Perú.
- Periche-Santamaría, A. 2011. Estudio de la fracción volátil de miel de Citrus comercializada en la Comunidad Valenciana. Trabajo fin de máster. Universidad Politécnica de Valencia.
- Piasenzotto, L.; Gracco, L.; Conte, L. 2003. Solid phase microextraction (SPME) applied to honey quality control. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **83(10)**, 1037-1044.

- Pintor, S. E.; Gianni, J. O. C. 2018. Nuevas herramientas en la lucha contra el fraude alimentario en el sector de la miel. *Revista de derecho agrario y alimentario*, **34(72)**, 49-85.
- Real Decreto 1049/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Norma de calidad relativa a la miel. Boletín Oficial del Estado, núm. 186, pp. 30181-30183.
- Revell, L. E.; Morris, B.; Manley-Harris, M. 2014. Analysis of volatile compounds in New Zealand unifloral honeys by SPME–GC–MS and chemometric-based classification of floral source. *Journal of Food Measurement and Characterization*, **8(2)**, 81-91.
- Rico, C.; Cáceres, J. 2017. Adulteración de Miel: Estado Actual y nuevas técnicas de Análisis. Facultad de Ciencias Químicas Universidad Complutense de Madrid.
- Rojas-Vélez, T. 2020. Revisión bibliográfica del análisis sensorial de mieles monoflorales españolas. Trabajo fin de máster. Universidad Politécnica de Valencia.
- Sancho, M. T.; Muniategui, S.; Huidobro, J. F.; Simal, J. 1991. Mieles del país Vasco. VI: Elementos de mielada. *Anales de bromatología*. **43(2/3)**, 165-172.
- Santander, F.; Fredes, C.; Nuñez, G.; Casaubon, G.; Espinoza, M. I.; Montenegro, G. 2014. Volatile compounds of unifloral honey and floral nectar from Quillaja saponaria. *Phyton, International Journal of Experimental Botany*, **83(1)**, 17-26.
- Shimoda, M.; Wu, Y.; Osajima, Y. 1996. Aroma compounds from aqueous solution of haze (*Rhus succedanea*) honey determined by adsorptive column chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44(12)**, 3913-3918.
- Soria, A. C.; González, M.; de Lorenzo, C.; Martínez-Castro, I.; Sanz, J. 2005. Estimation of the honeydew ratio in honey samples from their physicochemical data and from their volatile composition obtained by SPME and GC-MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **85(5)**, 817-824.
- Soria, A. C.; Martínez-Castro, I.; Sanz, J. 2003. Analysis of volatile composition of honey by solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, **26(9-10)**, 793-801.
- Soria, A. C.; Sanz, J.; Martínez-Castro, I. 2009. SPME followed by GC–MS: a powerful technique for qualitative analysis of honey volatiles. *European Food Research and Technology*, **228(4)**, 579-590.
- Verzera, A.; Tripodi, G.; Condurso, C.; Dima, G.; Marra, A. 2014. Chiral volatile compounds for the determination of orange honey authenticity. *Food Control*, **39**, 237-243.
- Wang, X.; Rogers, K. M.; Li, Y.; Yang, S.; Chen, L.; Zhou, J. 2019. Untargeted and Targeted discrimination of Honey collected by *Apis cerana* and *Apis mellifera* based on volatiles using HS-GC-IMS and HS-SPME-GC–MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, **67(43)**, 12144-12152.
- XLSTAT. 2021. Addinsoft, XLSTAT statistical and data analysis solution. New York, USA. <https://www.xlstat.com>.

ANEXOS

TABLA 1. Codificación proporcionada por el Ministerio y la correspondiente registrada en el laboratorio LABMIEL de las muestras crudas analizadas.

