



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

**Estudio de la composición volátil, no volátil
en mieles de plantas nativas del Uruguay.
Determinación de nuevos marcadores químicos
en combinación con aplicaciones quimiométricas**

Ana Godoy Franco

Tesis de Maestría

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Magíster

Programa de Posgrado en Biotecnología facultad de Ciencias

Universidad de la República

Agosto de 2023

Estudio de la composición volátil, no volátil en mieles de plantas nativas del Uruguay.

Determinación de nuevos marcadores químicos en combinación con aplicaciones quimiométricas

Tribunal:

Dra. Ana Denicola Creci. Laboratorio de Físicoquímica Biológica, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, y Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Dra. Carmen Rossini Caridad. Laboratorio de Ecología Química, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay

Dr. Ciro Invernizzi Castillo. Sección Etología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República y Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Director

Dr. Eduardo Dellacassa. Laboratorio de Biotecnología de Aromas, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química-UdelaR. Montevideo, Uruguay

Directora

Dra. Laura Fariña. Enología y Biotecnología de Fermentaciones, Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Química-UdelaR. Montevideo, Uruguay

**Estudio de la composición volátil, no volátil en mieles
de plantas nativas del Uruguay.**

**Determinación de nuevos marcadores químicos
en combinación con aplicaciones quimiométricas**

Ana Godoy

Programa de Posgrado en Biotecnología de la Facultad de Ciencias

Universidad de la República

2023

Directores:

Dr. Eduardo Dellacassa y Dra. Laura Fariña

(Facultad de Química Udelar)

A mi amor Manu

Y a nuestra hija, Amalia

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de este recorrido muchas personas contribuyeron en el desarrollo de este trabajo a quienes les quiero agradecer por sus enseñanzas, colaboración y compañía. Quiero agradecer en primer lugar a Manu por su contención, su apoyo incondicional, el constante aliento para culminar esta etapa, por ser mi lugar seguro y a nuestra hijita Amalia, quien desde su inocente mirada nos enseña algo nuevo todos los días, Gracias por todo su amor.

A mis padres, mis hermanos, abu lala, a Odile y Delmiro, mis suegros y cuñados por su apoyo, compañía y cariño que siempre está ahí.

A mis amigas de la vida y a las que me fue regalando la carrera, en especial a Sole y Marinelli gracias por su contribución en la edición final de este trabajo, Lu, Nato, Mana, Agus, Pola, Chicho, Ceci, Jenny, Flor, Noe, gracias por su oído, compañía y amistad.

A mis tutores Eduardo Dellacassa y Laura Fariña por permitirme ser parte de este trabajo, por sus valiosos aportes y por guiarme en el proceso. A todos los compañeros del laboratorio que desde el inicio contribuyeron a hacer del lab un lugar de disfrute: Flor, Noe, Vale, Ceci, Lauri, Karina, Yaninne, Eva, Maria Jose, Nico, Boni, Dellac, Gabriel, Francisco, Boido En especial a quienes nos prestaron su nariz para los análisis de GCO.

A Gloria Daners por los análisis polínicos

A Alexandra Sixto por los análisis de metales

A Alejandra Medrano, Adriana Fernández y Jessica Baéz por su colaboración con los análisis de poli fenoles totales y antioxidantes

A Gastón Ares por su colaboración en el análisis sensorial. A Chiara por el análisis polifenólicos

Un agradecimiento especial a todos los productores que confiaron en nosotros brindándonos sus mieles, nuestro objeto de estudio, para poder realizar esta tesis.

A quienes financiaron este trabajo: ANII beca de maestría, y CAP beca de finalización de maestría.

RESUMEN

La miel es un producto natural producido por abejas *Apis mellifera* a partir del néctar de plantas o sus secreciones. Su composición química depende de muchos factores, pero el origen floral del néctar del que se alimentan las abejas determina que puedan ser de origen mono o multifloral. El origen floral de la miel se define mediante análisis melisopalinológico y la caracterización se complementa con análisis sensorial y fisicoquímico. En los últimos años, las mieles se asocian con una dieta saludable por su contenido de nutrientes esenciales como los minerales y no esenciales como los polifenoles, brindándole propiedades como alimento funcional. Además, el perfil aromático es una de las características destacables de un producto alimenticio, tanto por su calidad organoléptica como su autenticidad. Por otra parte, tanto el perfil de flavonoides como la composición volátil contribuyen a reconocer el origen floral de la miel y en consecuencia pueden brindar información acerca de su origen geográfico.

En este trabajo se propone la valorización de las mieles provenientes de la flora nativa del Uruguay a través de la búsqueda de potenciales quimiomarcadores discriminantes de estas mieles. Con este objetivo se estudiaron como modelo de trabajo, 15 muestras de miel, de las cuales siete resultaron ser de plantas nativas del Uruguay, representadas principalmente por polen de *Scutia buxifolia* (*coronilla*) y *Schinus molle* (*anacahuita*). Las muestras de miel seleccionadas provinieron de diferentes regiones del sureste de Uruguay y se estudiaron utilizando diferentes enfoques que abordaron la composición polínica, análisis fisicoquímicos, sensorial, composición volátil y polifenólica. Para este fin se utilizaron diferentes metodologías, dentro de las cuales se distinguen cromatografía gaseosa acoplada a masa con extracción en espacio cabeza (HS-SPME, GC-MS) para estudiar la composición volátil y cromatografía líquida de alta presión acoplada a masa (HPLC-MS/Orbitrap) para el estudio de la composición polifenólica. Se obtuvieron resultados alentadores en ambas metodologías: el perfil volátil fue representado por 77 compuestos pertenecientes a distintas familias de los cuales la familia de los terpenos fue la mayoritariamente representada en las mieles nativas. Mientras que en la fracción polifenólica se lograron identificar y cuantificar 27 componentes. Estos resultados junto con los resultados obtenidos en el análisis polínico y fisicoquímicos nos permiten concluir que es posible caracterizar y distinguir mieles monoflorales producidas a partir de flora nativa del Uruguay. Estas mieles presentan propiedades interesantes que las destacan del resto de las mieles, pudiendo ser un punto de partida para la explotación de este mercado de mieles poco conocidas y de gran potencial nutricional.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	9
-----------------------	---

RESUMEN	11
---------------	----

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

Objetivo	17
Sección 1 – Miel en Uruguay	17
Sección 2 – Flora nativa de Uruguay	19
Bibliografía	22

Capítulo II

ESTUDIO PALINOLÓGICO Y PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LA MIEL

Introducción	27
Objetivos.....	31
Materiales y métodos.....	31
Análisis melisopalinológico	33
Evaluación de características fisicoquímicas	33
Análisis estadísticos.....	36
Resultados y Discusión.....	36
Análisis estadístico	44
Conclusiones	45
Bibliografía	45

ESTUDIO DEL PERFIL VOLÁTIL Y SENSORIAL DE LA MIEL
MEDIANTE CROMATOGRAFÍA GASEOSA ACOPLADA A MASA,
CROMATOGRAFÍA GASEOSA ACOPLADA A OLFATOMETRÍA Y
ANÁLISIS SENSORIAL CON CONSUMIDORES

Introducción	51
El concepto de <i>flavor</i>	51
El olfato	52
El aroma de la miel.....	53
Métodos de extracción.....	54
Metodologías GC-O	59
Análisis sensorial.....	60
Sección 1 - Análisis de compuestos volátiles de la miel.....	62
Objetivos.....	62
Materiales y métodos.....	62
Análisis estadístico	63
Resultados y Discusión.....	64
Conclusiones:	67
Sección 2 – Análisis sensorial.....	68
Objetivos.....	68
Materiales y métodos.....	68
Resultados y Discusión.....	69
Conclusiones	73
Sección 3 - Análisis de compuestos volátiles sensorialmente activos.....	73
Objetivos.....	73
Materiales y métodos.....	74
Resultados y Discusión.....	76
Conclusiones	82
Bibliografía	83

Capítulo IV

ESTUDIO DEL PERFIL POLIFENÓLICO Y MINERALES PRESENTES EN MIEL. ESTUDIO DE PROPIEDADES NUTRACÉUTICAS

Introducción:	91
Importancia de los polifenoles	91
Polifenoles en la miel	94
Minerales presentes en la miel	95
Sección 1- Análisis de composición polifenólica.....	97
Objetivo	97
Materiales y Métodos	97
Resultados y discusión.....	100
Conclusiones	105
Sección 2- Evaluación de propiedades nutraceuticas de la miel.....	106
Objetivo	106
Materiales y Métodos	106
Resultados y Discusión.....	109
Conclusiones	118
Bibliografía:	120

Capítulo V

CONCLUSIONES	127
ANEXO.....	129

INTRODUCCIÓN

Objetivo

Búsqueda de quimiomarcadores y propiedades nutraceuticas distintivas útiles para la valorización de mieles monoflorales de la flora aromática nativa producidas en Uruguay.

Sección 1 – Miel en Uruguay

La primera colmena de abejas melíferas *Apis mellifera*, fue introducida en Uruguay en 1834 por Bernardino Rivadavia, comenzando de esta manera a desarrollarse y extenderse por todo el territorio nacional la actividad apícola (Cordara, 2005). La relevancia de esta actividad radica en el rol fundamental de la abeja como polinizadora de cultivos y flores. La polinización de las abejas es considerada necesaria para mantener el rendimiento y la calidad de las semillas de muchas especies de plantas importantes para la agricultura y la conservación de la biodiversidad como patrimonio (Corbet et al., 1991). En este sentido, la abeja *A. mellifera* es el principal organismo polinizador (McGregor, 1976). Tal es así que diversos estudios muestran el valor económico de la polinización realizada por abejas *A. mellifera* en cultivos de interés comercial en nuestro país (Santos et al., 2009). Además del rol esencial de la polinización, las abejas proporcionan productos elaborados por ellas, a partir de diversos materiales recolectados de la naturaleza de gran importancia comercial. Los productos brindados por la colmena son: miel, polen, propóleos, jalea real, cera, y apitoxina, dentro de los cuales los tres primeros son los de mayor relevancia comercial. El sector apícola en Uruguay es netamente exportador, donde el 85% de la producción es exportada principalmente a España, Estados Unidos y Alemania (CHDA, 2018). En Uruguay, la miel sigue formando parte de los productos seleccionados para exportación pero presenta variaciones drásticas anuales; en el año 2011 existió un récord de exportaciones con aproximadamente 14.000 toneladas mientras que en el 2019 apenas se logró exportar 5500 toneladas (MGAP, 2019), los años siguientes han sido de gran variación para el mercado exportador y gran incertidumbre para los productores de miel. Esta coyuntura estimula la búsqueda de herramientas que hagan posible hacer aportes a favor de revertir esta situación; tanto para volver a valores de exportación de buen nivel en toneladas de miel, lograr un mejor precio por la miel que se produce así como para fomentar el consumo interno de miel mediante la valorización de nuestras mieles. Las mieles tienen mayor valor agregado cuando

proceden mayoritariamente de una especie vegetal (mieles monoflorales) o de una región circunscripta, es decir mieles de origen geográfico específico (monte, pradera, otros) (Alissandrakis et al., 2007; Fernández-Torres et al., 2005; Sawyer & Pickard, 1988). La producción de mieles monoflorales / multiflorales depende de varios factores y en particular de la oferta de plantas melíferas en cada región y en cada época del año. En el caso de las mieles monoflorales, al haber sido producidas en base al néctar de una planta específica, la razón por la que poseen mayor valor comercial es porque pueden demostrarse características químicas y sensoriales como su sabor y su aroma.

Definición de miel y su composición:

En Uruguay, el Reglamento Bromatológico Nacional (MSP, 2017) define a la miel como: “... *el producto alimenticio producido por las abejas melíferas a partir del néctar de las flores o de las secreciones procedentes de partes vivas de las plantas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de plantas, que las abejas recogen, transforman, combinan con sustancias específicas propias y almacenan y dejan madurar en los panales de la colmena...*”.

La composición de la miel depende del origen floral del néctar del que se alimentan las abejas, así como de factores externos tales como el clima, el medio ambiente y las condiciones de procesamiento (Santos-Buelga and González-Paramás, 2017). El origen floral puede ser muy variado, lo cual se ve reflejado en productos finales que difieren tanto en apariencia como en percepción sensorial y composición. La miel está compuesta principalmente por carbohidratos que constituyen el 95% de su peso seco, siendo los monosacáridos mayoritarios fructosa y glucosa (Santos-Buelga and González-Paramás, 2017). Además, se han detectado alrededor de 25 oligosacáridos diferentes, como: maltosa, sacarosa, turanosa (Doner, 1977). La miel también contiene numerosos compuestos orgánicos donde aproximadamente el 0,5% son proteínas, principalmente enzimas y aminoácidos libres. Las principales enzimas de la miel son la diastasa que descompone el almidón en unidades de azúcar; la invertasa capaz de descomponer la sacarosa en fructosa y glucosa y la glucosa oxidasa que produce peróxido de hidrógeno y ácido glucónico a partir de glucosa (Bogdanov et al., 2008). Las proporciones relativas de los aminoácidos presentes en la miel dependerán de su origen. Se han encontrado 26 aminoácidos en la miel dentro de los cuales el mayoritario es la prolina. Dado que el polen es la fuente principal de aminoácidos de la miel, el perfil de aminoácidos podría ser característico de su origen botánico (Alvarez-Suarez et al., 2010). El contenido mineral varía entre 0,04% en mieles claras a 0,2% en mieles oscuras, dependiendo del tipo de suelo en que se encuentra las plantas que originan el néctar, otros componentes minoritarios de la miel son las vitaminas, tales como la filoquinona (K), tiamina (B1),

piridoxina (B6), niacina, ácido pantoténico y ácido ascórbico (C). La cantidad de vitaminas y minerales es pequeña y la contribución de la miel a la ingesta diaria recomendada de las diferentes sustancias traza es pequeña (Anklam, 1998; Bogdanov et al., 2008).

Por otra parte, el perfil aromático es un componente característico de un producto alimenticio, tanto por su calidad organoléptica como por su autenticidad (Careri et al., 1993). Debido a la gran cantidad de componentes volátiles, el perfil aromático representa una huella digital del producto que podría utilizarse para determinar su origen (Anklam and Radovic, 2001). Los compuestos aromáticos están presentes en muy bajas concentraciones como mezclas complejas de diferente funcionalidad y peso molecular relativamente bajo (Cuevas-Glory et al., 2007). Para el caso de la miel, en la bibliografía existen reportes de componentes volátiles característicos de mieles monoflorales como lavanda, eucaliptos, acacia, romero, entre otras (Chudzinska and Baralkiewicz, 2010; Pérez et al., 2002; Vázquez et al., 2006; Verzera et al., 2001). A su vez, con respecto a la apariencia y las propiedades funcionales de la miel, los polifenoles son otro grupo importante de compuestos debido a su actividad antioxidante, antiinflamatoria, antibacteriana, antivirales y antiulcerosas, además de la capacidad anti-pardeamiento enzimático (Scepankova et al., 2017). Estas actividades se atribuyen principalmente a los compuestos fenólicos como los flavonoides, presentes en los productos de la colmena como la miel, propóleos y jalea real, situando a estos productos como ingredientes potenciales para diferentes alimentos debido a la gran cantidad de efectos beneficiosos que presentan (Bogdanov et al., 2008; Viuda-Martos et al., 2008). Los polifenoles en la miel son principalmente flavonoides (como quercetina, luteolina, kaempferol), ácidos fenólicos y derivados. Poseen un rol potencial como marcadores bioquímicos que autentican las propiedades geográficas y antioxidantes de la miel (Alvarez-Suarez et al., 2010; Tomás-Barberán and Andrés-Lacueva, 2012). Es así que el perfil de compuestos fenólicos constituye una herramienta valiosa para una mejor caracterización de la miel de acuerdo a su origen botánico y geográfico. (Tomás-Barberán et al., 2001).

Sección 2 – Flora nativa de Uruguay

Desde un punto de vista fitogeográfico la flora de Uruguay se encuentra mayoritariamente comprendida en la provincia Pampeana (Cabrera and Willink, 1980). Dentro de los principales ecosistemas del Uruguay se encuentran las praderas naturales, los bosques, los humedales y los ecosistemas costeros (OEA, 1992). Nuestras praderas naturales han co-evolucionado con el pastoreo de herbívoros nativos e introducidos. Estas praderas están integradas por comunidades vegetales multiespecíficas (principalmente gramíneas) que interactúan con el ambiente y los

animales que las pastorean (Millot et al., 1987). En los últimos años la superficie de la pradera se ha reducido significativamente (de 75,2% en 2000 a 64,3% en 2011) debido al aumento de la producción forestal, pasturas cultivadas y cultivos anuales. La reducción de las praderas uruguayas condujo a la intensificación del pastoreo concentrándose en áreas más reducidas y como consecuencia provocando un deterioro de las mismas (Ayala et al., 2011). Una respuesta al deterioro por parte de los productores es la siembra de ciertas leguminosas promisorias (no nativas) para complementar la pastura (Lapetina, 2012). Los bosques nativos, por otro lado, ocupan una porción bastante menor del territorio que las praderas (3,5%), sin embargo, poseen un alto valor ecológico debido al número de especies vegetales que presenta (Brazeiro, 2017).

En el contexto apícola, esta agregación de ecosistemas (monte, pradera) y agroecosistemas (forestación, praderas mejoradas con leguminosas) es que se encuentran instaladas en distintas intensidades los colmenares destinados a la producción de miel. Estos ecosistemas no son aislados ni permanentes, sino que varían en el tiempo y presentan ecotonos que se reflejan en la composición botánica de nuestras mieles (Cracco, 2018; Daners and Campá, 1996; Daners and Tellería, 1998; Tejera et al., 2013). Por un lado, el monte juega un papel de gran importancia, debido a que se caracteriza por tener una floración temprana, un período de escasa floración en diciembre-enero y una nueva floración en febrero-marzo. Durante el período de baja floración del monte, la producción melífera se basa fundamentalmente en las praderas (trébol blanco, lotus) o en otros cultivos anuales (por ejemplo, girasol) o permanentes (frutales, eucaliptos). A su vez, la floración tardía del monte resulta muy útil a la colmena para almacenar reservas para el invierno (Carrere, 2010).

En la Tabla 1.1 se describen especies vegetales presentes en estos ecosistemas y que son identificadas como buenas productoras de polen o néctar.

Tabla 1.1 Especies vegetales presentes en ecosistemas de pradera y monte

<p><i>Scutia buxifolia</i> Reissek “coronilla”</p>		<p>Árbol nativo muy frecuente en bosques ribereños y serranos de todo el país. Florece en primavera. (Daners and Campá, 1996)</p>
<p><i>Schinus molle</i> L. “anacahuita”</p>		<p>Árbol nativo de los bosques del norte del país. Por su valor ornamental su difusión abarca todo el territorio. Florece en primavera/verano y posee alto valor apícola (Carrere, 2009; Pérez Piedrabuena, 2004)</p>
<p><i>Blepharocalyx tweediei</i> (Hook et Arn.) Berg. “arrayán”</p>		<p>Árbol nativo muy frecuente en bosques serranos y ribereños de todo el país. Florece en primavera.</p>
<p><i>Eucaliptus</i> sp. “eucalipto”</p>		<p>Especie exótica utilizada en la industria papelera y maderera del país. Tiene una extensa temporada de floración de 6 a 8 meses. (Malkamäki et al., 2016)</p>
<p><i>Lottus</i> sp. “lotus”</p>		<p>Especies exóticas utilizadas en Uruguay como forrajeras y en la recuperación de pasturas ya que fijan nitrógeno atmosférico de manera eficiente</p>
<p><i>Trifolium repens</i> L. “trébol blanco”</p>		<p>Especie exótica muy utilizada en sistemas ganaderos como mejoramiento de las praderas naturales. Especie de relevancia apícola debido a que su miel posee muy buen sabor apreciada en el mercado. Florece principalmente en primavera (Izaguirre, 1995)</p>
<p><i>Trifolium pratense</i> L. “trébol rojo”</p>		<p>Especie exótica utilizada con los mismos fines de <i>T. repens</i>. Su floración comienza en primavera y puede prolongarse hasta el otoño. (Izaguirre, 1995)</p>

Bibliografía

- Alissandrakis, E., Tarantilis, P. A., Harizanis, P. C., Polissiou, M. (2007). Aroma investigation of unifloral Greek citrus honey using solid-phase microextraction coupled to gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *Food Chemistry*, 100(1), 396–404.
- Alvarez-Suarez, J. M., Tulipani, S., Romandini, S., Bertoli, E., Battino, M. (2010). Contribution of honey in nutrition and human health: A review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 3(1), 15–23.
- Anklam, E. (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 63(4), 549–562.
- Anklam, E., Radovic, B. (2001). Suitable analytical methods for determining the origin of European honey. *American Laboratory*, 33(10), 60-64.
- Ayala, W., Altesor, A., Paruelo, J. (2011). Los desafíos tecnológicos de la ganadería en los pastizales del río de la plata. En: Bases ecológicas y tecnológicas para el manejo de pastizales. *INIA Serie FPTA N°26*, 209–214.
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: A review. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(6), 677–689.
- Brazeiro, A. (2017). Bosques de Uruguay: necesidades de investigación para la gestión sustentable y conservación. Recientes Avances en la Investigación para la Gestión y Conservación del Bosque Nativo de Uruguay. Tradinco S.A., Uruguay.
- Cabrera, A., Willink, A. (1980). Biogeografía de América Latina. 2da edición. Secretaría General de la OEA. Washington.
- Careri, M., Mangia, A., Barbieri, G., Bouoni, L., Virgili, R., Parolari, G. (1993). Sensory property relationships to chemical data of italian-type dry-cured ham. *Journal of Food Science*, 58(5), 968–972.
- Carrere, R. (2009). Anacahuita (*Schinus molle*): la indígena más popular. Colección del Grupo Guayubira sobre especies indígenas - N° 15. <http://www.guayubira.org.uy> (consultado en febrero 2023).
- Carrere, R. (2010). Monte indígena. Mucho más que un conjunto de árboles. Reedición Montevideo: Nordan, Guayubira, Ciedur, EGP.
- CHAD (2018). Comisión Honoraria de Desarrollo Apícola: Estadísticas de comercio exterior. http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/informe_-sector_apicola_-comercio_exterior.pdf (consultado en febrero 2023).

- Chudzinska, M., Baralkiewicz, D. (2010). Estimation of honey authenticity by multielements characteristics using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) combined with chemometrics. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 284-290.
- Corbet, S. A., Williams, I. H., Osborne, J. L. (1991). Bees and the pollination of crops and wild flowers in the European community. *Bee World*, 72(2), 47-59.
- Cordara, J. (2005). La historia de la apicultura en Uruguay. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de la Empresa, Uruguay.
- Cracco, P. (2018). Caracterización de mieles por su origen: Valorización de la miel en Uruguay. VI Congreso AUPA - Asociación Uruguaya de Producción Animal Tacuarembó, Uruguay.
- Cuevas-Glory, L. F., Pino, J. A., Santiago, L. S., Sauri-Duch, E. (2007). A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 103(3), 1032-1043
- Daners, G. y Campá, P. (1996). Evidencia palinológica de la existencia de miel monofloral de coronillo (*Scutia buxifolia*) en Uruguay. Actas Del IV Congreso Ibero Latinoamericano de Apicultura. Mercedes, Uruguay.
- Daners, G., Tellería, M. C. (1998). Native vs. introduced bee flora: A palynological survey of honeys from Uruguay. *Journal of Apicultural Research*, 37(4), 221-229.
- Doner, L. W. (1977). The sugars of honey-A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28(5), 443-456.
- Fernández-Torres, R., Pérez-Bernal, J. L., Bello-López, M. Á., Callejón-Mochón, M., Jiménez-Sánchez, J. C., Guiraúm-Pérez, A. (2005). Mineral content and botanical origin of Spanish honeys. *Talanta*, 65(3), 686-691.
- Izaguirre, P. (1995). Especies indígenas y subespontáneas del género *Trifolium* L. *INIA Serie Técnica* N° 58.
- Lapetina, J. (2012). Guía de buenas prácticas ganaderas para el manejo y conservación de pastizales naturales en áreas protegidas. Quebradas del Norte. DINAMA, Uruguay.
- Malkamäki, A., Toppinen, A., Kanninen, M. (2016). Impacts of land use and land use changes on the resilience of beekeeping in Uruguay. *Forest Policy and Economics*, 70, 113-123.
- McGregor, S. E. (1976). Insect pollination of cultivated crop plants. Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture.
- MGAP. (2019). Anuario estadístico 2019. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. website: <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2019/Anuario2019.pdf> (Consultado en febrero 2023)

- Millot, J., Risso, D., Methol, R. (1987). Relevamiento de pasturas naturales y mejoramientos extensivos en áreas ganaderas del Uruguay. MGAP Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Comisión Honoraria del Plan Agropecuario. Montevideo, Uruguay.
- MSP. (2017). Miel y Productos Relacionados. Reglamento Bromatológico Nacional. 6ª Edición. Decreto N° 315/994 de fecha 5/7/1994. Anotado y concordado con Apéndice Normativo. IMPO.
- OEA. (1992). Uruguay - Estudio Ambiental Nacional Secretaria Ejecutiva para Asuntos Económicos y Sociales. Departamento de Desarrollo Regional y Medio Ambiente, Washington D.C. Pérez Piedrabuena, F. (2004). Flora nativa: árboles y arbustos del Uruguay y regiones vecinas. Ediciones Guyunusa, Montevideo, Uruguay.
- Pérez, R. A., Sánchez-Brunete, C., Calvo, R. M., Tadeo, J. L. (2002). Analysis of volatiles from Spanish honeys by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), 2633–2637.
- Pérez Piedrabuena, F. (2004). Flora nativa: árboles y arbustos del Uruguay y regiones vecinas, Volumen 2. Ediciones Guyunusa. Montevideo, Uruguay.
- Santos, E., Mendoza, Y., Díaz, R., Harriet, J., Campá, J. (2009). Valor económico de la polinización realizada por abejas *Apis mellifera* en Uruguay, una aproximación. *Serie de Difusión INIA*, 568, 25–28.
- Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M. (2017). Chemical Composition of honey. In: JM. Alvarez-Suarez (Ed.). *Bee Products - Chemical and Biological Properties*. Springer International Publishing AG, Switzerland, p. 43-82.
- Sawyer, R., Pickard, R. S. (1988). *Honey identification*. Cardiff Academic Press, Cardiff, United Kingdom
- Scepankova, H., Saraiva, J.A., Estevinho, L.M. (2017). Honey health benefits and uses in medicine. In: n: JM. Alvarez-Suarez (Ed.). *Bee Products - Chemical and Biological Properties*. Springer International Publishing AG, Switzerland, p. 83-98
- Tejera, L., Invernizzi, C., Daners, G. (2013). Población y recursos alimenticios en colonias de *Apis mellifera* L. en Uruguay. *Archivos de Zootecnia*, 62(240), 607–610.
- Tomás-Barberán, F., Martos, I., Ferreres, F., Radovic, B. S., Anklam, E. (2001). HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(5), 485–496.
- Tomás-Barberán, F. A., Andrés-Lacueva, C. (2012). Polyphenols and health: current state and progress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 8773–9150.

