



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Caracterización de mieles de Mozambique en base a
compuestos volátiles orgánicos de procedencia botánica.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR/A: Gotor Ramos, Pablo

Tutor/a: Escriche Roberto, M^a Isabel

Director/a Experimental: PERAL PINTO, ANA MARIA

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

TÍTULO: DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE COMPUESTOS VOLÁTILES DE LA MIEL DE MOZAMBIQUE

RESUMEN:

La miel puede constituir una fuente de ingresos para las zonas rurales de los países en vías de desarrollo, como es el caso de Mozambique. Por ello, resulta de especial interés caracterizar la miel procedente de las zonas de mayor producción del país, con la finalidad de ampliar su conocimiento para facilitar su comercialización y el impulso de la economía de las zonas rurales de Mozambique. En este sentido, el objetivo del presente estudio ha sido determinar la composición de la fracción volátil de mieles procedentes de 4 regiones de Mozambique (Manica, Nampula, Sofala y Zambezia) aplicando la metodología SPME-GC-MS. Se han identificado 97 compuestos volátiles, de los cuales 53 mostraron diferencias significativas entre regiones. El origen geográfico ha condicionado la presencia de determinados compuestos volátiles en las mieles, ya que algunos de ellos se han asociado a una determinada región, como es el caso del cyclopentane, 1,1,3,4-tetramethyl-, cis- (únicamente detectado en Sofala), o el 1-octanol solo presente en las mieles de Nampula. En general, las mieles de Zambezia mostraron una mayor diferencia con respecto a las de las demás regiones, posiblemente debido a la presencia en esta región de una flora específica que puede condicionar la composición de estas mieles. Por el contrario, las mieles de Nampula y Manica mostraron características similares ya que ambas regiones presentan vegetación similar y por lo tanto, cierta similitud del néctar de procedencia. Las diferencias entre distritos de una misma región (considerando el número de compuestos que mostraron diferencias significativas entre ellos) fueron más acusadas en Zambezia, seguida de Sofala, Nampula y Manica. Estos resultados avalan la eficacia de la metodología empleada en este estudio para la caracterización de las mieles de Mozambique en base a su origen geográfico

PALABRAS CLAVE:

Compuestos volátiles; Mozambique; miel; origen botánico; origen geográfico; SPME; GC-MS; aromas.

AUTOR: Pablo Gotor Ramos

Valencia, Julio 2022

TUTORA: Isabel Escriche Roberto

DIRECTORA EXPERIMENTAL: Ana María Peral Pinto

TITLE: DETERMINATION OF THE VOLATILE COMPOUND PROFILE OF MOZAMBIQUE HONEY

ABSTRACT:

Honey can be a source of income for rural areas of developing countries, such as Mozambique. For this reason, it is of special interest to characterize the honey from the areas of greatest production in the country, with the aim of expanding its knowledge to facilitate its commercialization and the promotion of the economy of the rural areas of the country of Mozambique. This is why the objective of this study has been to determine the composition of the volatile fraction of honeys from 4 regions of Mozambique (Manica, Nampula, Sofala and Zambezia) applying the SPME-GC-MS methodology. 97 volatile compounds have been identified, of which 53 showed significant differences between regions. Geographical origin has conditioned the presence of certain volatile compounds in honey, since some of them have been associated with a certain region, as is the case of cyclopentane, 1,1,3,4-tetramethyl-, cis- (only detected in Sofala), or 1-octanol only present in honeys from Nampula. In general, honeys from Zambezia showed a greater difference in comparison to those from other regions, possibly due to the presence in this region of a specific flora that can condition the composition of these honeys. On the contrary, the honeys from Nampula and Manica showed similar characteristics since both regions have similar vegetation and, therefore, a certain similarity of the nectar of origin. The differences between districts of the same region (considering the number of compounds that showed significant differences among them) were most pronounced in Zambezia, followed by Sofala, Nampula and Manica. These results support the effectiveness of the methodology used in this study for the characterization of Mozambique honey based on its geographical origin.

KEYWORDS:

Volatile compounds; Mozambique; honey; botanical origin; geographical origin; SPME; GC-MS; aromas.

TÍTOL: DETERMINACIÓ DEL PERFIL DE COMPOSTOS VOLÀTILS DE LA MEL DE MOÇAMBIC

RESUM

La mel pot constituir una Font d'ingressos per a les zones rurals dels països en vies de desenvolupament, com és el cas de Moçambic. Per això, resulta d'especial interès caracteritzar la mel procedent de les zones de major producció del país, amb la finalitat d'ampliar el coneixement per facilitar la comercialització i l'impuls de l'economia de les zones rurals del país de Moçambic. És per això que l'objectiu del present estudi ha sigut determinar la composició de la fracció volàtil de mels procedents de 4 regions de Moçambic (Manica, Nampula, Sofala i Zambezia) aplicant la metodologia SPME-GC-MS. S'han identificat 97 compostos volàtils, 53 dels quals van mostrar diferències significatives entre regions. L'origen geogràfic ha condicionat la presència de determinats compostos volàtils a les mels, ja que alguns s'han associat a una determinada regió com, és el cas del cyclopentane, 1,1,3,4-tetramethyl-, cis- (únicament detectat a Sofala), o el 1-octanol només present a les mels de Nampula. En general, les mels de Zambezia van mostrar una diferència més gran respecte a les de les altres regions, possiblement a causa de la presència en aquesta regió d'una flora específica que pot condicionar la composició d'aquestes mels. Per contra, les mels de Nampula i Manica van mostrar característiques similars ja que ambdues regions presenten vegetació similar i per tant, certa similitud del nèctar de procedència. Les diferències entre districtes d'una mateixa regió (considerant el nombre de compostos que van mostrar diferències significatives entre ells) van ser més acusades a Zambezia, seguida de Sofala, Nampula i Manica. Aquests resultats avalen l'eficàcia de la metodologia emprada en aquest estudi per a la caracterització de les mels de Moçambic basada en el seu origen geogràfic.

PARAULES CLAU:

Compostos volàtils; Moçambic; mel; origen botànic; origen geogràfic; SPME; GC-MS; aromes.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el programa ADSIDEO 2020 del Centro de Cooperación al Desarrollo de la Universitat Politècnica de Valencia a través de Proyecto titulado: “Análisis de Riesgos en productos apícolas de Mozambique. Oportunidad Social y Económica de las poblaciones rurales”.

Quiero agradecer a mi tutora Isabel Escriche, y a Ana Peral, todo lo que me han enseñado en este trabajo de fin de grado, y por hacer de mi estancia en LABMIEL durante su realización, a la que han contribuido enormemente, una etapa agradable y amena.

Les dedico el presente trabajo a mis padres por estar siempre para mí, y a mis amigos.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 LA MIEL	1
I.2 COMPOSICIÓN DE LA MIEL	1
I.3 IMPORTANCIA DE LA APICULTURA EN MOZAMBIQUE	2
I.4 TÉCNICAS EMPLEADAS PARA LA CLASIFICACIÓN DE LA MIEL	3
I.4.1 Métodos clásicos:	3
I.4.2 Otros métodos:	4
II. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO	6
II.1 OBJETIVO:	6
II.2 PLAN DE TRABAJO:	6
III. MATERIALES Y MÉTODOS	6
III.1 MUESTRAS DE MIEL:	6
III.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS DEL PERFIL VOLÁTIL	7
III.3 MÉTODO, EQUIPO Y CONDICIONES DE TRABAJO	7
III.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	9
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
IV.1 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES	9
IV.2 EFECTO DE LA ZONA GEOGRÁFICA EN LA COMPOSICIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES DE ORIGEN FLORAL	17
IV.2.1 Efecto de la región en el perfil volátil	17
IV.2.2 Efecto del distrito en el perfil volátil	19
IV.3 EFECTO GLOBAL DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL EN LA DIFERENCIACIÓN DE MIELES	26
V. CONCLUSIONES	30
VI. BIBLIOGRAFÍA	31
VII. ANEXOS	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de las regiones de Mozambique (www.wikimedia.org)

Figura 2. Cromatógrafo de gases Intuvo 9000 GC acoplado a un detector de masas 7000D GC/TQ (Agilent) (Imagen propia)

Figura 3. Imagen ilustrativa del funcionamiento de la fibra en SPME

Figura 4. Gráfico Temperatura vs- Tiempo del cromatógrafo durante los 46 minutos de extracción

Figura 5. Ejemplo de los “Alternate HITS” proporcionados por el programa

Figura 6. Ejemplo de picos no considerados compuestos

Figura 7. Ejemplo de picos sí considerados compuestos, correspondientes al 3-Furanmethanol en 2 muestras distintas.

Figura 8. Ejemplo de información proporcionada por MassHunter para una muestra, incluye; RT, nombre, Match Factor, Número CAS y Área de cada compuesto detectado.

Figura 9. Ejemplo de espectro de masas sí considerado compuesto

Figura 10. Ejemplo de espectro de masas no considerado compuesto

Figura 11. Ejemplo de intervalos LSD (Least significant difference) del ANOVA para un compuesto que mostró diferencias significativas entre regiones; $\alpha = 0.05$.

Figura 12. Ejemplo de diagramas Box-Whiskers del ANOVA de compuestos volátiles que mostraron diferencias significativas entre regiones.

Figura 13. Ejemplo de diagramas Box-Whiskers del ANOVA de compuestos volátiles que no mostraron diferencias significativas entre regiones.

Figura 14. Ejemplo de diagramas Box-Whiskers del ANOVA de compuestos volátiles que mostraron diferencias significativas entre distritos.

Figura 15. Ejemplo de diagramas Box-Whiskers del ANOVA de compuestos volátiles que no mostraron diferencias significativas entre distritos.

Figura 16. Gráfico de puntuaciones de las muestras para PCA.

Figura 17. Ampliación de la zona central del gráfico del PCA.

Figura 18. Representación de las variables (compuestos volátiles) para los factores principales

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Índices de Kovats, tiempo de retención (TR), fórmulas moleculares y definición de aroma de los compuestos volátiles identificados en la fracción volátil de las mieles de Mozambique.

Tabla 2. Compuestos volátiles identificados por SPME-GC-MS en las 4 regiones de Mozambique, agrupados por familia química ordenada alfabéticamente, y ordenados por tiempo de retención dentro de dicha familia. Los resultados están expresados en área (potencias de 10^4 valores máximos y mínimos); nd=no detectado. Está incluido el resultado del ANOVA para el factor región y distrito (F-ratio y P-value); significación: * $p < 0.01$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns= no significativo. Las letras (a,b,c) indican los grupos homogéneos del ANOVA.

Tabla 3. Correlaciones entre las variables y los factores para los componentes PC1 y PC2 del PCA.

Tabla 4. Glosario de fragancias.

Tabla 5. Código de las muestras analizadas según referencia asignada por LABMIEL, región de procedencia, distrito, apicultor y comentarios, Fecha de recepción de las muestras.

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Índice de Kovats

I. INTRODUCCIÓN

I.1 LA MIEL

La miel es un producto natural muy popular que se consume en distintas partes del mundo. Es un alimento muy calórico, semilíquido y dulce, producido por las abejas a partir del néctar de diferentes flores y las secreciones de las plantas. Según las disposiciones finales del Real Decreto 1049/2003, la miel se 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 plantas, que las abejas recolectan, transforman combinándolas con sustancias específicas propias, depositan, deshidratan, almacenan y dejan en colmenas para que madure”.

La explotación de las colmenas para la obtención de este alimento, se denomina apicultura. Además del papel que la miel ha tenido como alimento y edulcorante desde tiempos antiguos, se le atribuyen diversas propiedades medicinales y terapéuticas, entre las cuales destacan la de ser antiinflamatoria y antibacteriana (debido a su baja actividad del agua), resultando especialmente útil en el tratamiento de heridas (Gallardo-Chacón et al., 2008; Kassim et al., 2010; Mohamed et al., 2010, Nurul et al., 2013; Khan et al., 2014). Además, presenta actividad antioxidante debido a su contenido en flavonoides y ácidos fenólicos (Karlidag et al., 2021).

I.2 COMPOSICIÓN DE LA MIEL

La miel es una mezcla compleja de nutrientes, compuesta principalmente por azúcares (fructosa y glucosa en su mayoría) además de distintos tipos de lípidos, minerales, vitaminas, proteínas y compuestos fenólicos (Pyrzynska and Biesaga 2009; Lachman et al., 2010; Belitz et al., 2014). Dicha composición química depende de factores humanos y naturales, entre los que destaca la especie botánica de la que procede el néctar, la localización geográfica y la especie de abeja, entre otras variables (Bentivenga et al., 2004; Ruíz, 2011). También depende de las prácticas de la apicultura y de la flora apícola que rodea las colmenas, que se ve condicionada por el suelo y el clima.

Componentes mayoritarios:

- Azúcares: Suponen el 80% de la composición de la miel, y le confieren viscosidad y una baja actividad del agua (Aw). Estos son; fructosa -el azúcar dominante en la gran mayoría de las mieles- (Gleiter et al., 2006), glucosa, sacarosa, maltosa, y otros polisacáridos y azúcares minoritarios que definirán el valor energético de la miel, y su cristalización. La sacarosa puede ser un indicador de calidad, ya que una concentración mayor al 5% está relacionada con la adulteración de la miel o con una alimentación especial de las abejas (Kamal and Klein., 2011).
- Agua: Es el segundo componente principal de la miel. De ella dependerá su conservación, puesto que la miel es un producto notablemente higroscópico, es decir, que absorbe la humedad del ambiente. La humedad influirá en su color y en la percepción sensorial (Piana et al., 1989). El porcentaje óptimo es del 17%, pues una cantidad mayor puede favorecer la fermentación.

Componentes minoritarios:

- Proteínas: El contenido en proteínas de la miel es muy bajo, y tiene origen en las abejas y en el polen. El aminoácido más abundante es la prolina, que procede de la abeja y supone más de la mitad de la fracción de aminoácidos. La enzima diastasa es una enzima termolábil que sirve como indicador de la frescura del producto (Fechner et al., 2016). Según la ley, la actividad mínima en la escala Schade es de 8 (BOE núm 186, 2003).

- **Minerales:** Existe una cantidad muy pequeña en la miel, y depende de la tierra y el polen. El más abundante es el potasio (Bogdanov et al., 2007)
- **Grasas:** La presencia de lípidos es casi nula, constituyendo el 0.04% de la miel (Sáinz y Gómez, 1999).
- **Ácidos:** Tienen un efecto notorio en el sabor de la miel y le da cierta acidez, además de una determinada estabilidad frente a los microorganismos. El ácido mayoritario es el glucónico.
- **Compuestos volátiles:** Representan una fracción minoritaria, ya que están presentes en concentraciones muy bajas. Pertenecen a familias químicas muy diversas y dan lugar a diferentes aromas en la miel, que contribuyen a su unicidad. Los ésteres dotan a la miel de sabores dulces y afrutados y los aldehídos dan un sabor fresco y herbáceo, mientras que los furanos aportan un gusto amaderado. Las cetonas confieren olor a mantequilla y nuez, así como los alcoholes se asocian a sabores frescos (Markes International, 2021). Se ha demostrado en múltiples ocasiones que son unos marcadores químicos del producto muy fiables, por lo que presentan un gran interés científico.

La relación que existe entre la composición y los factores extrínsecos resulta de utilidad a la hora de caracterizar y diferenciar los distintos tipos de miel, lo que le aporta un valor añadido. De los distintos compuestos de la miel mencionados anteriormente, la fracción volátil ha demostrado guardar una relación significativa con el origen tanto geográfico como botánico en diversas investigaciones (Panseri et al., 2013; Pattamayutanon et al., 2017; Srinivasan et al., 2021). Se han realizado numerosos estudios acerca de la distinción de las mieles atendiendo a la percepción organoléptica en base a este tipo de compuestos, ya que, al ser la mayor parte de ellos compuestos aromáticos, dotan a las mieles de un olor determinado y distintivo que depende del tipo de néctar (Nurul et al., 2013). La fracción de compuestos volátiles está relacionada con el aroma y sabor de la miel, y se agrupa en las siguientes categorías: aldehídos, alcoholes, hidrocarburos, cetonas, bencenos, ésteres de bajo peso molecular, terpenos, furanos y sus derivados (Tanleque-Alberto et al., 2019).

Realizar un análisis que determine la fracción volátil de la miel puede ser útil para establecer 2 tipos de origen:

Origen Botánico: El conjunto de compuestos que conforman la miel depende de la variedad botánica de la que procede el néctar, además de la proporción en la que el polen se encuentra. El néctar es el factor natural que tiene mayor influencia en la composición química final de la miel (Many-Loh et al., 2011). Para determinar el origen floral, se deben considerar los compuestos derivados de la planta, y los metabolitos de estos, como pueden ser los terpenos y derivados del benceno. Por este motivo, los volátiles constituyen un marcador floral, y pueden ser especialmente útiles para discriminar las mieles monoflorales.

Origen Geográfico: Al igual que la procedencia botánica, la región geográfica de la que una miel procede, es un factor que influye en su composición volátil, ya que la planta depende del clima, las condiciones edafológicas, la humedad, y la luz solar. El origen geográfico puede estar vinculado al botánico, si la planta en la que pecorea la abeja es característica de una región determinada.