CÓDIGO MINISTERIO	ORIGEN GEOGRÁFICO	CÓDIGO LABMIEL	VARIEDAD DECLARADA POR EL APICULTOR
20_01124	Extremadura	I-21001	Mielada (Roble)
20_01125	Extremadura	I-21002	Mielada (Retama-bosque)
20_01126	Extremadura	I-21003	Mielada (Roble)
20_01127	Extremadura	I-21004	Mielada (Encina)
20_01128	Extremadura	I-21005	Mielada (Encina)
20_01129	Extremadura	I-21006	Mielada (Bosque)
20_01130	Extremadura	I-21007	Brezo
20_01131	Extremadura	I-21008	Mielada (Bosque)
20_01132	Extremadura	I-21009	Mielada (Roble)
20_01133	Extremadura	I-21010	Castaño
20_01134	Extremadura	I-21011	Mielada (Bosque-Roble)
20_01135	Extremadura	I-21012	Brezo
20_03928	Aragón	I-21013	Romero
20_03956	Aragón	I-21014	Romero
20_03957	Aragón	I-21015	Romero
20_04037	Castilla y León	I-21016	Girasol
20_04038	Castilla y León	I-21017	Mielada (Encina)
20_04039	Castilla y León	I-21018	Cantueso
20_04175	Cataluña	I-21019	Azahar
20_04176	Cataluña	I-21020	Romero
20_04177	Cataluña	I-21021	Romero
20_04178	Cataluña	I-21022	Azahar
20_04179	Cataluña	I-21023	Romero
20_04180	Cataluña	I-21024	Azahar
20_04306	Aragón	I-21025	Romero
20_04307	Aragón	I-21026	Romero
20_04308	Aragón	I-21027	Romero
20_04504	Murcia	I-21029	Azahar
20_04505	Murcia	I-21030	Azahar
20_04506	Murcia	I-21031	Azahar
20_04507	Murcia	I-21032	Azahar
20_04508	Murcia	I-21033	Azahar
20_04509	Murcia	I-21034	Azahar
20_05099	Galicia	I-21035	Mielada (Roble)
20_05100	Galicia	I-21036	Mielada (Roble)
20_05101	Galicia	I-21037	Mielada (Roble)
20_05102	Galicia	I-21038	Mielada (Roble)
20_05103	Galicia	I-21039	Mielada (Roble)
20_05104	Galicia	I-21040	Mielada (Roble)
20_05105	Galicia	I-21041	Mielada (Roble)
20_05106	Galicia	I-21042	Mielada (Roble)
20_05107	Galicia	I-21043	Mielada (Roble)

TABLA 2. Análisis estadístico de los compuestos volátiles identificados en 5 variedades de miel (valor mínimo, máximo, media y desviación estándar (SD)) y resultados del ANOVA para cada variedad (F-ratio y P-value).

NOMBRE DEL COMPUESTO	IK ^a	ROMERO		AZAHAR		ROBLE		BOSQUE		ENCINA		F-ratio
		Mín.- máx.	Media (SD)	Mín.- máx.	Media (SD)	Mín.- máx.	Media (SD)	Mín.- máx.	Media (SD)	Mín.- máx.	Media (SD)	
Dimethyl sulfone	1167.4	nd-302	29 (87)	nd-473	46 (123)	nd-157	13 (37)	nd-265	94 (97)	nd-184	77 (93)	ns
2(5H)-Furanone I	1174.1	nd-133	32 (57)	nd-144	9 (36)	nd-56	4 (15)	nd-61	8 (22)	nd	nd	ns
Isobutane	1176.1	nd-62	10 (24)	nd-151	16 (39)	nd-166	26 (34)	nd	nd	nd-18	7 (9)	ns
2-Nitropropane	1178.3	nd-113	18 (33)	nd-737	95 (250)	nd-52	14 (18)	nd-56	9 (20)	nd	nd	ns
2-Methyl-1-propanol	1184.7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd-29	17 (10) ^b	nd	nd	37***
1-Butanol	1189.4	nd-3	0.2 (0.8)	nd-155	23 (53)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	ns
4-Methyl-2,3-dihydrofuran	1200.8	nd-336	156 (112) ^a	nd-126	43 (50) ^a	nd-195	57 (69) ^a	nd	nd	nd-158	73 (65) ^a	7***
2-Propen-1-amine	1219.4	nd-742	166 (286)	nd-445	48 (120)	nd-379	48 (106)	nd-336	83 (155)	nd-207	52 (103)	ns
2-Cyclopentylethanol	1245.9	nd	nd	nd-253	70 (99) ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	6***
Acetoin I	1289.7	nd	nd	nd-66	7 (18) ^a	nd-206	139 (48) ^b	189-429	293 (95) ^c	nd-320	178 (132) ^b	53***
Octanal	1290.6	nd-27	9 (11) ^{ab}	nd-100	15 (26) ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4*
Acetic acid methyl ester	1302.4	nd	nd	nd	nd	nd-452	21 (92)	nd-113	30 (46)	nd	nd	ns
1-(2-Furanyl)-1-butanone	1316.2	nd-67	10 (24)	nd-48	9 (18)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	ns
Cis-3-Hexen-1-ol formate	1371.8	nd	nd	nd	nd	nd-130	48 (52) ^c	nd-108	38 (53) ^{bc}	nd	nd	6***
α-4-Dimethyl-3-cyclohexene-1-acetaldehyde	1376.4	nd-131	31 (44) ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	6***
Dimethyl trisulfide	1376.8	nd	nd	nd-191	28 (50) ^b	nd-26	3 (8) ^a	nd	nd	nd-47	21 (25) ^{ab}	3*