- Vázquez, L. C., Díaz-Maroto, M. C., Guchu, E., Pérez-Coello, M. S. (2006). Analysis of volatile compounds of Eucalyptus honey by solid phase extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, 224(1), 27–31.
- Verzera, A., Campisi, S., Zappalà, M., Bonaccorsi, I. (2001). SPME-GC-MS analysis of honey volatile components for the characterization of different floral origin. *American laboratory*, 33(15),18-23.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A. (2008). Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of Food Science*, 73(9), 117–124.

Capítulo II

ESTUDIO PALINOLÓGICO Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LA MIEL

Introducción

El origen botánico de la miel ha sido tradicionalmente determinado por análisis melisopalinológico: que consiste en la identificación del polen por examen microscópico (Maurizio, 1975; Louveaux et al., 1978; Von Der Ohe, 2004). Este análisis tiene un rol fundamental cuando se trata de comercializar mieles monoflorales. Internacionalmente y en forma general se considera un porcentaje de 45% de granos de polen de una misma especie vegetal en el análisis melisopalinológico para considerar una miel monofloral. Aunque existen excepciones como es el caso de la miel de *Eucalyptus* en la que sus granos de polen se encuentran sobrerrepresentados, por lo que para ser considerada monofloral debe presentar, al menos, el 75% de polen de este género (Santos et al., 2018). El caso opuesto es el de la miel de citrus en la que sus granos de polen se encuentran subrepresentados por lo que se considera suficiente una presencia de este tipo de polen entre un 10-20% para ser considerada monofloral de citrus (Louveaux et al., 1978; Juan-Borras et al., 2015).

Por otra parte, las mieles poliflorales son aquellas donde se encuentran en forma significativa granos de polen de diferentes orígenes florales sin predominancia determinante de ninguno. La producción de mieles monoflorales/multiflorales depende de varios factores, y en particular de la oferta de plantas melíferas en cada región. Sin embargo, en algunos casos, las mieles contienen cantidades muy pequeñas de polen, lo que dificulta su determinación. Esto se debe a que no todas las plantas son igualmente poliníferas, es decir existen especies que tienen una elevada producción de polen y otras que producen muy poco. Por lo tanto, no siempre es representativa la cantidad de granos de polen en una muestra de miel para determinar su origen floral, lo que podría conducir a un resultado impreciso. El problema en la determinación del origen botánico de la miel radica en las propias limitaciones que posee el análisis melisopalinológico tradicional. Entre las principales limitaciones que presenta este análisis se encuentra la necesidad de contar con un experto en el reconocimiento de especies vegetales a partir de sus granos de polen y el tiempo requerido para este análisis de reconocimiento (Rodopoulou et al., 2018).

Numerosos estudios se enfocan en la caracterización fisicoquímica de la miel de forma de complementar el análisis melisopolinológico para la determinación del origen floral de la misma (Popek, 1998; Bogdanov, 2007; Silva et al., 2009; Islam et al., 2012; Popek et al., 2017). Esta caracterización incluye la determinación de pH, acidez total, conductividad eléctrica, color, actividad de diastasa (enzima que evidencia la calidad de la miel), humedad y cenizas. Los trabajos que aplican esta caracterización hacen énfasis en las dificultades del método tradicional (Rodopoulou et al., 2018). Esto se debe al esfuerzo que representa el análisis de las muestras, así como la necesidad de contar con palinólogos expertos, capaces de reconocer las especies vegetales nativas a partir de los granos de polen. Los parámetros fisicoquímicos de cualquier alimento son indicadores de calidad de los mismos, tanto aquellos que se determinan mediante análisis de laboratorio como puede ser su estado de descomposición o adulteración, como los que pueden percibirse mediante los sentidos como aroma, sabor, textura, otros, condicionando al consumidor en su elección. En el caso de la miel además de ser indicadores de calidad los parámetros fisicoquímicos también son estudiados para contribuir a la determinación del origen botánico y geográfico de las mieles (Bogdanov, 2007; Popek et al., 2017), y resultan complementarios del análisis polínico. Las características de la miel varían según su origen botánico y geográfico, así como las condiciones climáticas, procesado y almacenamiento (Machado De-Melo et al., 2018).

La miel se compone principalmente de carbohidratos y agua, parámetros que influyen sobre su vida útil y algunas propiedades, entre las que se destacan el color, aroma, sabor, densidad, viscosidad, higroscopicidad y granulación (Machado De-Melo et al., 2018). Dentro de los parámetros que se relacionan con la vida útil de la miel se encuentra la humedad. La gran diferencia en el contenido de humedad entre el néctar y la miel depende del proceso de deshidratación del néctar colectado llevada a cabo por las abejas durante la etapa de maduración de la misma en la colmena. Pero este contenido de agua presente en la miel puede ser dependiente de diferentes factores como el origen botánico y/o geográfico del néctar, del suelo, condiciones climáticas, estación, intensidad del flujo de néctar, grado de maduración, manipulación del apicultor durante la cosecha, así como la extracción el procesamiento y condiciones de almacenamiento (Estupiñán et al., 1998; Singh and Singh, 2018). El porcentaje de humedad según el Reglamento Bromatológico Nacional no puede superar el 20% (MSP, 2017). Otros trabajos publicados sostienen que el contenido de humedad puede variar entre 13 y 25% (Simal et al., 1983), considerando óptimo un valor entre 17 y 18%, momento en el cual se considera la mejor condición para que ocurra la cristalización. Estudios previos han reportado la relación entre el contenido de humedad con la fermentación y el recuento de levaduras y se encontró que, por encima del 19% de humedad la miel puede no granularse tan fácilmente, lo que influye en el crecimiento de las levaduras y la consiguiente fermentación (Stephen, 1946; Singh and Singh, 2018). En tanto, mieles con bajo

contenido de humedad son más viscosas y presentan dificultades para el trabajo de extracción (Estupiñán et al., 1998).

La acidez de la miel se relaciona con la fuente de néctar que la abeja visita y la acción de enzimas y bacterias. La acidez libre se debe a ácidos orgánicos, principalmente ácido glucónico, (que está en equilibrio con su lactona), iones inorgánicos como fosfatos, cloruros, sulfatos y nitratos, que podrían producir sus ácidos correspondientes (Belay et al., 2013). El Reglamento Bromatológico Nacional (MSP, 2017) establece que la acidez libre no debe superar los 40meq/kg.

El pH de la miel no se relaciona necesariamente a la acidez dado que algunos componentes presentes en la miel como sales y minerales poseen capacidad buffer (Ojeda De Rodríguez et al., 2004). Aunque generalmente el bajo valor de pH (entre 3,5 y 5,5) se debe a la presencia de ácidos orgánicos que contribuyen al sabor de la miel y la estabilidad contra el deterioro microbiano (Bogdanov et al., 2004).

Un parámetro que puede indicar la frescura de la miel es la ausencia o presencia de trazas de hidroximetilfurfural (HMF), un compuesto furánico producido por la degradación de azúcar, este componente se forma mediante la deshidratación de hexosas en medio ácido y es un intermediario en la reacción de Maillard (Pascual-Maté et al., 2018). La reacción de Maillard es un tipo de pardeamiento no enzimático que involucra grupos amino libre de aminoácidos y grupos carbonilo de azúcares reductores. La interacción entre estos grupos conduce a una secuencia de reacciones donde se forman múltiples compuestos con diferentes funciones biológicas (actividad antioxidante y antibacteriana) (Brudzynski and Miotto, 2011). La concentración de HMF aumenta cuando la miel es calentada o bien adulterada con azúcares comerciales y de forma natural durante el almacenamiento prolongado (Maidana, 2004; Bogdanov, 2007; Belay et al., 2013). Según lo establecido por Reglamento Bromatológico Nacional el contenido máximo de HMF no debe superar los 40 mg/kg (MSP, 2017).

La diastasa es una enzima presente en la miel que puede tener diferentes orígenes, o bien proviene mayoritariamente de las glándulas hipofaríngeas de las abejas, aunque pequeñas cantidades pueden venir del néctar, melaza o polen que la abeja colecta (Persano et al., 1990). Esta enzima hidroliza el almidón y dextrinas dando como resultado carbohidratos de menor peso molecular. Debido a la sensibilidad de la diastasa al calor y al almacenamiento, la medida de la actividad enzimática es utilizada como indicador de frescura de la miel (Doner, 2003). Según el Reglamento Bromatológico Nacional (MSP, 2017), la miel debe presentar una actividad diastásica mínima de 8 en la escala de Gothe (Bogdanov and Martin, 2002; Pita-Calvo et al., 2017).

La conductividad eléctrica (CE) se refiere a la capacidad de un material para conducir una corriente eléctrica. En el caso de la miel, el valor de la CE está directamente relacionado con el origen

botánico, así como con el contenido mineral, iones inorgánicos, ácidos orgánicos, proteínas y otros componentes como azúcares, polioles y polen que pueden actuar como electrolitos (White, 1979; Živkov Baloš et al., 2018). Si bien el Reglamento Bromatológico Nacional no establece valores, según el Codex Alimentarius (2001) la conductividad eléctrica de la miel no debe superar los 0,80 msiemens/cm. La CE es una medida indirecta del contenido de cenizas en la miel (Accorti et al., 1987; Santos et al., 2018).

El contenido de cenizas en la miel es generalmente bajo y depende de la composición del néctar de las plantas predominantes en su formación. El tipo de suelo en el que se encontraban las plantas originales así como el néctar también influye en la cantidad de minerales presentes en las cenizas de la miel (Felsner et al., 2004). El contenido de cenizas de la miel es muy variable, desde 0,02 a 1% (Doner, 2003).

El color de la miel es una propiedad física que es percibida de inmediato por el consumidor. Puede variar de incolora y amarillo claro a ámbar oscuro o casi negro, incluso puede presentar reflejos verdes o rojizos (Accorti et al., 1986). El color de la miel se ha intentado relacionar con el origen floral, métodos industriales de procesamiento, temperatura y tiempo de almacenamiento (Terrab et al., 2004; Santos-Buelga et al., 2017), por otro lado, el color se ha relacionado al contenido de polifenoles (Amiot et al., 1989; Cianciosi et al., 2018) así como a la actividad antioxidante, conductividad eléctrica y contenido de cenizas (Al et al., 2009; Santos et al., 2018). Internacionalmente para medir color en miel se utiliza la escala Pfund (Bogdanov et al., 2004). Esta escala se basa en la comparación óptica con un estándar de glicerol y varía desde 0 a 150 mm, comenzando con miel de color muy claro y aumentando hasta miel muy oscura. La escala muestra siete gamas con diferentes designaciones de color: blanco agua (≤ 8), extra blanco (> 8 a ≤ 17), blanco (> 17 a ≤ 34), ámbar extra claro (> 34 a ≥ 50), ámbar claro (> 50 a ≥ 85), ámbar (> 85 a ≥ 114) y ámbar oscuro (> 114) hasta 150 mm Pfund (USDA, 1985).

La miel es una solución altamente concentrada de azúcar y agua donde los azúcares simples fructosa y glucosa representan más del 85% de sus sólidos. Otro 10 % de los sólidos de la miel incluye al menos otros 25 azúcares más complejos, dándole el perfil de azúcar más complejo de cualquier producto natural (Santos-Buelga et al., 2017). Algunos de estos azúcares están en niveles muy bajos, y se forman uniendo fructosa y glucosa en muchas combinaciones diferentes (Doner, 2003). Con el tiempo la miel líquida tiende a cristalizar. La mayoría de las mieles son soluciones sobresaturadas de glucosa, este azúcar puede cristalizar espontáneamente a temperatura ambiente en forma de monohidrato de glucosa y la solución vuelve al estado saturado más estable (Zamora and Chirife, 2006). La cristalización es un fenómeno que no siempre es deseado por el consumidor, la granulación espontánea puede conducir a cristales gruesos no deseados y puede causar pérdida de calidad debido a la separación de fases, la sedimentación, la actividad de agua aumentan hasta

niveles que pueden llevar a procesos de fermentación microbiana (Venir et al., 2010; Escuredo et al., 2014). Además, la cristalización puede presentar un problema para el procesamiento ya que afecta el flujo de la miel durante la extracción, bombeo, sedimentación, filtración y embotellado (Laos et al., 2011). El fenómeno más importante para provocar la cristalización es la relación fructosa/glucosa (F/G) a favor de la glucosa. Cuando la relación $F/G > 1,3$ la cristalización es más lenta y cuando la relación $F/G < 1$ la cristalización es más rápida. Otro indicador para predecir la cristalización de la miel es la relación glucosa/agua (G/W). Cuanto mayor sea el contenido de glucosa y menor el contenido de agua de la miel, más rápida será la cristalización (Dobre et al., 2012).

De lo expuesto, se desprende que tanto el análisis melisopalinológico como la caracterización fisicoquímica de la miel presentan dificultades en su determinación principalmente por la necesidad de personal experto y entrenado. Ambas metodologías resultan complementarias en la caracterización de la miel. Pero el contar con quimiomarcadores propios y característicos de los distintos tipos de miel es una alternativa más precisa y rápida en muchos casos si se cuenta con los marcadores adecuados identificados.

Objetivos:

-Determinar el origen botánico de las muestras de miel a partir del análisis melisopalinológico como información de partida para los siguientes análisis.

-Determinar los parámetros fisicoquímicos de las muestras de miel estudiadas como una primera aproximación para lograr una caracterización completa de las mieles estudiadas en este trabajo.

Materiales y métodos:

Recolección y acondicionamiento de muestras de miel

Quince muestras de miel fueron colectadas de la región sureste de Uruguay. Las primeras nueve muestras de miel que ingresaron fueron cosechadas entre los meses de marzo y abril del 2016, y provenían del departamento de Maldonado, a excepción de una que fue brindada por un productor del departamento de Lavalleja. El segundo ingreso correspondió a muestras de miel cosechadas durante los meses de setiembre y octubre del 2016 y provenían del departamento de Canelones, a excepción de una que fue proporcionada por productores del departamento de Rocha. Todas las muestras fueron codificadas y almacenadas en frascos de vidrio estériles manteniéndolas a 4°C en la oscuridad hasta ser analizadas en los meses contiguos a su ingreso (Tabla 2.1, Figura 2.1),

Tabla 2.1: Muestras de miel recolectadas: Las columnas indican el código asignado para cada una de las muestras de miel, (el cual será explicado más adelante en el capítulo), la región, departamento y momento de cosecha.

Código	Región	Departamento	Cosecha
Lm01	Villa del Rosario	Lavalleja	Marzo-Abril
Sbp02	Aiguá	Maldonado	
SMm03	Aiguá		
Sbm04	Aiguá		
Sbm05	Aigua		
Sbm06	Carapé		
Ep07	Las Cañas, San Carlos		
Ep08	San Carlos		
Sbm09	San Carlos		
Ep10	Castillos		
Ep11	Canelón Chico	Canelones	Set-October
Tp12	Toledo		
Lm13	Toledo		
Lm14	Sauce		
Sbp15	Santa Lucia		

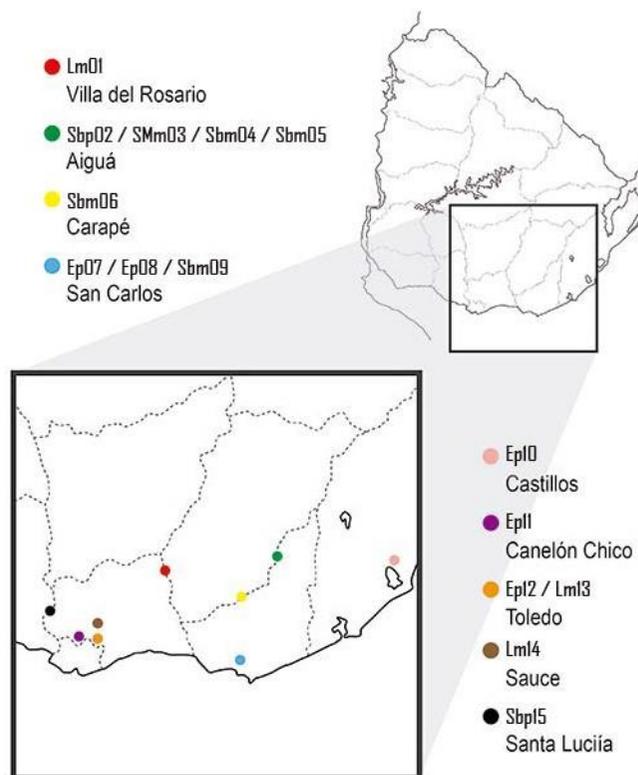


Figura 2.1. Mapa de las regiones de procedencia de las muestras de miel.

Análisis melisopalinológico

El análisis melisopalinológico de las muestras fue realizado con el apoyo de la Lic. Gloria Daners (Departamento de Evolución de Cuencas, Facultad de Ciencias-UdelaR). Este análisis se realizó en base al método propuesto por Loveaux et al. (1978). Este ha sido el método tradicional para determinar el origen botánico de la miel. El análisis consiste en la observación de la miel al microscopio con aumento 400X realizando recuentos sobre 1200 granos de polen, anotando la proporción porcentual de cada especie que aparece en ellos comparando con pólenes de referencia (Loveaux et al., 1978; Rialobos et al., 1997; Roselló Caselles et al., 1998).

Evaluación de características fisicoquímicas

La evaluación de las características fisicoquímicas se realizó de acuerdo a los métodos presentados por la International Honey Commission (IHC) (Bogdanov, 2009). Estos métodos han sido seleccionados y compilados para incluir métodos antiguos y otros modernos, considerados suficientes para la determinación de la calidad de la miel. Los parámetros fisicoquímicos que se determinaron son: pH, acidez, humedad, conductividad, cenizas, hidroximetilfurfural (HMF), color, índice de diastasa y azúcares. Para cada una de las 15 mieles se procedió de la siguiente manera:

-Determinación del pH y de la acidez libre por valoración

10g de miel se disolvieron en 75 mL de agua descarbonatada, se mido el pH y luego se procedió a la valoración de la muestra con NaOH 0,103 M previamente estandarizado. La acidez libre se expresa como miliequivalentes/kg miel.

-Humedad por refractometría

Cada muestra de miel fue homogenizada y colocada en un baño termostático de agua a 50°C hasta disolución de todos los cristales. Luego de alcanzada la temperatura ambiente se cubrió el prisma del refractómetro Abbe con la muestra. Se registró el índice de refracción y se corrigió por la temperatura. El contenido de agua se expresó como g en 100g de muestra.

-Conductividad

Se preparó una solución al 20% de cada muestra de miel (20 g de miel calculada en base seca disuelta en 100 mL de agua destilada) y 40 mL de ésta se colocaron en baño termostático a 20°C, luego de alcanzado el equilibrio térmico se midió la conductividad de la miel utilizando un conductímetro (Oakton Instruments, USA) y la temperatura en que se realizó la medición. El resultado se expresó en $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$.

-Cenizas

Se pesaron 5g de muestra en crisol previamente calentado y enfriado en desecador. Se añadieron dos gotas de aceite de oliva para evitar formación de espuma. La muestra se calcinó a 600°C en mufla. Se repite el procedimiento hasta alcanzar un peso constante. La proporción de ceniza se expresa g/100g de miel.

-Hidroximetilfurfural (HMF)

El contenido en HMF se determinó mediante el método espectrofotométrico de White (1979), tal como se describe por la International Honey Commission (IHC) (Bogdanov, 2009). Se disolvieron 5g de miel en 25mL de agua y se añadieron 0,5mL de solución Carrez I [(K₄Fe(CN)₆·3H₂O al 15%) y 0,5mL de solución Carrez II [Zn(CH₃COO)₂·2H₂O al 30%]. Se mezcló y llevó a volumen final de 50mL con agua destilada. Luego de filtrada esta solución se descartaron los primeros 10mL y se colocaron 5ml del filtrado en dos tubos de ensayos. En uno de los tubos se añadieron 5mL de agua destilada (muestra problema) y al segundo tubo se le añadieron 5 mL de Na₂S₂O₅, 0,2% (blanco de referencia). Se agitó y se determinó la absorbancia de la muestra contra la de referencia a 284nm y 336nm.

La concentración de HMF se calculó como:

$$\text{HMF (mg/kg)} = (A_{284} - A_{336}) * 149,7.$$

-Diastasa

Para la determinación de la actividad diastasa se utilizó el método de Schade et al. (1958), que se basa en la velocidad de hidrólisis de una solución de almidón al 2% por las enzimas diastasas en una solución amortiguada de miel utilizando una solución de yodo como indicador mediante una medida espectrofotométrica a 660 nm.

La miel se preparó disolviendo 10g de miel en 15mL de agua se agregaron 5mL de buffer acetato (43,5g CH₃COONa·3H₂O en 250mL de agua, pH 5,3) y 3mL de NaCl (2,9g NaCl en 100mL de agua) y se llevó a 50mL con agua.

Para comenzar la determinación de diastasa en la muestra de miel se tomaron 10mL de la solución de miel previamente preparada y se colocaron en un baño de agua a 40°C, al mismo tiempo se colocaron 10 mL de la solución de almidón a la misma temperatura. Luego de transcurridos 15 minutos se transfirieron 5mL de la solución de almidón a la solución de miel, sin retirar del baño termostático se esperó 5 minutos y se tomaron 0,5mL de la mezcla a un matraz con la cantidad de agua determinada previamente en la calibración del almidón con el consecuente agregado de 5mL de la solución de yodo 0,0007N. Se mezcló y se midió la absorbancia a 660nm. Dependiendo del valor obtenido en esta primera medida se estableció el tiempo de las siguientes mediciones para

cada muestra de miel procediendo de la misma manera para obtener al menos 3 medidas dentro del rango de absorbancia de 0,456 - 0,155.

La actividad diastasa se calcula como DN (número diastasa) de la siguiente manera (Kedzierska-Matysek et al., 2016):

$$DN = (60 \text{ minutos} / t_x) * (0,10/0,01) * (1,0/2,0) = 300/t_x$$

Siendo t_x el tiempo de reacción en minutos para alcanzar la absorbancia 0,235. Este tiempo es obtenido mediante regresión lineal.

-Color

El color de las mieles fue determinado por medida directa en fotómetro portátil digital (HANNA HI 96785). Las muestras de miel a temperatura ambiente, homogéneas y sin burbujas de aire fueron transferidas a una celda de 10mm. La celda se insertó en colorímetro con lectura directa en milímetros Pfund (USDA, 1985) al compararse con un estándar de glicerol. La medida de color se basa en la escala mm Pfund insertada en el fotómetro y varía de 0 a 150 mm Pfund, La escala muestra siete gamas con diferentes designaciones de color : blanco agua (≤ 8), extra blanco (>8 a ≤ 17), blanco (>17 a ≤ 34), ámbar extra claro (>34 a ≥ 50), ámbar claro (>50 a ≥ 85), ámbar (>85 a ≥ 114) y ámbar oscuro (>114) hasta 150 mm Pfund (USDA, 1985).

-Azúcares

Se determinaron por cromatografía líquida (HPLC) de acuerdo al método original descrito por Bogdanov and Bauman (1988). El método determina el contenido de azúcares por HPLC equipado con detector de índice de refracción (IR). Los picos se identificaron por sus tiempos de retención y la cuantificación se realizó mediante el uso de estándar externo (curva de calibración). Se utilizaron estándares de fructosa, glucosa, sacarosa, turanosa y maltosa. Las muestras de miel se prepararon disolviendo 5g de miel en 40 mL de agua. Por separado se tomaron 25 mL de metanol en un matraz aforado de 100,0 mL y la solución de miel fue transferida cuantitativamente al matraz. Se completó con agua hasta el aforo. Finalmente se filtró la solución a través de filtro de membrana 0,22 μm previo al análisis de HPLC.

Para el análisis por HPLC se utilizó un equipo Shimadzu LC 20-10 con detector de índice de refracción. La columna cromatográfica utilizada fue SUPELCOSIL™ LC-NH2 (15 cm x 4.6 mm, 5 μm), Flujo: 1,3 mL/min, Temperatura de la columna y del detector: 30°C, Volumen de la muestra: 10 μL .

Análisis estadísticos

El análisis estadístico multivariado por componentes principales (PCA) se realizó utilizando el software InfoStat (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Este análisis consiste en la transformación de variables originales en nuevas variables o componentes obtenidos por la combinación de las originales. De esta forma se logra la reducción de la complejidad de los datos que fácilmente pueden ser representados en 2 o 3 componentes principales.