I.3 IMPORTANCIA DE LA APICULTURA EN MOZAMBIQUE

Mozambique es un país con litoral situado al sudeste de África. Se trata de un país en vías de desarrollo, en el que la producción y venta de mieles juega un papel importante a la hora de generar un sustento económico en las comunidades rurales. La apicultura en Mozambique ha tenido una gran importancia tradicional, especialmente en las zonas rurales, pues se trata de un trabajo que puede ser económicamente rentable con un

impacto positivo en el medio ambiente. Mozambique goza de unas condiciones climatológicas y una orografía apropiadas para la apicultura, además de una vegetación abundante. Presenta extensas áreas boscosas donde proliferan las abejas de tipo *Apis Mellifera*, que posibilitan el desarrollo de la actividad. Por otro lado, las explotaciones son pequeñas, y el comercio está mayormente dirigido al mercado interno. En Mozambique se producen unas 600 toneladas de miel al año, con un crecimiento anual constante, mientras que en el continente africano, cerca de 170 mil toneladas (FAOSTAT, 2016).

Si bien existe una bibliografía muy amplia sobre las mieles de Europa (Pajuelo, 2004; Alissandrakis et al., 2009; Revell et al., 2013; Juan-Borrás et al., 2014; Karabagias et al., 2018), hay una gran falta de información acerca de la miel de África, y muy especialmente de Mozambique. Estandarizar la miel de Mozambique puede tener como consecuencia un aumento del valor de esta, lo que puede ser de gran interés para el país. Esto le daría la oportunidad de impulsar su economía y aumentar su competitividad, al encontrar un lugar estable en el mercado de la miel.

I.4 TÉCNICAS EMPLEADAS PARA LA CLASIFICACIÓN DE LA MIEL

La gran importancia que la miel tiene en el mercado hace que determinar su autenticidad y establecer su origen resulte muy necesario, con el objetivo de proteger al consumidor del fraude y detectar adulteraciones, así como de prevenir el etiquetado incorrecto de la miel y normalizarla de manera fiable. Las técnicas llevadas a cabo son las siguientes:

I.4.1 Métodos clásicos:

El **análisis melisopolinológico** se basa en la identificación, mediante la observación por microscopio, de los granos de polen presentes en la miel, atendiendo a su morfología y la cantidad en que se encuentran. El objetivo es establecer el origen botánico de la miel, pero al no existir un método oficial para el reconocimiento del polen, se suele realizar como análisis complementario a otras técnicas. Es un análisis complicado que requiere mucho tiempo, y la experiencia de un profesional (Popek et al., 2017).

El **análisis sensorial** es de gran relevancia, ya que la calidad organoléptica de la miel determinará su éxito en el mercado, pues es el parámetro que con mayor facilidad puede valorar el consumidor. No existe un procedimiento específico para este tipo de análisis, pero debe ser realizado por expertos, con el fin de que la información recabada acerca del origen botánico, sea fiable. La principal ventaja de este análisis es que las características valoradas son aquellas que serán percibidas por el consumidor. Se trata de una técnica de análisis complementaria al análisis físico-químico y al análisis del polen, al tiempo que indispensable.

Los **análisis físico-químicos** son utilizados de manera rutinaria para determinar la calidad de la miel, pero resultan muy útiles para establecer su procedencia floral, especialmente atendiendo a su contenido en azúcares y su conductividad. Los parámetros físicos y químicos estudiados son los siguientes:

- **Color:** Puede tener desde tonos marrones hasta colores ámbar o anaranjados. El análisis del color sólo es apropiado para miel fresca, pues puede cambiar durante el almacenamiento, dependiendo de las condiciones de este (Escriche et al., 2017).
- **pH:** Los valores del pH de la miel varían desde 3,5 a 5,5.
- **Actividad óptica:** depende de la concentración de azúcares en la miel.
- **Actividad enzimática,** solo útil en mieles frescas.
- **Humedad:** El contenido en agua de la miel se ve influido por el clima, pero no es un parámetro muy fiable, ya que la miel puede haber sido adulterada.

- Conductividad eléctrica: Depende en gran medida del contenido en minerales de la miel, y toma valores desde 0,06 a 2,17 mS/cm. Estos valores dependen también de su origen botánico (Fechner et al., 2016).
- Azúcares: La relación entre la concentración de fructosa y glucosa, al igual que la concentración de estos glúcidos, es útil para la clasificación de mieles monoflorales (Persano Oddo et al., 1995). Generalmente, la determinación de azúcares minoritarios únicamente permite distinguir la miel de flores, de la miel de mielada.

I.4.2 Otros métodos:

La **resonancia magnética nuclear** es una técnica avanzada de caracterización de las estructuras moleculares presentes en la miel, a nivel atómico. Es una herramienta que nos permite conocer el origen botánico de la miel.

El **análisis de la relación de isótopos de carbono estable** –Stable Carbon Isotope Ratio Analysis (SCIRA)- permite detectar la presencia de azúcar C4 como el azúcar de caña o el jarabe de maíz, añadidos de forma no declarada. Una miel no adulterada no debería contener más de un 7% de azúcar C4.

El **análisis de la actividad enzimática**: los distintos tipos de miel presentan diferencias importantes en cuanto a la actividad enzimática, y puede ayudarnos a determinar el origen botánico de la miel, ya que la presencia de diastasas depende de él. Este análisis debe efectuarse en mieles frescas, ya que la actividad de las enzimas disminuye con el tiempo de almacenamiento y la temperatura.

La **espectroscopía de Raman** proporciona información detallada y significativa acerca de la estructura e identidad de los compuestos químicos presentes en la miel. Es útil para la diferenciación de la procedencia botánica de la miel, y para la detección de adulteraciones por adición de azúcares (Paradkar et al., 2002).

La **espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier** (FTIR) es una técnica rápida y no destructiva. Ha sido utilizada, al igual que la técnica mencionada anteriormente, para la detección de adulteraciones de la miel. La medición de la absorción de las muestras de distintos tipos de miel, también es de utilidad para determinar el origen de la miel, ya que se obtiene información a nivel molecular de los componentes de ésta (Davies et al., 2002). Suele ir acompañada de un análisis del componente principal (PCA) que facilite el procesado de la información obtenida por el espectro infrarrojo, y refuerce la fiabilidad de los resultados obtenidos.

La **calorimetría diferencial de barrido (DSC)** es una técnica termoanalítica no muy utilizada para la diferenciación de mieles, que consiste en la observación de los cambios físicos que experimentan las muestras de miel cuando se les aporta calor de manera controlada. Se obtiene una curva de temperatura versus tiempo de la muestra problema y la muestra de referencia, haciendo posible la comparación entre ellas. (Cardona-Rodríguez et al., 2015, Sobrino-Gregorio et al., 2017)

La **PCR (reacción en cadena polimerasa)** es una técnica bioquímica basada en la obtención de miles de copias de un fragmento de ADN, pudiendo establecer el origen botánico de la miel, gracias a la identificación de la especie vegetal (Jain et al., 2013; Sobrino-Gregorio et al., 2019)

La **lengua electrónica** es un instrumento de análisis que posee sensores químicos. Es una técnica fiable y barata, que ha sido utilizada tanto para la caracterización de mieles en base a su origen botánico, como para la detección de mieles adulteradas (Escriche et al., 2018).

La **cromatografía de gases para el análisis de compuestos volátiles** es una técnica basada en la volatilidad de los compuestos y su polaridad, diferenciando los analitos que presentan un comportamiento distinto entre ellos. Es la técnica cromatográfica más ampliamente utilizada, ya que posee una gran sensibilidad, si bien depende de la estabilidad térmica de los compuestos de la muestra. Los factores fundamentales de esta metodología son: temperatura, flujo del gas inerte, y tiempo de análisis (Tanleque-Alberto et al., 2019).

Es una técnica separativa y cualitativa: proporciona información relacionada con la identidad molecular o de los grupos funcionales que están en la muestra. Es un proceso dinámico de retención de las sustancias, en una fase estacionaria, y su elución por el paso de una fase móvil gaseosa. El tipo de respuesta son picos asociados a un compuesto químico, representando el tiempo de retención en la columna en el Eje X, y la señal del detector en el Eje Y. El tiempo de retención dependerá de la naturaleza de la molécula y sus propiedades fisico-químicas. El cromatógrafo suele ir acoplado a un detector de masas.

- **El espectrómetro de masas (MS)** parte de un compuesto puro que se fragmenta para generar iones. Este tiene unos patrones de rotura conocidos e identificables, denominados espectros de masas, que el MS explora a medida que los componentes abandonan la columna. El MS se basa en el uso de un campo eléctrico y uno magnético sobre los iones para separarlos. Es una técnica de análisis cualitativo de gran utilidad para conocer la naturaleza de los compuestos, y por ello es muy empleada para la determinación de estructuras orgánicas, como son los compuestos volátiles orgánicos (VOC).

Para el análisis de VOC por cromatografía de gases, se encuentra el método de extracción de purga y trampa, que permite trabajar con muestras tanto sólidas como líquidas, y lleva a cabo una concentración de la muestra antes de su inyección en la columna. Consta de una fase de extracción de los analitos -purga- mediante el burbujeo de un gas inerte en la muestra, y otra de retención en la trampa, en función de sus características fisicoquímicas. La desorción se da por el uso de calor, y por el paso de gas en sentido contrario, conduciendo los compuestos al cromatógrafo de gases.

También se puede distinguir entre las técnicas de espacio de cabeza dinámico (DHS) y estático (Static HS) - El segundo no requiere de enriquecimiento de la muestra, puesto que los compuestos se hallan en altas concentraciones-.

La técnica de extracción de volátiles, ITEX (In-Tube Extraction), corresponde al espacio de cabeza dinámico. Se basa en el uso de una jeringa rellena de material adsorbente, cuya función es la de recolectar y concentrar los compuestos volátiles presentes en el espacio de cabeza, por medio de aspiraciones repetidas. La desorción de los compuestos se da por aumento de temperatura.

Dentro del espacio de cabeza, el procedimiento más utilizado es la microextracción en fase sólida (SPME-HS), que presenta una alta selectividad y sensibilidad, y no requiere el uso de solventes. Además, permite la cuantificación de una gran cantidad de compuestos y requiere poca manipulación de la muestra, o ninguna, lo que reduce considerablemente el tiempo de análisis (Many-Loh et al., 2011). El mecanismo de extracción consiste en la adsorción de los compuestos volátiles por parte de la fibra, es decir, los analitos permanecen en la superficie del recubrimiento de esta. Es un proceso competitivo, lo que significa que unas moléculas pueden reemplazar a otras en función de su afinidad por el recubrimiento: esto hace que la matriz de la muestra en la que se encuentran los compuestos, sea un factor importante. La extracción finaliza cuando la concentración de analitos en el material polimérico y la de la muestra son iguales, alcanzando así el equilibrio.

II. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO

II.1 OBJETIVO:

El objetivo del presente trabajo ha sido analizar la fracción volátil de miel de las zonas de mayor producción de Mozambique, centrando el estudio en los compuestos asociados a las plantas o fuentes de néctar.

II.2 PLAN DE TRABAJO:

La realización del estudio se planteó en tres etapas:

- Preparación y acondicionamiento de las muestras de miel para su análisis cromatográfico por SPME.
- Identificación de compuestos químicos presentes en las muestras en base a la comparación de los picos cromatográficos, espectros de masas (utilizando la librería NIST 17.L.) y bibliografía.
- Tratamiento de datos para la evaluación del efecto de la zona geográfica en la composición volátil de la miel, considerando los distintos distritos dentro de cada una de las regiones. Para ello, se requiere realizar un análisis estadístico de la información que se ha recopilado: realización de un análisis ANOVA mediante Statgraphics Centurion XVIII, para determinar las diferencias significativas entre la composición de las mieles, considerando la variable dependiente (Compuesto volátil) y la variable independiente (Región o distrito), también denominado factor.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 MUESTRAS DE MIEL:

En este estudio se realizó el análisis de 63 muestras de miel cruda procedente de cuatro regiones distintas de Mozambique, siendo: 20 de Nampula, 12 de Sofala, 11 de Manica y 20 de Zambezia.

En cada región, las muestras se obtuvieron de diferentes distritos: Nampula; 9 de Angoche, 6 de Mogincual y 5 de Mecuburi. Sofala; 5 de Caia, 3 de Maringue y 4 de Gorongosa. Zambezia; 5 de Alto Molocue, 5 de Gile, 5 de Mocubela y 5 de Mulevala, y Manica; 3 de Tambara, 5 de Sussudenga, y 3 de Manica. La figura 1 muestra un mapa de las regiones de Mozambique.

Las mieles fueron recolectadas en 2021. En la Tabla 5, situada en anexos, consta el código de las muestras y los apicultores.



Figura 1. Mapa de las regiones de Mozambique (www.wikimedia.org)

III.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS DEL PERFIL VOLÁTIL

Para cada muestra, se pesaron 8 gramos de miel en viales de vidrio de 20 ml con tapón de rosca. Después, se adicionaron 1 ml de agua bidestilada y 2 ml de agua con NaCl. Se pesó 1 g de perlas de vidrio en una zapata y se añadió a continuación a cada vial. La función de estas perlas fue favorecer la homogeneización en el Vórtex. La agitación en el Vórtex fue de 2 minutos, asegurando la mezcla completa de la muestra.

III.3 MÉTODO, EQUIPO Y CONDICIONES DE TRABAJO

Para la extracción de la fracción volátil de la miel, se aplicó la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) acoplada a cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS). Esta técnica se basa en la ionización y fragmentación de los analitos y posterior separación en función a su relación m/z.



Figura 2. Cromatógrafo de gases Intuvo 9000 GC acoplado a un detector de masas 7000D GC/TQ (Agilent) (Imagen propia)

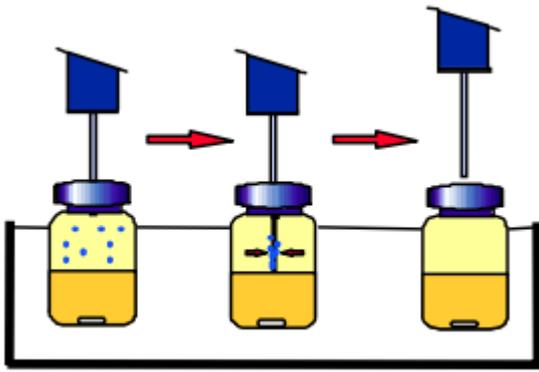


Figura 3. Imagen ilustrativa del funcionamiento de la fibra en SPME-HS (Gil, S. M. 2017)

La fibra que se utilizó es de tipo DVB/CAR/PDMS (Se trata de: Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane) de 50/30 μm . La fibra se acondicionó a 260°C durante 3 min. La temperatura de extracción de los compuestos volátiles de las muestras, fue 50°C, con una agitación de 250 rpm durante 30 minutos. El tiempo de desorción de la muestra en el inyector a 250°C, fue de 3 min en modo splitless: Esto significa que todo el gas portador es introducido en la columna -a diferencia del tipo de inyección denominado “Split”, en el que parte del gas sale del sistema a través de una válvula-. La inyección se realizó mediante un sistema automatizado PAL RSI 120, utilizando helio como gas portador con un flujo constante de 1 ml/min. La separación de los compuestos y el posterior análisis se realizó con una columna DB WAX (30m x 0,25mm x 0,25 μm) en un cromatógrafo de gases Intuvo 9000 GC acoplado a un detector de masas 7000D GC/TQ (Agilent). Las condiciones cromatográficas fueron: temperatura de partida del horno: 35°C (constante durante 3 minutos), aumento de 5°C/min hasta 215°C (pendiente 1). A continuación, se incrementaba 30°C/min hasta 250°C (pendiente 2), manteniéndose durante 6 minutos, teniendo el cromatograma una duración total de 46 minutos (La figura 4 muestra la evolución de la temperatura en función del tiempo en el cromatógrafo). Las condiciones del detector de masas (MS) fueron las siguientes: modo de impacto electrónico (EI) a 70 eV, teniendo un rango de masas de m/z 40-280.