Los resultados aparecen expresados por potencias de 10⁴. Las letras en cada fila indican los grupos homogéneos basado en el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel del 95.0% de confianza. nd=no detectado; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 y ns =no significativo. ^aIK= Índice de retención de Kovats calculado en una columna DB WAX.

TABLA 2. Continuación.

NOMBRE DEL COMPUESTO	IK ^a	ROMERO		AZAHAR		ROBLE		BOSQUE		ENCINA		F-ratio
		Mín.- máx.	Media (SD)	Mín.- máx.	Media (SD)	Mín.- máx.	Media (SD)	Mín.- máx.	Media (SD)	Mín.- máx.	Media (SD)	
Nonanal	1394.2	20-296	102 (92) ^c	25-152	74 (35) ^{bc}	nd-111	24 (26) ^a	nd-87	40 (36) ^{ab}	14-87	45 (32) ^{ab}	6 ^{***}
Isophorone I	1401.9	nd-82	16 (31)	nd-78	12 (26)	nd	nd	nd	nd	nd-10	2 (5)	ns
3,4-Dimethylstyrene	1435.3	nd	nd	nd-63	26 (18) ^b	nd-59	5 (13) ^a	nd-28	11 (12) ^a	nd	nd	10 ^{***}
1,3,8-p-Menthatriene	1438.1	nd	nd	nd-31	10 (10) ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	13 ^{***}
2,7-Dimethyl-5-hydroxy-4-octanone	1448.3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd-93	22 (41) ^b	nd-28	14 (16) ^{ab}	5 ^{**}
Trans-Linalool oxide	1453.6	nd	nd	nd	nd	nd-16	3 (5) ^{bc}	nd-17	5 (8) ^c	nd	nd	3 [*]
1-Octen-3-ol	1457.5	nd	nd	nd	nd	nd-52	8 (15)	nd-51	13 (23)	nd	nd	ns
2-Methyl-6-hepten-1-ol	1471.1	nd	nd	nd-23	8 (10) ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	8 ^{***}
3,6-Dihydro-4-methyl-2-(2-methyl-1-propenyl)-2H-pyran	1472.1	nd-21	5 (8) ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	5 ^{**}
2-Ethyl-1-hexanol	1496.8	3-166	52 (56) ^b	nd-36	20 (13) ^a	nd-63	12 (15) ^a	nd	nd	nd-15	4 (7) ^a	6 ^{***}
Decanal	1499.1	nd-17	6 (7) ^a	nd-17	3 (5) ^a	nd-26	3 (7) ^a	nd-38	19 (17) ^b	nd-26	9 (12) ^{ab}	6 ^{***}
Fluoroethene	1509.4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd-97	35 (37) ^b	nd	nd	13 ^{***}
Benzyl chloride	1510.4	nd	nd	nd	nd	nd-96	35 (33) ^b	nd-80	31 (38) ^b	12-18	15 (3) ^{ab}	7 ^{***}
Camphor	1513.9	nd-32	22 (10) ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	66 ^{***}
Dill ether I	1514.7	nd	nd	nd-339	126 (137) ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	10 ^{***}
Benzaldehyde	1519.8	nd-1529	477 (533) ^a	nd-1409	464 (418) ^a	nd-2042	451 (529) ^a	1091-2598	1724 (652) ^b	nd-599	289 (334) ^a	11 ^{***}
2-Nonanol	1527.2	nd-10	2 (3) ^c	nd-9	2 (3) ^{bc}	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3 [*]

Los resultados aparecen expresados por potencias de 10⁴. Las letras en cada fila indican los grupos homogéneos basado en el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel del 95.0% de confianza. nd=no detectado; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 y ns =no significativo. ^aIK= Índice de retención de Kovats calculado en una columna DB WAX.