Resultados y Discusión

En la Tabla 2.2 se muestran los resultados del análisis palinológico de la miel y su tipificación (monofloral o polifloral) según el porcentaje de polen observado. Con el fin de hacer más ágil la lectura de resultados y contribuir a un mejor análisis de los mismos es que se opta por el uso de la nomenclatura ya mencionada anteriormente para cada muestra de miel, la misma hace referencia al origen floral según el análisis palinológico realizado en esta sección. La nomenclatura utilizada es la siguiente: **Lm**: *Lotus* sp. monofloral, **Sbp** *Scutia buxifolia* polifloral, **SMm** *Schinus molle* monofloral, **Sbm** *Scutia buxifolia* monofloral, **Ep** *Eucaliptus* sp. polifloral, **Tp** *Trifolium* polifloral. El número corresponde al orden de ingreso de la muestra. Se encontró que 8 de las 15 muestras de miel son monoflorales. De las cuales 5 son monoflorales nativas (SMm03, Sbm04, Sbm05, Sbm06 y Sbm09), 3 monoflorales no nativas (Lm01, Lm13, Lm14), las 7 restantes resultaron ser poliflorales. Dentro de las monoflorales nativas el polen predominante encontrado fue de *Scutia buxifolia* en 4 de ellas y una monofloral nativa de *Schinus molle*. Las 3 monoflorales no nativas resultaron ser de *Lotus sp* mientras que las 7 restantes muestras poliflorales presentaron, en su mayoría, predominancia de polen de *Eucaliptus sp*. Los resultados obtenidos sobre los pólenes identificados en estas mieles concuerdan con trabajos previos reportados en la bibliografía, acerca de los taxones de las comunidades vegetales más comunes del país (Daners & Tellería, 1998; Corbella and Cozzolino, 2006;Tejera et al., 2013).

Tabla 2.2. Composición polínica de cada muestra de miel y su tipificación

Muestra	Tipificación	Origen floral	
		% polen mayoritario	% polen minoritario
Lm01	Monofloral	<i>Lotus sp</i> (77.6%)	<i>Ammi sp.</i> (5.6%); <i>Eucaliptus sp</i> (5.0%); <i>Trifolium pratense</i> (3.1%); <i>Asterea</i> (2.4%); <i>Echium sp.</i> (1.7%); <i>Trifolium repens</i> (1.0%); <i>Scutia buxifolia</i> (1.0%)
Sbp02	Polifloral	<i>Scutia buxifolia</i> (43.9%); <i>Schinus molle</i> (24.4%); <i>Eucaliptus sp</i> (12.5%); <i>Salix sp.</i> (5.7%); <i>Lotus sp</i> (3.8%); <i>Blepharocalyx tweediei</i> (2.8%); <i>Echium sp</i> (2.1%); <i>Allophylus edulis</i> (1.2%)	
SMm03	Monofloral	<i>Schinus molle</i> (62.9%)	<i>Scutia buxifolia</i> (17.9%); <i>Blepharocalyx tweediei</i> (3.8%); <i>Lotus sp</i> (3.6%); <i>Eucaliptus sp</i> (2.7%); <i>Baccharis sp</i> (2.4%); <i>Trifolium repens</i> (1.2%); <i>Struthanthus acuminatus</i> (1.2%)
Sbm04	Monofloral	<i>Scutia buxifolia</i> (52.8%)	<i>Blepharocalyx tweediei</i> (30.8%); <i>Schinus molle</i> (10.6%); <i>Eucalyptus sp</i> (1.8%)
Sbm05	Monofloral	<i>Scutia buxifolia</i> (64.2%)	<i>Schinus molle</i> (29.1%); <i>Eucalyptus sp</i> (1.7%)
Sbm06	Monofloral	<i>Scutia buxifolia</i> (51.4%)	<i>Schinus molle</i> (44.5%)
Ep07	Polifloral	<i>Eucalyptus sp</i> (41.7%); <i>Schinus molle</i> (18.3%); <i>Scutia buxifolia</i> (10.3%); <i>Baccharis sp</i> (8.3%); <i>Echium sp.</i> (6.9%); <i>Blepharocalyx tweediei</i> (4.7%); <i>Trifolium repens</i> (2.8%); <i>Trifolium pretense</i> (1.7%); <i>Acacia sp</i> (1.6%)	
Ep08	Polifloral	<i>Eucalyptus sp</i> (39.3%); <i>Scutia buxifolia</i> (31.6%); <i>Echium sp.</i> (9.3%); <i>Blepharocalyx tweediei</i> (6.7%); <i>Lotus sp</i> (5.2%); <i>Schinus molle</i> (1.4%); <i>Baccharis sp</i> (1.2%)	
Sbm09	Monofloral	<i>Scutia buxifolia</i> (55.2%)	<i>Schinus molle</i> (27.8%); <i>Eucalyptus sp</i> (8.0%); <i>Blepharocalyx tweediei</i> (4.2%)
Ep10	Polifloral	<i>Eucalyptus sp</i> (46.7%); <i>Acacia longifolia</i> (34.8%); <i>Lotus sp</i> (3.9%); <i>Papilionoidea</i> (3.0%); <i>Schinus molle</i> (2.6%); <i>Euphorbiaceae</i> (2.4%); <i>Baccharis sp</i> (2.2%)	

Tabla 2.2. Continuación

Ep11	Polifloral	<i>Eucalyptus sp</i> (71.5%); <i>Lotus sp</i> (5.9%); <i>Trifolium repens</i> (5.4%); <i>Trifolium pratense</i> (5.3%); <i>Baccharis sp</i> (4.7%); <i>Shinus molle</i> (1.7%)	
Tp12	Polifloral	<i>Trifolium repens</i> (23.2%); <i>Trifolium pratense</i> (22.2%); <i>Lotus sp</i> (15.5%); <i>Eucalyptus sp</i> (13.5%); <i>Shinus molle</i> (5.3%); <i>Ligudtrum vulgare</i> (2.8%); <i>Echium sp</i> (2.3%); <i>Brassicaceae</i> (2.2%); <i>Cynara cardunculuus</i> (2.0%); <i>Mentha pulegium</i> (1.8%); <i>Ammi visnaga</i> (1.5%); <i>Daucus carota</i> (1.0%)	
Lm13	Monofloral	<i>Lotus sp</i> (49.0%)	<i>Schinus molle</i> (12.1%); <i>Trifolium pretense</i> (10.2%); <i>Scutia buxifolia</i> (9.0%); <i>Eucalyptus sp</i> (7.0%); <i>Trifolium repens</i> (6.0%); <i>Ammi visnaga</i> (1.5); <i>Cynara cardunculuus</i> (1.5%)
Lm14	Monofloral	<i>Lotus sp</i> (61.6%)	<i>Eucalyptus sp</i> (15.9%); <i>Trifolium repens</i> (6.5%); <i>Scutia buxifolia</i> (3.6%); <i>Schinus molle</i> (2.9%); <i>Ammi visnaga</i> (2.1%); <i>Trifolium pretense</i> (1.4%); <i>Echium sp</i> (1.3%)
Sbp15	Polifloral	<i>Scutia buxifolia</i> (42.1%); <i>Echium sp</i> (22.4%); <i>Lotus sp</i> (14.0%); <i>Schinus molle</i> (5.9%); <i>Eucalyptus sp</i> (5.7%); <i>Trifolium repens</i> (3.7%); <i>Trifolium pretense</i> (1.7%); <i>Brassicaceae</i> (1.3%)	

En la Tabla 2.3 se muestran los resultados obtenidos de los análisis fisicoquímicos de las muestras de miel.

Tabla 2.3. Resultado fisicoquímico de las mieles

Muestra de miel	pH	Acidez (meq/Kg)	% Humedad	% Cenizas	Act. Diastasa Escala Gothe	HMF mg/Kg	Conductividad ms.cm-1	Color (mm) pfund
Lm01	4.0	21.5	17.6	0.06	48.4	0	0.51	48
Sbp02	5.6	12.0	18.4	0.5	26.6	0	1.32	99
SMm03	4.7	19.0	19.2	0.38	45.2	0	1.06	98
Sbm04	4.9	18.5	18.4	0.46	33.0	0	1.27	112
Sbm05	6.1	7.5	18.8	0.49	32.0	0	1.44	102
Sbm06	5.2	7.0	18.8	0.44	26.4	0	1.17	92
Ep07	5.5	13.5	18.8	0.46	22.7	0	1.38	118
Ep08	4.8	14.5	17.6	0.57	17.5	0	1.72	109
Sbm09	5.8	8.0	17.8	0.45	15.1	0	1.35	92
Ep10	4.2	18.5	15.0	0.20	14.7	0	1.03	71
Ep11	3.6	29.5	17.4	0.19	18.3	15.2	0.63	65
Tp12	3.5	30.0	17.2	0.11	24.8	8.6	0.48	44
Lm13	3.7	24.5	15	0.15	22.7	7.6	0.44	50
Lm14	3.5	36.5	16.8	0.08	24.9	8.5	0.49	60
Sbp15	4.4	17.5	17.4	0.39	n.d.	1.0	1.08	145
min	3.5	7.0	15.0	0.06	14.7	0.0	0.44	44
max	6.1	36.5	19.2	0.5	48.4	15.2	1.72	145

Los valores de pH obtenido para las muestras de miel variaron entre 3.5 y 6.1. Estos se encuentran dentro de los límites estándar del Códex Alimentario que establece el límite de pH entre 3.4 - 6.10. Este parámetro es de gran importancia durante la extracción y almacenamiento de la miel ya que influye en su textura, estabilidad y la vida útil de la miel (Terrab et al., 2004). Independientemente de su origen, el pH de la miel es generalmente ácido y se encuentra normalmente dentro del rango 3.4 a 6.4, suficientemente bajo como para inhibir el desarrollo de microorganismos (Cavia, 2002; Gomes et al., 2010). Los valores de acidez libre oscilaron entre 7 y 36.5 meq/kg por lo que se encontraron por debajo del valor máximo establecido en 40 meq/kg. El porcentaje de humedad varió entre 15.0 y 19.2%. un valor que se encuentra por debajo del límite máximo establecido de 20% en el Reglamento Bromatológico Nacional (MSP, 2017). Lo que nos indica un correcto almacenamiento dado que un valor superior podría ser indicio de crecimiento microbiano en las muestras durante el almacenamiento. Las abejas deshidratan y almacenan la miel en las celdas del panal que luego tapan para que se produzca la maduración, por lo que una cosecha temprana puede ser responsable de los valores altos de humedad en la miel.

A su vez, valores elevados de humedad pueden conducir fácilmente a la fermentación debido a que reduce la presión osmótica del azúcar que en condiciones normales es lo suficientemente elevada como para evitar la proliferación de levaduras osmófilas (tolerantes al azúcar) (Bogdanov and Martin, 2002).

Los valores de HMF estuvieron todos por debajo del límite máximo permitido que establece que no debe superar los 40 mg/kg (MSP, 2017). Este parámetro de frescura de la miel nos indica que la miel no fue sometida a tratamiento térmico luego de ser cosechada.

Por otra parte, este valor de bajo contenido de HMF se correlaciona con el valor de la actividad diastásica determinado para las mieles, ya que todas las mieles presentaron alto valor de la actividad diastásica que, según el Reglamento Bromatológico Nacional, no deben presentar un valor inferior a 8 en la escala de Gothe (MSP, 2017). Estos dos parámetros confirman la frescura de la miel luego de ser cosechada debido a que tanto la presencia de HMF como la reducción de la actividad enzimática, son provocados ya sea por el almacenamiento inadecuado de la miel o por el uso excesivo de calor en el procesamiento de la miel para la licuefacción o pasteurización, lo que provoca efectos adversos sobre la calidad de la miel (Bogdanov, 2007).

En cuanto al porcentaje de cenizas los valores obtenidos también se encontraron por debajo del límite máximo establecido en el Reglamento Bromatológico Nacional de 0.6% para miel de flores (MSP, 2017). Esto es un indicativo de la limpieza de las muestras de miel y ausencia de adulteración con melaza (Terrab et al., 2003a).

Los valores de conductividad variaron entre 0.44 y 1.70 ms/cm, solo 5 de las 15 muestras de miel estuvieron por debajo del límite máximo establecido para la miel en el Codex Alimentarius (2001) de 0.8 ms/cm. Tanto la conductividad como el contenido de cenizas están relacionados con el contenido mineral de la miel (Pires et al., 2009; Santos et al., 2014).

Las mieles con mayor porcentaje de cenizas presentaron mayores valores de conductividad. En la Figura 2.2 se observa la relación entre el contenido de cenizas y la conductividad eléctrica. La relación entre ambos valores se explica por el hecho de que la conductividad eléctrica, por definición, se refiere a la capacidad de un material de conducir una corriente eléctrica y dado que la miel es una mezcla de agua, minerales, ácidos y principalmente materiales orgánicos, cuanto mayor sea el contenido de minerales, que se ve reflejado en las cenizas, mayor será la conductividad eléctrica.

En cuanto al color, las mieles presentaron un amplio rango de valores de la escala Pfund en milímetros que van desde 48 a 145 (ámbar extra claro al ámbar oscuro respectivamente). Las mieles Sbm04, Sbm05, Sbm06 y Sbm09 monoflorales de *Scutia buxifolia* y SMm03 monofloral de *Shinus*

molle presentaron valores de conductividad superiores al establecido por Codex Alimentarius de 0.8 ms/cm y color ámbar, mientras que las mieles Lm01, Lm13 y Lm14 monoflorales de *Lotus* presentaron valores de conductividad por debajo del límite máximo establecido por Codex Alimentarius de 0.8 ms/cm⁻¹ y colores ámbar claro y extra claro (Codex Alimentarius. 2001).

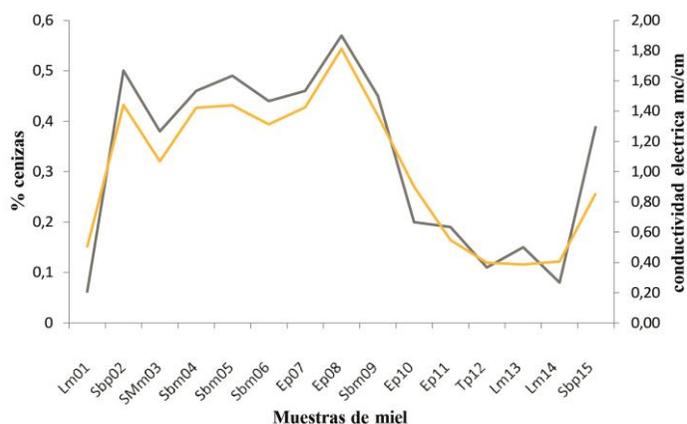


Figura 2.2. Relación entre contenido de cenizas (gris) y conductividad eléctrica (amarillo) de las diferentes mieles.

En la Figura 2.3 se observa la relación entre la conductividad eléctrica y el color de las mieles estudiadas. Resultados similares a los encontrados fueron reportados en la bibliografía en los que se relaciona altos valores de conductividad con el color oscuro de las mieles (Doner, 2003; Corbella et al., 2005; Corbella and Cozzolino. 2006; Yadata, 2014; Santos et al., 2018)

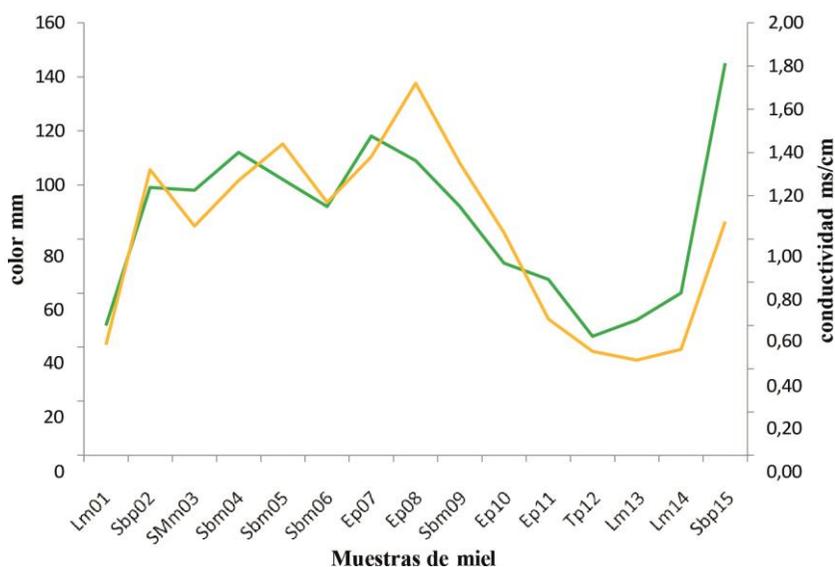


Figura 2.3. Relación entre el color (verde) y la conductividad eléctrica (amarillo) de las diferentes mieles

La Figura 2.4 muestra la representación gráfica del perfil cromatográfico típico de HPLC de azúcares en miel utilizando detector de índice de refracción. En la Tabla 2.4 se puede observar el contenido de cada azúcar en cada muestra de miel. En todos los casos los monosacáridos fructosa y glucosa son los azúcares mayoritarios, seguido por los disacáridos maltosa, sacarosa y turanosa. Dentro de las disposiciones particulares para miel en el Reglamento Bromatológico Nacional se establecen dos clasificaciones de miel según su origen en miel de flores y miel de mielada (MSP, 2017).

Mediante la suma de los azúcares reductores fructosa + glucosa ($F + G$), es posible distinguir entre estos dos tipos de miel. En la columna $F + G$ de la Tabla 2.4 se verifica que todas las mieles son miel de flores dado que se encuentran dentro de lo establecido por el reglamento bromatológico que indica que la suma $F + G$ no debe ser menor a 65% y además la sacarosa no debe superar el 5% para la miel de flores (MSP, 2017).

Por otro lado, la relación F/G nos permite predecir la tendencia a la cristalización de la miel, dado que la glucosa es menos soluble en agua que la fructosa (Laos et al., 2011). La relación $F/G < 1$ indica una rápida cristalización, mientras que la relación $F/G > 1.3$ indica una cristalización lenta (Dobre et al., 2012). En la Tabla 2.4 se puede observar que las mieles Tp12 y Lm14 presentaron una relación $F/G > 1.3$ por lo que pueden ser consideradas de cristalización lenta, mientras que el resto de las mieles presentan valores de F/G que quedan entre los límites de rápida y lenta cristalización. Otro parámetro que se utiliza para predecir la cristalización de la miel es la relación glucosa/agua (G/W). Esto es debido a que la humedad puede afectar las propiedades físicas de la miel (viscosidad, cristalización) así como otros parámetros como el color, la apariencia y conservación. Según este parámetro cuando la relación G/W es mayor a 1.7 la cristalización será lenta, mientras que cuando la relación $G/W > 2$ será una cristalización rápida (Dobre et al., 2012).

En la Tabla 2.4 se puede ver que las mieles Ep10 y Lm13 mostraron una relación $G/W > 2$ por lo que pueden presentar una cristalización rápida; mientras que las mieles Sbp02, SMm03, Sbm04, Sbm05, Sbm06, Sbm09, Tp12 presentaron una relación $G/W < 1.7$ por lo que su cristalización será lenta. Según estas dos relaciones F/G y G/W , el parámetro que mejor clasifica la tendencia a cristalizar en este caso es G/W .

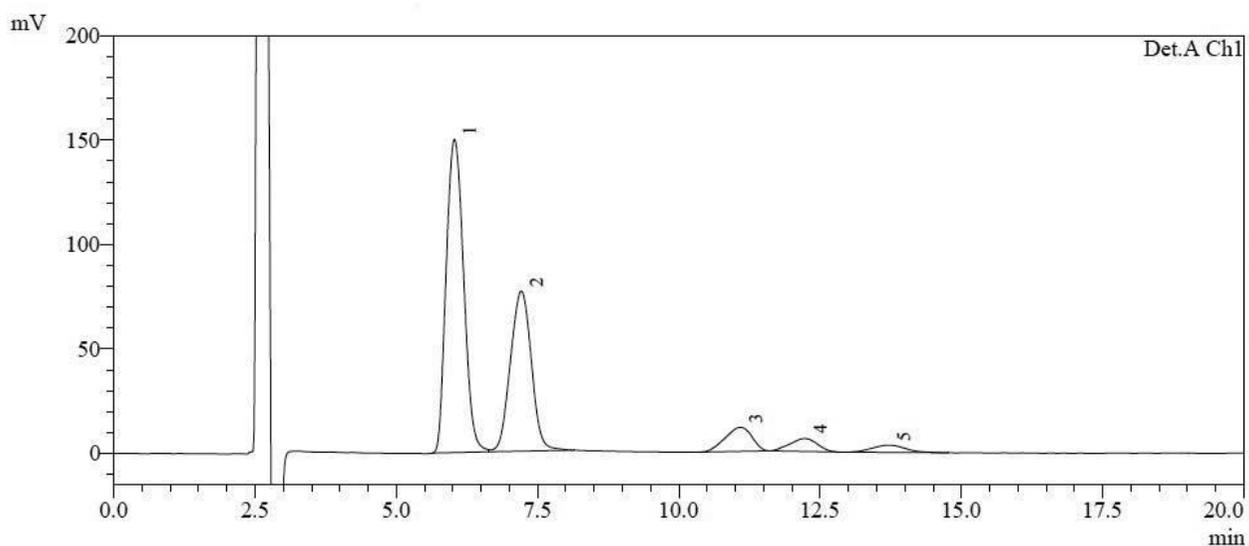


Figura 2.4. Perfil cromatográfico por HPLC de azúcares en miel (1: Fructosa. 2: Glucosa. 3: Sacarosa. 4: Maltosa. 5: Turanosa)

Tabla 2.4. Contenido de cada azúcar (g/100g) en las mieles

Muestra de miel	Fructosa	Glucosa	Sacarasa	Turanosa	Maltosa	F+G	F/G	G/W
Lm01	39.5	33.4	2.0	0.9	2.7	72.9	1.2	1.9
Sbp02	36.4	29.2	3.1	3.0	3.8	65.6	1.2	1.6
SMm03	36.9	29.9	2.9	1.9	3.4	66.8	1.2	1.6
Sbm04	37.0	29.3	2.9	2.2	3.0	66.3	1.3	1.6
Sbm05	36.2	28.9	2.8	2.7	3.8	65.1	1.3	1.5
Sbm06	36.1	28.9	3.2	2.8	3.9	65.0	1.2	1.5
Ep07	36.5	31.4	3.1	2.9	3.7	67.9	1.2	1.7
Ep08	38.1	29.2	3.4	2.9	4.2	67.3	1.3	1.7
Sbm09	36.2	28.9	3.1	3.0	4.5	65.1	1.3	1.6
Ep10	40.4	36.6	2.5	1.1	1.7	77.0	1.1	2.4
Ep11	40.8	30.8	2.1	0.9	2.4	71.6	1.3	1.8
Tp12	42.5	27.9	0.4	1.8	4.5	70.4	1.5	1.6
Lm13	40.0	31.7	0.9	2.4	1.8	71.7	1.3	2.1
Lm14	42.1	29.1	2.3	1.2	2.0	71.2	1.4	1.7
Sbp15	37.4	28.8	2.8	2.3	3.9	66.2	1.3	1.7
min	36.1	27.9	0.4	0.9	1.7	65.0	1.10	1.5
max	42.5	36.6	3.4	3.0	4.5	77.0	1.53	2.4

Mediante el uso de herramientas estadísticas multivariantes se realizó el análisis de componentes principales (PCA). En la Figura 2.5 es posible observar la distribución de las muestras a través de las variables proyectadas (acidez, contenido HMF, actividad diastasa, % humedad, pH, Color, % cenizas, Conductividad, relación G/W).

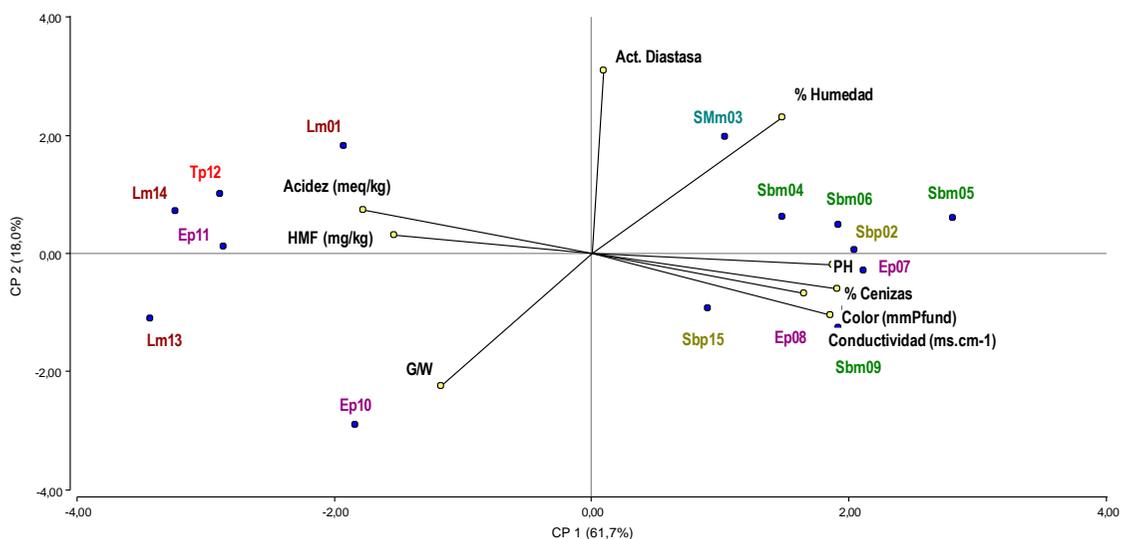


Figura 2.5: PCA en dos dimensiones de los primeros dos componentes principales.

Color bordo: corresponde a mieles monoflorales de *Lotus sp*; color verde oliva: corresponde miles poliflorales con predominancia de *Scutia buxifolia*; color turquesa: corresponde a miel monofloral de *Schinus molle*; color verde: corresponde a mieles monoflorales de *Scutia buxifolia*; color violeta: corresponde a mieles poliflores con predominancia de *Eucalyptus sp*; color negro: corresponde a las propiedades fisicoquímicas evaluadas.