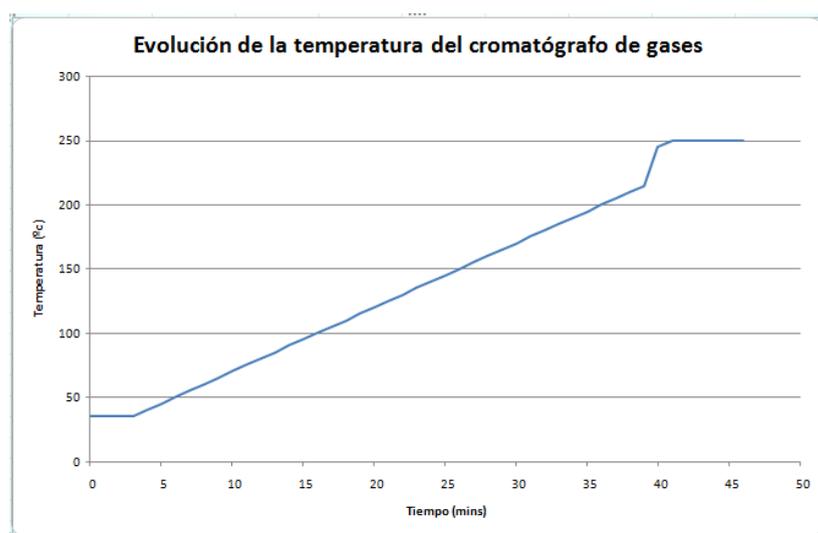


Figura 4. Gráfico Temperatura vs Tiempo del cromatógrafo durante los 46 minutos de extracción

III.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) utilizando Statgraphics Centurion XVIII para Windows para evaluar la influencia de la región de origen de la miel, en los distintos compuestos de la fracción volátil. El método empleado para realizar múltiples comparaciones fue el test LSD con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$. Además, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) mediante software estadístico XLSTAT para evaluar el efecto de la zona geográfica (regiones) en el perfil volátil de las mieles.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES

La primera etapa del presente trabajo se centró en el aprendizaje de utilización del equipo cromatográfico (GC-MS) y del programa MassHunter (Unknown), encargado de procesar la información recogida tras el análisis de cada una de las muestras objeto de estudio. La identificación de los distintos compuestos de la fracción volátil se realizó en primer lugar comparando los picos cromatográficos de las muestras analizadas, con las distintas alternativas proporcionadas por el programa (Alternate HITS) así como los espectros de masas de cada compuesto, con los espectros disponibles en la base de datos del propio equipo (librería NIST 17.L, National Institute of Standards and Technology). Al mismo tiempo, se realizó una comparación con datos bibliográficos, puesto que un mismo compuesto químico puede tener diversos nombres, como sucedió con los isómeros del lilac aldehyde A, B, C y D. El mismo caso se dio con el 1,3-cyclohexadiene-1-carboxaldehyde, 2,6,6-trimethyl-, también llamado safranal, y el benzenoacetic acid, que también tiene el nombre de phenylacetic acid. En este sentido, el número CAS, único para cada compuesto químico, fue de gran ayuda para su distinción e identificación.

Otra información proporcionada por el programa MassHunter que se tuvo en cuenta, fue el “Match Factor”, que indica el porcentaje de coincidencia entre el compuesto detectado y el de la librería NIST. Si bien un valor mayor indica mayor coincidencia, no es el único dato a considerar, por lo que en ocasiones fue necesario investigar las opciones proporcionadas por el programa, en el apartado de “ALTERNATE HITS” mencionado anteriormente. En ciertos casos, estas alternativas resultaron tener más lógica, por ser compuestos ampliamente reconocidos y propios de la miel (Figura 5). La Figura 5 muestra que el programa sugiere como alternativa el Trans-Linalool oxide, derivado del linalool, terpeno asociado a varias flores y compuesto encontrado en diversas ocasiones en la miel. Se optó por esta alternativa, en lugar de la primera opción (Ethyl 2-(5-methyl-5-vinyltetrahydrofuran-2-yl) propan-2-yl carbonate), considerando el porcentaje de coincidencia de 97.54, y la bibliografía consultada.

Compound Name	Match Factor	CAS#
Ethyl 2-(5-methyl-5-vinyltetrahydrofuran-2-yl)acetate	98.55	1000373-80-3
trans-Linalool oxide (furanoid)	97.54	34995-77-2
2-Furanmethanol, 5-ethenyltetrahydrofuran-2-yl	96.68	5989-33-3
.alpha.-Methyl-.alpha.-[4-methyl-3-penten-2-yl]acetate	95.71	1000132-13-0
cis-Linalooloxide	87.86	1000121-97-4
2-Furanmethanol, 5-ethenyltetrahydrofuran-2-yl	73.87	104188-13-8
1-Cyclopentene-1-methanol, 2-methyl-	72.32	80113-82-2
Spiro[2.4]heptane-5-methanol, 5-hydroxy-	71.56	109532-58-3
Cyclohexene, 3-acetoxy-4-(1-hydroxyethyl)-	69.98	1000196-01-7
1,3-Cyclohexanediol, 5-methyl-2-nitro-	69.73	114454-85-2
Verbenol	68.64	473-67-6
Lilac aldehyde D	67.97	53447-47-5
Lilac aldehyde C	67.70	53447-48-6
Linalool	65.88	78-70-6
Lilac aldehyde B	64.76	53447-45-3
Lilac aldehyde A	63.32	53447-46-4
Decanal	50.68	112-31-2
D-Limonene	45.41	5989-27-5
Dill ether	43.06	74410-10-9
Dill ether	43.06	74410-10-9

Figura 5. Ejemplo de los “Alternate HITS” proporcionados por el programa

En el proceso de identificación de compuestos, se descartaban algunos picos ya que por su forma eran considerados ruido del sistema y no se podían atribuir a ningún compuesto. Es decir, los picos irregulares no fueron clasificados como compuestos detectados (Figura 6.)

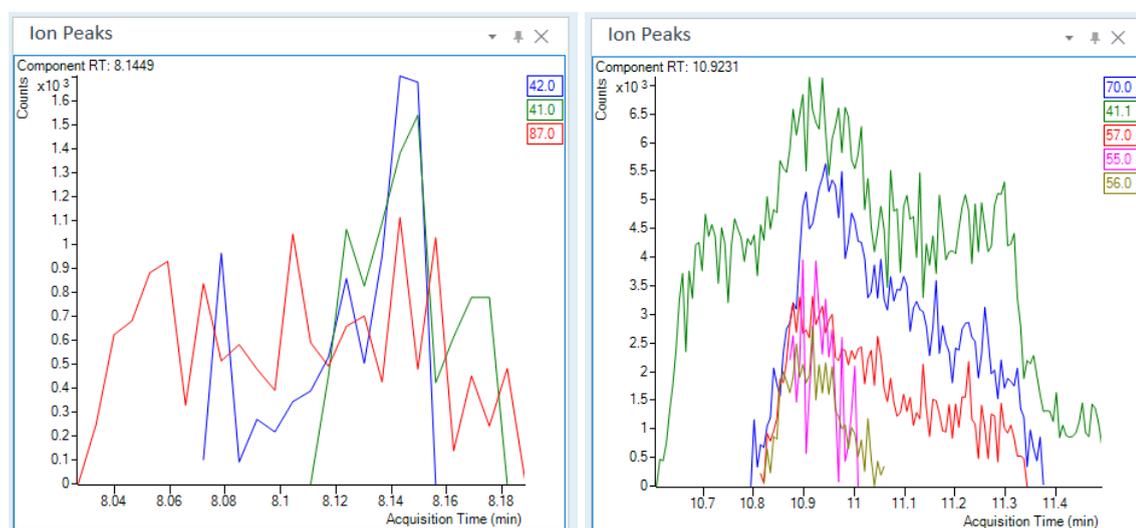


Figura 6. Ejemplo de picos no considerados compuestos

Los picos que se asociaron a compuestos volátiles, fueron aquellos que tenían una forma definida, que coincidiese entre los compuestos de todas las muestras en las que se identificaron (Figura 7). Podían presentar forma gaussiana o no gaussiana. Fue necesario tener en cuenta que algunos de los compuestos identificados, eran propios de la columna utilizada en la cromatografía, como el silanediol, y fueron descartados.

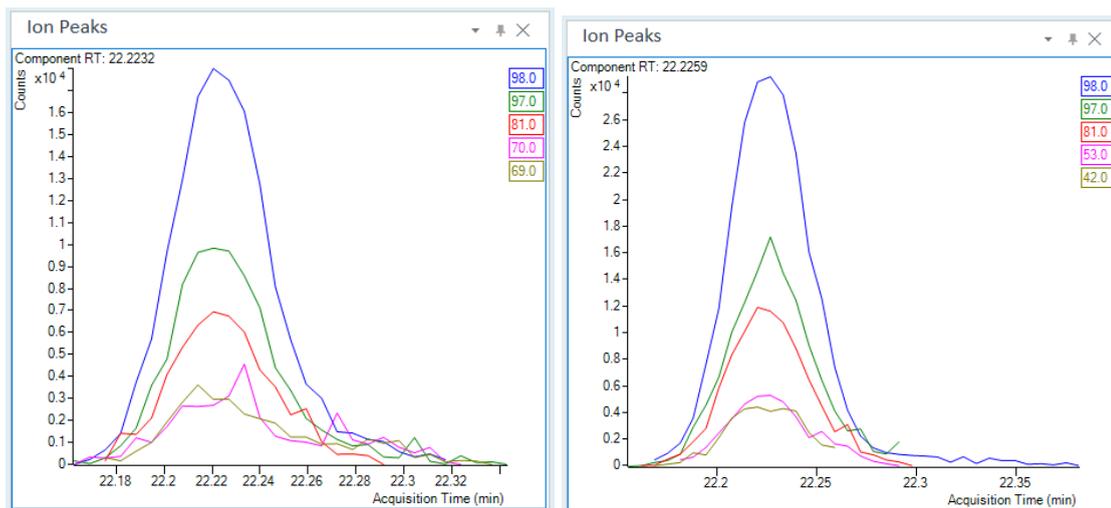


Figura 7. Ejemplo de picos considerados compuestos, correspondientes al 3-furanmethanol en 2 muestras distintas.

La Figura 8 muestra la información de una muestra proporcionada por el programa MassHunter, pudiendo observarse el Match Factor del 3-furanmethanol -87,1-.

Component RT	Compound Name	Match Factor	CAS#	Base Peak Area
18.8139	Benzaldehyde	93.5	100-52-7	75825.4
18.8265	(1H)Pyrrole-3-carbo...	73.9	26187-27-9	75743.4
19.2860	2,5-Dihydroxybenzal...	95.2	56114-69-3	70344.1
19.6390	1,5-Dimethyl-1-vinyl...	82.2	78-36-4	28186.9
20.0756	2-Furancarboxaldeh...	93.1	620-02-0	204185.0
20.5832	Isophorone	84.1	78-59-1	34399.2
21.6148	Benzeneacetaldehy...	96.1	122-78-1	250677.6
22.1061	Silanediol, dimethyl-	98.4	1066-42-8	1100023.3
22.2232	3-Furanmethanol	87.1	4412-91-3	56193.9
22.8120	Trisiloxane, octamet...	73.1	107-51-7	4149.3
22.8348	2,6,6-Trimethyl-2-cy...	83.8	1125-21-9	10654.2
23.5895	Ethanone, 1-(2-fura...	78.8	1192-62-7	10743.0
24.5284	Methyl 3-butynoate	73.8	32804-66-3	3564.0
26.2453	Furan, 3-phenyl-	81.4	13679-41-9	11582.0
26.4403	Phenol, 2-methoxy-	93.8	90-05-1	27966.1
26.8395	1,2-Ethanediol, 1,2-...	81.5	52340-78-0	6292.8
27.5508	1,5-Hexadiene, 3,3,...	74.9	1763-21-9	5620.4
27.5583	Phenylethyl Alcohol	97.8	60-12-8	119583.4
27.9951	Quinoline	82.3	91-22-5	11559.1
27.9954	Benzonitrile, 4-ethe...	74.4	3435-51-6	11946.3
29.3423	p-Cresol	77.9	106-44-5	11071.4
29.3433	1,2-Ethanediol, 1,2-...	82.2	52340-78-0	11052.1

Figura 8. Ejemplo de información proporcionada por MassHunter para una muestra, incluye; RT, nombre, Match Factor, Número CAS y Área de cada compuesto detectado.

Para asignar un compuesto a un pico, en paralelo a la observación de la relación de opciones dadas por MassHunter, se comparaban los espectros de masas de las distintas opciones con el del pico cromatográfico objeto. Para ello, se observaban las roturas que se producen a 70 eV. de la librería NIST, y las roturas identificadas por el propio espectrómetro de masas del pico.

En la Figura 9 se observa la similitud entre las roturas correspondientes a las masas 42, 53, 70, 81 y 98 para el 3-furanmetanol tanto en la muestra analizada como en la librería NIST.

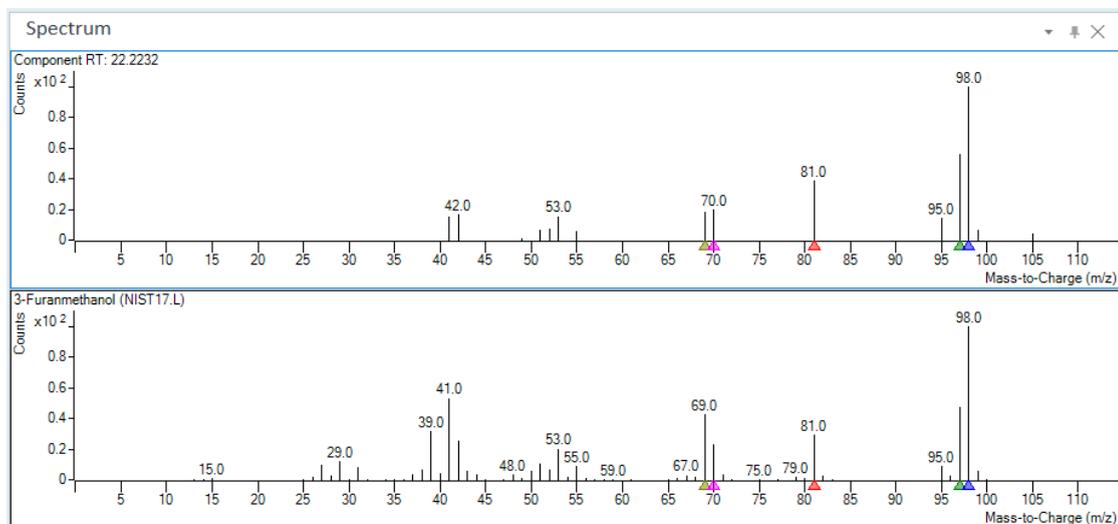


Figura 9. Ejemplo de espectro de masas considerado compuesto

La Figura 10 muestra las diferencias entre las roturas del difluorometano de la muestra y el de la NIST. Al no coincidir, a este compuesto no se le asignó el nombre sugerido por el programa.

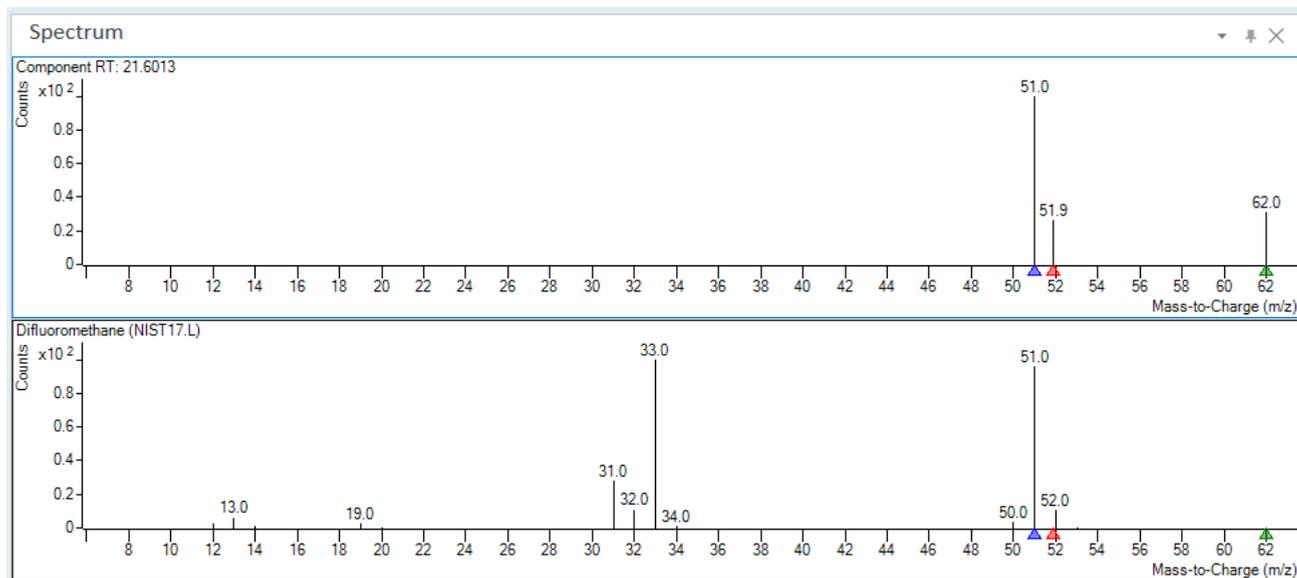


Figura 10. Ejemplo de espectro de masas no considerado compuesto

Con la finalidad de corroborar la asignación dada a cada compuesto, en paralelo, se calculaban también los índices de Kovats o Índices de retención de todos ellos. Para ello, se pincharon patrones de alcanos que se procesaron cromatográficamente en las mismas condiciones (Escriche et al., 2021). Estos índices permitieron esclarecer algunas dudas presentadas en las asignaciones dadas por la NIST, ya que en ocasiones asignan un mismo nombre a compuestos situados en tiempos de retención muy dispares. El d-limonene fue un ejemplo, ya que apareció a dos tiempos de retención distintos; 10.02 y 20.2, con unos IK de 1196 y 1572,5 respectivamente. Gracias a la bibliografía consultada, se supo que el verdadero d-limonene era el primero, ya que su índice de retención estaba comprendido en el intervalo de 1995-1999 para una columna DB-Wax (Stashenko & Martínez., 2010).