TABLA 2. Continuación.

NOMBRE DEL COMPUESTO	IK ^a	ROMERO		AZAHAR		ROBLE		BOSQUE		ENCINA		F-ratio
		Mín.- máx.	Media (SD)	Mín.- máx.	Media (SD)	Mín.- máx.	Media (SD)	Mín.- máx.	Media (SD)	Mín.- máx.	Media (SD)	
Lilac aldehyde A	1542.1	nd-20	7 (9) ^a	19-150	67 (44) ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	26 ^{***}
2,3-Butanediol I	1547.6	nd-43	9 (15) ^a	nd-177	42 (47) ^a	1162- 5403	3372 (1276) ^b	3847- 7064	5324 (1175) ^c	2730- 5777	4166 (1642) ^{bc}	69 ^{***}
Linalool	1553.5	nd	nd	nd	nd	5-47	14 (12) ^b	15-46	28 (10) ^c	8-53	30 (26) ^c	19 ^{***}
Lilac aldehyde B	1554.9	nd-22	7 (10) ^a	34-200	93 (53) ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	35 ^{***}
Lilac aldehyde C	1564.3	nd-14	4 (6) ^a	nd-112	48 (31) ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	27 ^{***}
1-Octanol	1565.4	nd-15	5 (5) ^{ab}	nd-22	2 (6) ^a	6-36	16 (8) ^c	15-25	20 (3) ^c	11-13	12 (1) ^{bc}	18 ^{***}
Acetoin II	1568.0	nd	nd	nd	nd	nd-18	2 (5) ^{ab}	nd-13	5 (7) ^b	nd	nd	3 [*]
5-Methyl-2-furancarboxaldehyde	1571.6	nd-31	13 (10) ^a	nd-51	24 (13) ^{ab}	nd-219	50 (64) ^b	135-196	171 (21) ^c	nd-43	25 (21) ^{ab}	21 ^{***}
2,3-Butanediol II	1584.6	nd-136	29 (48) ^a	nd-508	120 (147) ^a	1931- 7172	4775 (1598) ^b	5189- 10152	7519 (1813) ^c	4730- 7702	6089 (1544) ^{bc}	85 ^{***}
Lilac aldehyde D	1587.3	nd-14	5 (6) ^a	20-118	61 (36) ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	31 ^{***}
Isophorone II	1592.6	nd-227	69 (89)	nd-169	41 (59)	nd-174	44 (45)	nd-59	15 (27)	nd	nd	ns
Dill ether II	1599.4	nd-57	15 (20) ^b	nd-13	2 (4) ^a	nd	nd	nd	nd	nd	nd	6 ^{***}
Terpinen-4-ol	1604.8	nd	nd	nd-31	5 (10)	nd-4	0.5 (1)	nd	nd	nd	nd	ns
Dihydro-5-methyl-2(3H)-furanone	1609.6	nd	nd	nd-11	3 (5) ^b	nd-6	0.5 (2) ^a	nd	nd	nd-13	9 (6) ^c	10 ^{***}
Tetrahydro-2H-pyran-2-one	1611.1	nd	nd	nd	nd	nd-23	6 (8) ^b	nd-24	9 (11) ^b	nd-7	4 (4) ^{ab}	5 ^{**}
Propoxybenzene	1613.3	nd-44	4 (13) ^a	nd-333	124 (114) ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	14 ^{***}
Difumaric acid	1613.8	nd	nd	33-348	153 (113) ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	22 ^{***}

Los resultados aparecen expresados por potencias de 10⁴. Las letras en cada fila indican los grupos homogéneos basado en el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel del 95.0% de confianza. nd=no detectado; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 y ns =no significativo. ^aIK= Índice de retención de Kovats calculado en una columna DB WAX.

TABLA 2. Continuación.