La combinación de los dos primeros componentes permite explicar aproximadamente el 80% de la variabilidad total del sistema. Hacia valores positivos del eje x se agrupan las muestras nativas estudiadas, ya sean monoflorales de *Scutia buxifolia* (Sbm04, Sbm05, Sbm06 y Sbm09). monofloral de *Schinus molle* (SMm03). y polifloral con predominancia de polen de *Scutia buxifolia* (Sbp02 y Sbp15). junto con dos **no** nativas (Ep07 y Ep08) poliflorales ambas con predominancia de polen de *Eucalyptus sp* seguido de un aporte de polen secundario nativo *Schinus molle* y *Scutia buxifolia* respectivamente. Puede apreciarse como este grupo de mieles nativas se agruparon próximas a las propiedades fisicoquímicas: conductividad eléctrica, porcentaje de cenizas y color que además están relacionadas entre sí. Hacia valores negativos del eje x se agruparon las mieles no nativas monoflorales de *Lotus sp* (Lm01, Lm13, Lm14). y poliflorales con principal aporte de *Eucalyptus spp* (Ep10 y Ep11) y *Trifolium repens* (Tp12).

Conclusiones

El análisis palinológico de las muestras permite concluir que es posible obtener mieles monoflorales producidas a partir de flora nativa del Uruguay. A partir de los resultados obtenidos en la evaluación de las propiedades fisicoquímicas, es posible concluir por un lado que todas las mieles analizadas son frescas, es decir que no han sufrido tratamiento térmico ni adulteración, debido al bajo contenido de HMF y alto valor de número Gothe para la enzima diastasa. Por otra parte, se pudo constatar que las mieles monoflorales nativas de *Scutia buxifolia* y *Shinus molle* presentan conductividades altas y colores oscuros además de un alto porcentaje de ceniza, lo que es un indicativo de alto contenido mineral (Accorti et al., 1987; Popek 2002; Terrab et al., 2003b; Kropf et al., 2008; Yadata, 2014), siendo esta una característica a destacar de las mieles monoflorales nativas del Uruguay desde el punto de vista nutricional.

La suma de los azúcares reductores F + G fue mayor a 65% en todas las muestras de miel estudiadas, lo que permitió confirmar el origen floral de las muestras por contraste con las características de las denominadas miel de mielatos (MSP, 2017).

Complementariamente, se pudo constatar que las mieles nativas estudiadas (Sbp02. SMm03. Sbm04. Sbm05. Sbm06. Sbm09) y una no nativa polifloral (Tp12) poseen una tendencia a la cristalización lenta según la relación G/W que resultó ser <1.7 . Mientras que, las mieles no nativas poliflorales (Ep10 y Lm13) poseen una tendencia a la cristalización rápida según la relación G/W que resultó ser >2 . Esta diferencia entre mieles nativas y no nativas con tendencia a la cristalización rápida o lenta indica la influencia que puede tener el origen botánico en las proporciones de azúcar presentes en la miel y por lo tanto en la cristalización. A partir del análisis de componentes principales es posible diferenciar las mieles nativas de no nativas a través de sus propiedades fisicoquímicas. Este es un aspecto relevante en la valorización de las mieles y es un tema de interés en todas las zonas productoras tal como se verifica a partir de antecedentes existentes en la literatura (Escuredo et al., 2014; Ruoffa et al., 2007).

Bibliografía

- Accorti, M., Persano Oddo, L., Piazza, M.G., & Sabatini, A.G. (1986). Schede di caratterizzazione delle principali qualità di miele italiano. *Apicoltura*, 2. appendice: 35 pp
- Accorti, M., Piazza, M.G., Persano Oddo, L. (1987). La conductividad eléctrica y el contenido en cenizas de la miel. *Apiacta*, 22, 19-20

- Al, M.L., Daniel, D., Moise, A., Bobis, O., Laslo, L., & Bogdanov, S. (2009). Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chemistry*, 112(4), 863–867.
- Amio, M.J., Aubert, S., Gonnet, M., & Tacchini, M. (1989). Les composés phénoliques des miels: étude préliminaire sur l'identification et la quantification par familles. *Apidologie*, 20(2), 115–125.
- Belay, A., Solomon, W.K., Bultossa, G., Adgaba, N., & Melaku, S. (2013). Physicochemical properties of the Haremma forest honey. Bale. Ethiopia. *Food Chemistry*, 141(4), 3386–3392.
- Bogdanov, S. (2007). Authenticity of honey and other bee products: state of the art. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Animal Science and Biotechnologie*, 64, 1–8.
- Bogdanov, S. (2009). Harmonised methods. International Honey Commission (ICH).
- Bogdanov, S. & Baumann, E. (1988). Determination of sugar composition of honeys by HPLC. *Mitteilungen Aus Dem Gebiete Dour Lebensmittel-Untersuchung Und-Hygiene*, 79, 198–206.
- Bogdanov, S.. & Martin, P. (2002). Honey Authenticity. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene (Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène)*, 93, 232–254.
- Bogdanov, S.. Ruoff, K., & Persano Oddo, L. (2004). Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie*, 35, S4-S17.
- Brudzynski, K., & Miotto, D. (2011). The relationship between the content of Maillard reaction-like products and bioactivity of Canadian honeys. *Food Chemistry*, 124(3). 869–874.
- Cavia, M. del M. (2002). *Estudio del envejecimiento de mieles de Burgos y Galicia: Influencia de la granulación inducida*. Tesis de Doctorado. Universidad de Burgos, España.
- Cianciosi, D., Forbes-Hernández, T.Y., Afrin, S., Gasparrini, M., Reboledo-Rodriguez, P., Manna, P.P., Zhang, J., Bravo Lamas, L., Martínez Flórez, S., Agudo Toyos, P., Quile, J.L., Giampieri, F., & Battino, M. (2018). Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: a review. *Molecules*, 23, 2322.
- Codex Alimentarius. (2001). Normas internacionales de los alimentos. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/list-standards/es/>
- Corbella, E., Tejera, L., & Cernuschi, F. (2005). Calidad y origen botánico de mieles del Noreste de Uruguay. *Revista INIA*, 3, 6-7.
- Corbella, E., & Cozzolino, D. (2006). Classification of the floral origin of Uruguayan honeys by chemical and physical characteristics combined with chemometrics. *LWT-Food Science and Technology*. 39(5), 534-539.

- Daners, G., & Tellería, M. C. (1998). Native vs. introduced bee flora: A palynological survey of honeys from Uruguay. *Journal of Apicultural Research*, 37(4), 221–229.
- Dobre, I., Georgescu, L. A., Alexe, P., Escuredo, O., & Seijo, M. C. (2012). Rheological behavior of different honey types from Romania. *Food Research International*, 49(1), 126–132.
- Doner, L. W. (2003). Honey. In P. Caballero, Finglas, & Trugo (Eds.). *Encyclopedia of food sciences and nutrition*, 2nd ed., Academic Press, London, p. 3125–3130.:
- Escuredo, O., Dobre, I., Fernández-González, M., & Seijo, M. C. (2014). Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chemistry*, 149, 84–90. h
- Estupiñán, S., Sanjuán, E., Millán, R., & Gonzalez-cortes, Y. M. A. (1998). Parámetros de calidad de la miel: I. Microbiología. Caracteres fisicoquímicos y de envejecimiento: Revisión. *Alimentaria*, 296, 89-94.
- Felsner, M. L., Cano, C. B., Bruns, R. E., Watanabe, H. M., Almeida-Muradian, L. B., & Matos, J. R. (2004). Characterization of monofloral honeys by ash contents through a hierarchical design. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17(6), 737–747.
- Gomes, S., Dias, L. G., Moreira, L. L., Rodrigues, P., & Estevinho, L. (2010). Physicochemical, Microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 48(2), 544–548.
- Islam, A., Khalil, I., Islam, N., Moniruzzaman, M., Mottalib, A., Sulaiman, S. A., & Gan, S. H. (2012). Physicochemical and antioxidant properties of Bangladeshi honeys stored for more than one year. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 177.
- Juan-Borras, M., Periche, A., Domenech, E., Escriche, I. (2015). Correlation between methyl anthranilate level and percentage of pollen in Spanish citrus honey.
- Kedzierska-Matysek, M., Florek, M., Wolanciuk, A., Skalecki, P., Litwinczuk, A. (2016). Characterisation of viscosity, colour, 5-hydroxymethylfurfural content and diastase activity in raw rape honey (*Brassica napus*) at different temperatures. *Journal of Food Science and Technology*, 53, 2092–2098.
- Kropf, U., Jamnik, M., Bertoneclj, J., & Golob, T. (2008). Linear regression model of the ash mass fraction and electrical conductivity for slovenian honey. *Food Technology and Biotechnology*, 46(3), 335–340.
- Laos, K., Kirs, E., Pall, R., & Martverk, K. (2011). The crystallization behaviour of Estonian honeys. *Agronomy Research*, 9, (Special Issue II), 427–432.

- Louveaux, J., Maurizio, A., & Vorwohl, G. (1978). Methods of Melissopalynology. *Bee World*, 59(4), 139–157.
- Machado De-Melo, A.A., Bicudo de Almeida-Muradian, L., Sancho, M.T., & Pascual-Maté, A. (2018). Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of Apicultural Research*, 57(1), 5-37.
- Maidana, J. (2007). La miel. Características y composición. Análisis y adulteración. Santiago del Estero. Argentina: CEDIA. Universidad Nacional de Santiago del Estero.
- Maurizio, A. (1975). Microscopy of honey. In: E. Crane (Ed.). *Honey: a Comprehensive Survey*. William Heinemann Ltd., London, UK, p. 240-257.
- MSP. (2017). Miel y Productos Relacionados. Reglamento Bromatológico Nacional. 6ª Edición. Decreto N° 315/994 de fecha 5/7/1994. Anotado y concordado con Apéndice Normativo. IMPO
- Ojeda De Rodríguez, G., Sulbarán De Ferrer, B., Ferrer, A., & Rodríguez, B. (2004). Characterization of honey produced in Venezuela. *Food Chemistry*, 84(4), 499–502.
- Pascual-Maté, A., Osés, S.M., Fernández-Muiño, M.A., & Sancho, M.T. (2018). Methods of analysis of honey. *Journal of Apicultural Research*, 57(1). 38-74.
- Persano Oddo, L., Baldi, E., & Accorti, M. (1990). Diastatic activity in some unifloral honeys. *Apidologie*, 21(1), 17–24.
- Pires, J., Estevinho, M. L., Feás, X., Cantalapiedra, J., & Iglesias, A. (2009). Pollen spectrum and physico-chemical attributes of heather (*Erica* sp.) Honeys of north Portugal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(11), 1862–1870.
- Pita-Calvo, C., Guerra-Rodriguez, M.E., & Vazquez, M. (2017). A review of the analytical methods used in the quality control of honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(4), 690-703.
- Popek, S. (1998). Electrical conductivity as an indicator of the quality of nectar honeys. *Forum Ware*, 1(4), 75–79.
- Popek, S. (2002). A procedure to identify a honey type. *Food Chemistry* 79, 401-406.
- Popek, S., Halagarda, M., & Kurska, K. (2017). A new model to identify botanical origin of Polish honeys based on the physicochemical parameters and chemometric analysis. *LWT - Food Science and Technology*, 77, 482–487.

- Rodopoulou, M., Tananaki, C., Dimou, M., Liolios, V., Kanelis, D., Goras, G., & Thrasyvoulou, A. (2018). The determination of the botanical origin in honeys with overrepresented pollen: combination of melissopalynological. Sensory and physicochemical analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(7), 2705-2712.
- Rialobos, R. S., Sánchez Escobero C. M., & Pizarro Calles, A. (1997). Miel y polen de Extremadura. Laboratorio Agroalimentario de Extremadura. Badajoz, España.
- Roselló Caselles, J., Burgaz Moreno, E., Mateu Andrés, I., & Gómez Ferras, C. (1998). Espectro polínico de mieles de labiadas valencianas. *Botanica Macaronesica*, 23, 155-166.
- Ruoffa, K., Luginbuhl, W., Kilchenmann, V., Olivier Bosset, J., von der Ohe, K., von der Ohe, W., & Amado, R. (2007). Authentication of the botanical origin of honey using profiles of classical measurands and discriminant analysis. *Apidologie*, 38, 438-452.
- Santos, E., Meerhoff. E., García Da Rosa, E., Ferreira, J., Raucher, M., Quintana, W., Martínez, A., González, C., Mancebo, Y. (2018). Color and electrical conductivity of honeys produced by *Apis mellifera* in Uruguay Color y conductividad eléctrica de las mieles producidas por *Apis mellifera* en Uruguay. *INNOTECH*, 16, 51-55
- Santos, F., Dantas Filho, A., Leite, R., Aroucha, E., Santos, A., & Oliveira, T. (2014). Rheological and some physicochemical characteristics of selected floral honeys from plants of caatinga. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 86(2), 981–994.
- Santos-Buelga, C., & González-Paramás, A.M. (2017). Chemical Composition of honey. In: JM. Alvarez-Suarez (Ed.). *Bee Products - Chemical and Biological Properties*. Springer International Publishing AG, Switzerland, p. 43-82.
- Schade, J. E., Marsh, G. L., & Eckert, J. E. (1958). Diastase activity and hydroxy-methyl-furfural in honey and their usefulness in detecting heat alteration. *Journal of Food Science*, 23(5), 446–463.
- Silva, L. R., Videira, R., Monteiro, A. P., Valentão. P., & Andrade, P. B. (2009). Honey from Luso region (Portugal): Physicochemical characteristics and mineral contents. *Microchemical Journal*, 93(1), 73–77.
- Simal, J., Huidobro, J., & Araquistain, J. (1983). Parámetros de calidad de la miel: determinación del contenido de agua. *Offarm*, 2(7/8), 243-248.
- Singh, I., Singh, S. (2018). Honey moisture reduction and its quality. *Journal of Food Science and Technology*, 55(10),3861-3871.
- Stephen, W. A. (1946). The Relationship of Moisture Content and Yeast Count in Honey Fermentation. *Scientific Agriculture*, 26(6), 258–264.

- Tejera, L., Invernizzi, C., & Daners, G. (2013). Población y recursos alimenticios en colonias de *Apis mellifera* L. en Uruguay. *Archivos de Zootecnia*, 62(240), 607–610.
- Terrab, A., González, A. G., Díez, M. J., & Heredia, F. J. (2003a). Mineral content and electrical conductivity of the honeys produced in Northwest Morocco and their contribution to the characterisation of unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(7), 637–643.
- Terrab, A., Díez, M. J., & Heredia, F. J. (2003b). Palynological, physico-chemical and colour characterization of Moroccan honeys: III. Other unifloral honey types. *International Journal of Food Science and Technology*, 38(4), 395–402.
- Terrab, A., Escudero, M. L., González-Miret, M. L., & Heredia, F. J. (2004). Colour characteristics of honeys as influenced by pollen grain content: A multivariate study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(4), 380–386.
- USDA. (1985). United States standards for grades of extracted honey. https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Extracted_Honey_Standard%5B1%5D.pdf.
- Venir, E., Spaziani, M., & Maltini, E. (2010). Crystallization in “Tarassaco” Italian honey studied by DSC. *Food Chemistry*, 122(2), 410–415.
- Von Der Ohe, W., Persano Oddo, L., Piana, M.L., Morlot, M., Martin, P. (2004). Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*, 35, S18–S25
- White, J.W., Pairent, F.W. (1959). Report on the analysis of honey. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists*, 42(2), 341-348.
- White, J.W. Jr. (1979). Physical characteristics of honey. In: E.E. Crane (Ed.). *Honey: A comprehensive survey*, 2nd ed. Heinemann, London, UK, p. 207–239
- White, J.W. (1979). Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in honey. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 62(3), 509–514.
- Yadata, D. (2014). Detection of the electrical conductivity and acidity of honey from different areas of Tepi. *Food Science and Technology*, 2(5), 59–63.
- Zamora, M. C., & Chirife, J. (2006). Determination of water activity change due to crystallization in honeys from Argentina. *Food Control*, 17(1), 59–64.
- Živkov Baloš, M., Popov, N., Vidaković, S., Ljubojević Pelić, D., Pelić, M. Mihaljev, Ž., & Jakšić, S. (2018). Electrical conductivity and acidity of honey. *Arhiv Veterinarske Medicine*, 11(1), 91-101.

Capítulo III

ESTUDIO DEL PERFIL VOLÁTIL Y SENSORIAL DE LA MIEL MEDIANTE CROMATOGRAFÍA GASEOSA ACOPLADA A MASA, CROMATOGRAFÍA GASEOSA ACOPLADA A OLFATOMETRÍA Y ANÁLISIS SENSORIAL CON CONSUMIDORES

Introducción

El concepto de *flavor*

Las propiedades sensoriales de los alimentos, como apariencia, textura y sabor influyen en la aceptación de los mismos, siendo el sabor o *flavor* un factor decisivo para la elección de un producto en particular (Jelen, 2011). La percepción del sabor se produce cuando un alimento o bebida entra en la boca. Aunque la percepción resultante depende de las entradas de múltiples modalidades sensoriales, se experimenta como una percepción única de un alimento o bebida. Cuando nos referimos al *flavor* en la ciencia de los alimentos, alude a la percepción sensorial de los alimentos u otras sustancias que se consumen por vía oral, pero también se usa para referirse a la sustancia en sí que causa la percepción del sabor (Deibler, 2007). Es decir, el término *flavor* describe una experiencia multimodal ya que cuando “saboreamos”, también tocamos la comida o bebida en la boca y sentimos su olor a través del olfato retronasal (Figura 3.1). Mientras que el sentido gustativo (es decir, el gusto) se refiere específicamente a las sensaciones de dulce, agrio, salado, amargo, (Chandrashekar et al., 2006) y quizás gordo (Chale-Rush et al., 2007).

Las percepciones se construyen a partir de una combinación de los gustos reales y las propiedades de sabor del olor que se codifican en la memoria (Stevenson and Boakes, 2004). Cada una de las cinco cualidades principales del sabor sirve para señalar una clase específica de nutrientes o amenazas potenciales: señales dulces de energía en forma de calorías, señales saladas de electrolitos, señales ácidas de pH bajo, señales de proteínas saladas (umami) y, dado que la mayoría de las sustancias venenosas son amargas, el amargor indica toxinas potenciales (Scott and Plata-Salaman, 1991). Por lo tanto, el sentido del gusto ayuda a identificar los nutrientes fisiológicamente beneficiosos y los estímulos potencialmente dañinos.

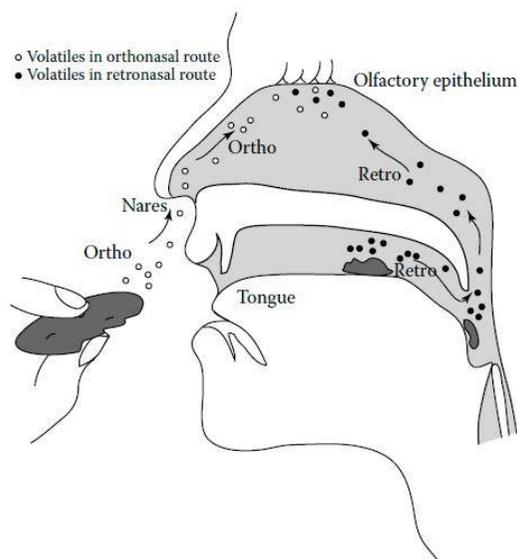


Figura 3.1 Olfato ortonasal vs. retronasal. Representación esquemática de dos salidas de la percepción olfativa: ortonasal y retronasal. Los olores percibidos por vía ortonasal entran en el cuerpo a través de la nariz (narinas) y viajan directamente al epitelio olfatorio de la cavidad nasal. Los olores detectados por vía retronasal entran en la boca al comer y beber. Los volátiles se liberan de los alimentos o bebidas y posteriormente pasan a través de la nasofaringe en la parte posterior de la cavidad oral para ingresar a la cavidad nasal y alcanzar el epitelio olfatorio (Kringelbach and Berridge, 2009).

El olfato

El sentido del olfato es capaz de detectar y discriminar entre miles de olores, en su mayoría compuestos orgánicos de baja masa molecular. La principal cualidad de un compuesto químico que nos permite olerlo es su volatilidad. El compuesto debe tener una presión de vapor relativamente alta que permita que los mismos escapen de su matriz e interactúen con los receptores sensoriales bioquímicos dentro de nuestro cuerpo. Entre estos compuestos encontramos moléculas con variadas estructuras y diversos grupos funcionales como aldehídos, esteroides, cetonas, alcoholes, ácidos carboxílicos, aminas, iminas, tioles, haluros, nitrilos, sulfuros y éteres. El sistema olfativo es capaz de realizar esta tarea discriminatoria sofisticada gracias a una gran familia de receptores acoplados a la proteína G en la cavidad nasal (Jimenez et al., 2021). Una vez unida la molécula de olor al receptor se inicia una cascada de eventos que transforman la energía química de unión en una señal neural (Firestein, 2001). La percepción en el sistema sensorial implica inicialmente el reconocimiento de estímulos externos por parte de las neuronas sensoriales primarias. La información sensorial se transmite al cerebro, donde es decodificada para permitir la discriminación de los diferentes olores

(Buck, 1992). Generalmente los compuestos odoríferos están presentes en los alimentos en muy bajas concentraciones del orden de mg/kg, pero a menudo se presentan en concentraciones mucho más bajas ug/kg o incluso ng/kg de producto. Sin embargo, poder percibirlos sensorialmente no depende simplemente de la cantidad que haya presente sino del umbral de cada compuesto, el cual depende además de la matriz en que se encuentra. El umbral de olor se define como la mínima concentración de un compuesto en un medio específico que es suficiente para el reconocimiento del olor en particular (Jelen, 2011). El aroma de un alimento es producido por la percepción simultánea de muchos compuestos volátiles, pero solo algunos de ellos tienen implicancia en la determinación de su *flavor* (Audouin et al., 2001). Aquellos compuestos cuya concentración exceda el nivel de umbral determinado para el alimento en estudio, son significativos en su *flavor*, mientras que los que se encuentren por debajo del umbral no lo son. Esta herramienta fue propuesta por Patton y Josephson (1957) para estimar la importancia de un compuesto en el *flavor* de un alimento.

El aroma de la miel

El perfil aromático es una característica típica de un producto alimenticio, tanto por su calidad organoléptica como por su autenticidad y este aspecto es especialmente relevante para alimentos como la miel (Careri et al. 1994). El aroma de la miel es consecuencia de la presencia de una mezcla compleja formada por cientos de compuestos volátiles (Tananaki et al., 2022). Los compuestos volátiles en la miel tienen diferentes orígenes, como puede ser su transferencia por parte de la planta, la participación de la abeja transformando constituyentes vegetales en otros compuestos con propiedades volátiles, incluso estos compuestos pueden verse afectados por el procesamiento posterior a la cosecha, por presencia de microorganismos (Gianelli et al., 2010). Cada miel monofloral posee un aroma característico debido a compuestos volátiles específicos que pueden derivarse del néctar floral, por lo tanto su calidad organoléptica depende principalmente de la fuente floral de origen (Kaškonienė and Venskutonis, 2010). Como ya se mencionó en capítulos anteriores de esta tesis, el origen floral de la miel usualmente es determinado por análisis polínico, determinaciones fisicoquímicas y organolépticas. Sin embargo, la presencia de polen específico en cierto tipo de mieles (cítricas) es bajo, esto conduce a una identificación poco confiable del origen floral, además los compuestos químicos presentes en la miel pueden sufrir modificaciones a través del tiempo y condiciones de almacenamiento, lo que también reduce la fiabilidad de este tipo de métodos para la identificación del origen floral. Estas dificultades han incentivado la búsqueda de otras herramientas que permitan autenticar de forma certera el origen floral de la miel. Muchos autores describen el perfil aromático de la miel como una huella digital debido a que se relaciona directamente al néctar de la planta extraído por las abejas. Por esta razón, el análisis de la

composición volátil puede ser una herramienta útil para la caracterización de los orígenes botánicos (Anklam, 1998; Verzera et al., 2001; Manyi-Loh et al., 2011). De hecho, existen compuestos reportados como marcadores de algunas mieles comerciales como es el caso 3,9-epoxi-1-p-mentadieno, *trans*-8-p-menten-1,2-diol y *cis*-óxido de rosa como marcadores para la miel de tilo (Blank et al., 1989; Tsuneya et al., 1974), altas concentraciones de 3-aminoacetofenona fueron informadas como distintivas para las mieles de castaño (Bonaga and Giumanini, 1986). En otro estudio se reportaron los compuestos hexanal y heptanal como marcadores de mieles de lavanda (Bouseta et al., 1992). Las mieles cítricas se caracterizan por la presencia en altas concentraciones de compuestos terpénicos, principalmente linalol y sus derivados (óxidos de linalol y aldehídos y alcoholes de lila) y α -terpineol y antranilato de metilo (Castro-Vázquez et al., 2007). Se han identificado más de 600 compuestos volátiles en distintos tipos de miel, pertenecientes a diferentes familias químicas entre las que se incluyen: hidrocarburos, aldehídos, alcoholes, cetonas, ácidos, ésteres, bencenoides, derivados furánicos y piránicos, norisoprenoides, terpenos y compuestos azufrados (Manyi-Loh et al., 2011). Aunque el análisis aromático de cualquier alimento no es una tarea sencilla, existen diversas técnicas analíticas capaces de proporcionar información valiosa acerca del aroma. Por otra parte, el paso previo de obtención del extracto aromático es un punto crítico a la hora de la elección del método más adecuado, por las variadas consideraciones que se debe tener en cuenta y la importancia de que el extracto final sea lo más representativo posible del producto a analizar.