La ecuación 1 muestra la fórmula para la determinación del índice de Kovats, donde T_x es el tiempo de retención del compuesto “x”, y T_n y T_{n+1} son los tiempos de retención de n-alcanos (C8-C20) que eluyen anterior y posteriormente al compuesto “x”.

$$KI = 100 \times \frac{T_x - T_n}{T_{n+1} - T_n} \quad \text{Ecuación 1. Índice de Kovats}$$

La Tabla 1 muestra los Índices de Kovats, calculados para una columna DB WAX, de los 97 compuestos volátiles, ordenados por tiempo de retención (TR), y sus fórmulas moleculares. En los casos en los que se ha podido encontrar la equivalencia aromática de estos compuestos, también se ha incluido esta información en la tabla.

Tabla 1. Índices de Kovats, tiempo de retención (TR), fórmulas moleculares y definición de aroma de los compuestos volátiles identificados en la fracción volátil de las mieles de Mozambique.

COMPUESTOS	IK (DBWAX)	TR	FÓRMULA MOLECULAR	AROMA
1-Propanol, 2-methyl-	1178	8,21	C4H10O	Aromático, herbáceo, a alcanfor (e)
Pentane	1179	8,25	C5H12	-
3,4-Dimethyldihydrofuran-2,5-dione	1189	9,32	C6H8O3	-
D-Limonene	1196	10,02	C10H16	Cítrico, fresco, herbáceo (e)
Propanedinitrile, 2-(5-phenylthio-2-thienylmethylene)-	1198	10,07	C14H8N2S2	-
Furan	1199	10,32	C4H4O	-
1-Butanol, 2-methyl-	1215	10,89	C5H12O	Avinado, picante (a)
2-Propen-1-amine	1216	10,91	C3H7N	-
.alpha.-Phellandrene	1220	11,54	C10H16	Cítrico, a lima, herbáceo (e)
Benzeneacetic acid	1221	11,61	C8H8O2	A miel, floral, dulce (e)

Acetoin	1246	12,81	C4H8O2	A comida, a mantequilla, a leche (e)
2-Hexanol, 5-methyl-	1267	13,96	C7H16O	-
Propanoic acid, 2-hydroxy-, ethyl ester, (L)-	1273	14,46	C5H10O3	-
1-Hexanol	1280	14,81	C6H14O	Fruta, plátano, suave (a) Verde, balsámico (d), a resina, a flor, verde (f) a resina, floral, verde (g) balsámico, hierba aromática (h)
Acetone	1280	14,83	C3H6O	-
Alpha-pyrone-6-carboxylic acid	1282	14,94	C6H4O4	-
Nonanal	1295	15,65	C9H18O	Graso, cera, picante (a) floral, cítrico, a aceite, fresco (d,f,g) a aldehído, dulce, naranja (e) verde (g) a aldehído, a cítrico, floral, verde (h)
Octanoic acid, ethyl ester	1434	16,78	C10H20O2	Frutal, fresco, a piña (e)
Cis-Linalool Oxide	1449	17,05	C10H18O2	Dulce, floral (d) herbáceo, a tierra (e) floral (g)
Acetic acid	1457	17,21	C2H4O2	Avinado, vinagre (a) agrio (f)
Furfural	1464	17,43	C5H4O2	A comida, a pan, a café, galletas (b) A madera, dulce, a pan (c) dulce, frutal, a cereza (h) a almendra, dulce, a pan (i)
4-Octanone, 5-hydroxy-2,7-dimethyl-	1476	17,69	C10H20O2	-
trans-linalool oxide	1477	17,75	C10H18O2	Floral (c)
1-Hexanol, 2-ethyl-	1497	18,27	C8H18O	A aldehído, alcanfor, dulce (e)
1-Hydroxy-2-butanone	1498	18,28	C4H8O2	-
Decanal	1500	18,32	C10H20O	Frutal, cítrico, dulce, a aceite (d) naranja, verde, a aldehído (e)
Benzofuran	1497	18,39	C8H6O	-
Ethanone, 1-(2-furanyl)-	1505	18,47	C6H6O2	Goloso, dulce, a leche (e)
1,7,7-Trimethylbicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-one	1510	18,58	C10H14O	Herbáceo, a alcanfor, verde (e)
Benzaldehyde	1521	18,81	C7H6O	Floral, a rosa, dulce, a jacinto (d) frutal, a cereza, a almendra (e) azúcar quemado, a almendra (g) dulce, a almendra, a mazapán (h) a almendra, dulce, frutal (i)
2-Nonanol	1523	19,00	C9H20O	-
1-Nonanol	1527	19,01	C9H20O	Graso, rancio (a) limpio, floral, cítrico, a aceite (c), a aceite, verde (g) verde, dulce (h)
Lilac aldehyde A	1549	19,36	C10H16O2	-
2,3-Butanediol (l)	1549	19,52	C4H10O2	Frutal, cremoso, a mantequilla (e)

Linalool	1555	19,64	C10H18O	Floral, cítrico, naranja, limón (c y e) dulce , a lavanda, fresco(e) dulce, cítrico, geranio (h)
Lilac aldehyde B	1556	19,68	C10H16O2	-
Lilac aldehyde C	1559	19,89	C10H16O2	-
Cyclobutane, 1,2-diethyl-	1560	19,92	C8H16	-
1-Octanol	1561	19,93	C8H18O	Cítrico, verde, a aceite (e) a metal, a quemado (g)
Benzaldehyde, 2-hydroxy-5-methoxy-	1565	20,01	C8H8O3	-
2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-	1567	20,08	C6H6O2	-
1-Propanone, 1-(2-furanyl)-	1571	20,16	C7H8O2	-
3,5-Dihydroxybenzaldehyde	1577	20,19	C7H6O3	-
2,3-Butanediol II	1581	20,41	C4H10O2	Frutal, cremoso, a mantequilla (e)
Lilac aldehyde D	1583	20,45	C10H16O2	-
Benzofuran, 2-methyl-	1585,4	20,51	C9H8O	-
Isophorone	1594	20,58	C9H14O	Picante (h) a menta (i)
Benzonitrile	1595,7	20,76	C7H5N	Goloso, a almendra, a nuez (e)
(R)-3,5,5-Trimethylcyclohex-3-en-1-ol	1601	20,89	C9H16O	-
2(3H)-Furanone, dihydro-5-methyl-	1603	20,92	C5H8O2	-
Hotrienol	1610	21,09	C10H16O	Floral, a fruta (e) floral, fresco, frutal (i)
2-Imidazolidinone	1621	21,33	C3H6N2O	-
Benzeneacetaldehyde	1633	21,61	C8H8O	Dulce, floral, verde, a miel (c) floral, a jazmín, verde (e) áspero, verde, a miel (f)
Decanoic acid, ethyl ester	1637	21,71	C12H24O2	-
Safranal	1640	21,77	C10H14O	-
Acetophenone	1642	21,83	C8H8O	Floral, dulce (e) dulce, acre, a jazmín (i)
Ethanone,2-(formyloxy)-1-phenyl-	1640	21,85	C8H8O2	-
2-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-cyclohex-2-enone	1659	22,21	C9H14O2	-
3-Furanmethanol	1660	22,22	C5H6O2	-
Benzoic acid, ethyl ester	1661	22,24	C9H10O2	-
Cyclopentane, 1,1,3,4-tetramethyl-, cis-	1663	22,29	C9H18	-
Butanedioic acid, diethyl ester	1680	22,58	C8H14O4	Frutal, a manzana, a pera (e)

2,6,6-Trimethyl-2-cyclohexene-1,4-dione	1693	22,83	C9H12O2	Floral, cítrico, verde (e)
.alpha.-Terpineol	1696	23,05	C10H18O	Herbáceo, floral, a pino (e) verde, floral (i)
Ethanone, 1-(3-hydroxyphenyl)-	1697	23,06	C8H8O2	-
3-Furancarboxylic acid	1722	23,61	C5H4O3	-
4-Methyleneisophorone	1725	23,68	C10H14O	-
Benzaldehyde, 2,5-dimethyl-	1730	23,79	C9H10O	-
1, 1, 5-Trimethyl-1, 2-dihydronaphthalene	1736	23,92	C13H16	-
(3R,6S)-2,2,6-Trimethyl-6-vinyltetrahydro-2H-pyran-3-ol	1764	24,53	C10H18O2	-
Methyl salicylate	1767	24,59	C8H8O3	Menta, dulce, aromático (c) herbáceo, medicinal (e)
Oxime-, methoxy-phenyl-	1768	24,63	C8H9NO2	-
1,4-Cyclohexanedione, 2,2,6-trimethyl-	1778	24,75	C9H14O2	-
Benzeneacetic acid, ethyl ester	1781	24,90	C10H12O2	Frutal, a miel, a baya (e)
4,5-Octanediol, 2,7-dimethyl-	1784	24,98	C10H22O2	-
Lilac alcohol B	1788	25,05	C10H18O2	-
Benzoic acid, 2-hydroxy-, ethyl ester	1810	25,35	C9H10O3	Floral, frutal, dulce (e)
Acetic acid, 2-phenylethyl ester	1811	25,53	C10H12O2	Floral, a rosa, a miel (e)
Propane, 1-isocyanato-	1827	25,88	C4H7NO	-
Dodecanoic acid, ethyl ester	1841	26,17	C14H28O2	Floral, a aldehído, dulce (e)
Furan, 3-phenyl-	1853	26,25	C10H8O	-
Phenol, 2-methoxy-	1862	26,44	C7H8O2	Picante, a humo, a animal (e) a humo, dulce, medicinal (i)
Benzene, 1,4-dimethoxy-	1867	26,70	C8H10O2	Balsámico, a anís (e)
Benzyl Alcohol	1881	26,84	C7H8O	balsámico, frutal, floral (e) dulce, floral (g)
Phenylethyl Alcohol	1916	27,56	C8H10O	A rosa, floral, herbáceo (d) a miel, picante, a rosa (g) floral, a rosa, a miel (e)
Benzene, 1-isociano-3-methyl-	1918	27,74	C8H7NO	-
1H-Indene-4-carboxaldehyde, 2,3-dihydro-	1923	27,84	C10H10O	-
Quinoline	1931	28,00	C9H7N	-
2-Methoxy-5-methylphenol	1950	28,39	C8H10O2	-
2,5-Furandicarboxaldehyde	1976	28,78	C6H4O3	-

p-Cresol I	>2000	29,34	C7H8O	floral, a jazmín (e) medicinal, a humo (i)
Phenol	>2000	29,38	C6H6O	A animal, fenólico, seco (e)
p-Cresol II	>2000	30,84	C7H8O	floral, a jazmín (e) medicinal, a humo (i)
p-Cresol III	>2000	30,98	C7H8O	floral, a jazmín (e) medicinal, a humo (i)
2-Propenoic acid, 3-phenyl-, ethyl ester	>2000	31,72	C11H12O2	Picante, a canela, balsámico (e)
Ethyl linalool	>2000	32,05	C11H22O	Floral, fresco, a lavanda (e)
Phenol, 2,3,5-trimethyl-	>2000	35,93	C9H12O	-

(a) Reboredo, P (2015), (b) Osorio Monsalve et al., (2016), (c) Markes International (2021), (d) Min Zhu et al., (2022), (e) IFRA (2020), (f) Dong, L et al., (2015), (g) Zhu, J et al., (2016), (h) Manyi-Loh et al., (2011), (i) Castro-Vázquez et al., (2006).

En ANEXOS se adjunta un glosario de palabras clave para un mejor entendimiento del vocabulario utilizado para describir los aromas (Tabla 4) (IFRA, 2020).

IV.2 EFECTO DE LA ZONA GEOGRÁFICA EN LA COMPOSICIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES DE ORIGEN FLORAL

Se han identificado un total de 97 compuestos en la fracción volátil de las 63 muestras de miel de las 4 regiones muestreadas. Las áreas de los picos correspondientes a cada compuesto se dispusieron de forma adecuada, agrupadas por región para poder realizar el tratamiento estadístico, con el objetivo de comprobar el efecto de la región en su composición volátil. La Tabla 2 indica los resultados del ANOVA: los F-ratio y las diferencias significativas para el factor región y para el factor distrito, dentro de esa misma región, así como los valores máximos y mínimos del área del pico de cada compuesto.

IV.2.1 Efecto de la región en el perfil volátil

De los 97 compuestos identificados, 53 mostraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al factor “Región”, siendo los compuestos: 2,3-butanediol, phenol, p-cresol, benzeneacetaldehyde, cis-linalool oxide, acetoin y benzonitrile, algunos de los que presentaron un mayor F-ratio, y por tanto, mayor diferencia entre regiones. Todos ellos presentaron un p-valor <0,0001, equivalente a diferencia significativa del 99,9%.

El acetoin, por ejemplo, fue significativamente más abundante en la región de Manica (99,9%). Lo mismo sucede con el 2,3-butanediol II, en la región de Zambezia. Esto nos hace pensar que las mieles de Manica pueden presentar tonos aromáticos lácteos, ya que el acetoin se relaciona con el aroma a mantequilla y leche, y que las de Zambezia pueden tener tonos afrutados, ya que el 2,3-Butanediol está asociado con aroma frutal, atendiendo a la Tabla 1.

El compuesto cyclopentane, 1,1,3,4-tetramethyl-, cis-, fue únicamente detectado en la región de Sofala, así como el 1-octanol solo estuvo presente en las mieles de Nampula. Estas últimas podrían presentar un gusto a cítrico (Tabla 1).

Por otro lado, el benzyl alcohol no mostró diferencias significativas entre regiones.

La figura 11 muestra los intervalos LSD del ANOVA del benzoic acid, 2-hydroxy-, ethyl ester, ejemplo de compuesto que mostró diferencias significativas entre regiones. La figura 12 es un ejemplo de los diagramas Box-Whiskers del ANOVA para el acetic acid, 2-phenylethyl ester y el 2,5-furandicarboxaldehyde, que

mostraron diferencias significativas entre regiones. En contraposición, la figura 13 muestra los diagramas Box-Whiskers del (3R,6S)-2,2,6-trimethyl-6-vinyltetrahydro-2H-pyran-3-ol, y el 1-butanol, 2-methyl-, que no mostraron diferencias significativas entre regiones.

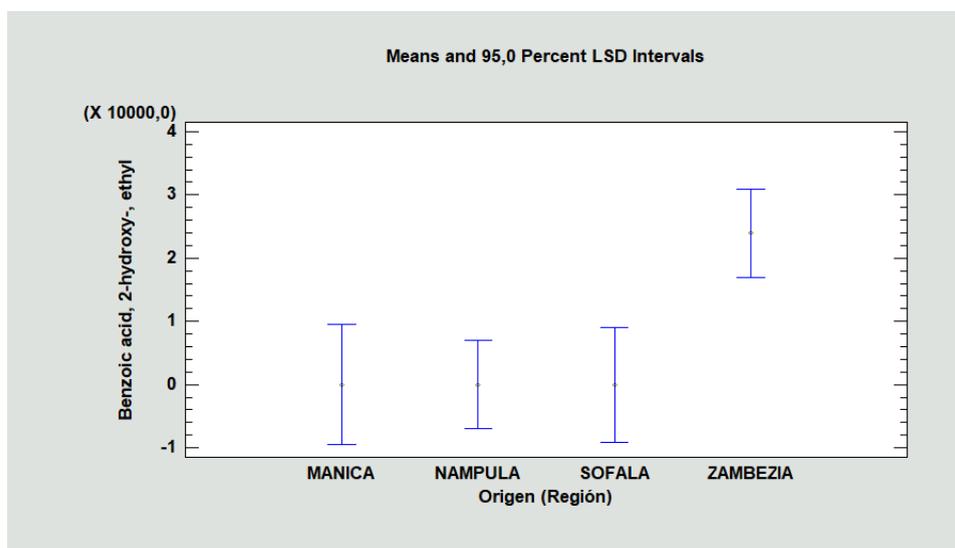


Figura 11. Ejemplo de intervalos LSD (Least significant difference) del ANOVA para un compuesto que mostró diferencias significativas entre regiones; $\alpha = 0.05$.

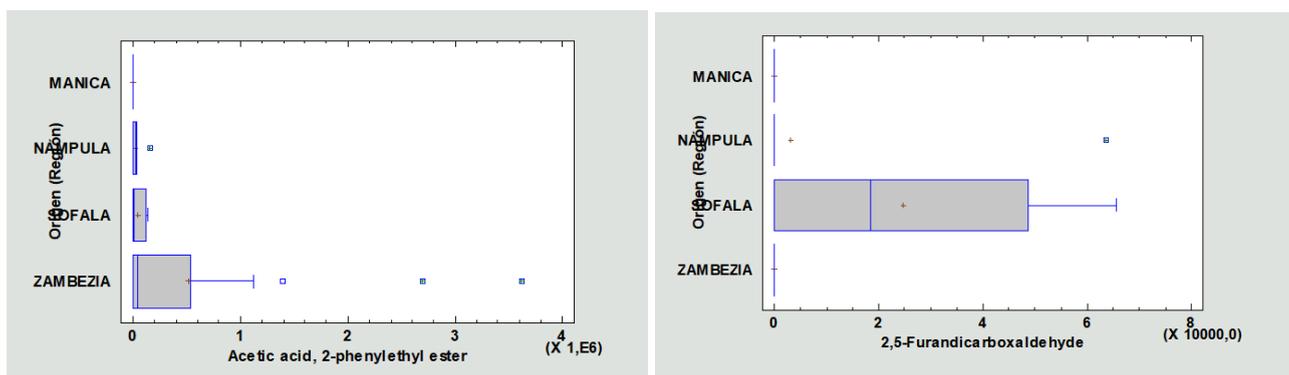


Figura 12. Ejemplo de diagramas Box-Whiskers del ANOVA de compuestos volátiles que mostraron diferencias significativas entre regiones.