NOMBRE DEL COMPUESTO	IK ^a	ROMERO		AZAHAR		ROBLE		BOSQUE		ENCINA		F-ratio
		Mín.- máx.	Media (SD)	Mín.- máx.	Media (SD)	Mín.- máx.	Media (SD)	Mín.- máx.	Media (SD)	Mín.- máx.	Media (SD)	
Butyrolactone	1623.9	nd-9	4 (4) ^a	nd-8	1 (3) ^a	11-57	31 (12) ^b	55-82	64 (11) ^c	22-35	29 (7) ^b	86 ^{***}
Butanoic acid	1631.9	nd-10	2 (4) ^a	nd-220	39 (72) ^b	nd-22	2 (5) ^a	nd	nd	nd-18	9 (10) ^{ab}	3 [*]
Safranal	1644.7	nd	nd	nd	nd	nd-26	5 (7) ^b	nd-17	4 (8) ^{ab}	nd	nd	4 [*]
Acetophenone	1647.9	nd-10	2 (4) ^a	nd-11	3 (4) ^a	nd-68	32 (20) ^b	23-171	100 (65) ^c	3-31	17 (15) ^{ab}	22 ^{***}
3-Furanmethanol	1664.5	nd-48	16 (15) ^a	16-57	30 (13) ^a	58-528	129 (105) ^b	133- 365	245 (88) ^c	114- 361	233 (135) ^c	17 ^{***}
Benzoic acid ethyl ester	1665.7	nd	nd	nd-28	6 (11) ^a	nd-55	17 (20) ^b	nd-39	11 (18) ^{ab}	nd	nd	4 [*]
1-Nonanol	1667.2	5-24	13 (8) ^a	12-49	27 (13) ^b	19-65	41 (12) ^{cd}	29-95	51 (26) ^d	26-32	28 (3) ^{abc}	12 ^{***}
2-Hydroxybenzaldehyde	1673.3	nd	nd	nd	nd	nd-203	17 (57) ^a	nd-160	78 (57) ^b	nd	nd	6 ^{***}
Methyl formate	1673.3	nd	nd	nd	nd	nd-48	7 (16) ^a	nd	nd	nd-72	47 (34) ^b	13 ^{***}
2-Methylbutanoic acid	1674.9	nd-9	2 (4) ^a	nd-7	0.9 (2) ^a	22-522	86 (114) ^b	nd-188	105 (77) ^b	41-46	44 (2) ^{ab}	5 ^{**}
8-Methyl-tricyclo[3.3.0.0(2,8)]octan-3-one	1691.1	nd-62	11 (23) ^a	nd-206	83 (69) ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	15 ^{***}
α-Terpineol	1701.6	nd-6	2 (3) ^a	nd-11	7 (5) ^b	nd-17	6 (4) ^b	nd-18	11 (7) ^c	nd-5	2 (3) ^{ab}	6 ^{***}
endo-Borneol	1706.0	nd-36	19 (11) ^a	nd	nd	14-197	74 (44) ^b	nd-159	102 (58) ^b	nd-28	14 (16) ^a	19 ^{***}
4-Methyleneisophorone	1729.3	nd-219	76 (91) ^b	nd-300	72 (94) ^b	nd-18	5 (4) ^a	nd	nd	nd	nd	5 ^{**}
p-Mentha-1,5-dien-8-ol	1730.6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd-19	12 (8) ^c	nd-7	3 (4) ^b	32 ^{***}
1, 1, 5-Trimethyl-1, 2-dihydronaphthalene	1740.7	nd-6	2 (2) ^a	nd-5	3 (2) ^a	nd-115	22 (29) ^b	nd-63	16 (29) ^{ab}	nd-2	0.5 (1) ^{ab}	3 [*]
2(5H)-Furanone II	1748.5	nd	nd	nd	nd	nd-45	7 (12) ^b	nd-35	22 (11) ^c	nd	nd	12 ^{***}

Los resultados aparecen expresados por potencias de 10⁴. Las letras en cada fila indican los grupos homogéneos basado en el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel del 95.0% de confianza. nd=no detectado; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 y ns =no significativo. ^aIK= Índice de retención de Kovats calculado en una columna DB WAX.

TABLA 2. Continuación.