Métodos de extracción

Dada la gran cantidad y heterogeneidad de los compuestos volátiles presentes en los alimentos resulta importante utilizar métodos adecuados para extraer los compuestos que nos interesan. En la elección de la metodología de extracción a ser empleada es importante tener en cuenta una serie de factores:

- que los compuestos volátiles están presentes en un amplio rango de concentraciones
- debe considerarse la complejidad de la composición aromática, debido a las diferentes clases de compuestos presentes (diferentes polaridades, solubilidades, pHs)
- la matriz en la que se encuentran también es otra variable a tener en cuenta, dado que los compuestos aromáticos pueden estar interaccionando con otros componentes no volátiles de los alimentos como azúcares, proteínas y grasas que afectan a su retención, intensidad y calidad del aroma
- otra variable a considerar es el rango de volatilidad de los componentes que va desde muy por

debajo de la temperatura ambiente hasta aquellos que son sólidos como la vainillina

-finalmente se debe tener en cuenta la inestabilidad de los componentes que pueden ser oxidados por el aire o degradados por el calor o pH extremos (Delahunty et al., 2006; Parliment, 2002).

Teniendo en cuenta la cantidad de variables que deben considerarse al momento de extraer los compuestos volátiles de una muestra, resulta evidente que no existe una única técnica óptima para cada muestra. En la bibliografía se han reportado técnicas variadas para la extracción de la composición volátil, como lo son las técnicas de extracción con solventes orgánicos que, si bien tiene la ventaja de ser técnicas simples, pueden determinar la formación de artefactos conduciendo a la obtención de resultados poco relevantes (Rowland et al. 1995; D'Arcy et al. 1997). En este sentido, se ha aplicado también las técnicas que combinan destilación y extracción de vapor simultánea (SDE) como es la de Likens-Nickerson. Este método se basa en una destilación por vapor y una extracción simultánea con un solvente de volatilidad elevada y con densidad diferente a la del agua pero que tenga afinidad con los componentes de la fracción volátil de la muestra (Bouseta and Collin, 1995).

Otro tipo de técnica utilizada es la extracción en fase sólida (SPE) que consiste en hacer pasar a la muestra a través de una columna empaquetada con un polímero poroso capaz de retener los analitos según su afinidad por la composición de este polímero. Luego los analitos adsorbidos son eluidos con un solvente adecuado (Shimoda et al., 1996; Peña et al., 2004). Algunos de los inconvenientes principales en este tipo de extracción es el empleo de solventes de alta pureza y el tiempo requerido para cada muestra, ya que es necesario el acondicionamiento previo de la columna, la preparación de la muestra previa a su paso por la columna y las posteriores etapas de eliminar interferencias y elución del analito.

Para superar este aspecto se han desarrollado técnicas que también se destacan por prescindir del pretratamiento de la muestra o la utilización de solventes que pueden enmascarar compuestos de interés, son las técnicas de espacio cabeza (HS). Según el sistema de muestreo de las técnicas de HS se dividen en dos grandes grupos (Diez-Simon et al., 2020). Por un lado, la técnica de espacio cabeza con muestreo estático consiste en la introducción de la muestra en un recipiente sellado y a temperatura controlada de modo que, los compuestos volátiles de la muestra alcanzan un equilibrio entre la fase sólida o líquida que las contiene y la fase gaseosa y a continuación son extraídos del espacio cabeza. Por otro lado, la técnica de espacio cabeza dinámica no se permite alcanzar el equilibrio de los volátiles entre la matriz y la fase gaseosa, sino que el equilibrio se desplaza constantemente hacia la fase gaseosa. En este muestreo los compuestos volátiles son arrastrados por el pasaje de un gas inerte a través de la muestra, y son retenidos en una trampa. Los analitos

son transferidos de esta trampa al cromatógrafo de gases generalmente mediante desorción térmica (Wampler, 2002).

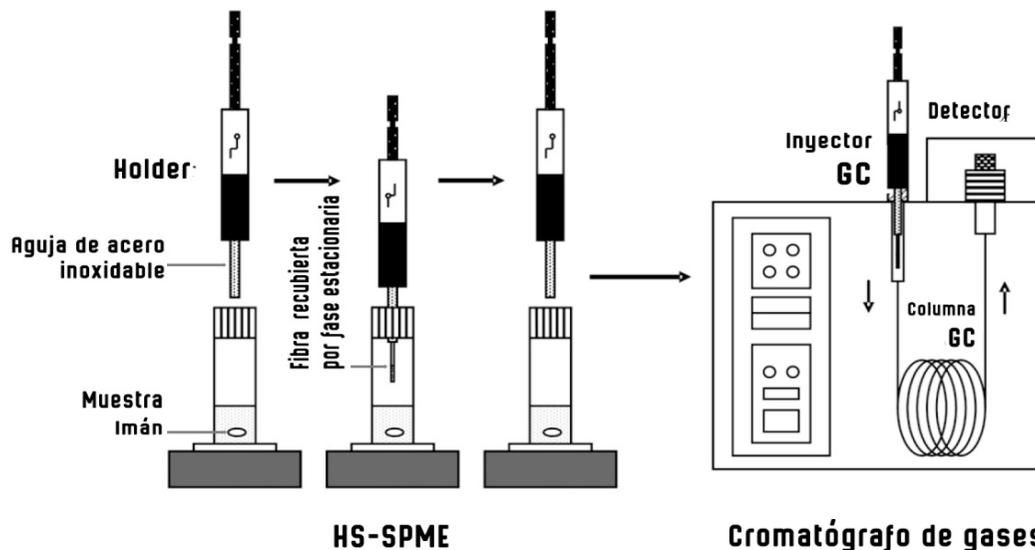
Si bien el muestreo HS, estático o dinámico, ha contribuido a solucionar algunos problemas relacionados al uso de solventes como la pérdida de compuestos altamente volátiles o co-extracciones, también es cierto que muchos compuestos volátiles presentan una baja concentración en los extractos obtenidos de esta manera, lo que dificulta su análisis e identificación. Este problema ha sido solucionado parcialmente mediante el uso de trampas de absorbentes/adsorbentes (Tenax, LiChrolut EN) (Pollien et al., 1997; Campo et al., 2005) o mediante técnicas de HS-SPME (Deibler, 2007) con los que se logra concentrar la muestra en la etapa de extracción.

En este trabajo se empleó la técnica de micro extracción en fase sólida (SPME), ésta presenta varias ventajas respecto de otras técnicas, como la posibilidad de eliminar por completo la utilización de solventes lo que la hace más amigable con el medio ambiente y en consecuencia más económica, además de reducir el tiempo requerido para cada extracción así como la alta sensibilidad que posee (Pawliszyn, 1997; Piasenzotto et al., 2003). Esta técnica utiliza una fibra de sílice fundida con diferentes recubrimientos poliméricos para extraer compuestos orgánicos directamente de una muestra acuosa o en el espacio superior de una muestra líquida o sólida y transferirlos directamente al inyector cromatográfico. En este trabajo se utilizó específicamente la técnica HS-SPME en la que se alcanza el equilibrio más rápido que en SPME de inmersión ya que no hay líquido que impida la difusión del analito sobre el recubrimiento (Yang and Peppard, 1994; Diez-Simon et al., 2020). Una consideración importante en este tipo de técnica es la selección de la fibra apropiada, que dependerá de la naturaleza del analito, siendo los recubrimientos de fase mixta los más apropiados para el análisis de compuestos volátiles (Pawliszyn, 1997). En SPME la cantidad de analito extraído en la fibra depende de la polaridad y del espesor de la fase estacionaria, pero también del tiempo de reacción y la concentración del analito en la muestra. La extracción se puede mejorar si se consideran los siguientes factores: agitación magnética (acelera la transferencia del analito desde la matriz de la muestra a la fibra de recubrimiento), adición de sales solubles como cloruro de sodio (mejora la eficiencia de la extracción al producir modificaciones en la fuerza iónica de la solución), variación de pH (se acidifica la muestra para la extracción de analitos ácidos y se alcaliniza para la extracción de analitos básicos) y aumento de la temperatura (aumenta la concentración de analitos en la fase gaseosa en HS-SPME) (Kataoka et al., 2000).

El análisis de los compuestos volátiles extraídos por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS) mediante la desorción de los analitos en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases (Figura 3.2). Los equipos de GC-MS combinan una alta eficiencia de separación y sensibilidad además de proporcionar datos cualitativos y cuantitativos para los

compuestos volátiles. Es la técnica más utilizada para determinar el perfil aromático en muestras de miel (Cuevas-Glory et al., 2007).

Figura 3.2 Extracción de composición volátil por HS-SPME y desorción térmica por GC.



Aunque el perfil obtenido a partir de este análisis nos brinda información sobre la composición volátil de la muestra, no es capaz de brindar información sobre cuáles componentes son sensorialmente activos.

Esto es debido a que el olor que percibimos en cualquier matriz, como puede ser un alimento, se compone de una mezcla de compuestos volátiles que están presentes en concentraciones variadas por encima del umbral de sensibilidad. Los humanos no somos capaces de distinguir de forma individual cada componente de esa mezcla, sino que percibimos un número limitado de estímulos (Mayol and Acree, 2001). Dentro de esa mezcla, existen números compuestos que no presentan olor, pero se hallan en concentraciones elevadas y por el contrario existen compuestos en muy baja concentración que si contribuyen al olor por poseer umbrales de percepción bajos. Para comprender la contribución de cualquier compuesto volátil a la calidad del olor no basta con saber si el compuesto está presente o no, también debe conocerse como se percibe a una determinada concentración y cuál será la intensidad percibida del mismo (Delahunty et al., 2006; Manyi-Loh et al., 2011). De ahí la importancia en la elección del método adecuado para la obtención del extracto, el cual debe asegurar la mayor fidelidad entre el aroma del extracto aislado y el material de partida, ya que, tanto en las técnicas de extracción antes mencionadas, con solventes o métodos de destilación producen extractos totales de una muestra, lo que no representa necesariamente la proporción de compuestos que son percibidos por un sujeto al oler o inhalar (percepción ortosonal) o comer

(exhalar) una muestra (percepción retronasal) (Deibler et al., 1999; Prescott, 2012). Además, los compuestos altamente volátiles que pueden contribuir a la nota más característica de un alimento planta o flor pueden perderse durante la extracción con solvente, destilación o procedimientos de concentración y pueden resultar en extractos donde las proporciones de los diferentes componentes no sea representativos de la muestra original (Grosch, 2001), ya sea por pérdida o co-extracción de otros componentes de la matriz a parte de la fracción volátil deseada. La cromatografía gaseosa acoplada a olfatometría (GC-O) se utiliza para detectar compuestos volátiles con actividad sensorial dentro de una mezcla compleja como puede ser el aroma de un alimento. Esta combinación de técnicas utiliza detectores humanos (olfatometría) para establecer la actividad sensorial de los picos cromatográficos obtenidos mediante cromatografía gaseosa (Friedrich and Acree, 1998). Este tipo de estudios es limitado en el caso de la miel, siendo las primeras investigaciones a fin de la década de 1980. Blank et al. (1989) comenzaron a indagar sobre los compuestos con actividad odorante en la miel de tilo y encontraron que (*E*)- β -damascenona, fenilacetaldehído y *p*-anisaldehído son los principales responsables de las características aromáticas de la esta miel. Desde entonces se ha investigado mediante GC-O acerca de los compuestos sensorialmente activos de distintos tipos de miel (Ruisinger and Schieberle, 2012). Un análisis por GC-O consiste en la introducción de un extracto aromático representativo del producto a analizar en el cromatógrafo de gases a través del puerto de inyección. Dentro del cromatógrafo una columna capilar se encarga de separar los distintos componentes de la mezcla y a la salida de esta se divide el flujo. Donde una parte del efluente se dirige al detector convencional (generalmente un detector de ionización de llama FID o un espectrómetro de masas MS) y otra va hacia el puerto olfatómico fuera del cromatógrafo donde se sitúa el juez que evalúa el olor. De esta manera es posible relacionar la información química que aportan los detectores convencionales (tiempo de retención, índice de Kovats, espectro de masa) con la información sensorial aportada por el detector olfatómico (descriptor sensorial) (Aceña et al., 2009). En la práctica el puerto olfatómico está formado por un cono de vidrio o teflón al que se acerca la nariz del analista, donde los volátiles eluyen. Debe ubicarse a una altura y posición cómoda para el analista, dado que las corridas pueden durar más de 30 minutos. Los volátiles llegan al evaluador en una corriente de aire caliente y humidificado para descartar los efectos ocasionados por el gas portador que al ser caliente y seco incomoda y afecta la sensibilidad del evaluador (Dravnieks and O'Donnell, 1971). El análisis del aroma no finaliza con la obtención del extracto y su análisis cromatográfico, sino que es necesario determinar la importancia relativa de esos olores en el aroma total de la muestra, y para ello se han desarrollado diferentes metodologías que se describen brevemente a continuación.

Metodologías GC-O

Existen reportes de diferentes metodologías desarrolladas de GC-O para evaluar el impacto de los compuestos aromáticos en una muestra. A continuación, se describen los métodos más utilizados.

-Métodos de dilución: estos métodos consisten en realizar una serie de diluciones a un extracto y cada dilución se inhala hasta que no se detecta olor significativo y así se determina para cada olor el factor de dilución (FD): última dilución en la que se detectó olor. Dos variantes recurrentes de los métodos de dilución son: CHARM (Combined Hedonic Aroma Response Measurements) (Acree et al., 1984) y AEDA (Aroma Extract Dilution Analysis) (Ullrich and Grosch, 1987). Ambos métodos se basan en el mismo principio de umbral de detección de olores. En AEDA el factor de dilución es simplemente la última dilución a la que se detecta un compuesto activo con olor. En CHARM las diluciones se presentan en orden aleatorio para evitar el sesgo introducido por el conocimiento de las muestras. En este análisis el juez señala el comienzo y el final de cada percepción y le asigna un descriptor cualitativo.

Estos métodos de dilución presentan algunas desventajas como requerir de varias inyecciones para alcanzar una dilución del extracto de aroma en que ya no se detecta olor, además del tiempo requerido para completar el análisis de cada dilución de un extracto. A lo que se debe sumar la dificultad de disponer de un panel de jueces entrenados (Blank, 2002).

Método de intensidad posterior: consiste en el registro de la intensidad del olor por un panel de analistas de olor en una escala previamente fijada después de que el pico haya eluido de la columna. Se obtienen estimaciones de la intensidad percibida. La desventaja de esta técnica es el uso de una misma escala por todos los analistas, ya que la percepción varía considerablemente de un individuo a otro y no es posible proporcionar los valores de referencia mientras se realiza el análisis olfatométrico (Van Ruth, 2001).

Método de frecuencia de detección: Linssen et al. (1993) emplearon por primera vez este método, aunque recién en 1997 Pollien et al. desarrollaron y formalizaron el método. El mismo consiste en que un grupo de evaluadores, en lugar de uno o dos, que huelen a la salida del puerto de olfacción el mismo extracto aromático. Para cada individuo se registran los tiempos de retención en los que se detectan olores y la descripción y duración de estos. El número de evaluadores que detectan un compuesto activo con olor (frecuencia de detección) se utiliza como una estimación de intensidad del olor del compuesto. Este método cuenta con la ventaja de no requerir con un entrenamiento previo del panel de jueces, además de producir resultados respetables con un mínimo de corridas cromatográficas.

Método de frecuencia modificada: Campo et al. (2005) denominaron “frecuencia modificada” (MF) al método que combina intensidad y frecuencia de detección, el mismo consiste en que un juez sensorial asigna a cada aroma que percibe un descriptor y una intensidad (en una escala acordada). Luego se aplica la fórmula propuesta por Dravnieks and O’Donnell (1971) para el cálculo de la frecuencia modificada según:

$$F.M. = \sqrt{F(\%) \times I(\%)}$$

donde F (%) es la frecuencia de detección del aroma percibido expresado como porcentaje, I (%) es la intensidad promedio expresada como porcentaje de la máxima intensidad

Análisis sensorial

El análisis sensorial se refiere a la medición y cuantificación de las características de los productos alimenticios evaluables por los sentidos (Montenegro et al., 2008). La evaluación del perfil organoléptico es utilizada en diversos campos (alimentos, cosméticos, productos farmacéuticos, textiles), a través de lo percibido por los órganos sensoriales (color, sabor, olor, textura y sonido) es posible evaluar como lo concibe el consumidor y comprender sus preferencias (Piana et al., 2004). Con respecto a la miel, el análisis sensorial se utilizó por primera vez en Francia en 1979 (Gonnet and Vache, 1979; 1985; 1992) y a partir de ahí se comenzó a implementar en otros países de la región como Italia (Persano Oddo et al., 1995), España (Serra and Gómez, 1988) desarrollando diferentes metodologías de evaluación que se han extendido a otros países donde se han publicado nuevas propuestas para aplicaciones modernas.

Fruto de dichas investigaciones en el área del análisis sensorial surgió una valiosa contribución de un grupo belga (Piana et al., 2004) al desarrollar una “rueda de olor y aromas para la miel”. El diseño proviene de la compilación de los términos estandarizados utilizados como descriptores de olores, que luego de algunas modificaciones por parte del grupo de la Comisión Internacional de la Miel (IHC) surge la rueda armonizada que se muestra en la Figura 3.3.

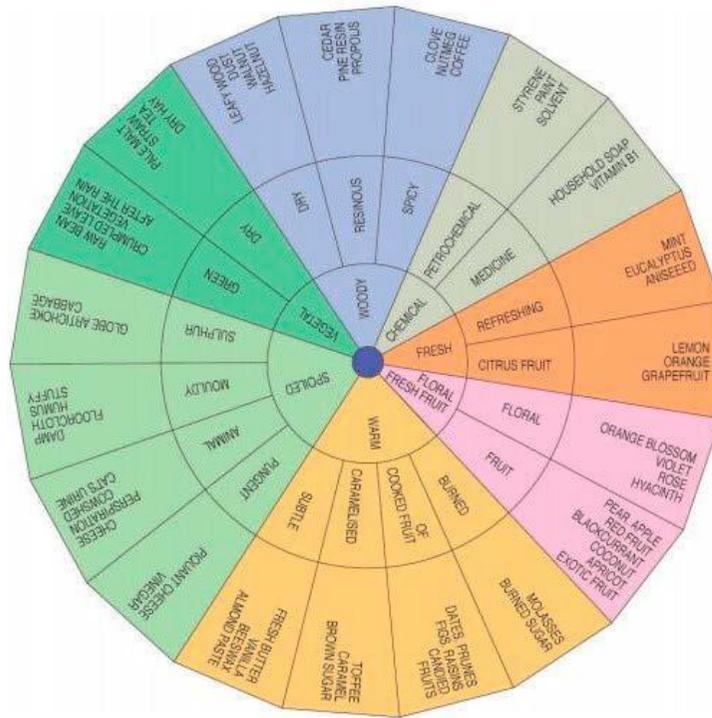


Figura 3.3 Rueda de aromas de la miel (IHC, 2001)

El análisis sensorial es una parte complementaria importante de los análisis fisicoquímicos y de polen tradicionales. Se utiliza como herramienta analítica para el control de calidad de la miel complementando la evaluación del origen botánico (Bicudo de Almeida-Muradian et al., 2020). Además, es clave al momento de registrar defectos como la fermentación, presencia de impurezas, malos olores de humo, sabor metálico y otras características que los análisis de rutina de laboratorios comunes no tienen acceso. En particular, la evaluación sensorial es importante para verificar la conformidad de las mieles monoflorales, ya que puede revelar la presencia de componentes botánicos que no fueron calificados por otros sistemas analíticos, pero que sin embargo alteran las características sensoriales típicas, incluso obstaculizando su comercialización como uniflorales (Piana et al., 2004). Otro rol importante del análisis sensorial es el papel que tiene en la definición de estándares de productos y en los controles relacionados con las denominaciones botánicas y otras etiquetas específicas que enfatizan la calidad de la miel (Marcazzan et al., 2018). En este trabajo se empleó la técnica de *napping* (Risvik et al., 1994), esta es una variante de la técnica de mapeo proyectivo en la que las muestras se presentan simultáneamente al evaluador y este debe proyectarlas sobre una superficie bidimensional, ya sea en un papel o en una pantalla. El criterio de posicionar las muestras será según similitudes y diferencias entre sí, las muestras que se coloquen cerca se consideran muy similares sensorialmente, mientras las que se coloquen muy

distantes se consideraran sensorialmente muy diferentes. Además, la herramienta implica agregar descriptores a cada muestra, lo que enriquece la evaluación. Luego las coordenadas cartesianas de las proyecciones (x, y) y las frecuencias de descripciones de las muestras similares constituyen los datos de la evaluación (Dehlholm, 2014). Debido a que los criterios para el posicionamiento de las muestras son elegidos individualmente por el consumidor, esto hace que el napping sea un procedimiento flexible y espontáneo (Ares et al. 2011; Varela and Ares, 2012).

Sección 1 - Análisis de compuestos volátiles de la miel

Objetivos

En esta sección se pretende mediante el análisis por HS-SPME-GC-MS de las mieles estudiadas identificar los componentes volátiles característicos de las mismas. En paralelo se busca identificar, de entre estos componentes, aquellos que puedan ser considerados marcadores de origen botánico.

Materiales y métodos

Muestras de miel

Se estudió la composición volátil de las quince muestras de miel descritas en el capítulo dos de esta tesis. En la tabla 3.1 se enlistan las muestras de miel con la información que nos brinda su nomenclatura a modo de recordatorio.

Origen floral		
Muestra	Tipificación	% polen mayoritario
Lm01	Monofloral	<i>Lotus sp</i> (77.6%)
Sbp02	Polifloral	<i>Scutia buxifolia</i> (43.9%); <i>Schinus molle</i> (24.4%); <i>Eucalyptus sp</i> (12.5%)
SMm03	Monofloral	<i>Schinus molle</i> (62.9%)
Sbm04	Monofloral	<i>Scutia buxifolia</i> (52.8%)
Sbm05	Monofloral	<i>Scutia buxifolia</i> (64.2%)
Sbm06	Monofloral	<i>Scutia buxifolia</i> (51.4%)
Ep07	Polifloral	<i>Eucalyptus sp</i> (41.7%); <i>Schinus molle</i> (18.3%); <i>Scutia buxifolia</i> (10.3%)
Ep08	Polifloral	<i>Eucalyptus sp</i> (39.3%); <i>Scutia buxifolia</i> (31.6%)
Sbm09	Monofloral	<i>Scutia buxifolia</i> (55.2%)
Ep10	Polifloral	<i>Eucalyptus sp</i> (46.7%); <i>Acacia longifolia</i> (34.8%); <i>Lotus sp</i> (3.9%)
Ep11	Polifloral	<i>Eucalyptus sp</i> (71.5%); <i>Lotus sp</i> (5.9%)
Tp12	Polifloral	<i>Trifolium repens</i> (23.2%); <i>Trifolium pratense</i> (22.2%); <i>Lotus sp</i> (15.5%)
Lm13	Monofloral	<i>Lotus sp</i> (49.0%)
Lm14	Monofloral	<i>Lotus sp</i> (61.6%)
Sbp15	Polifloral	<i>Scutia buxifolia</i> (42.1%); <i>Echium sp</i> (22.4%); <i>Lotus sp</i> (14.0%)

Tabla 3.1 Nomenclatura de las muestras. El numero corresponde al orden de ingreso: **Lm**: *Lotus sp.* monofloral, **Sbp** *Scutia buxifolia* polifloral, **SMm** *Schinus molle* monofloral, **Sbm** *Scutia buxifolia* monofloral, **Ep** *Eucalyptus sp.* polifloral, **Tp** *Trifolium* polifloral.

Extracción de compuestos volátiles mediante HS-SPME

Para la extracción de los compuestos volátiles presentes en la miel, se llevó a cabo el método de micro extracción en fase solida (SPME) descrito por Alissandrakis et al. (2005a). La extracción se realizó en el espacio cabeza del vial mediante fibra con recubrimiento de divinilbenceno/ carboxen/ polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) ya que se pudo demostrar que estas fibras, donde se usan mezclas de fases estacionarias, son aptas para extraer un amplio rango de analitos.

Se preparó una solución de 6 g miel en 2 mL de agua destilada y se agregó 20 μ L de una mezcla de estándares internos (2-octanol, 1- heptanol, ambos a 0,02 mg/mL en metanol)] en un vial de 20 mL con septa de PTFE/silicona. El vial se mantuvo en baño termostatzado a 60°C con agitación durante todo el procedimiento. El tiempo de equilibrio fue de 30 minutos y la extracción mediante espacio cabeza transcurrió durante 60 minutos.

Análisis por GC-MS de la composición volátil de miel

Una vez evaluada la técnica, la extracción por SPME fue automatizada, utilizando un inyector automático AOC-6000 de Shimadzu, acoplado a un cromatógrafo de gases GC 2010 Plus acoplado a un espectrómetro de masa Shimadzu QP 2020. El cromatógrafo de gases estaba equipado con columna capilar de sílice fundida con fase estacionaria DB-WAX (Agilent J&W GC Columns). (30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 μ m espesor de film). El programa de temperaturas utilizado fue: temperatura inicial, 40°C (8min), 40-180° a 3°/ min, 180-220°C a 5°C/min. Temperatura del inyector y de la interfase a la fuente de ionización del masa, 240°C; modo splitless, 2 min; luego se pasa a modo split, con relación de split 1:40; gas carrier, hidrógeno (flujo 1,30 mL/min).

En el caso del espectrómetro de masa se utilizó el modo de impacto electrónico con un voltaje de ionización de 70 eV. El rango de masa escaneado fue 31-350 uma. La identificación de los compuestos aromáticos obtenidos se confirmó por medio de la determinación de índices de retención lineal (Kovats), obtenidos utilizando una mezcla de n-alcanos (C₉-C₂₆). Y se comparó con bases de datos con espectros de referencia comercial y propia. La concentración de los compuestos volátiles se determinó utilizando 2-octanol como estándar interno.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se realizó un análisis de compuestos principales (PCA), mediante la utilización del software InfoStat 2008.