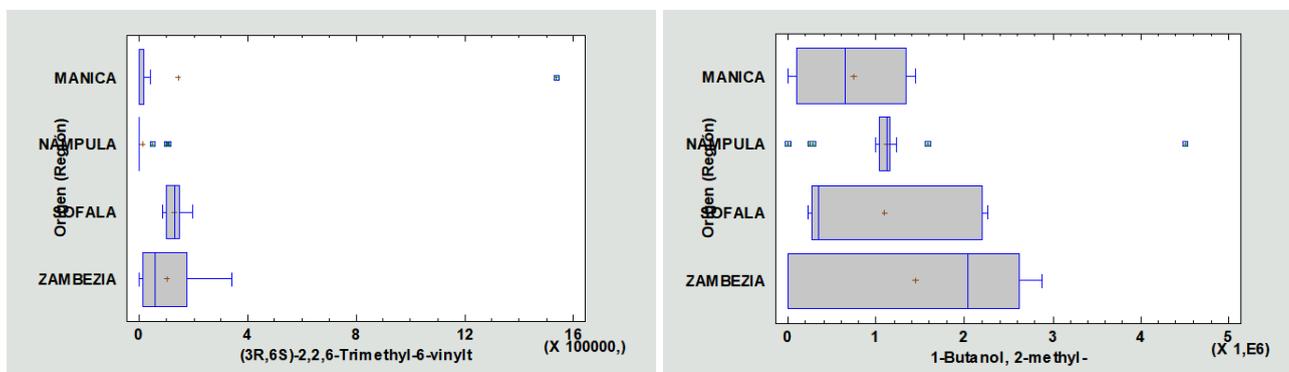


Figura 13. Ejemplo de diagramas Box-Whiskers del ANOVA de compuestos volátiles que no mostraron diferencias significativas entre regiones.

IV.2.2 Efecto del distrito en el perfil volátil

Además de evaluar el efecto de la región, se consideró interesante ver en cada región el efecto de los distritos, ya que estos correspondían a ubicaciones geográficas distintas. La tabla 2 muestra los resultados del ANOVA para el factor distrito. La región que mostró mayores diferencias entre distritos fue Zambezia, seguida de Sofala, Nampula y Manica, considerando el número de compuestos que mostraron diferencias significativas entre ellos: 40, 17, 11 y 10, respectivamente.

En la región de Zambezia, de los 40 compuestos significativos, 25 lo fueron al 99,9%, 11 al 99% y 4 al 90%. Las muestras del distrito de Gile fueron abundantes en terpenos como el linalool, cis-linalool oxide y trans-linalool oxide (99,9% de diferencia significativa). Estos 3 compuestos podrían aportar a esta miel tonos florales y dulces, ya que se relacionan con aroma a flor (Tabla 1). El safranal solo fue identificado en la miel de Mulevala, al igual que el (R)-3,5,5-trimethylcyclohex-3-en-1-ol, este último con una diferencia del 99%.

En Sofala, de los 17 compuestos significativos: 13 lo fueron al 90%, 4 al 99%, y ninguna al 99,9%. El 1H-indene-4-carboxaldehyde, 2,3-dihydro- solo estuvo presente en la miel de Maringue (90%).

En Nampula, fueron 11 los compuestos que presentaron diferencias significativas: 6 al 90%, 5 al 99%, y al igual que sucede en Sofala, 0 al 99,9%. El compuesto 1, 1, 5-trimethyl-1, 2-dihydronaphthalene, se asoció al distrito de Mecubiri (90%).

Para la región de Manica, únicamente 10 compuestos fueron significativos entre distritos, lo que demuestra cierta homogeneidad entre las mieles de las diferentes zonas de esta región: 6 al 90% (3-furancarboxylic acid; phenol, 2-methoxy-; 2-furancarboxaldehyde, 5-methyl-; furan, 3-phenyl-; 1-butanol, 2-methyl- y el linalool), 1 al 99% (3-furancarboxylic acid, solo presente en el distrito de Tambara) y 3 al 99,9% (2-methoxy-5-methylphenol, isophorone y quinoline, que no fueron detectados en ninguna muestra de Sussundenga).

Cabe destacar que algunos compuestos como el linalool, presentes en muchas flores y plantas, fue identificado en las mieles de todos los distritos de todas las regiones, si bien en diferentes concentraciones. De la misma manera, el benzaldehyde y el 1-hexanol también fueron identificados en todos los distritos. Algunos autores proponen al 1-hexanol como marcador de la miel de lavanda (Escriche et al., 2017).

La figura 14 muestra como ejemplo los diagramas Box-Whiskers del ANOVA de compuestos que mostraron diferencias significativas entre los distritos de Sofala. Por otro lado, en la figura 15 se observan 2 diagramas Box-Whiskers de compuestos que no mostraron diferencias significativas entre distritos para la misma región.

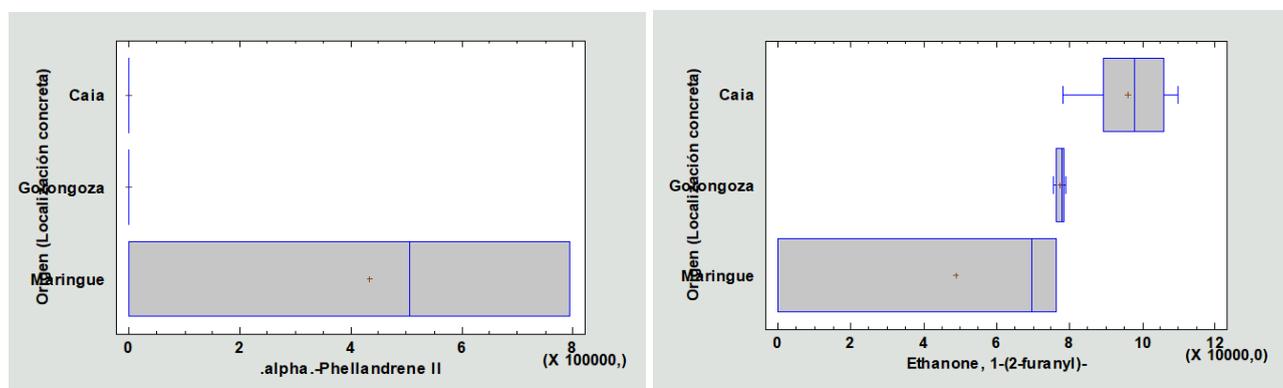


Figura 14. Ejemplo de diagramas Box-Whiskers del ANOVA de compuestos volátiles que mostraron diferencias significativas entre distritos.

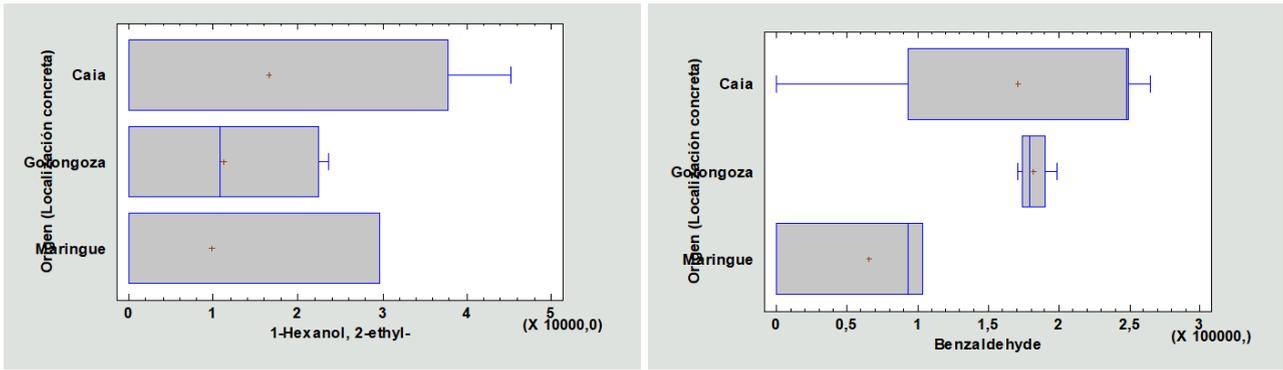


Figura 15. Ejemplo de diagramas Box-Whiskers del ANOVA de compuestos volátiles que no mostraron diferencias significativas entre distritos.

Tabla 2. Compuestos volátiles identificados por SPME-GC-MS en las 4 regiones de Mozambique, agrupados por familia química ordenada alfabéticamente, y ordenados por tiempo de retención dentro de dicha familia. Los resultados están expresados en área (potencias de 10^4) (valores máximos y mínimos); nd=no detectado. Está incluido el resultado del ANOVA para el factor región y distrito (F-ratio y P-value); significación: *p<0.01; **p<0.01; ***p<0.001; ns= no significativo. Las letras (a,b,c) indican los grupos homogéneos del ANOVA.

	MANICA			F-Ratio (distrito)	ZAMBEZIA				F-Ratio (distrito)	SOFALA			F-Ratio (distrito)	NAMPULA			F-Ratio (distrito)	F-Ratio (regiones)
	Manica	Susundenga	Tambara		Alto Molocue	Gile	Mocubela	Mulevala		Gorongonza	Maringue	Caia		Angoche	Mogincual	Mecuburi		
	n=3	n=5	n=3		n=5	n=5	n=5	n=5		n=4	n=3	n=5		n=9	n=6	n=5		
COMPUESTOS	Max-Min	Max-Min	Max-Min		Max-Min	Max-Min	Max-Min	Max-Min		Max-Min	Max-Min	Max-Min		Max-Min	Max-Min	Max-Min		
ÁCIDOS																		
Benzeneacetic acid	nd	nd	nd	ns	nd	(nd-11.9)a	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	ns
Propanoic acid, 2-hydroxy-, ethyl ester, (L)-	nd	nd	nd	ns	(nd-34.1)a	(nd-22.3)a	(151-252)b	(nd-13.7)a	118.2***	nd	(nd-29.5)a	(nd-29.2)a	ns	nd	nd	nd	ns	4.7**
Alpha-pyrone-6-carboxylic acid	nd	nd	nd	ns	nd	(nd-5.3)a	(13.3-21.3)b	nd	59.6***	nd	(nd-0.7)a	nd	ns	(nd-5.8)a	(nd-1.6)a	nd	ns	6.1**
Acetic acid	(nd-1.7)ab	nd	(nd-3.8)b	ns	(nd-3)a	nd	(nd-5.3)a	(nd-5.1)a	ns	(nd-2.7)a	nd	(nd-3.9)a	ns	(nd-3.8)a	(nd-6.5)a	(nd-6.7)b	10**	ns
3-Furancarboxylic acid	nd	nd	(nd-1.4)b	5.8*	nd	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	(nd-1)a	(nd-1)a	nd	ns	ns
ALCOHOLES																		
1-Propanol, 2-methyl-	(nd-18)a	(nd-3.1)a	(nd-13.6)a	ns	(nd-68)a	(38-146)b	(72-209)b	(13-127)ab	5*	(nd-2)a	(nd-99)a	(nd-99)a	ns	(nd-219)b	(17.2-62.5)ab	(nd-20.3)a	ns	6.2**
2-Hexanol, 5-methyl-	(nd-4.7)a	(nd-33.5)a	nd	ns	(10-18.7)b	nd	nd	(nd-3.1)a	64.5***	(nd-10.7)a	nd	(nd-15.5)a	ns	(nd-8.6)a	(nd-7.9)a	(nd-10.4)a	ns	ns
1-Hexanol	(nd-3.9)a	(nd-21.3)a	(4.2-4.9)a	ns	(nd-4)a	(nd-9.3)a	(nd-6.5)a	(nd-5.2)a	ns	(nd-2)a	(9.4-11.8)b	(nd-13)ab	4.7*	(nd-7)b	(5.6-6.6)b	(nd-5)a	3.7*	ns
1-Hexanol, 2-ethyl-	nd	(nd-4.3)a	nd	ns	nd	nd	(nd-15)a	(nd-2)a	ns	(nd-2.4)a	(nd-3)a	(nd-4.5)a	ns	(nd-14)a	(nd-1.9)a	nd	ns	ns
2-Nonanol	nd	(nd-3.2)a	nd	ns	(nd-3.1)a	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	(nd-2.6)a	(nd-2.3)a	(nd-4.7)a	ns	ns
1-Nonanol	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	(nd-0.7)a	(nd-0.7)a	nd	ns	ns
2,3-Butanediol (I)	(nd-14.7)a	(nd-141)a	nd	ns	(nd-16.2)a	(nd-18.4)a	(nd-37.6)a	(4.5-79)b	5.7**	nd	nd	nd	ns	(nd-8)a	(nd-2.6)a	nd	ns	4*
1-Octanol	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	(nd-2)a	(nd-1.2)a	nd	ns	ns
2,3-Butanediol II	(nd-44)a	(nd-158)a	nd	ns	(7.7-42.3)a	(26-39.5)a	(56-106)a	(10.8-248)b	6**	(nd-2.6)a	(7-9.2)b	(nd-10)ab	5*	(5.1-34)a	(nd-6.7)a	(nd-9)a	ns	8.3***
(R)-3,5,5-Trimethylcyclohex-3-en-1-ol	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	(nd-8.4)b	5.9**	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	ns
(3R,6S)-2,2,6-Trimethyl-6-vinyltetrahydro-2H-pyran-3-ol	nd	(nd-154)a	nd	ns	(nd-1.3)a	(28-34)c	(4.4-6.6)b	(1.6-6.9)b	278***	(8.4-10)a	(12.5-14)b	(12-20)b	9**	(nd-4.6)a	nd	(nd-10.6)b	ns	ns
4,5-Octanediol, 2,7-dimethyl-	nd	(nd-5)a	nd	ns	nd	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	3.6*
Lilac alcohol B	nd	(nd-14.9)a	nd	ns	nd	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	ns
Phenol, 2-methoxy-	(2.6-2.8)ab	(nd-3.2)a	(3.4-3.8)b	5.3*	(1-3.6)ab	(2.7-4)b	(5-7.3)c	(nd-2.8)a	21***	(1.4-2.2)a	(6.4-7.8)b	(1.7-7.9)ab	6*	(1.5-3.4)a	(2.9-3.1)a	(1.7-22.6)a	ns	ns