NOMBRE DEL COMPUESTO	IK ^a	ROMERO		AZAHAR		ROBLE		BOSQUE		ENCINA		F-ratio
		Mín.- máx.	Media (SD)	Mín.- máx.	Media (SD)	Mín.- máx.	Media (SD)	Mín.- máx.	Media (SD)	Mín.- máx.	Media (SD)	
2-Methylciclohexanone	1767.8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd-4	2 (2) ^b	14 ^{***}
Trans-Linalool 3,7-oxide	1768.5	nd	nd	nd	nd	nd-10	4 (3) ^b	nd-25	11 (7) ^c	nd	nd	23 ^{***}
p-Mentha-1,5-dien-8-ol	1785.0	nd	nd	nd	nd	nd-9	2 (2) ^b	nd-12	5 (5) ^c	nd-3	1 (2) ^{ab}	7 ^{***}
Benzeneacetic acid ethyl ester	1785.6	nd-1	0.09 (0.3) ^a	nd-30	10 (10) ^b	nd-19	4 (6) ^a	nd	nd	nd	nd	5 ^{***}
Dimethyl sulfone	1792.5	nd	nd	nd	nd	nd-3	0.4 (1) ^a	nd-5	1 (2) ^b	nd	nd	3 [*]
α-Methylbenzenemethanol	1814.5	nd	nd	nd	nd	nd-30	13 (9) ^c	nd-20	7 (9) ^b	nd	nd	14 ^{***}
Oxalic acid hexyl 2-phenylethyl ester	1815.7	nd-13	3 (5) ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	5 ^{***}
(E)-1-(2,6,6-Trimethyl-1,3-cyclohexadien-1-yl)-2-Buten-1-one	1820.4	nd	nd	nd-8	2 (4)	nd-5	0.7 (1)	nd-6	2 (3)	nd	nd	ns
3-Phenyl-furan	1825.2	nd	nd	nd-98	20 (32)	nd-65	20 (20)	nd-45	13 (20)	nd-12	6 (7)	ns
2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]heptane-2,3-diol	1865.2	nd	nd	nd	nd	nd-6	1 (2) ^{bc}	nd-8	3 (4) ^c	nd	nd	4 ^{**}
Benzyl alcohol	1878.8	15-56	38 (12) ^a	9-94	35 (31) ^a	9-355	141 (97) ^b	nd-236	77 (98) ^a	25-73	49 (27) ^a	7 ^{***}
2-Methyl-naphthalene	1878.9	nd	nd	nd-67	13 (22) ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4 ^{**}
2-Amino-4-phenylpyrimidine	1890.6	nd	nd	nd-3	0.5 (1)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	ns
2,4-Difluoro-3-hydroxybenzaldehyde	1908.3	nd	nd	nd	nd	nd-22	3 (5)	nd-7	2 (3)	nd	nd	ns

Los resultados aparecen expresados por potencias de 10⁴. Las letras en cada fila indican los grupos homogéneos basado en el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel del 95.0% de confianza. nd=no detectado; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 y ns =no significativo. ^aIK= Índice de retención de Kovats calculado en una columna DB WAX.

TABLA 2. Continuación.