Resultados y Discusión

Mediante el análisis por GC-MS se logró separar los componentes de la mezcla volátil que representa el aroma de la miel, a la vez que obtener la información necesaria para la determinación estructural de cada componente. Por otra parte, una técnica de extracción de alta sensibilidad y selectividad como lo es HS-SPME con fibra de triple recubrimiento (DVB/CAR/PDMS) asegura un aislamiento eficiente de los diferentes componentes volátiles que conforman el aroma de la miel en el rango de volatilidad existente.

Utilizando esta estrategia, en este capítulo se buscó evaluar el perfil aromático de 15 mieles de diferentes orígenes florales, para lo cual se extrajo la composición volátil de las mieles por duplicado y los extractos fueron analizados mediante GC-MS. La figura 3.4 muestra un cromatograma típico de las mieles estudiadas. Se identificaron y cuantificaron un total de 77 compuestos volátiles que se agruparon en diferentes familias (Tabla anexo), incluida la presencia de 28 terpenos, 6 compuestos carbonílicos, 4 alcoholes, 6 esterés, 5 sesquiterpenos, 5 compuestos con estructura piránica y furánica, 12 compuestos fenólicos, 5 ácidos grasos, 2 lactonas y 1 compuesto indólico.

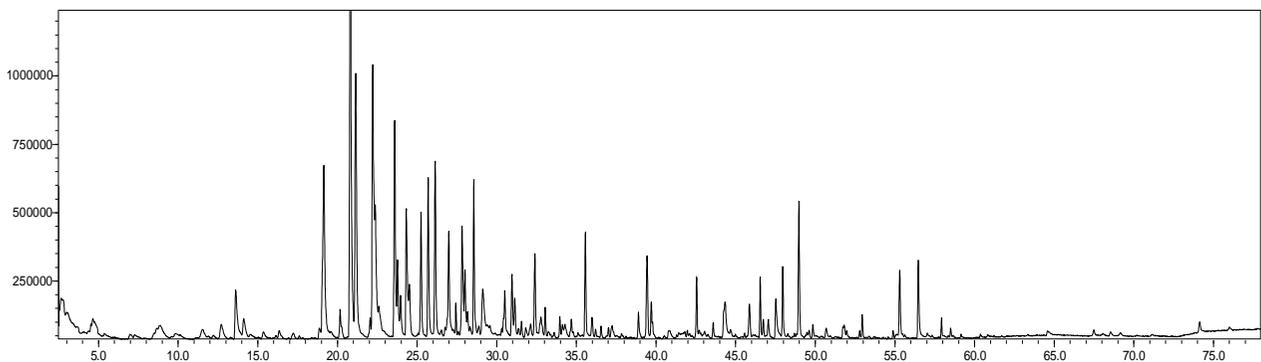


Figura 3.4 Cromatograma típico de GC-MS de la fracción volátil extraída por SPME de la miel.

En la Figura 3.5 se puede observar la distribución porcentual de cada familia de compuestos en cada muestra de miel, siendo la familia de los terpenos la representada en mayor proporción en todas las mieles nativas. Los terpenos son compuestos importantes ya que proporcionan sabor, olor y propiedades biomédicas a la miel (Pattamayutanon et al., 2017). A continuación, le siguen en menor proporción los compuestos fenólicos y los esterés.

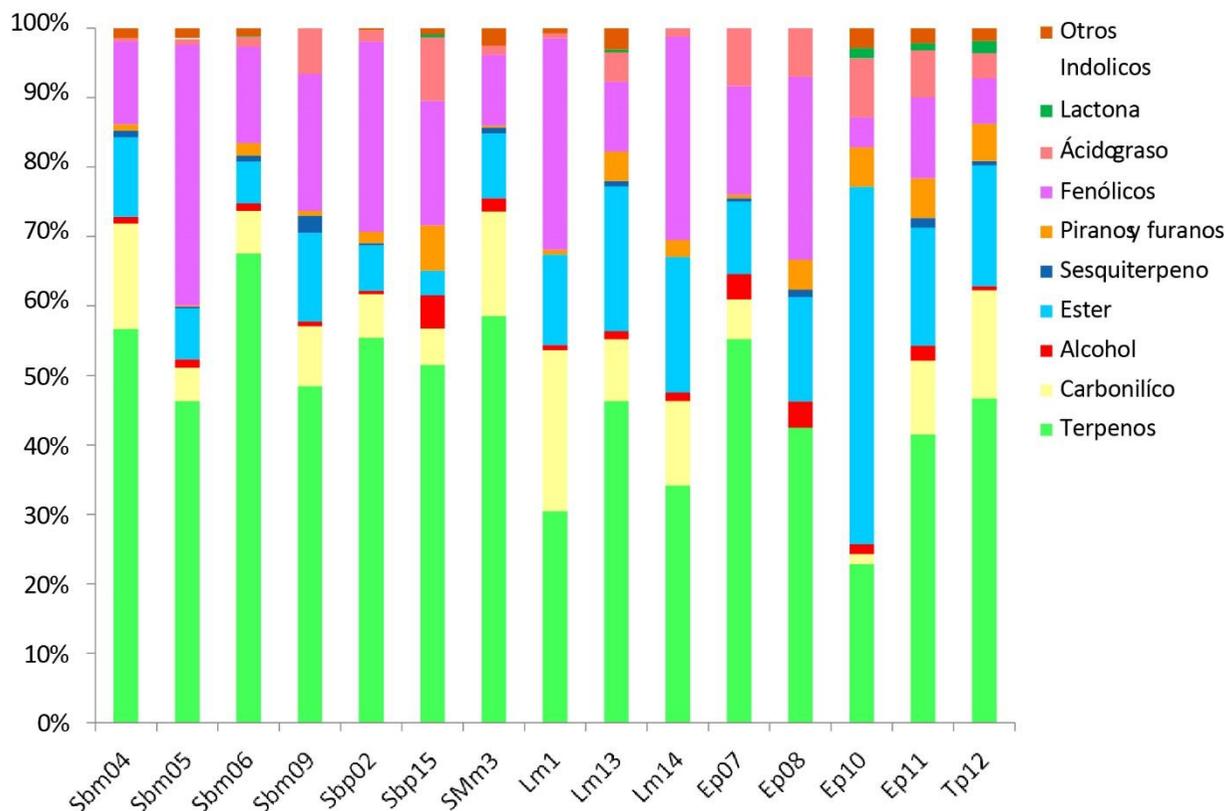


Figura 3.5 Distribución porcentual de familias de compuestos volátiles en cada miel.

En la Figura 3.6 se presentan los resultados del análisis de componentes principales realizado donde los tres primeros componentes explican el 50% de la varianza del sistema, y donde la distribución de las muestras en ambas figuras es similar.

Como es posible observar, las mieles provenientes de flora nativa (Sbp02, SMm03, Sbm04, Sbm05, Sbm06 y Sbm09) se orientaron hacia valores negativos del eje X. Mientras que las mieles provenientes de flora no nativa (Lm01, Ep10, Ep11, Tp12, Lm13, Lm14) se orientaron hacia valores positivos del eje X. Este agrupamiento observado en la Figura 3.6 de las muestras de miel es coherente con el origen botánico de las mismas. Sin embargo 3 muestras de miel presentan un apartamiento de este comportamiento, como es el caso de la miel Sbp15 que se ubicó próxima a las mieles no nativas y cuyo origen botánico es polifloral con polen mayoritario de *Scutia buxifolia*. Es decir, se trata de una muestra de miel nativa, pero contiene como polen secundario polen de *Echium sp* y *Lotus sp*, que corresponden a especies no nativas.

Otras mieles que se apartan de este comportamiento son Ep07 y Ep08. En ambos casos se trata de mieles poliflorales con un aporte principal de polen de *Eucalyptus sp*, pero presentan como polen secundario un alto porcentaje de *Schinus molle* y *Scutia buxifolia* respectivamente lo que podría explicar su orientación próxima a las mieles nativas en el PCA.

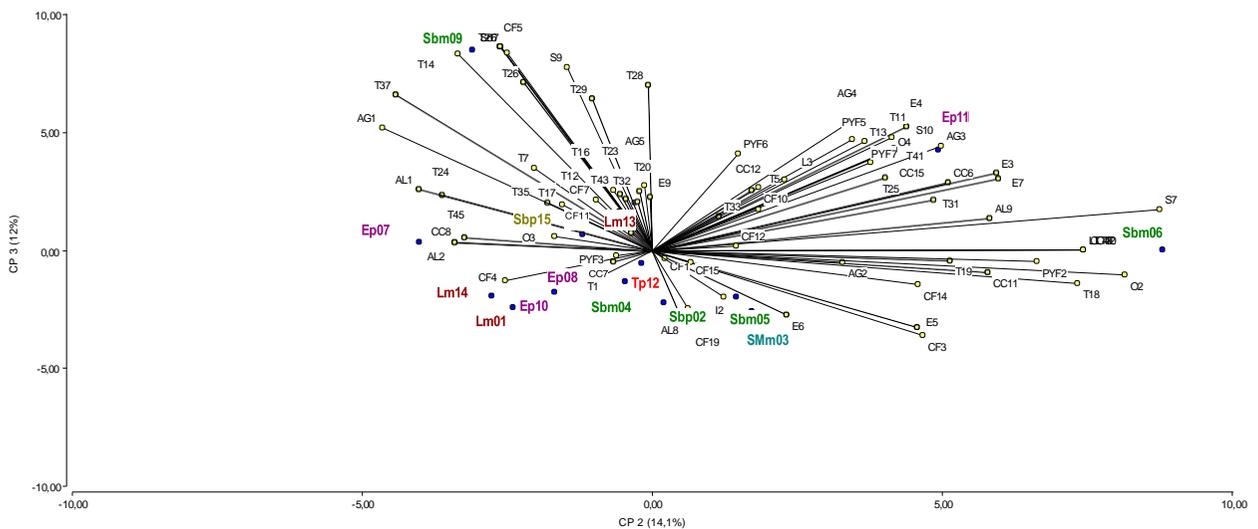
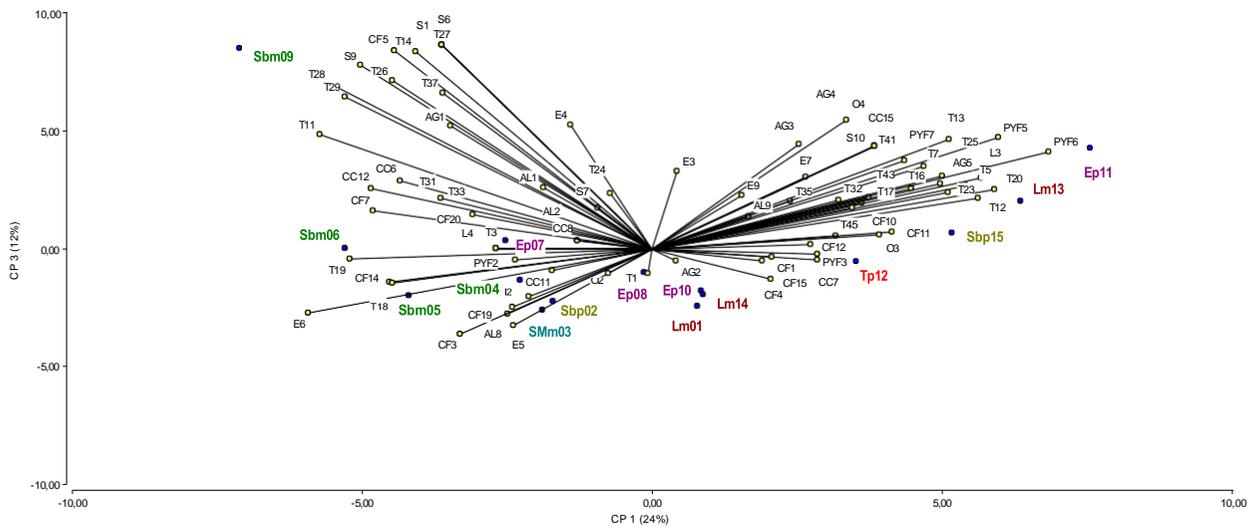
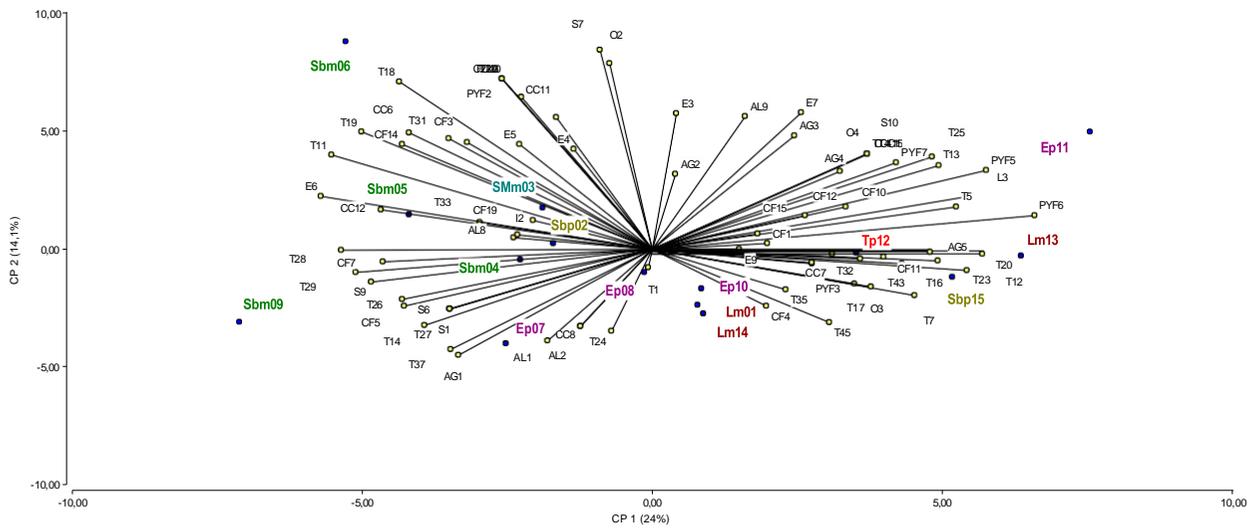


Figura 3.6 Análisis de componentes principales de la composición volátil de las mieles estudiadas.

Analizando las familias mayoritarias presentes en las muestras se observa una relación de las mieles nativas con algunos terpenos como linalol e isoforona cuya presencia ha sido reportada previamente en mieles de citrus, castaño, tilo y tomillo (Alissandrakis et al., 2007a; 2007b; Guyot et al., 1998), trans-pinocarveol compuesto reportado como posible marcador floral para mieles de *Turbina corymbosa* (Ceballos et al., 2010), el monoterpeneo cis-linalol óxido es un compuesto comúnmente reportado en diferentes tipos de miel (Jerković and Kuš, 2014). Otros terpenos que mostraron una correlación positiva con las mieles nativas fueron mirceno, perilleno, α -camfolenal, cisverbenol, carveol, verbenona y *p*-mentil,5-dien-8ol.

Los compuestos fenólicos que correlacionaron de manera positiva con las mieles nativas fueron safranal, compuesto previamente reportado como marcador floral de la miel chilena de corontillo (Montenegro et al., 2009), acetofenona, compuesto reportado previamente en mieles de *Turbina corymbosa*, *Ipomoea triloba*, *Gouania polígama* (Ceballos et al., 2010). La acetofenona también fue reportada en miel de tomillo (Alissandrakis et al., 2007b) y además se identificó como marcador floral de mieles de castaño (Machado et al., 2020). El *p*-anisaldehído y el eugenol son compuestos reportados como importantes odorantes en miel de kanuka (*Kunzea ericoides*) y de tilo (Beitlich et al., 2014; Blank et al., 1989). Otros compuestos fenólicos que correlacionaron de forma positiva con las mieles nativas fueron el 2-(4-metoxifenil) acetato de metilo y el acetato de 2-metilbencilo.

El tercer grupo de compuestos volátiles mayoritarios obtenido para las mieles nativas pertenece a la familia de los ésteres, siendo representados por los siguientes compuestos: decanoato de metilo y dodecanoato de metilo que han sido reportados previamente en distintos tipos de miel como por ejemplo la miel de algodón (Alissandrakis et al., 2005), miel de citrus (Alissandrakis et al., 2007a), o miel de tomillo (Alissandrakis et al., 2007b). Finalmente, otro compuesto que se correlacionó de forma positiva con las mieles nativas fue el éster metílico del ácido 2,8 nonadienoico.

Conclusiones:

Los resultados obtenidos muestran que existe una gran variedad de compuestos volátiles presentes en los diferentes tipos de miel. Se lograron identificar compuestos comúnmente presentes en la mayoría de las mieles estudiadas en diferentes partes del mundo. A partir de estos resultados, es posible determinar que el estudio de la fracción volátil de la miel utilizando HS-SPME-GC-MS proporciona información útil para separar las muestras por su origen botánico. Dado el bajo número de muestras analizadas no fue posible determinar marcadores volátiles específicos para cada tipo de miel ya que es necesario analizar mayor número de muestras durante más cosechas.

Sección 2 – Análisis sensorial

Objetivos

Los objetivos de este estudio son, en primer lugar, obtener información acerca de la percepción por parte del consumidor de las mieles producidas a partir de la flora nativa del Uruguay y, en segundo lugar, establecer descriptores asociados a las mismas y advertir cuan diferentes o similares las perciben los evaluadores.

Materiales y métodos

Muestras de miel

Debido a las características que presenta el análisis sensorial empleado en esta oportunidad, en el que las muestras se presentan al juez de forma simultánea en una sola sesión, resultó necesario reducir el número de muestras a evaluar para no incurrir en la fatiga de los consumidores. Por esta razón se seleccionaron siete muestras de miel del total y el criterio de elección se basó fundamentalmente en nuestro interés por la profundización del estudio de las mieles monoflorales producidas a partir de flora nativa del Uruguay (SMm03: *Schinus molle*; *Scutia buxifolia*: Sbm04, Sbm05, Sbm06,) y a su vez compararlas con muestras de dos mieles poliflorales nativas (*Scutia buxifolia*: Sbp02, Sbp15) y una miel polifloral no nativa (*Eucalyptus*: Ep07).

Análisis sensorial por napping

El estudio sensorial se llevó a cabo con el asesoramiento del grupo de trabajo de Comportamiento Alimentario de la Facultad de Química, liderado por el Dr. Gastón Ares. Las evaluaciones se realizaron en un cuarto acondicionado para este fin y las muestras se presentaron en recipientes opacos y tapados para que su color o textura no influya al momento de realizar la evaluación. Las muestras se codificaron con números aleatorios de tres dígitos. En el estudio participaron 61 personas, hombres y mujeres con edades comprendidas entre 21 y 73 años, consumidores habituales de miel.

Los participantes fueron reclutados del ámbito universitario y lugares públicos de la ciudad de Montevideo, Uruguay. Para el análisis de napping se pidió al evaluador que oliera cada una de las muestras y que escribiera los olores que ellos considerasen adecuados para describirlas.

Luego se solicitó a los participantes que ubicaran las muestras en una pantalla en blanco de acuerdo a sus similitudes y diferencias según su criterio, especificando que no habría respuestas correctas o incorrectas, sino que aquellas muestras de miel que se ubicaran en posiciones cercanas serían similares y las que se ubiquen alejadas serían diferentes entre sí.

Para el procesamiento de los datos se determinaron las coordenadas (x,y) correspondientes a la ubicación de cada muestra, siendo el punto cero (0,0) la esquina inferior izquierda de la pantalla.

Las palabras utilizadas para describir las muestras se analizaron cualitativamente como se describe en Ares et al. (2010) . Los términos con significado similar se agruparon en diferentes categorías dentro de cada miel y la frecuencia de mención de cada categoría para cada miel se determinó contando el número de consumidores que usaron esas palabras para describirlas. Los datos se analizaron utilizando el Análisis de Factores Múltiples (MFA) (Pagès, 2005).

Con la finalidad de estudiar el vínculo entre la composición volátil (GC-MS) y el análisis sensorial de las muestras de miel se utilizó la herramienta web ClustVis, a través de la cual es posible visualizar la agrupación de datos multivariados mediante el análisis de mapas de calor (Metsalu and Vilo, 2015).

Resultados y Discusión

La Tabla 3.2 reúne los términos utilizados con mayor frecuencia por los evaluadores para describir cada muestra en el análisis de napping. Los términos más utilizados fueron “chiquero”, “caramelo”, “floral”.

Tabla 3.2 algunos de los términos que más utilizaron los evaluadores para describir las muestras de miel. Entre paréntesis se muestra la frecuencia de cada término.

Muestra	Descriptorios más frecuentes
Sbp02	chiquero (25), suave (9), caramelo (9)
SMm03	caramelo (16), floral (16), miel (10)
Sbm04	caramelo (13), floral (10), miel (10), suave (10), herbáceo (8)
Sbm05	chiquero (24), suave (10)
Sbm06	chiquero (10), suave (9), caramelo (9), herbáceo (8)
Ep07	caramelo (18), miel (9), floral (9), intenso (8)
Sbp15	chiquero (27), caramelo (9), suave (8)

En la Figura 3.7 se muestra el resultado del Análisis de Factores Múltiples (MFA) en el que las dos primeras dimensiones explican el 51% de la varianza del sistema. En esta figura se muestra la representación de las mieles (Figura 3.7a) y la proyección de los términos (Figura 3.7b) utilizados para describirlas en el análisis de napping. Según la posición de las muestras (Figura 3.7a) en las dos primeras dimensiones del MFA es posible clasificarlas en 5 grupos:

-mieles Sbp02 y Sbp15

-mieles Ep07 y SMm03

-las mieles Sbm04, Sbm05 y Sbm06 se ubicaron separadas una de otra y del resto de las muestras conformando cada una de ellas un grupo.

Como se muestra en la Figura 3.7b, la primera dimensión del MFA se correlacionó positivamente con los términos “floral”, “miel”, “caramelo” y negativamente con los términos hedónicos “chiquero”, “agria”.

En tanto, la segunda dimensión del MFA se correlacionó positivamente con los términos “especiado”, “frutal”, “químico” y negativamente con “tostado”, “intenso”, “quemado”. Teniendo en cuenta la representación de las muestras y la correlación de las descripciones de los consumidores con las dimensiones del MFA, las diferencias entre las muestras podrían describirse en términos de descripciones sensoriales y hedónicas. Las muestras SMm03, Sbm04 y Ep07 correspondieron principalmente a muestras florales, con aroma a miel y caramelo; mientras que las muestras Sbp02 y Sbp15 se describieron como “chiquero”, “agria” y “quemadas”. La muestra Sbm05 presentó características sensoriales más suaves y la Sbm06 presentó descriptores del tipo tostado y quemado.

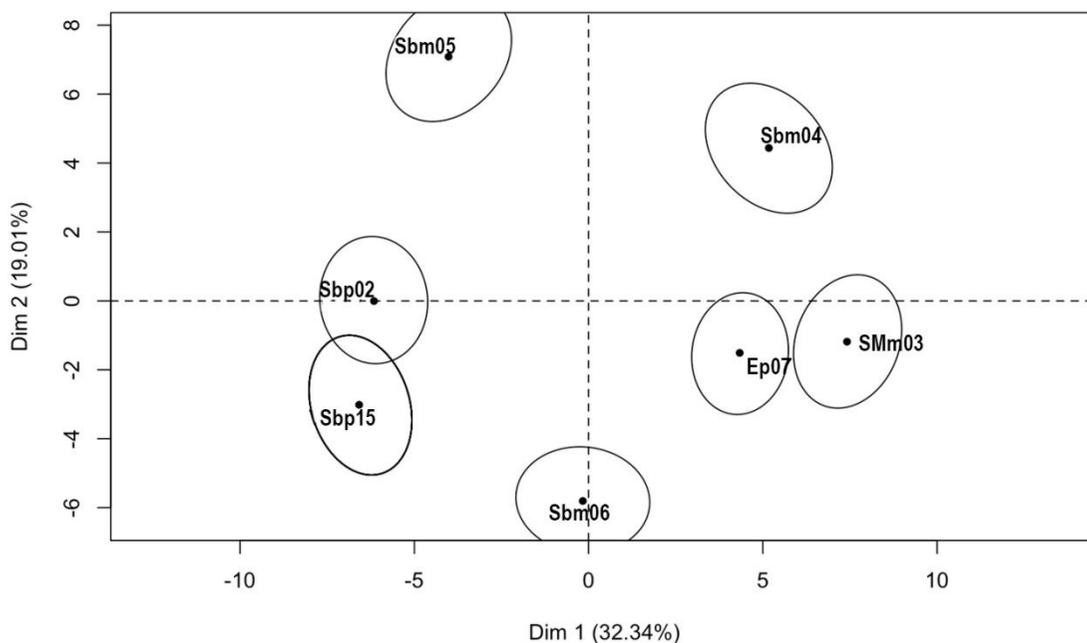


Figura 3.7a Representación de las muestras de miel en las dos primeras dimensiones del MFA

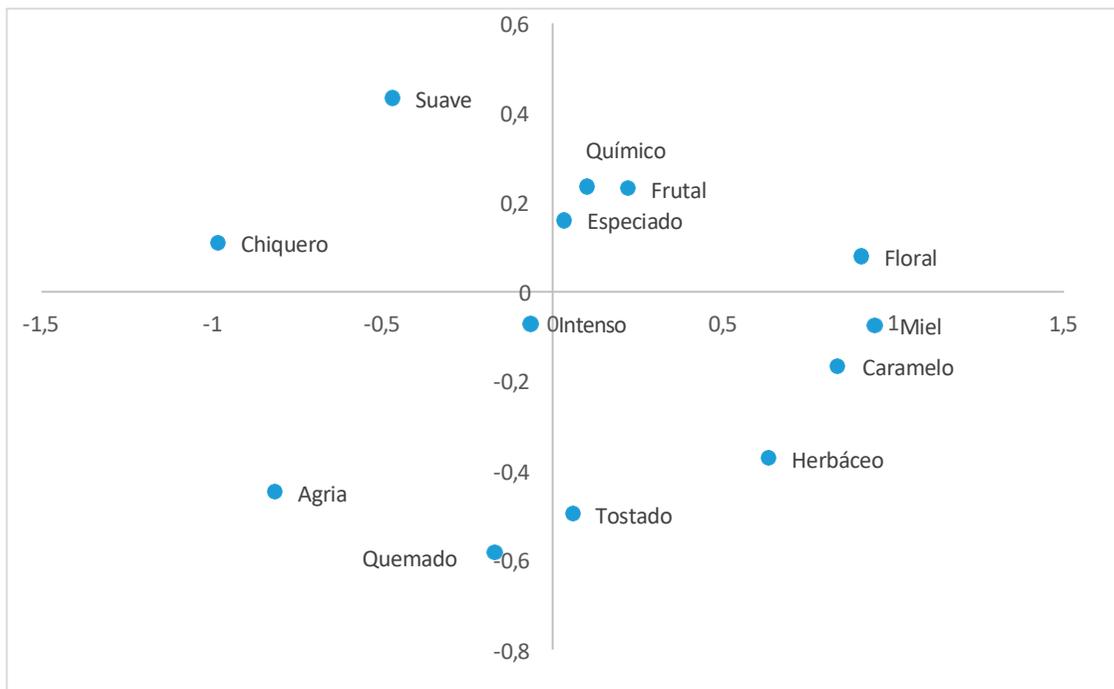


Figura 3.7b Proyección de términos utilizados para describir las muestras de miel en las dos primeras dimensiones de MFA.