Continuación **Tabla 2.**

	MANICA			F-Ratio (distrito)	ZAMBEZIA				F-Ratio (distrito)	SOFALA			F-Ratio (distrito)	NAMPULA			F-Ratio (distrito)	F-Ratio (regiones)
	Manica	Susundenga	Tambara		Alto Molocue	Gile	Mocubela	Mulevala		Gorongonza	Maringue	Caia		Angoche	Mogincual	Mecuburi		
	n=3	n=5	n=3		n=5	n=5	n=5	n=5		n=4	n=3	n=5		n=9	n=6	n=5		
ALCOHOLES (Continuación)	Max-Min	Max-Min	Max-Min		Max-Min	Max-Min	Max-Min	Max-Min		Max-Min	Max-Min	Max-Min		Max-Min	Max-Min	Max-Min		
Benzyl Alcohol	(nd-0.6)a	(1.9-47.6)a	(0.6-0.8)a	ns	(1.4-2.2)a	(nd-3.1)a	(2.3-3.6)a	(nd-3.4)a	ns	(2.4-2.7)a	(1.4-1.8)a	(1.7-4.6)a	ns	(0.7-3.5)a	(1.5-1.8)a	(1.3-3)a	ns	ns
Phenylethyl Alcohol	(4.2-12)ab	(8.5-47)b	(4-4.9)a	ns	(15-54)a	(136-193)c	(79-115)b	(3-20.6)a	72***	(261-297)ab	(91.6-106)a	(113-469)b	ns	(20.9-220)a	(33.4-37.8)a	(14.8-302)a	ns	16.4***
2-Methoxy-5-methylphenol	(nd-0.5)a	nd	(0.9-1)b	52.5***	(nd-2.1)ab	nd	(nd-3.2)b	(nd-2.2)ab	ns	(nd-1)a	(3.3-4)b	(nd-4)ab	6.8*	(nd-1.55)a	(nd-1.31)a	(nd-4.9)a	ns	3.6*
p-Cresol I	(1.1-2.3)a	(nd-2.8)a	(1-1.2)a	ns	(nd-1.6)a	(nd-1)a	(2.01-2.88)b	(nd-1.76)a	11.2***	(1.8-2.5)a	(nd-3)a	(nd-3.2)a	ns	(nd-2.3)a	(nd-2.2)a	(1.8-3.1)a	ns	4.7**
Phenol	(7.7-11)a	(5.5-13)a	(8.3-11)a	ns	(4.9-9.9)a	(6.8-8.2)a	(11.7-16)c	(7.2-11.6)b	13.5***	(5.9-6.8)a	(9-10.6)b	(7-13.5)ab	ns	(23-4)b	(36-41.7)b	(6.8-36)a	9.5**	53.6***
p-Cresol II	(1-2.2)a	(0.7-2)a	(1.1-1.2)a	ns	(0.5-2)b	nd	(nd-3.2)b	(nd-1.4)ab	ns	(1.3-2)a	(nd-2.2)a	(1.9-2.7)a	ns	(nd-1.6)a	(nd-1.4)a	(1.2-2.1)a	ns	4.7**
p-Cresol III	(0.9-1.5)a	(nd-1.8)a	(1-1.1)a	ns	nd	nd	(nd-1.6)a	(nd-1)a	ns	(1.3-1.7)a	(1.9-2.3)b	(1.8-2.4)b	13.6**	(nd-1)a	(nd-0.9)a	(0.7-1.8)b	7.4**	25.8***
Phenol, 2,3,5-trimethyl-	(nd-1.2)a	(nd-1.9)a	nd	ns	nd	nd	(nd-11.5)a	(nd-34)b	7.5**	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	3.4*
ALDEHÍDOS																		
Nonanal	(nd-4.8)a	(nd-11.1)a	(3.9-5.4)a	ns	(nd-3.7)a	nd	(nd-23.4)b	(nd-4.1)a	ns	(4.3-5.3)b	nd	(nd-7.2)a	ns	(nd-2.1)a	nd	(nd-4.5)a	ns	ns
Furfural	(11.7-24)a	(10.8-414)a	(19.5-21.8)a	ns	(nd-7.2)a	(nd-5.7)a	(46-90.5)c	(15.3-37)b	31.2***	(150-173)b	(20.2-23.1)a	(22.2-239)b	ns	(18.1-24.5)a	(17.4-22.4)a	(17-171)b	4.8*	5.6**
Decanal	nd	(nd-8.4)a	nd	ns	nd	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	ns
Benzaldehyde	(7.6-12.5)a	(6.7-199)a	(5.8-6.3)a	ns	(4.4-14)a	(nd-5.9)a	(16-34)b	(nd-25.7)a	6.2**	(17.1-19.9)a	(nd-10.4)a	(nd-26.5)a	ns	(11.2-29.9)a	(13.6-18.5)a	(13.1-22.1)a	ns	3.5*
Lilac aldehyde A	nd	(nd-2.2)a	nd	ns	(nd-2)a	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	ns
Lilac aldehyde B	nd	(nd-98)a	nd	ns	(nd-3)b	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	ns
Lilac aldehyde C	nd	(nd-95.6)a	nd	ns	(nd-1.8)b	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	ns
Benzaldehyde, 2-hydroxy-5-methoxy-	nd	nd	nd	ns	nd	nd	(nd-36.5)a	(nd-125)b	5.3**	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	2.9*
3,5-Dihydroxybenzaldehyde	nd	nd	nd	ns	nd	(nd-1.8)a	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	ns
Lilac aldehyde D	nd	(nd-82.3)a	nd	ns	(nd-2.6)a	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	ns
Benzeneacetaldehyde	(25-107)a	(10.1-59.8)a	(26.8-33.1)a	ns	(14-100)b	(nd-8.7)a	(14.3-29.4)a	(nd-3.8)a	7.5**	(95.8-101)b	(32.7-50.2)a	(50.1-131)b	ns	(67.7-138)a	(97.7-136)a	(77.2-107)a	ns	39.5***
Benzaldehyde, 2,5-dimethyl-	nd	(nd-0.6)a	nd	ns	(nd-0.5)a	nd	nd	(nd-0.7)a	ns	nd	nd	nd	ns	(nd-0.84)a	(nd-0.6)a	(nd-0.6)a	ns	ns
1H-Indene-4-carboxaldehyde, 2,3-dihydro-	nd	nd	nd	ns	(nd-0.9)a	nd	(nd-0.5)a	nd	ns	nd	(nd-0.5)b	nd	6.7*	(nd-0.5)a	(nd-0.4)a	nd	ns	ns

Continuación **Tabla 2.**

	MANICA			F-Ratio (distrito)	ZAMBEZIA				F-Ratio (distrito)	SOFALA			F-Ratio (distrito)	NAMPULA			F-Ratio (distrito)	F-Ratio (regiones)
	Manica	Susundenga	Tambara		Alto Molocue	Gile	Mocubela	Mulevala		Gorongonza	Maringue	Caia		Angoche	Mogincual	Mecuburi		
	n=3	n=5	n=3		n=5	n=5	n=5	n=5		n=4	n=3	n=5		n=9	n=6	n=5		
CETONAS	Max-Min	Max-Min	Max-Min		Max-Min	Max-Min	Max-Min	Max-Min		Max-Min	Max-Min	Max-Min		Max-Min	Max-Min	Max-Min		
Acetoin	(nd-17.5)ab	(nd-155)b	nd	ns	(nd-20)b	nd	nd	nd	ns	(nd-2.7)a	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	7.9***
Acetone	nd	(nd-13.9)a	nd	ns	nd	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	ns
4-Octanone, 5-hydroxy-2,7-dimethyl- 1-Hydroxy-2-butanone	nd	(nd-8.1)a	nd	ns	nd	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	5.9**
Ethanone, 1-(2-furanyl)- 1,7,7-Trimethylbicyclo[2.2.1]hept-5-en-2	(nd-2.2)a	(nd-17)a	(nd-1.6)a	ns	(nd-1.7)a	(nd-4.4)ab	(8.2-9.9)c	(nd-7)b	17.1***	(7.6-7.9)ab	(nd-7.7)a	(7.8-11)b	4.5*	(4.5-25.6)a	(6.9-7.8)a	(5.8-8.6)a	ns	5.6**
1-Propanone, 1-(2-furanyl)-	nd	nd	nd	ns	nd	nd	(nd-6.4)b	(nd-1.6)	5*	nd	nd	nd	ns	(nd-0.8)ab	(nd-0.9)b	nd	ns	2.8*
Isophorone	(3.4-6)c	nd	(3.5-3.6)b	49.9***	(7-14.4)a	nd	(nd-126)a	(4.7-380)b	8.8**	nd	nd	nd	ns	(nd-3.6)a	(nd-3.5)a	(nd-2.9)a	ns	3.9*
2-Imidazolidinone	nd	nd	nd	ns	(nd-0.6)a	nd	(nd-1.8)b	(nd-1.3)ab	ns	(nd-0.9)a	nd	(nd-1.6)a	ns	(nd-0.7)a	(nd-0.7)ab	(nd-1)b	ns	ns
Acetophenone	nd	nd	nd	ns	(nd-1.2)a	nd	nd	(nd-0.6)a	ns	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	ns
Ethanone,2-(formyloxy)-1-phenyl-	(nd-1.2)a	nd-1	(nd-0.6)a	ns	nd	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	5.6**
2-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-cyclohex-2-en one	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	(nd-25.6)b	6**	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	ns
2,6,6-Trimethyl-2-cyclohexene-1,4-dione	(1.07-3.2)a	(nd-6.8)a	(nd-1.4)a	ns	(nd-1)a	nd	(nd-71)a	(nd-186)b	ns	nd	(nd-0.8)a	(nd-1.2)a	ns	(nd-1)a	(nd-1)a	(nd-87.4)a	ns	3.7*
Ethanone, 1-(3-hydroxyphenyl)-	nd	(nd-0.7)a	(nd-0.3)a	ns	nd	nd	nd	nd	ns	(nd-0.53)a	nd	(nd-0.81)a	ns	nd	nd	(nd-0.6)a	ns	ns
4-Methyleneisophorone	nd	(nd-0.3)a	nd	ns	(nd-0.6)a	nd	(nd-13.3)a	(0.8-53)b	9**	nd	nd	nd	ns	(nd-0.7)a	(nd-0.6)a	(nd-0.5)a	ns	3.4*
1,4-Cyclohexanedione, 2,2,6-trimethyl-	nd	(nd-0.5)a	nd	ns	nd	nd	(nd-3.3)a	(1.5-9.3)b	13***	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	4*
COMPUESTOS NITROGENADOS																		
Propanedinitrile, 2-(5-phenylthio-2-thienylmethylene)-	nd	nd	nd	ns	nd	(nd-16.1)a	nd	nd	ns	(nd-1.11)a	nd	nd	ns	(nd-6.2)a	(nd-2.7)a	(nd-3.2)a	ns	ns
2-Propen-1-amine	(nd-112)a	(nd-43.5)a	nd	ns	nd	(nd-178)ab	(nd-208)b	(nd-219)ab	ns	nd	(nd-181)b	(nd-21.4)a	6.4*	nd	(nd-82.5)b	(nd-73.4)ab	ns	ns
Benzonitrile	(nd-1)a	(nd-1.7)a	nd	ns	nd	(nd-0.6)a	nd	(nd-0.7)a	ns	nd	nd	nd	ns	(nd-2.5)a	(1.9-2.1)a	(nd-2)a	ns	23.9***
Oxime-, methoxy-phenyl-	nd	(nd-75.8)a	(0.7-1.4)b	8.8**	(nd-1)a	(nd-1.5)a	(nd-1.4)a	(nd-0.9)a	ns	(0.6-0.7)a	(0.7-0.8)a	(nd-1)a	ns	(nd-0.8)a	(nd-0.8)a	(nd-0.8)a	ns	2.8*

Continuación **Tabla 2.**

	MANICA			F-Ratio (distrito)	ZAMBEZIA				F-Ratio (distrito)	SOFALA			F-Ratio (distrito)	NAMPULA			F-Ratio (distrito)	F-Ratio (regiones)
	Manica	Susundenga	Tambara		Alto Molocue	Gile	Mocubela	Mulevala		Gorongonza	Maringue	Caia		Angoche	Mogincual	Mecuburi		
	n=3	n=5	n=3		n=5	n=5	n=5	n=5		n=4	n=3	n=5		n=9	n=6	n=5		
COMPUESTOS NITROGENADOS (Continuación)	Max-Min	Max-Min	Max-Min		Max-Min	Max-Min	Max-Min	Max-Min		Max-Min	Max-Min	Max-Min		Max-Min	Max-Min	Max-Min		
Propane, 1-isocyanato-	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	(nd-1.5)a	(nd-1.53)a	nd	ns	3*
Benzene, 1-isociano-3-methyl-	(nd-2.8)a	(nd-2.5)a	nd	ns	(0.9-2.8)b	nd	nd	nd	29****	(nd-0.4)a	nd	(nd-0.8)a	ns	(0.4-1)b	(0.7-0.8)b	(nd-0.7)a	5.1*	ns
Quinoline	(nd-1.2)a	nd	(1.6-2)b	27.8****	nd	nd	nd	nd	ns	nd	(nd-0.8)a	(nd-1)a	ns	nd	nd	nd	ns	6.9****
ESTERES																		
Octanoic acid, ethyl ester	nd	nd	nd	ns	nd	(nd-0.3)ab	(nd-22.7)b	nd	ns	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	4.6**
Decanoic acid, ethyl ester	nd	nd	nd	ns	nd	(nd-8.5)b	(nd-0.9)a	nd	7.4**	nd	nd	nd	ns	(nd-3.4)a	nd	nd	ns	ns
Benzoic acid, ethyl ester	nd	(nd-1.8)a	nd	ns	(nd-5.9)a	(55.7-133)b	(12.4-20.3)a	(nd-3)a	32.5****	nd	(5.2-6.6)b	(nd-7.3)ab	5.2*	(nd-10)a	(nd-3.6)a	(nd-3.6)a	ns	5.7**
Butanedioic acid, diethyl ester (Diethyl succinate)	nd	nd	nd	ns	nd	(7.6-13.9)a	(nd-80.2)b	(nd-1.6)a	10.5****	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	5.2**
Methyl salicylate	(nd-0.5)a	nd	nd	ns	(nd-0.7)a	(nd-1.2)a	(3.9-7.5)b	nd	74.5****	(nd-0.5)a	nd	nd	ns	nd	nd	(nd-4.2)a	ns	4.1*
Benzeneacetic acid, ethyl ester	nd	nd	nd	ns	(nd-5.3)a	13.6-29.4)c	(33.6-63.3)c	(nd-3)a	52.3****	nd	(6.5-6.9)b	(nd-8)ab	5*	(8-114)a	(10-11.7)a	(nd-9.9)a	ns	3.3*
Benzoic acid, 2-hydroxy-, ethyl ester	nd	nd	nd	ns	nd	(nd-10)a	(4.99-10.6)b	nd	10.5****	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	5.3**
Acetic acid, 2-phenylethyl ester	nd	nd	nd	ns	(nd-4.8)a	(91.7-362)b	(nd-4.8)a	(nd-15.6)a	13.4****	(nd-1)a	(6-12.9)b	(nd-12.3)ab	ns	(nd-14.9)a	(nd-3.4)a	(nd-2.5)a	ns	3.4*
Dodecanoic acid, ethyl ester	nd	nd	nd	ns	nd	(nd-3.7)b	(nd-0.9)a	nd	10.4****	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	3.6*
2-Propenoic acid, 3-phenyl-, ethyl ester	nd	nd	nd	ns	nd	nd	(nd-4.6)a	(nd-8)b	4.2*	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	3.4*
ÉTERES																		
Benzene, 1,4-dimethoxy-	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	nd	ns	nd	nd	(nd-0.8)a	ns	nd	nd	(nd-1.4)a	ns	ns
FURANOS																		
3,4-Dimethylidihydrofuran-2,5-dione	(nd-1.5)a	nd	(nd-7.2)a	ns	(nd-19.4)ab	(nd-20.6)a	(nd-28.5)b	(nd-20.6)a	ns	nd	(nd-15.8)a	(nd-7.1)a	ns	(nd-4.1)a	nd	(nd-9.3)a	ns	6.3****
Furan	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	(nd-91.6)a	ns	nd	nd	nd	ns	(nd-101)a	nd	nd	ns	ns
Benzofuran	(nd-1.6)a	(nd-1.5)a	nd	ns	nd	nd	nd	nd	ns	nd	nd	(nd-1.8)a	ns	(nd-1.8)ab	(nd-1.6)b	nd	ns	3.7*
2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-	(nd-20.4)a	(nd-8.3)a	(19.4-20.3)b	7.4*	nd	nd	nd	(nd-31.4)a	ns	(7-8)b	nd	(nd-11.5)ab	ns	(3.7-9.1)a	(5.7-9.4)a	(1.6-8.3)a	ns	ns

Continuación **Tabla 2.**

	MANICA			F-Ratio (distrito)	ZAMBEZIA				F-Ratio (distrito)	SOFALA			F-Ratio (distrito)	NAMPULA			F-Ratio (distrito)	F-Ratio (regiones)
	Manica	Susundenga	Tambara		Alto Molocue	Gile	Mocubela	Mulevala		Gorongonza	Maringue	Caia		Angoche	Mogincual	Mecuburi		
	n=3	n=5	n=3		n=5	n=5	n=5	n=5		n=4	n=3	n=5		n=9	n=6	n=5		
	Max-Min	Max-Min	Max-Min		Max-Min	Max-Min	Max-Min	Max-Min		Max-Min	Max-Min	Max-Min		Max-Min	Max-Min	Max-Min		
FURANOS (Continuación)																		
Benzofuran, 2-methyl-	nd	(nd-0.8)a	nd	ns	nd	nd	nd	nd	ns	(nd-0.8)a	nd	(nd-1)a	ns	(nd-0.51)a	nd	nd	ns	4.2**
2(3H)-Furanone, dihydro-5-methyl-	nd	nd	nd	ns	(nd-1.2)a	nd	(nd-3.8)a	(nd-0.5)a	ns	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	2.9*
3-Furanmethanol	(nd-5.6)a	(nd-7.6)a	(5.8-6.4)a	ns	nd	nd	(nd-0.5)b	(nd-25.6)b	5.2*	(3.9-4.7)a	(9.9-11.7)b	(6.4-12.5)b	9.9**	(5.9-10.7)b	(8.3-9)b	(1.6-7.8)a	9.9**	ns
Furan, 3-phenyl-	(nd-1.2)a	(nd-0.6)a	(1-1.4)b	7.3*	(nd-1)a	nd	nd	(nd-0.9)a	ns	(nd-0.5)a	(nd-0.6)a	(nd-0.6)a	ns	(1-1.6)b	(1.3-1.6)b	(nd-1.4)a	9.2**	18.9***
2,5-Furandicarboxaldehyde	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	nd	ns	(3.7-5.2)b	nd	(nd-6.5)ab	ns	nd	nd	(nd-6.3)a	ns	9***
HIDROCARBUROS																		
Pentane	nd	nd	(nd-0.7)a	ns	(nd-11)a	nd	nd	nd	ns	nd	(nd-50.7)a	(nd-95.8)a	ns	(nd-19.5)a	nd	nd	ns	ns
1-Butanol, 2-methyl-	(nd-127)a	(10.2-94.7)a	(134-145)b	5*	(nd-72.4)a	(nd-238)b	(nd-274)b	(66.4-288)b	4*	(22.1-29.7)a	(220-227)b	(24.2-226)ab	6.7*	(nd-451)a	(109-116)a	(nd-114)a	ns	ns
Cyclobutane, 1,2-diethyl-	nd	(nd-0.4)a	nd	ns	nd	nd	(nd-1.4)a	nd	ns	nd	(0.5-0.6)b	(nd-0.7)a	6.3*	(nd-1.4)a	(nd-1.7)a	(nd-1.1)a	ns	12.6***
Cyclopentane, 1,1,3,4-tetramethyl-, cis-	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	nd	ns	(nd-1.1)a	nd	(nd-1.7)a	ns	nd	nd	nd	ns	10.5***
TERPENOS																		
D-Limonene	nd	nd	nd	ns	(nd-29)a	(nd-205)a	(nd-142)a	nd	ns	nd	nd	nd	ns	nd	(nd-40.5)a	(nd-11.1)a	ns	ns
.alpha.-Phellandrene	nd	nd	nd	ns	(nd-20.1)a	(nd-43.8)a	(nd-151)a	nd	ns	nd	(nd-79.3)	nd	5.9*	nd	nd	nd	ns	ns
Cis-Linalool Oxide	(3.9-5)a	(11-1030)a	(3.2-3.7)a	ns	(5.84-63.5)a	(233-278)c	(175-226)b	(11.3-67.8)a	128.7***	(961-1040)b	(171-189)a	(177-1350)b	ns	(2.6-228)a	(2.7-3.4)a	(2.5-1070)b	3.7*	13***
trans-linalool oxide	(nd-1.8)a	(nd-472)a	(1.4-1.5)a	ns	(nd-14.5)a	(130-155)c	(37.9-46.8)b	(3.7-20.6)a	382.7***	(328-354)b	(50-56.8)a	(53-497)b	ns	(nd-62.6)a	nd	(nd-369)b	3.9*	10***
Linalool	(nd-2.8)a	(nd-1.6)a	(3.1-3.1)b	6.9*	(nd-2.4)a	(nd-11.3)a	(37.1-56.5)c	(8.7-40)b	34.5***	(nd-1.7)a	(4.8-5.4)b	(nd-7.2)ab	ns	(nd-30.8)a	(nd-2.5)a	(nd-2)a	ns	9.4***
Hotrienol	(nd-3.3)a	(nd-170)a	nd	ns	(nd-12)a	(184-271)b	(8.6-14.8)a	nd	224.4***	(4.7-6)a	(71.7-84)b	(8.7-98.6)ab	5.5*	(nd-5.2)a	nd	(nd-5.6)a	ns	3.3*
Safranal	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	(nd-1.28)b	5.8**	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	ns
.alpha.-Terpineol	nd	nd	nd	ns	(nd-1.2)a	nd	(2.47-2.91)c	(nd-2.48)b	23.2***	(nd-0.5)a	(nd-0.62)a	nd	ns	nd	nd	nd	ns	13.7***
1, 1, 5-Trimethyl-1, 2-dihydronaphthalene	nd	(nd-1)a	nd	ns	nd	(1.7-4)c	(0.6-1.3)b	nd	28.2***	(0.6-0.7)b	8nd-0.4)a	(0.5-0.9)b	8.8**	nd	nd	(nd-0.6)b	3.9*	4.7**
Ethyl linalool	nd	(nd-1.9)a	nd	ns	(nd-1.9)a	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	nd	nd	nd	ns	ns