NOMBRE DEL COMPUESTO	IK ^a	ROMERO		AZAHAR		ROBLE		BOSQUE		ENCINA		F-ratio
		Mín.- máx.	Media (SD)	Mín.- máx.	Media (SD)	Mín.- máx.	Media (SD)	Mín.- máx.	Media (SD)	Mín.- máx.	Media (SD)	
1-Isociano-3-methylbenzene	1923.1	nd-3	0.5 (1) ^a	3-22	13 (6) ^c	nd-51	14 (13) ^c	nd-31	11 (13) ^{bc}	nd	nd	5**
α-Ethylidene-benzeneacetaldehyde	1928.5	nd	nd	nd	nd	nd-8	2 (3) ^b	nd-7	3 (3) ^b	nd	nd	6***
Benzothiazole	1953.2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd-25	6 (11) ^b	nd	nd	4**
Trans-3-methyl-4-octanolide	1954.3	nd	nd	nd	nd	nd-17	5 (6) ^b	nd-24	12 (12) ^c	nd-7	4 (4) ^{ab}	7***
1,2-Dimethylnaphthalene	1989.4	nd	nd	nd-5	1 (2) ^b	nd-2	0.4 (0.7) ^a	nd	nd	nd	nd	4*
4-(1-Methylethenyl)-1-cyclohexene-1-methanol formate	1999.6	nd-2	0.3 (0.6) ^a	nd-6	1 (2) ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	5**
Phenol	>2000	nd-14	5 (5) ^a	nd-23	4 (8) ^a	nd-39	18 (13) ^b	28-57	43 (11) ^c	13-29	21 (9) ^b	23***
o-(4-Methylbenzoyl)-o'-(2-methoxybenzoyl)- 1,3-benzenediol	>2000	nd	nd	nd	nd	nd-49	10 (13) ^c	nd-22	11 (9) ^{bc}	nd	nd	5**
(E)-Cinnamaldehyde	>2000	nd-6	2 (2) ^{ab}	nd	nd	2-37	12 (9) ^c	22-50	34 (11) ^d	nd-19	9 (10) ^{bc}	32***
3-Phenylpropanol	>2000	nd	nd	nd	nd	nd-4	1 (2) ^b	nd-3	0.5 (1) ^a	nd	nd	7***
Octanoic acid	>2000	nd	nd	nd	nd	nd-6	0.4 (2) ^a	nd-26	6 (9) ^b	nd-3	0.7 (1) ^a	6***
p-Cresol	>2000	nd	nd	nd	nd	nd-14	1 (3)	nd	nd	nd	nd	ns
2-Hydroxy-1-phenylethanone	>2000	nd	nd	nd	nd	nd-66	12 (18) ^a	nd-84	39 (42) ^b	nd-7	3 (4) ^a	7***
Lilac aldehyde E	>2000	nd	nd	nd-25	6 (8) ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	6***
Thymol	>2000	nd	nd	nd-2	0.2 (0.6)	nd-59	5 (15)	nd	nd	nd	nd	ns

Los resultados aparecen expresados por potencias de 10⁴. Las letras en cada fila indican los grupos homogéneos basado en el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel del 95.0% de confianza. nd=no detectado; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 y ns =no significativo. ^aIK= Índice de retención de Kovats calculado en una columna DB WAX.

TABLA 2. Continuación.

NOMBRE DEL COMPUESTO	IK ^a	ROMERO		AZAHAR		ROBLE		BOSQUE		ENCINA		F-ratio
		Mín.- máx.	Media (SD)	Mín.- máx.	Media (SD)	Mín.- máx.	Media (SD)	Mín.- máx.	Media (SD)	Mín.- máx.	Media (SD)	
3-Aminoacetophenone	>2000	nd-25	7 (9) ^{bc}	nd	nd	nd-38	10 (11) ^c	nd-19	11 (7) ^c	nd	nd	5 ^{**}
2,3,5-Trimethylphenol I	>2000	nd-3	0.5 (1)	nd-4	0.9 (2)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	ns
Methyl anthranilate	>2000	nd	nd	nd-132	53 (36) ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	26 ^{***}
3-Phenyl-2-propen-1-ol	>2000	nd	nd	nd	nd	nd-3	0.6 (1) ^b	nd	nd	nd	nd	3 [*]
(2,4-ditert-butylphenyl)-5-hydroxypentanoic acid	>2000	nd-3	0.8 (1) ^a	nd	nd	nd-26	9 (6) ^b	nd	nd	nd	nd	17 ^{***}
Iodo-ethene	>2000	nd	nd	nd	nd	nd-25	3 (7)	nd	nd	nd	nd	ns
2,3,5-Trimethylphenol II	>2000	nd-25	8 (10) ^a	nd-43	16 (16) ^b	nd-28	3 (7) ^a	nd-17	8 (7) ^{ab}	nd-9	5 (4) ^{ab}	4 ^{**}
1,4:3,6-Dianhydro- α -D-glucopyranose	>2000	nd	nd	nd	nd	nd-86	9 (21)	nd-54	14 (17)	nd	nd	ns
Benzoic acid	>2000	nd	nd	nd	nd	nd-66	13 (17) ^{bc}	nd-46	20 (18) ^c	nd-4	2 (2) ^{ab}	6 ^{***}

Los resultados aparecen expresados por potencias de 10⁴. Las letras en cada fila indican los grupos homogéneos basado en el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel del 95.0% de confianza. nd=no detectado; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 y ns =no significativo. ^aIK= Índice de retención de Kovats calculado en una columna DB WAX.