Mediante un mapa de calor (“heat-map”) y análisis de cluster de la composición volátil de las muestras utilizadas en el estudio sensorial, se evaluó la posible existencia de similitudes entre ellas.

En la Figura 3.8 el mapa de calor muestra una matriz de datos donde la coloración brinda una descripción general de las diferencias numéricas y en la parte superior podemos observar el dendograma que nos indica el agrupamiento las muestras según su composición volátil.

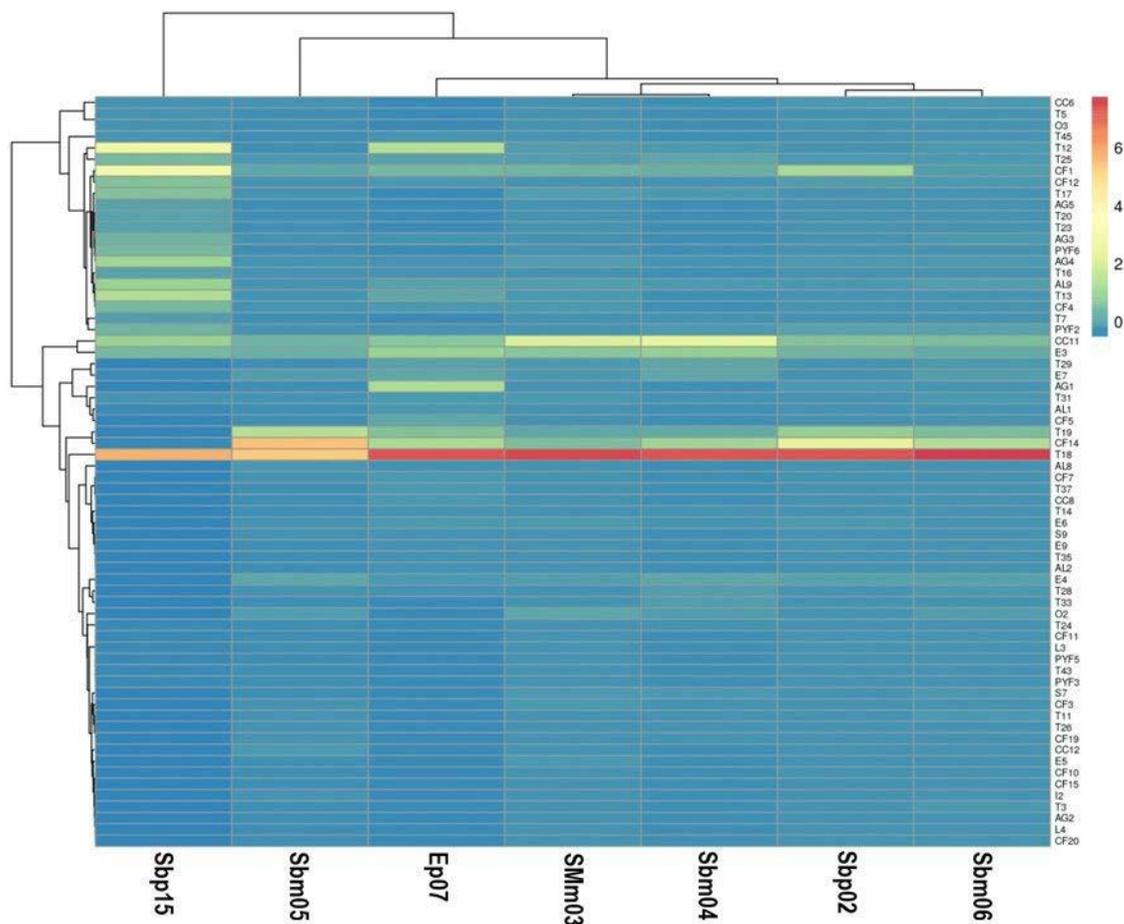


Figura 3.8 Mapa de calor y análisis de cluster entre las muestras de miel estudiadas en el análisis sensorial y su composición volátil.

Las muestras Sbm06 y Sbp02 son similares ya que presentaron una composición volátil semejante entre los que se destacan el terpeno T18 (linalol) con una coloración roja indicando alta concentración de este compuesto, Las muestras Sbm04 y SMm03 son similares entre si ya que presentan una alta concentración del terpeno linalol y del compuesto carbonílico CC11 (nonanal). Estos dos agrupamientos presentan una correlación positiva con los resultados obtenidos en el MFA ya que las muestras Sbm06 y Sbp02 se ubicaron en valores negativos de eje X y las muestras Sbm04 y SMm03 en valores positivos del eje X.

Estos resultados coinciden con el origen botánico de las muestras ya que estos dos grupos corresponden a mieles nativas de *Scutia buxifolia* con presencia de polen minoritario de *Schinus molle* para el caso de Sbp02 y Sbm06, mientras que Sbm04 presenta de polen minoritario de *Blepharocalyx* y *Schinus molle* y otra miel nativa de *Schinus molle* con polen secundario de *Scutia buxifolia* (SMm03).

El siguiente nivel jerárquico fue compartido con la muestra Ep07 por presentar alta concentración del terpeno linalol, resultado que coincide con el MFA ya que se ubicó próxima a las muestras SMm03 y Sbm04. Por otro lado, la muestra Ep07 corresponde a una miel polifloral con polen mayoritario *Eucalyptus sp*; *Schinus molle* y *Scutia buxifolia*.

No fue posible explicar en toda su extensión la distribución de muestras obtenidas mediante técnicas multivariantes sobre los datos sensoriales con la composición volátil de las muestras, debido principalmente a las diferencias en el umbral de percepción de los compuestos volátiles, la existencia de interacciones entre componentes que pueden tener efectos aditivos o de supresión, así como a los diferentes pesos otorgados a los olores percibidos en el napping (Fariña et al, 2015).

Conclusiones

El análisis de napping nos proporcionó un perfil sensorial de las muestras evaluadas. Esta evaluación permitió discriminar las mieles de acuerdo con sus similitudes y diferencias y partir de los descriptores utilizados por los consumidores fue posible comprender esa distribución en términos sensoriales y hedónicos.

La aplicación de la herramienta de napping permitió concluir que las mieles monoflorales nativas *Schinus molle*: SMm03, *Scutia buxifolia*: Sbm04 y la miel polifloral no nativa con predominancia de polen de *Eucalyptus*: Ep07, se encuentran asociadas a descriptores agradables como “floral”, “miel”, “caramelo” y se percibieron como similares entre sí, y diferentes al resto que se asociaron a descriptores más que nada desagradables como “chiquero”, “agria” y “quemadas”.

En resumen, a partir de los análisis de mapa de calor y cluster fue posible agrupar las muestras de acuerdo a las semejanzas entre ellas según su composición volátil, se separaron en dos grupos diferentes las muestras Sbp02 y Sbm06 de las muestras SMm03 y Sbm04, estos resultados coinciden con la discriminación a partir de descriptores utilizados por los consumidores en el análisis de napping.

Sección 3 - Análisis de compuestos volátiles sensorialmente activos

Objetivos

Esta sección tiene por objetivo la identificación y determinación de los compuestos sensorialmente activos dentro de la compleja mezcla de aromas que componen la miel.

Materiales y métodos

Muestras de miel

En esta sección el análisis de los compuestos sensorialmente activos se realizó para 3 muestras de miel del total de muestras analizadas en esta tesis. La elección de estas se debió a dos razones. La primera es el interés en ahondar sobre el estudio de las mieles monoflorales nativas y su comparación con una miel polifloral. Por otro lado, la selección de estas 3 mieles se apoyó en los resultados obtenidos en la sección anterior en la que se realizó un análisis sensorial y estas tres mieles fueron percibidas por los evaluadores como similares entre sí y asociadas a descriptores agradables.

En consecuencia, las mieles utilizadas en este análisis fueron dos muestras monoflorales nativas *Schinus molle*: SMm03 y *Scutia buxifolia*: Sbm04; y una miel polifloral con polen mayoritario de *Eucalyptus* y *Schinus molle*: Ep07.

Extracción HS dinámico y análisis mediante GC/O de los compuestos volátiles sensorialmente activos

Para la extracción de los componentes volátiles, se llevó a cabo la técnica espacio cabeza dinámico (Figura 3.9) tal como fue reportado por Bonini (2010).

Mediante la metodología empleada, se trata de simular las condiciones que se tienen en la boca al ingerir la miel. La temperatura empleada fue de 37°C, que es la temperatura del cuerpo humano, con burbujeo de nitrógeno para extraer los componentes que se percibirían por vías nasal y retronasal.

La trampa de extracción se construyó con un tubo de polipropileno estándar (SPE, 0,8 cm de diámetro interno, con un volumen interno de 3 mL) empacado con 400 mg de resina Lichrolut EN®. La resina se lavó previamente con diclorometano (CH₂Cl₂), se secó con corriente de aire y se colocó en la parte superior del sistema de extracción.

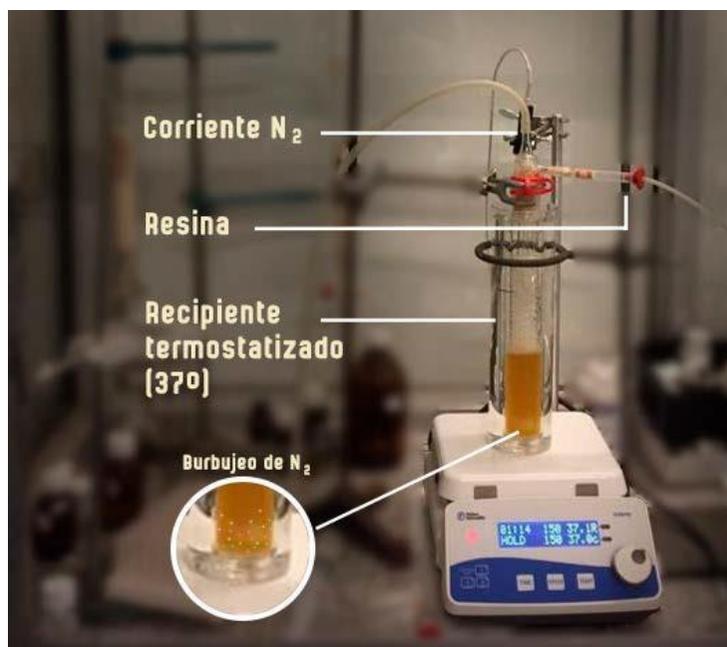


Figura 3.9. Extracción por *headspace* dinámico

La muestra se preparó disolviendo 40 g de miel en 40 mL de agua destilada, se agregaron 40 μ L de estándar interno 2-octanol, 1- heptanol y se hizo burbujear N₂ a 100mL/minuto. La solución se agito en forma continua mediante agitador magnético y se mantuvo en baño de agua termostático a 37°C. Se mantuvo el burbujeo de N₂ durante 180 minutos y luego los compuestos retenidos se eluyeron de la resina mediante 4,0 mL de CH₂Cl₂. El extracto se almacenó en freezer. Pevio a su análisis se concentró hasta 200 μ L en corriente de N₂.

A continuación, se procedió a la inyección de 2 μ L del extracto, modo *splitless* en un GC-O Shimadzu GC-14 B equipado con un detector de FID y un soporte para *sniffing* (GERSTEL Ol-factory Detection Port ODP 4) equipado con una columna con un divisor de flujo que permitió conducir el eluyente hacia los dos detectores. La columna utilizada fue capilar con fase estacionaria polar Carbowax 20 M (crossbonded, MEGA Legano, Italia) (30 m x 0.32 mm d.i., 0,32 μ m de espesor). El gas carrier utilizado fue N₂ (70kPa). El programa de temperaturas fue: temperatura inicial, 40°C (8min), 40-180°C a 3°C/min, 180-220°C a 5°C/min; temperatura del inyector y del detector, 250°C. El panel estuvo integrado por 6 jueces sensoriales. El tiempo de sniffing fue dividido en dos sesiones de 35 minutos cada una, que cada juez realizo en dos corridas independientes.

Para valorar cada aroma percibido se estableció una escala de valores de 4 puntos (0 = no detectado; 1 = difícil de reconocer; 2 = claro, pero no intenso; 3 = aroma intenso). Los datos fueron procesados como frecuencia modificada (F.M).

Finalmente, para la identificación de los compuestos sensorialmente activos, el mismo extracto obtenido por HS dinámico se analizó mediante en GC-MS Shimadzu QP 2020 equipado con columna capilar de sílica fundida con fase estacionaria Carbowax 20M (crossbonded, MEGA Legano, Italia) (30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 μ m espesor de film). Las condiciones experimentales fueron las utilizadas en la sección 1 de este mismo capítulo.

Los compuestos aromáticos fueron identificados por comparación de sus índices de retención lineal (Kovats), obtenidos utilizando una mezcla de n-alcanos (C₉-C₂₆) y su fragmentación característica por MS verificada con espectros de masa de base de datos. Así se estableció una correlación entre los descriptores que surgieron del análisis GC-O por parte de los jueces y los compuestos volátiles causantes de ese olor que se identificaron en GC-MS.

Resultados y Discusión

El método de análisis de GC-O es la combinación de una técnica analítica capaz de separar los componentes de una mezcla mediante una columna capilar y una técnica olfatométrica que emplea la nariz humana como detector, que debido a una correcta extracción de compuestos volátiles como lo es *headspace* es posible obtener información acerca de cuáles son realmente los odorantes con impacto en la miel.

En el análisis de los extractos de miel se logró detectar alrededor de 80 compuestos aromáticos donde se seleccionaron aquellos que presentaron un porcentaje de F.M. mayor de 30 (excepto aquellos compuestos que están presentes en más de una miel), y los compuestos que no alcanzaron este valor fueron descartados.

Para la identificación de los compuestos volátiles sensorialmente activos, los resultados de GC-MS y GC-O se correlacionaron utilizando los índices de retención de Kovats. En la Tabla 3.3 se muestran las notas aromáticas percibidas por los evaluadores en el análisis GC-O con la F.M para cada miel, el compuesto identificado mediante GC-MS y su índice de Kovats.

La ausencia de algún compuesto específico puede deberse a la co-elución de compuestos de mayor intensidad, que enmascaren compuestos de baja intensidad o simplemente significa que el compuesto no se detectó mediante GC-O, siendo que aún puede estar presente en la muestra, pero en concentraciones inferiores a su umbral de percepción en el aire.

Tabla 3.3 Compuestos aromáticos encontrados en la miel por análisis GC-O. Datos expresados en Frecuencia Modificada (F.M.)

LRIGCO	Descriptores	F.M.			LRI-GC-MS	Compuesto
		SMm03	Sbm04	Ep07		
1096	almendras	-	51	44		n.i.
1117	dulce, crema	17	75	35		n.i.
1158	limón, tomillo	40	22	22		n.i.
1179	frutos rojos	-	61	44		n.i.
1198	madera, frutal	-	49	24	1264	mirceno
1222	tabaco, desagradable, fecal	59	62	58	1285	heptanal
1248	licor, frutal	27	31	29	1290	limoneno
1288	ahumado	29	45	19	1309	alcohol isoamílico
1326	limón, frutal	-	31	17	1335	γ -terpineno
1389	cítrico, herbáceo	31	39	29	1356	p-cimeno
1406	húmedo, chocolate	-	39	37	1371	acetoína
1420	herbal	-	47	-	1377	2-octanona
1430	tostado, dulce	37	47	42	1381	octanal
1449	herbal, quemado	-	26	33	1418	2-heptanol
1478	tierra, hongo	27	37	37	1427	6-metil-5-hepten-2-ona
1494	herbáceo, citrus, frutal	33	41	29	1482	nonanal
1504	tierra, floral	30	41	31	1500	n.i.
1515	herbáceo, fresco, hongo	-	51	33	1518	2-octanol
1531	floral, frutos rojos	24	37	-		n.i.
1556	pasto mojado, tierra, hongo	27	37	29	1551	heptanol
1564	fruta, dulce	33	-	-	1582	nonanoato de metilo
1567	acético	-	-	44		n.i.
1644	floral, dulce	-	-	31	1644	linalol
1654	caramelo	-	-	33	1657	5-metil furfural
1662	dulce, fruta	-	-	43	1661	isoforona
1690	yuyo, tilo	-	-	37	1703	hotrienol
1695	caramelo, miel	33	-	29	1719	fenilacetaldehído
1713	cítrico, floral	31	-	-		acetofenona
1735	herbal, caucho	49	29	-	1766	oxoforona
1752	herbáceo, podrido	-	31	42		n.i.
1818	hierba seca, humo	41		24	1825	γ -crotonolactona
1835	floral, miel, dulce	-	36	-	1837	fenilacetato de etilo
1852	rancio, goma	-	51	-	1852	3,5,5-trimetil-1,4-ciclohexanodiona

continuación						
LRIGCO	Descriptores	F.M.			LRI-GC-MS	Compuesto
		SMm03	Sbm04	Ep07		
1868	te, yuyo	35	-	-		n.i.
1874	manteca	-	37	-		n.i.
1895	limón, durazno	-	-	49		n.i.
1909	tilo, marcela	-	41	-		n.i.
1937	durazno, frutal	25	-	31		n.i.
1963	durazno, miel, floral	45	-	19		n.i.
2028	frutos secos, miel	30	-	35	2020	n.i.
2089	miel, dulce	41	-	37	2092	anisaldehído
2178	frutal, vainilla	41	-	-	2130	(2Z,6Z)-farnesol
2222	caramelo, dulce	-	-	61		n.i.
2255	caramelo, dulce	45	-	-	2239	6-caprolactama
2292	miel, floral	-	-	33	2272	4-vinilguaiacol
2333	miel, tilo	35	-	22	2304	hexadecanoato de etilo
2358	vainilla, miel	-	45	35	2340	2,6-dimetoxifenol
2395	tilo	33	-	-	2393	n.i.
2412	miel, caramelo	-	-	41		n.i.
2447	miel, tilo	33	-	-		n.i.
2577	floral, miel	35	-	-		n.i.
2592	te, miel	-	-	37		n.i.
2609	tierra	31	-	-		n.i.
2737	miel, frutal, dulce	39	-	27	2727	bencilacetona
2845	miel, ahumado	33	-	24		n.i.
2884	floral, frutal, miel	-	-	43	2998	tirosol
3020	miel, vainilla	41	-	24		n.i.
3097	miel, floral	37	-	31	3088	n.i.

LRIGCO: Índice de retención Línea en GC-O; LRIGCMS: Índice de retención líneal en el GC-MS; n.i.: compuesto no identificado por GC-MS

Se lograron identificar 35 compuestos sensorialmente activos mediante los descriptores aportados por los evaluadores en el análisis por GC-O y su comparación con los índices de Kovats analizado por GC-MS. Además, se consultó en bases de datos online como “Chirality and odour perception” (<http://www.leffingwell.com/chirality/chirality.htm>), “The pherobase” (<https://www.pherobase.com/database/compound/compounds-index.php>), “The good scentscompany” (<http://www.thegoodscentcompany.com/>) los olores característicos de cada compuesto identificado para corroborar si los descriptores manifestados por los evaluadores eran acertados.

Como puede verse en la Tabla 3.3 la miel Ep07 polifloral con polen mayoritario de *Eucalyptus* y *Schinus molle* presentó mayor cantidad de compuestos sensorialmente activos. La siguiente muestra de miel en importancia por el número de compuestos detectados fue la miel SMm03 monofloral *Schinus molle*, mientras que la miel Sbm04 monofloral de *Scutia buxifolia* presentó el perfil de aroma más pobre de las muestras analizadas.

En la Figura 3.10 se observa la proporción de los descriptores brindados por los evaluadores, para ésto, los descriptores fueron agrupados en cuatro categorías según la rueda de aromas de la miel (Figura 3.3) cálidos, frutales, vegetal y desagradables.

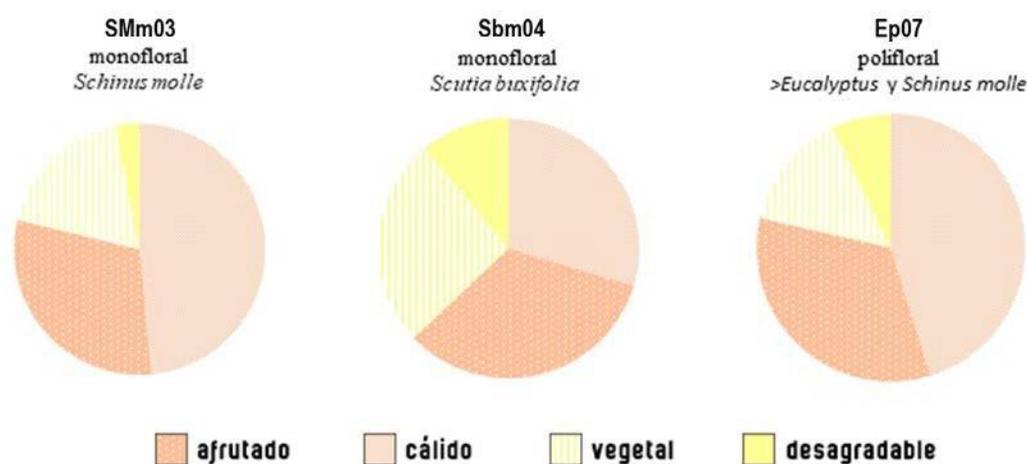


Figura 3.10. Proporciones de descriptores agrupados en cuatro categorías para cada miel.

La miel Ep07 se caracterizó por mayor cantidad de términos cálidos como “caramelo”, “miel”, “dulce”, “floral” y afrutados como “limón”, “durazno”, “frutos rojos” seguida de SMm03, mientras que Sbm04 fue la que presentó mayor cantidad de descriptores de las categorías “vegetal” como “herbáceo” y “desagradables” como “rancio”.

Estos resultados obtenidos mediante GC-O correlacionan con los obtenidos mediante el análisis sensorial de la sección anterior, ya que las mieles Ep07 y SMm03 fueron ubicadas contigua una de la otra, lo que sugiere que son percibidas como similares y fueron descritas con términos como floral, caramelo, miel.

A su vez, la miel Sbm04 fue descrita por los mismos términos con la incorporación del término herbáceo el cual la desplazó a ser ubicada apenas separada de las otras dos.

Los compuestos sensorialmente activos encontrados en las muestras de miel pertenecen a distintas familias de compuestos (Figura 3.11):

-en el extracto de miel SMm03 *Schinus molle* se detectaron 19 compuestos aromáticos activos pertenecientes a las familias de aldehídos y cetonas (11), terpenos y sequiterpenos (3), alcoholes (1), hidrocarburo (1), norisoprenoide (1), ácido (1), derivado del ácido shikimico (1)

-en el extracto de miel Sbm04 *Scutia buxifolia* se detectaron 17 compuestos sensorialmente activos pertenecientes a la familia aldehídos y cetonas (7), terpenos y sequiterpenos (5), alcoholes (2), hidrocarburo (1), norisoprenoide (1), ácido (1)

-en el extracto de miel Ep07 polifloral con polen mayoritario de *Eucalyptus* y *Schinus molle* fue en el que se detectó la mayor cantidad de compuestos sensorialmente activos, revelándose 25 compuestos pertenecientes a las familias aldehídos y cetonas (7), terpenos y sequiterpenos (9), alcoholes (2), hidrocarburos (2), norisoprenoides (1), ácidos (1), derivados del ácido shikimico (2), piránicos, furánicos (1).

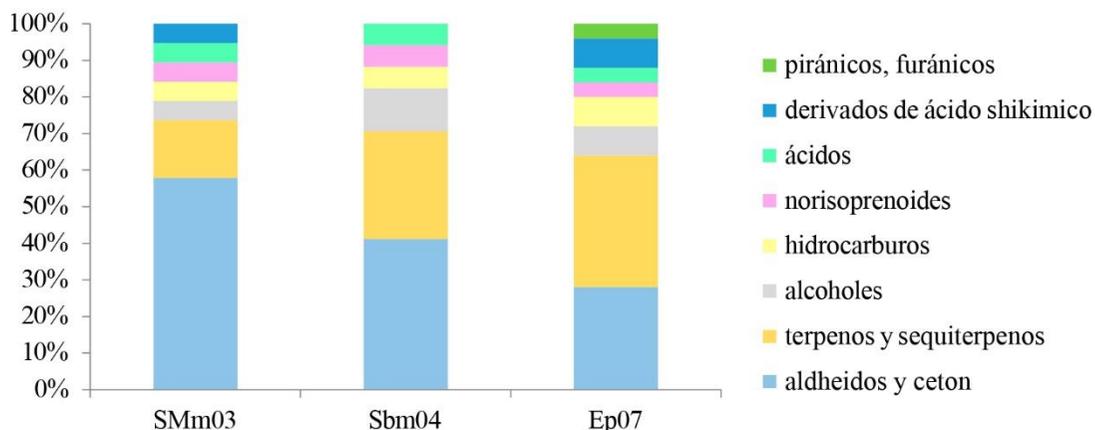


Figura 3.11. Distribución porcentual de las distintas familias de compuestos para cada miel.