IV.3 EFECTO GLOBAL DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL EN LA DIFERENCIACIÓN DE MIELES

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con el objetivo de observar el efecto global de la región de la miel sobre su fracción volátil, considerando de manera conjunta los compuestos que la conforman. Este análisis proporciona información adicional, y complementa los resultados que se obtuvieron con el programa Statgraphics Centurion XVIII.

La figura 16 muestra la proyección de las variables sobre 2 componentes principales (F1 y F2 respectivamente). En ella se representan las muestras mediante un código que engloba la región, el distrito, y el número de muestra dentro de este. Por ejemplo, el código ZA-Mo-10, pertenece a la muestra número 10, de la región de Zambezia, distrito de Mocubela. Todas las muestras se hallan distribuidas en los 4 cuadrantes, la cercanía entre los puntos indica que guardan similitud. Se puede observar que hay una gran diferencia entre las muestras de Zambezia y Sofala; la miel de Zambezia, situada en el cuadrante derecho, se asocia con el factor 1 positivo (también denominado componente 1), mientras que la miel de Sofala, en el cuadrante izquierdo, está asociada con el primer componente negativo. El hecho de que las mieles de Zambezia se sitúen alejadas del resto de muestras, indica que estas mieles son las más diferentes del resto. Esto puede deberse a la flora de la región, ya que el tipo de planta condiciona la composición final de la miel. En Zambezia existe vegetación exclusiva de la zona con presencia de especies botánicas como: *Zamiaceae Encephalartos gratus Prain*, *Annonaceae Huberantha mossambicensis*, *Asphodelaceae Aloe torrei*, y *Commelinaceae Cyanotis namuliensis*, entre otras (Darbyshire et al., 2019).

La figura 17 muestra, en detalle, la zona central de la figura 16, en dónde se observa que las mieles de Nampula y Manica se encuentran muy próximas entre sí, prácticamente sin distinción entre ellas. Se puede observar alguna muestra de Manica con un comportamiento distinto de las demás de su grupo. Por ejemplo, la muestra MA-Sun-2 (distrito de Sussundenga, número 1174) se encuentra muy alejada del resto de muestras de esta región. Esto se puede explicar por la menor cantidad de compuestos volátiles identificados en la misma con respecto a las otras muestras de Manica.

La cercanía las mieles de Nampula y Manica se puede atribuir a que ambas regiones presentan vegetación similar y por lo tanto, cierta similitud del néctar de procedencia, al compartir hasta 9 plantas de distintas familias: *Pteridaceae Adiantum mendoncae*, *Orchidaceae Bulbophyllum balli*, y *Acanthaceae Sclerochiton coeruleus*, por ejemplo (Darbyshire et al., 2019).

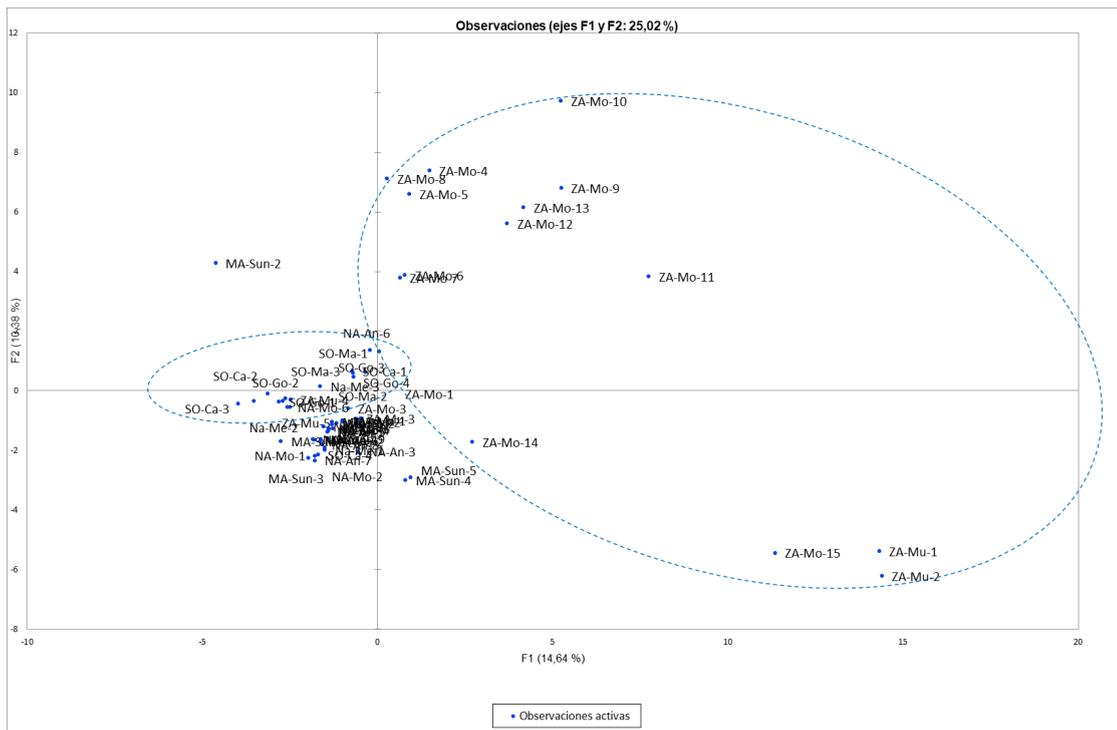


Figura 16. Gráfico de puntuaciones de las muestras para PCA.



Figura 17. Ampliación de la zona central del gráfico del PCA.

La tabla 3 indica los valores correspondientes a las correlaciones entre los compuestos volátiles y los factores, tras la rotación Varimax, para los dos factores principales. Cuanto más cercano a 1 es dicho valor, mayor influencia tiene el compuesto en el componente principal. Se observa que el 4-methyleneisophorone, el isophorone, el phenol, 2,3,5-trimethyl- y el benzaldehyde, 2-hydroxy-5-methoxy- son los compuestos más estrechamente relacionados con la miel de Zambezia, PC1 positivo. Esto queda respaldado por los resultados del ANOVA, ya que, efectivamente, todos ellos muestran diferencias significativas entre regiones. Los tres primeros son notoriamente más abundantes en Zambezia, y el benzaldehyde, 2-hydroxy-5-methoxy-, solo fue detectado en esta región (tabla 2).

La zona negativa del primer componente, Sofala, se asocia con el benzeneacetaldehyde, el phenol, 2-methoxy- (también llamado guaiacol) y los p-cresoles (tabla 3). Gracias a los resultados del análisis de la varianza, se conoce que el benzeneacetaldehyde es abundante en la miel de Sofala, y que presenta diferencias significativas entre regiones del 99,9%. Del mismo modo, el p-cresol está presente en las mieles de todos los distritos de Sofala, y tanto el p-cresol I, II y III presentan diferencias significativas entre regiones.

La figura 18 relaciona los compuestos volátiles con los componentes principales, representando lo expuesto en la tabla 3.

Tabla 3. Correlaciones entre las variables y los factores para los componentes PC1 y PC2 del PCA, tras rotación Varimax

PC 1 POSITIVO		PC 1 NEGATIVO	
4-Methyleneisophorone	0,989	Benzeneacetaldehyde	-0,392
Isophorone	0,988	Phenol, 2-methoxy-	-0,301
Phenol, 2,3,5-trimethyl-	0,985	p-Cresol I	-0,288
Benzaldehyde, 2-hydroxy-5-methoxy-	0,978	p-Cresol II	-0,282
1,4-Cyclohexanedione, 2,2,6-trimethyl-	0,971	p-Cresol III	-0,281
2,6,6-Trimethyl-2-cyclohexene-1,4-dione	0,970	2-Methoxy-5-methylphenol	-0,266
(R)-3,5,5-Trimethylcyclohex-3-en-1-ol	0,966	Furan, 3-phenyl-	-0,250
Safranal	0,965	Cyclobutane, 1,2-diethyl-	-0,243
2-Hydroxy-3,5,5-trimethyl-cyclohex-2-enone	0,965	Benzonitrile	-0,190
2-Propenoic acid, 3-phenyl-, ethyl ester	0,961	2-Hexanol, 5-methyl-	-0,167
2,3-Butanediol II	0,843	Phenylethyl Alcohol	-0,160
2,3-Butanediol (I)	0,551	Benzene, 1-isocyano-3-methyl-	-0,158

Tabla 3. Continuación

PC 2 POSITIVO		PC 2 NEGATIVO	
Phenol	0,943	Acetophenone	-0,379
Benzeneacetic acid, ethyl ester	0,932	Benzaldehyde, 2,5-dimethyl-	-0,343
.alpha.-Phellandrene II	0,921	Butanedioic acid, diethyl ester	-0,320
2-Propen-1-amine	0,858	Benzene, 1-isocyano-3-methyl-	-0,317
Lilac aldehyde C	0,847	2,3-Butanediol (I)	-0,291
1-Nonanol	0,825	Acetoin	-0,276
Ethyl linalool	0,810	Safranal	-0,176
Decanoic acid, ethyl ester	0,765	Oxime-, methoxy-phenyl-	-0,175
p-Cresol I	0,733	Acetic acid, 2-phenylethyl ester	-0,164
Acetic acid	0,661	1-Octanol	-0,164
2-Nonanol	0,624	Lilac aldehyde D	-0,150
Benzeneacetaldehyde	0,579	Decanal	-0,141

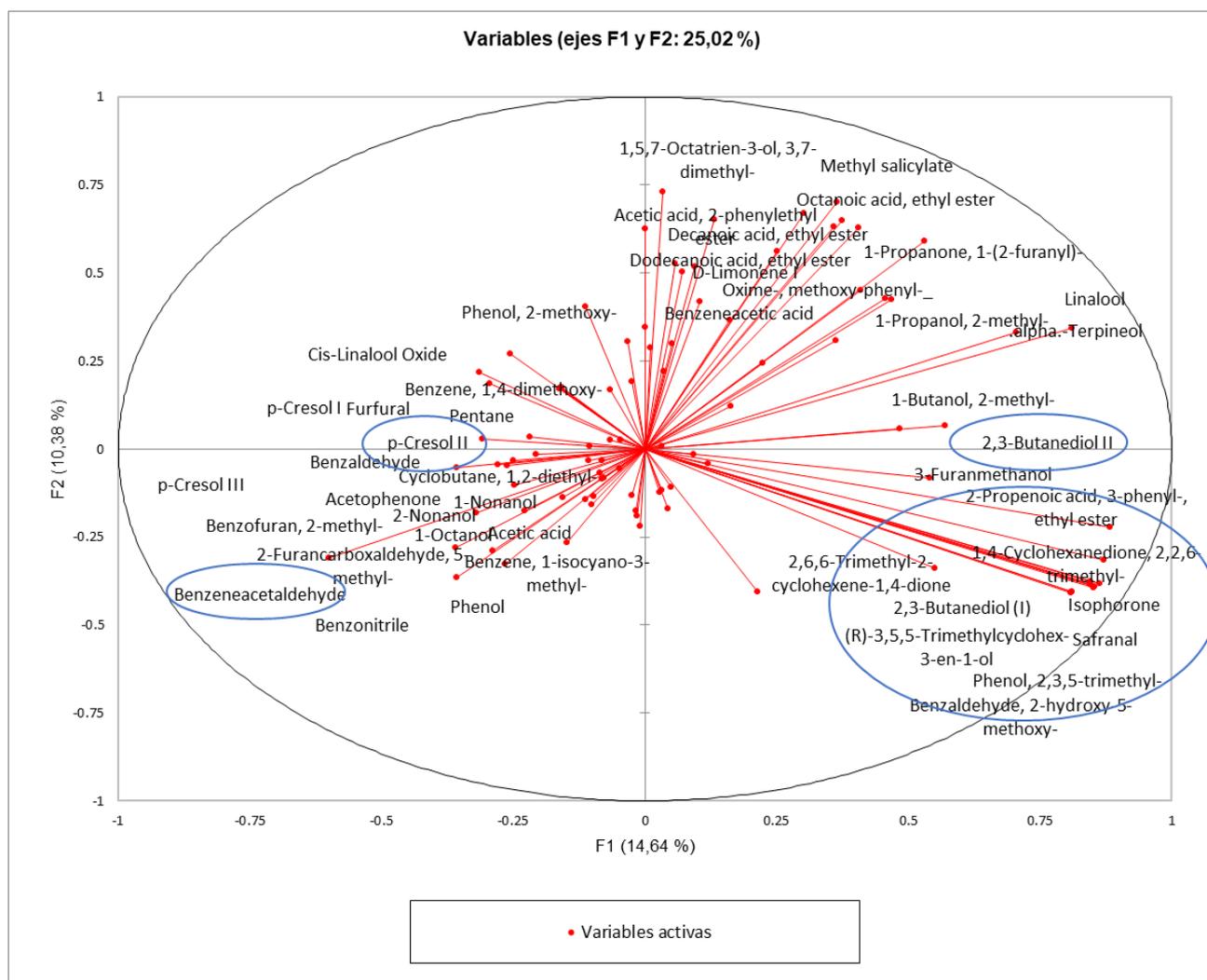


Figura 18. Representación de las variables (compuestos volátiles) para los factores principales.

V. CONCLUSIONES

Se han identificado 97 compuestos volátiles en las mieles de 4 regiones muestreadas de Mozambique (Manica, Nampula, Sofala y Zambezia), de los cuales 53 mostraron diferencias significativas entre ellas.

El origen geográfico ha condicionado la presencia de determinados compuestos volátiles en las mieles ya que algunos de ellos se han asociado a una región concreta como es el caso del cyclopentane, 1,1,3,4-tetramethyl-, cis-, que únicamente se detectó en la región de Sofala, o el 1-octanol solo presente en las mieles de Nampula.

Las mieles de Zambezia mostraron una mayor diferencia con respecto a las de las demás regiones posiblemente debido a la presencia en esta región de una flora específica que puede condicionar la composición de estas mieles. Por el contrario, las mieles de Nampula y Manica mostraron características similares ya que ambas regiones presentan vegetación similar y por lo tanto, cierta similitud del néctar de procedencia.

Las diferencias entre distritos de una misma región (considerando el número de compuestos que mostraron diferencias significativas entre ellos) fueron más acusadas en Zambezia, seguida de Sofala, Nampula y Manica.

Estos resultados avalan la eficacia de la técnica de extracción SPME-HS, y demuestran que resulta de gran utilidad para la determinación del perfil volátil de la miel, y su diferenciación en base a su origen geográfico.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Alissandrakis, Tarantilis, P. A., Pappas, C., Harizanis, P. C., & Polissiou, M. (2009). Ultrasound-assisted extraction gas chromatography–mass spectrometry analysis of volatile compounds in unifloral thyme honey from Greece. *European Food Research & Technology*. 229(3). 365–373.

Doi: <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1046-8>

Belitz, H., Grosch, W., Schieberle, P. (2014). *Food chemistry*. 4th ed. Berlin: Springer-Verlag.

Bentivenga, G., D'Auria, M., Fedeli, P., Mauriello, G., & Racioppi, R. (2004). SPME-GC-MS analysis of volatile organic compounds in honey from Basilicata. Evidence for the presence of pollutants from anthropogenic activities. *International Journal of Food Science & Technology*. 39(10). 1079–1086.

Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.00889.x>

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

Bogdanov, S., Haldimann, M., Luginbühl, W., Gallmann, P. (2007). Minerals in honey: environmental, geographical and botanical aspects. *Journal of Apicultural Research*. 46:4. 269-275.

Doi: <https://doi.org/10.1080/00218839.2007.11101407>

Cardona-Rodríguez, Y., Torres-Sánchez, D. A., & Hoffmann, W. (2015). Análisis térmico de mieles de Trigona (Tetragonisca) angustula de Norte de Santander, Colombia. *Respuestas*. 20 (2). 135–144.

Doi: <https://doi.org/10.22463/0122820X.380>

Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. Consuelo., Pérez-Coello, M. Soledad. (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.

Doi: <https://doi.org/10.1021/jf0604384>

Darbyshire, I., Timberlake, J., Osborne, J., Rokni, S., Matimele, H. (2019). The endemic plants of Mozambique: diversity and conservation status. *PhytoKeys*.

Doi: <https://doi.org/10.3897/phytokeys.136.39020>

Davies, A., Radovic, B., Fearn, T., and Anklam, E. (2002). A Preliminary Study on the Characterisation of Honey by Near Infrared Spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 10 (2). 121-135.

Diana C. Fechner., Adriana, L., Moresi, Juan D., Ruiz Díaz, Roberto G. Pellerano., Francisco A. Vazquez. (2016). Multivariate classification of honeys from Corrientes (Argentina) according to geographical origin based on physicochemical properties. *Food Bioscience*. 15. 49-54.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.05.002>

Dong, Liang., Hou, Yingmin., Li, Feng., Piao, Yongzhe., Zhang, Xiao., Zhang, Xiaoyu., Li, Cheng., Zhao, Changxin. (2015). Characterization of volatile aroma compounds in different brewing barley cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 95 (5). 915–921.

Doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.6759>

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

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.051>

Escriche, I., Juan-Borrás, M., Visquert, M., Asensio-Grau, A., & Valiente, J. M. (2021). Volatile profiles of Spanish raw citrus honey: The best strategy for its correct labeling. *Journal of Food Processing and Preservation*. 46.

Doi: <https://doi.org/10.1111/jfpp.16200>

FAOSTAT (2016). Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Statistic Division*.

Available at: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QL/visualize>.

Gil, S, M. (2017) Microextracción en fase sólida: Aplicaciones de interés farmacéutico. *Trabajo de fin de grado*. Página 9.

Gleiter, R., Horn, H. and Isengard, H. (2006). Influence of type and state of crystallisation on the water activity of honey. *Food Chemistry*. 96 (3), 441-445.

Doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.051>

Gómez Pajuelo, A. (2004): Origen botánico de la miel. Miel de España y Portugal. *Eds. Montagud, Barcelona*, 50-56.

Jain, S., Jesus, F., Marchioro, G., & Araújo, E. (2013). Extraction of DNA from honey and its amplification by PCR for botanical identification. *Food Science and Technology (Campinas)*. 33. 753-756.

Doi: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612013000400022>

Joan J. Gallardo-Chacón, Montserrat Caselles, Maria Izquierdo-Pulido & Núria Rius (2008). Inhibitory activity of monofloral and multifloral honeys against bacterial pathogens. *Journal of Apicultural Research*. 47 (2). 131-136.

Doi: <https://doi.org/10.1080/00218839.2008.11101439>

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.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.045>

Kamal, M., & Klein, P. (2011). Determination of sugars in honey by liquid chromatography. *Saudi journal of biological sciences*. 18. 17-21.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2010.09.003>

Karabagias, I.K., Nikolaou, C. & Karabagias, V. K. (2018). Volatile fingerprints of common and rare honeys produced in Greece: in search of PHVMs with implementation of the honey code. *European Food Research & Technology*. 245(1). 23–39.

Doi: <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3137-x>

Karlidag, Keskin, M., Bayram, S., Mayda, N., & Ozkok, A. (2021). Honey: Determination of volatile compounds, antioxidant and antibacterial activities. *Czech Journal of Food Sciences*, 39(3), 208–216.

Doi: <https://doi.org/10.17221/63/2021-CJFS>

Kassim M, Achoui M, Mansor M, Yusoff KM. (2010). The inhibitory effects of Gelam honey and its extracts on nitric oxide and prostaglandin E-2 in inflammatory tissues. *Fitoterapia*. 81. 1196-201.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.07.024>

- Khan, F., Hill, J., Kaehler, S., Allsopp, M. and van Vuuren, S. (2014). Antimicrobial properties and isotope investigations of South African honey. *Journal of Applied microbiology*. 117: 366-379.
Doi: <https://doi.org/10.1111/jam.12533>
- Lachman, J., Orsák, M., Hejtmánková, A., Kovářová, E. (2010). Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. *LWT - Food Science and Technology*. 43 (1). 52–58.
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.06.008>
- Manyi-Loh, Clarke, A. M., & Ndip, R. N. (2011). Identification of volatile compounds in solvent extracts of honeys produced in South Africa. *African Journal of Agricultural Research*, 6(18), 4327–4334.
Doi: <https://doi.org/10.5897/AJAR11.754>
- Manyi-Loh, C. E., Ndip, R. N., & Clarke, A. M. (2011). Volatile compounds in honey: A review on their involvement in aroma, botanical origin determination and potential biomedical activities. *International Journal of Molecular Sciences*. 12(12). 9514–9532.
Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms12129514>
- Markes International (2021). Authentic or synthetic? Discovering authenticity markers in luxury to low-cost honey varieties using a high-capacity sorptive extraction technique (HiSorb™). *Application note 275*.
- Min Zhu, Jing Sun, Haoan Zhao, Fanhua Wu, Xiaofeng Xue, Liming Wu, Wei Cao. (2022). Volatile compounds of five types of unifloral honey in Northwest China: Correlation with aroma and floral origin based on HS-SPME/GC–MS combined with chemometrics. *Food Chemistry*. 384.
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132461>.
- Mohamed M., Sirajudeen K.N.S., Swamy M., Yaacob M., Sulaiman S. (2010). Studies on the antioxidant properties of Tualang honey of Malaysia. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 7: 59–63.
Doi: <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v7i1.57256>
- Nurul S. M. S., Gan, S. H., Halim, A. S., Shah, N. S. M & Sukari, H. A. (2013). Analysis of volatile compounds of Malaysian Tualang (*Koompassia excelsa*) honey using gas chromatography mass spectrometry. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*. 10 (2). 180–188.
Doi: <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v10i2.2>
- Osorio Monsalve, J., López, C., Zapata, J. (2016). Caracterización de los compuestos del aroma en rones colombianos por HS-SPME-GC-MS-O. *Revista Colombiana de Química*. 45 (2). 48-54.
Doi: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v45n2.60406>
- Panseri, Manzo, A., Chiesa, L. M., & Giorgi, A. (2013). Melissopalynological and Volatile Compounds Analysis of Buckwheat Honey from Different Geographical Origins and Their Role in Botanical Determination. *Journal of Chemistry*. 1–11.
Doi: <https://doi.org/10.1155/2013/904202>
- Paradkar, M., Irudayaraj, J., & Sakhamuri, S. (2002). Discrimination and classification of beet and cane sugars and their inverts in maple syrup by FT-Raman. *Applied Engineering in Agriculture*. 18: 379–383.
Doi: <https://doi.org/10.13031/2013.8589>

Pattamayutanon, P., Angeli, S., Thakeow, P., Abraham, J., Disayathanoowat, T., & Chantawannakul, P. (2017). Volatile organic compounds of Thai honeys produced from several floral sources by different honey bee species. *PloS One*, 12(2).

Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172099>

Persano Oddo, L., Piazza, M. G., Sabatini, A. G., Accorti, M. (1995). Characterization of unifloral honeys. *Apidologie*. 26: 453-465.

Doi: <https://doi.org/10.1051/apido:19950602>

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.

Popek, S., Halagarda, M., Kurska, K. (2017). A new model to identify botanical origin Polish honeys based on the physicochemical parameters and chemometric analysis. *LWT Food Sci. Technol.* 77: 482–487.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.003>

Pyrzynska K., Biesaga M. (2009). Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *TrAC– Trends in Analytical Chemistry*. 28: 893–902.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.03.015>.

Reboredo, P. (2015) Caracterización aromática y fenólica de aceitunas y aceites de oliva producidos en Galicia. *Investigo. Repositorio institucional de la Universidad de Vigo*. 39-41.

Revell, L.E., Morris, B., & Manley-Harris, M. (2013). Analysis of volatile compounds in New Zealand unifloral honeys by SPME–GC–MS and chemometric-based classification of floral source. *Journal of Food Measurement & Characterization*, 8(2), 81–91.

Doi: <https://doi.org/10.1007/s11694-013-9167-y>

Ruíz, L. (2011). Libro Intermiel. Interprofesional de la Miel y los Productos Apícolas. Momentos Miel. Diseño y maquetación: Alcandora Publicidad. Depósito legal: M47914-2011.

Sáinz, C., Gómez, C. (1999). *Mieles españolas*. 1ª Edición. Madrid, España: Editorial Ediciones Mundi-Prensa S.A.

Sobrino-Gregorio, L., Vargas, M., Chiralt, A., & Escriche, I.(2017). Thermal properties of honey as affected by the addition of sugar syrup. *Journal of Food Engineering*. 213: 69-75.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.02.014>

Sobrino-Gregorio, L., Bataller Prats, R., Soto Camino, J., Escriche Roberto, MI. (2018). Monitoring honey adulteration with sugar syrups using an automatic pulse voltammetric electronic tongue. *Food Control*. 91: 254-260.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.003>

Sobrino-Gregorio, L., Villanova, S., Prohens, J., y Escriche, I. (2019). Detection of honey adulteration by conventional and real-time PCR. *Food Control*. 95: 57-62.

Srinivasan, Maruthavanan, T., Mayildurai, R., & Ramasubbu, A. (2021). GC–MS investigations of VOCs in South Indian honey samples as environmental biomarkers. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193(8).

Doi: <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09302-9>

Stashenko, E. E., & Martínez, J.R. (2010). Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia chromatographica*. 2 (1). 29-47.

Tanleque-Alberto, F., Juan-Borrás, M., Escriche, I. (2019). Quality parameters, pollen and volatile profiles of honey from North and Central Mozambique. *Food Chemistry*. 277. 543-553.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.007>

The International Fragrance Association (2020) Fragrance ingredient glossary. IFRA.

Zhu, Jiancai., Chen, Feng., Wang, Lingying., Niu, Yunwei., Chen, HeXing., Wang, HongLin., Xiao, Zuobing. (2016). Characterization of the Key Aroma Volatile Compounds in Cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) Using Gas Chromatography-Olfactometry (GC-O) and Odor Activity Value (OAV). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 25-27.

Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01150>

VII. ANEXOS

Tabla 4. Glosario de fragancias

-A animal: a almizcle, olor fuerte
-A comida: olor sabroso, de vegetales asados
-Alcanfor: tonos propios del romero, alcanfor o mejorana
-Aldehído: olor que recuerda a la planta de lino
-Aromático: propios de especias y hierbas
-Avinado: gusto agrio que recuerda al vino y al vinagre
-Balsámico: olor delicado ligeramente dulce y propio de la madera
-Cítrico: aroma propio de las frutas de la familia Citrus
-Floral: aromas asociados con el jazmín, la rosa, el narciso, y otros
-Frutal: frutas como la banana, la manzana y el mango.
-Goloso: sabor a postre dulce, de caramelo o chocolate
-Herbáceo: fragancia de especias que imparten notas verdes y frescas
-Menta: notas frescas propias de la menta y el mentol
-Picante: Aroma punzante que recuerda a la pimienta y al clavo entre otros
-Verde: parecido al césped cortado

Tabla 5. Código de las muestras analizadas según referencia asignada por LABMIEL, región de procedencia, distrito, apicultor y comentarios. Fecha de recepción de las muestras; 09/09/2021.

CÓDIGO	REGIÓN	DISTRITO	APICULTOR	COMENTARIOS
I-21170	Manica	Manica	Pedro II	MM01
I-21171	Manica	Manica	Tequimo	MM02
I-21172	Manica	Manica	Alek	MM03
I-21173	Manica	Sussundenga	MHC-Macadamia	MS01
I-21174	Manica	Sussundenga	MHC-Litch	MS02
I-21175	Manica	Sussundenga	MCH	MS03
I-21176	Manica	Sussundenga	Rosa	MS04
I-21177	Manica	Sussundenga	Faral	MS05
I-21178	Manica	Tambara	Paulo 1	MT01
I-21179	Manica	Tambara	Paulo 2	MT02
I-21180	Manica	Tambara	Pedro 1	MT03
I-21181	Zambezia	Alto Molocue	Misse Oliveira Rofino	ZAM01
I-21182	Zambezia	Alto Molocue	Manuel Duarte Maleleca	ZAM02
I-21183	Zambezia	Alto Molocue	Gonçalves Morais Mucanco	ZAM03
I-21184	Zambezia	Alto Molocue	Fernando Joao Maricoa	ZAM04
I-21185	Zambezia	Alto Molocue	Inacio Fernando	ZAM05
I-21186	Zambezia	Gile	Nelson Benjamim	ZG01
I-21187	Zambezia	Gile	José Lourenço	ZG02
I-21188	Zambezia	Gile	Eudacio Miguel	ZG03
I-21189	Zambezia	Gile	Baptista Pedro	ZG04
I-21190	Zambezia	Gile	Castiano Iohalequina	ZG05

I-21191	Zambezia	Mocubela	Assama Domingos	ZMO01
I-21192	Zambezia	Mocubela	João Mebeue	ZMO02
I-21193	Zambezia	Mocubela	José A. Manuel	ZMO03
I-21194	Zambezia	Mocubela	Laurindo Calisto	ZMO04
I-21195	Zambezia	Mocubela	Vasco Pascoal	ZMO05
I-21196	Zambezia	Mulevala	Secinio Abrao	ZMU01
I-21197	Zambezia	Mulevala	Mauricio Francisco	ZMU02
I-21198	Zambezia	Mulevala	Felizardo João	ZMU03
I-21199	Zambezia	Mulevala	Afonso Pedro	ZMU04
I-21200	Zambezia	Mulevala	Isac António	ZMU05
I-21201	Sofala	Gorongozza	PNG	SG01
I-21202	Sofala	Gorongozza	PNG	SG02
I-21203	Sofala	Gorongozza	PNG	SG03
I-21204	Sofala	Gorongozza	PNG	SG04
I-21205	Sofala	Maringue	Apicultor 1 Jorge	SM01
I-21206	Sofala	Maringue	Apicultor 2 Amarildo	SM02
I-21207	Sofala	Maringue	Apicultor 3 Joseph	SM03
I-21208	Sofala	Caia	Molevaleha	SC01
I-21209	Sofala	Caia	Antonio	SC02
I-21210	Sofala	Caia	Marcos Jose	SC03
I-21211	Sofala	Caia	Caiardo	SC04
I-21212	Sofala	Caia	Mussequese	SC05
I-21213	Nampula	Angoche	Momade Papu	NA01
I-21214	Nampula	Angoche	Marques	NA02
I-21215	Nampula	Angoche	Momade Muleque	NA03
I-21216	Nampula	Angoche	Assumane Abudo	NA04
I-21217	Nampula	Angoche	Mussa Momade	NA05
I-21218	Nampula	Angoche	Dinis	NA06
I-21219	Nampula	Angoche	Alves Pedro	NA07
I-21220	Nampula	Angoche	Cassimo	NA08
I-21221	Nampula	Angoche	Juma Abacar	NA09
I-21222	Nampula	Mogincual	Ossufo Musafir	NM01
I-21223	Nampula	Mogincual	Assane	NM02
I-21224	Nampula	Mogincual	Momade Omar	NM03
I-21225	Nampula	Mogincual	Abel Celestino	NM04
I-21226	Nampula	Mogincual	Momade Mupana	NM05
I-21227	Nampula	Mogincual	Associacao Ophentana	NM06
I-21228	Nampula	Mecuburi	Mario Quatieque	NME01
I-21229	Nampula	Mecuburi	Patricio Paqueleque	NME02
I-21230	Nampula	Mecuburi	Luisa Acacio	NME03
I-21231	Nampula	Mecuburi	Silva Muasamisa	NME04
I-21232	Nampula	Mecuburi	Isac Estevaeo	NME05