En cuanto a los compuestos presentes que se identificaron en las tres muestras de miel fueron: heptanal (tabaco, feo, fecal), octanal (tostado, dulce), 6-metil-5hepten-2-one (tierra, hongo) y nonanal (herbáceo, citrus, floral) pertenecientes a la familia de aldehídos y cetonas; limoneno (licor, fruta) y p-cimeno (cítrico, herbáceo) que integran la familia de los terpenos; alcohol isoamílico (ahumado), compuesto de la familia de los alcoholes y tetradecano (tierra, floral) un hidrocarburo.

El hecho de que estos compuestos se hayan identificado en los tres tipos de mieles analizados sugiere que ninguno de estos podría considerarse por sí solo, un marcador específico de estos orígenes florales, dado que se encontraron en las tres muestras de miel. Para las muestras de mieles SMm03 y Ep07 se identificaron tres compuestos asociados a descriptores agradables que no fueron detectados en la miel Sbm04: fenilacetaldehído (caramelo, miel), anisaldehído (miel, dulce) y bencilacetona (miel, fruta, dulce).

Estos resultados coinciden con los obtenidos en el análisis sensorial ya que estas dos mieles fueron agrupadas juntas y asociadas a descriptores agradables.

Por otro lado, fue posible distinguir algunos compuestos que se presentaron exclusivamente en cada una de las muestras de miel que podrían considerarse marcadores potenciales (Figura 3.12).

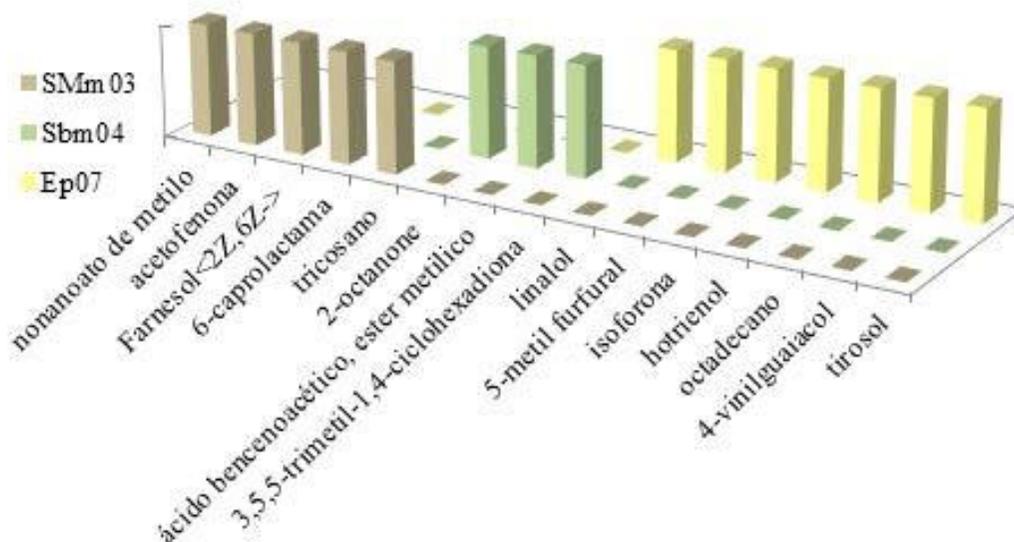


Figura 3.12. Posibles compuestos marcadores para cada muestra de miel.

Seis compuestos se detectaron únicamente en la miel Ep07 polifloral con polen mayoritario de *Eucalyptus* y *Schinus molle*. Entre ellos, los terpenos: linalol (floral, dulce), hotrienol (yuyo, tilo), 4-vinilguaiacol (miel, floral), un derivado del ácido shikimico: tirosol (floral, fruta, miel), un norisprenoide: isoforona (dulce, fruta), y un hidrocarburo: octadecano (limón, durazno).

En tanto cinco compuestos se detectaron únicamente en la miel SMm03 monofloral *Schinus molle*: nonanoato de metilo (fruta, dulce), acetofenona (cítrico, floral), (2Z, 6Z)-farnesol (frutal, vainilla), 6-caprolactama (caramelo, dulce) y tricosano (tilo); mientras que para la miel Sbm04 monofloral *Scutia buxifolia* se detectaron exclusivamente 3 compuestos de los cuales dos pertenecen a la familia de aldehídos y cetonas: 2-octanone (herbal) y 3,5,5-trimetil-1,4-ciclohexadiona (rancio, goma) y un compuesto ácido; ácido bencenoacético (floral, miel, dulce).

Al no contar con literatura previa sobre la composición volátil en mieles de *Scutia buxifolia* y *Schinus molle* no fue posible establecer un vínculo con investigaciones anteriores. Sin embargo, algunos de los compuestos sensorialmente activos identificados en este estudio ya han sido reportados en la bibliografía como parte del aroma activo de distintos tipos de miel. Como por ejemplo: la acetofenona que ha sido reportado para mieles de canola, lavanda y frambuesa aportando

notas verdes (Seisonen et al., 2015). El compuesto acetoína se ha reportado para mieles de canola, citrus, eucalipto y acacia, se encuentra reportado con olor a grasa, se ha observado que luego del calentamiento de la miel este compuesto desaparece (Graddon et al., 1979; Wardencki et al., 2009; Uckun and Selli, 2017).

Otro compuesto comúnmente reportado es el linalol, que se ha encontrado en mieles de canola, frambuesa, citrus, eucalipto y acacia proporcionando aromas florales. El fenilacetaldehído es uno de los componentes más recurrentes y se ha reportado para mieles de canola, lavanda, frambuesa, citrus, trigo sarraceno y acacia aportando olores florales, frutales y acaramelados (Ruisinger and Schieberle, 2012; Seisonen et al., 2015; Uckun and Selli, 2017; Wardencki et al., 2009; Zhou et al., 2002).

Otro compuesto frecuentemente reportado en mieles es el anisaldehído encontrado en mieles de canola, lavanda citrus, trigo sarraceno y acacia proporcionando notas de miel, dulce (Seisonenet al., 2015; Wardencki et al., 2009; Zhou et al., 2002).

Por otra parte, es importante remarcar la ausencia en este estudio de ciertos compuestos que sí son detectados con frecuencia en diferentes tipos de miel y son considerados entre los componentes aromáticos más importantes que contribuyen al *flavor* de la miel. Algunos de estos compuestos son: (E)- β -damascenona (olor a uva, manzana cocida), alcohol bencílico (floral) y ácido fenilacético con olor a miel (Blank et al., 1989; Ruisinger and Schieberle, 2012; Zhou et al., 2002).

Es importante tener en cuenta que, a partir de los resultados disponibles no puede descartarse que la ausencia de estos compuestos relevantes en la miel pueda ser consecuencia de limitaciones atribuibles al método de extracción utilizado, Ya que, como se mencionó anteriormente, la extracción es una etapa clave en la que es necesario considerar un número elevado de variables que influyen en la calidad del extracto obtenido.

Conclusiones:

Mediante el análisis de GC-O fue posible obtener componentes característicos responsables del aroma general de las mieles.

A través del método de análisis utilizado (frecuencia modificada) fue posible determinar el impacto sensorial de los compuestos clave en el aroma de las diferentes mieles estudiadas. La miel polifloral con predominancia de *Eucalyptus sp.* y *Schinus molle* fue la que presentó mayor cantidad de compuestos sensorialmente activos y mayor cantidad de familias de compuestos. Posiblemente por tratarse de una miel polifloral con mayor versatilidad volátil, pero con la desventaja de no poder asignarle su riqueza volátil a un tipo de especie vegetal particular dado que no podemos

saber el aporte de néctar de cada planta. Sin embargo, se lograron identificar 3 compuestos como posibles responsables de la percepción similar por parte de los consumidores de las mieles SMm03 y Ep07 dado que fueron detectados solo para estas dos mieles: fenilacetaldhído, anisaldehído y bencilacetona.

Este comportamiento posiblemente se deba al aporte de néctar de diferentes plantas identificadas mediante técnicas palinológicas, siendo SMm03 monofloral de *Schinus molle* con polen secundario de *Scutia buxifolia* y Ep07 polifloral de *Eucalyptus sp.*, *Schinus molle* y algo de *Scutia buxifolia*.

Por otro lado, aunque los contenidos polínicos son similares no dejan de ser mieles monoflorales o polifloral de diferentes especies por lo que también fue posible identificar compuestos exclusivos para cada muestra de miel que podrían considerarse marcadores potenciales para cada muestra.

Para la miel monofloral de *Schinus molle* se lograron identificar cinco compuestos que no fueron detectados en las otras dos mieles, donde cuatro de ellos (nonanoato de metilo (fruta, dulce), (2Z, 6Z)-farnesol (frutal, vainilla), 6-caprolactama (caramelo, dulce) y tricosano (tilo) no se encontraban reportados previamente en la bibliografía.

En lo que refiere a la miel monofloral de *Scutia buxifolia*, se logró identificar tres compuestos que no fueron detectados en las otras dos mieles ni se encontraron reportados en la bibliografía [2-octanone (herbal) y 3,5,5-trimetil-1,4-ciclohexadiona (rancio, goma)] y un compuesto ácido, ácido bencenacético (floral, miel, dulce).

Bibliografía

- Aceña, L., Busto, O., & Mestres, M. (2009). La cromatografía de gases con detector olfatimétrico una herramienta esencial para el análisis del aroma de bebidas alcohólicas. *Cerveza y malta*, (182), 49–64.
- Acree, T.E., Barnard, J., & Cunningham, D.G. (1984). A Procedure for the sensory analysis of gas chromatographic effluents. *Food Chemistry*, 14(4), 273–86.
- Alissandrakis, E., Kibaris, A.C., Tarantilis, P.A., Harizanis, P.C., & Polissiou, M. (2005). Flavour compounds of Greek cotton honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(9), 1444–52.
- Alissandrakis, E., Kibaris, A.C., Tarantilis, P.A., Harizanis, P.C., & Polissiou, M. (2007a). Aroma investigation of unifloral Greek citrus honey using solid-phase microextraction coupled to gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *Food Chemistry*, 100(1), 396–404.

- Alissandrakis, E., Kibaris, A.C., Tarantilis, P.A., Harizanis, P.C., & Polissiou, M. (2007b). Comparison of the Volatile Composition in Thyme Honeys from Several Origins in Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(20), 8152–57.
- Anklam, E.. 1998. A Review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 63(4), 549–62.
- Ares, G., Deliza, R., Barreiro, C., Giménez, A., & Gámbaro, A. (2010). Comparison of two sensory profiling techniques based on consumer perception. *Food Quality and Preference*, 21(4), 417–26.
- Audouin, Valérie, Florence Bonnet, Zata M. Vickers, & Gary A. Reineccius. (2001). Limitations in the use of odor activity values to determine important odorants in foods. *ACS Symposium Series*, 782(7), 156–71.
- Beitlich, N., Koelling-Speer, I., Oelschlaegel, S., & Speer, K. (2014). Differentiation of Manuka honey from Kanuka honey and from jelly bush honey using HS-SPME-GC/MS and UHPLC-PDA-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(27), 6435–44.
- Bicudo de Almeida-Muradian, L., Barth, O.M., Dietemann, V., Eyer, M., da Silva de Freitas, A., Martel, A.C., Marcazzan, G.L., Marchese, C.M., Mucignat-Caretta, C., Pascual-Maté, A., Reybroeck, W., Sancho, M.T., & Gasparotto Sattler, J.A. (2020). 2020. Standard methods for *Apis mellifera* honey research. *Journal of Apicultural Research*, 59(3), 1–62.
- Blank, I. (2002). Gas Chromatography-Olfactometry in food aroma analysis. In: Marsili, R. (Ed.). Flavor, Fragrance, and Odor Analysis. Marcel Dekker, Inc.
- Blank, I., Heinz Fischer, K., & Grosch, W. (1989). Intensive neutral odourants of linden honey differences from honeys of other botanical origin. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 189(5), 426–33.
- Bonaga, G., & Giumanini, A.G. (1986). The volatile fraction of chestnut honey. *Journal of Apicultural Research*, 25(2), 113–20.
- Bonini, A. (2010). Desarrollo de metodologías para la determinación y clasificación de compuestos aromáticos en mieles producidas en Uruguay. Tesis de Licenciatura en Química-UdelaR. Montevideo, Uruguay.
- Bouseta, A., & Collin, S. (1995). Optimized Likens-Nickerson methodology for quantifying honey flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(7), 1890–97.
- Bouseta, A., Collin, S., & Dufour, J.P. (1992). Characteristic aroma profiles of unifloral honeys obtained with a dynamic headspace GC-MS system. *Journal of Apicultural Research*, 31(2), 96–109.

- Buck, L. B. 1992. A Novel multigene family may encode odorant receptors. *Society of General Physiologists series*, 47, 39–51.
- Campo, E., Ferreira, V., Escudero, A., & Cacho, J. (2005). Prediction of the wine sensory properties related to grape variety from dynamic-headspace gas chromatography-olfactometry data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5682–90.
- Careri, M., Mangia, A., Barbieri, G., Bolzoni, L., Virgili, R., & Parolari, G. (1994). Sensory property relationship to chemical data italian-type dry-cured ham. *Journal of Food Science*, 27(5), 491-495.
- Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M.C., & Pérez-Coello, M.S. (2007). Aroma composition and new chemical markers of Spanish Citrus honeys. *Food Chemistry*, 103(2), 601–6.
- Ceballos, L., Pino, J.A., Quijano-Celis, C.E., & Dago, A. (2010). Optimization of a hs-spme/gc-ms method for determination of volatile compounds in some Cuban unifloral honeys. *Journal of Food Quality*, 33(4), 507–28.
- Chale-Rush, A., Burgess, J.R., & Matte, R.D. (2007). Evidence for human orosensory (taste?) sensitivity to free fatty acids. *Chemical Senses* 32, 423-431.
- Chandrashekar, J., Hoon, M., Ryba, N., & Zuker, C.S. (2006). The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*, 444, 288-294.
- Chirality and odour perception. <http://www.leffingwell.com/chirality/chirality.htm>.
- Cuevas-Glory, L.F., Pino, J.A., Santiago, L.S., & Sauri-Duch, E. (2007). A Review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 103(3), 1032–43.
- D’Arcy, B.R., Rintoul, G.B., Rowland, C.Y., & Blackman, A.J. (1997). Composition of Australian honey extractives. 1. Norisoprenoids, monoterpenes, and other natural volatiles from blue gum (*Eucalyptus Leucoxydon*) and yellow box (*Eucalyptus Melliodora*) honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(5), 1834–43.
- Dehlholm, C. (2014). Projective Mapping and napping. In: Varela, P., Ares, G. (Eds.) *Novel Techniques in Sensory Characterization and Consumer Profiling*. Boca Raton, Crc Press, 229–54.
- Deibler, K.D., T.E. Acree, & E.H. Lavin. 1999. *Flavor Chemistry, 30 Years of Progress*. eds. R. Teranishi, E.L. Wick, and I. Hornstein. New York.
- Deibler, Kathryn. 2007. Flavors, Overview. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*.
- Delahunty, C.M., Eyres, G., & Dufour, J.P. (2006). Gas Chromatography-Olfactometry. *Journal of Separation Science*, 29(14), 2107–25.

- Diez-Simon, D., Ammerlaan, C., Berg, B., Duynhoven, M., Jacobs, J., Mumm, D., & Roland Hall, Rt. (2020). Comparison of volatile trapping techniques for the comprehensive analysis of food flavourings by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1624, 461191. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461191>.
- Dravnieks, A., & O'Donnell, A. (1971). Principles and some techniques of high-resolution headspace analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 19(6), 1049–56.
- Fariña, L., Villar, V., Ares, G., Carrau, F., Dellacassa, E., & Boido, E. (2015). Volatile composition and aroma profile of Uruguayan Tannat wines. *Food Research International*, 69, 244-225.
- Firestein, S. (2001). How the olfactory system makes sense of scents. *Neurology Psychiatry and Brain Research*, 18(4), 181–85.
- Friedrich, J.E., & Acree, T.E. (1998). Gas Chromatography Olfactometry (GC/O) of dairy products. *International Dairy Journal* 8(3), 235–41.
- Gianelli Barra, M.P., Ponce-Díaz, M.C., & Venegas-Gallegos, C. (2010). Volatile compounds in honey produced in the central valley of Ñuble Province, Chile. *Chilean journal of agricultural research*, 70(1), 75–84.
- Gonnet, M., & Vache, G. (1979) Technique de dégustation des miels et recherche d'un système de notation et de classification objectif pour apprécier leur qualité par l'analyse sensorielle, 27th Apimondia Int. Apic. Congr., Athènes, pp. 499-506.
- Gonnet, M., & Vache, G. (1985) Le goût du miel. Ed. U.N.A.F., Paris, France.
- Gonnet, M., & Vache, G. (1992) The taste of honey, Apimondia, Bucarest.
- Graddon, A.D., Morrison, & J.D., Smith, J.F. (1979). Volatile constituents of some unifloral Australian honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(4), 832–37.
- Grosch, W. (2001). Evaluation of the key odorants of foods by dilution experiments, aroma models and omission. *Chemical Senses*, 26(5), 533–45.
- Guyot, C., Bouseta, A., Scheirman, & V, Collin, S. (1998). Floral Origin markers of chestnut and lime tree honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(2), 625–33.
- Jelen, H. (2011). Specificity of Food Odorants. In *Food Flavors, Chemical, Sensory and Technological Properties*, Crc Press, 1–15.
- Jerković, I., & Marek Kuš, P. (2014). Terpenes in honey, occurrence, origin and their role as chemical biomarkers. *RSC Advances*, 4(60), 31710–28.
- Jimenez, R.C., Casajuana-Martin, N., García-Recio, A., Alcántara, L., Pardo, L., Campillo, M., & Gonzalez, A. (2021). The mutational landscape of human olfactory G protein-coupled

- receptors. *BMC Biology*, 19(1), 1–15.
- Kaškonienė, V., & Venskutonis, P.R. (2010). Floral Markers in honey of various botanical and geographic origins, a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(6), 620–34.
- Kataoka, H., Lord, H.L., & Pawliszyn, J. (2000). Applications of Solid-Phase Microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography, A* 880 1–2, 35–62.
- Kringelbach, M.L., & Berridge, K.C. (2009). *Pleasures of the Brain*. Oxford handbook.
- Linssen, J. P.H., Janssens, J.L.G.M., Roozen, J.P., Posthumus, M.A. (1993). Combined gas chromatography and sniffing port analysis of volatile compounds of mineral water packed in polyethylene laminated packages. *Food Chemistry*, 46(4), 367–71.
- Machado, A.M., Miguel, M.G., Vilas-Boas, M., & Figueiredo, A.C. (2020). Honey volatiles as a fingerprint for botanical origin—a review on their occurrence on monofloral honeys. *Molecules* 25(2), 1–32. <https://doi.org/10.3390/molecules25020374>
- Manyi-Loh, C.E., Ndip, R.N., & Clarke, A. (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.
- Marcazzan, G.L., Mucignat-Caretta, C., Marchese, C.M., & Piana, M.L. (2018). Una Revisión de los métodos para el análisis sensorial de la miel. *Journal of Apicultural Research*, 57(1), 75–87.
- Mayol, A. R., & Acree, T.E. (2001). Advances in Gas Chromatography-Olfactometry. *ACS Symposium Series*, 782, 1–10.
- Metsalu, T., & Vilo, J. (2015). ClustVis, A web tool for visualizing clustering of multivariate data using principal component analysis and heatmap. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W566–570.
- Montenegro, G., Gómez, M., Pizarro, R., Casaubon, G., & Peña, R.C. (2008). Implementación de un panel sensorial para mieles chilenas. *Ciencia e Investigación Agraria*, 35(1), 51–58.
- Montenegro, G., Gómez, M., Casaubon, G., Belancic, A., Mujica, A.M., & Peña, R.C. (2009). Analysis of volatile compounds in three unifloral native Chilean honeys. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*, 78, 61–65.
- Pagès, J. (2005). Collection and analysis of perceived product inter-distances using multiple factor analysis, application to the study of 10 white wines from the Loire valley. *Food Quality and Preference*, 16(7), 642–49.
- Parliment, T. (2002). Solvent extraction and distillation techniques. In: Marsili, R. (Ed.). *Flavor, Fragrance, and Odor Analysis*. New York, Marcel Dekker Inc., 1–23.

- 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), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172099>
- Patton, Stuart, & Donald V. Josephson. 1957. A method for determining significance of volatile flavor compounds in foods. *Journal of Food Science*, 22(3), 316–18.
- Pawliszyn, J. (1997). Solid-Phase Microextraction. Theory and Practice. Wiley–VCH. New York.
- Peña, R.M., Barciela, J., Herrero, C., & García-Martín, S. (2004). Solid-Phase Microextraction Gas Chromatography-Mass Spectrometry determination of monoterpenes in honey. *Journal of Separation Science*, 27(17–18), 1540–44.
- Persano Oddo, L., Piana, L., & Sabatini, A.G. (1995). Conoscere il miele. Guida All'analisi sensoriale. Avenue Media, Bologna, Italia.
- Piana, M.L., Persano Oddo, L., Bentabol, A., Bruneau, E., Bogdanov, S., & Guyot Declerck, C. (2004). Sensory analysis applied to honey, state of the art. *Apidologie*, 35, 26–37.
- Piasenzotto, L., Gracco, L., & Conte, L. (2003). Solid Phase Microextraction (SPME) applied to honey quality control. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(10), 1037–44.
- Prescott J. (2012). Multimodal chemosensory interactions and perception of flavor. In: Murray M.M., Wallace, M.T. (Eds.). *The Neural Bases of Multisensory Processes*. Boca Raton (FL), CRC Press/Taylor & Francis.
- Pollien, P., Ott, A., Montigon, F., Baumgartner, M., Muñoz-Box, R., & Chaintreau, A. (1997). Hyphenated headspace-gas chromatography-sniffing technique, screening of impact odorants and quantitative aromagram comparisons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7), 2630–37.
- Risvik, E., McEwan, J.A., Colwill, J.S., Rogers, R., & Lyon, D.H. (1994). Projective mapping, a tool for sensory analysis and consumer research. *Food Quality and Preference*, 5(4), 263–69.
- Rowland, C.Y., Blackman, A.J., D'Arcy, B.R., & Rintoule, G.B. (1995). Comparison of Organic extractives found in leatherwood (*Eucryphia Lucida*) honey and leatherwood flowers and leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(3), 753–63.
- Ruisinger, B., & Schieberle, P. (2012). Characterization of the key aroma compounds in rape honey by means of the molecular sensory science concept. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(17), 4186–94.
- Scott, T.R., Plata-Salaman, C.R., Smith, V.L., & Giza, B.K. (1991). Gustatory neural coding in the monkey cortex, stimulus intensity. *Journal of Neurophysiology*, 65(1), 76–86.

- Seisonen, S., Kivima, E., & Vene, K. (2015). Characterisation of the aroma profiles of different honeys and corresponding flowers using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry/olfactometry. *Food Chemistry*, 169, 34–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.125>.
- Serra, B.J., & Gómez, P.A. (1988). La Calificación de mieles mediante el análisis organoléptico. *Apicata*, 23, 103–108.
- Shimoda, M., Wu, Y., & Osajima, Y. (1996). Aroma Compounds from aqueous solution of haze (*Rhus Succedanea*) honey determined by adsorptive column chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(12), 3913–18.
- Smith-Swintosky, V.L., Plata-Salaman, C.R., & Scott, T.R. 1991. Gustatory neural coding in the monkey cortex, stimulus quality. *Journal of Neurophysiology*, 66(4), 1156–65.
- Stevenson, Richard J., & Boakes, R. (2004). Sweet and sour smells learned synesthesia between the senses of taste and smell. In *The Handbook of Multisensory Processes*, eds. Calvert, G.A., Spence, C., Stein, B.E. Cambridge, MA, MIT Press., 69–83.
- Tananaki, Chrysoula, Vasilios Liolios, Dimitrios Kanelis, & Maria Anna Rodopoulou. (2022). Investigation of volatile compounds in combination with multivariate analysis for the characterization of monofloral honeys. *Applied Sciences*, 12(1), 264. <https://doi.org/10.3390/app12010264>
- The good scentscompany. <http://www.thegoodscentscompany.com/>. Consultado en marzo 2022.
- The pherobase. <https://www.pherobase.com/database/compound/compounds-index.php>. Consultado en marzo 2022.
- Tsuneya, T., Shibai, T, Yoshioka, A., & Shiga, M. (1974). The study of Shina (*Linden, Tilia japonica* Simk.) honey flavor. *Koryo*, 109, 29–34.
- Uckun, O., & Selli, S. (2017). Characterization of key aroma compounds in a representative aromatic extracts from citrus and astragalus honeys based on aroma extract dilution analyses. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(2), 512–22.
- Ullrich, F., & Grosch, W. (1987). Identification of the most intense volatile flavour compounds formed during autoxidation of linoleic acid. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 184(4), 277–82.
- Van Ruth, S.M. (2001). Methods for Gas Chromatography-Olfactometry, A review. *Biomolecular Engineering*, 17(4–5), 121–28.
- Varela, P., & Ares, G. (2012). Sensory Profiling, the blurred line between sensory and consumer science. a review of novel methods for product characterization. *Food Research International*,

48(2), 893–908.

- Verzera, A., Campisi, S., Zappalà, M., & Bonaccorsi, I. (2001). SPME-GC-MS analysis of honey volatile components for the characterization of different floral origin. *American Laboratory*, 33(15), 18–21.
- Wampler, T.P. (2002). Analysis of food volatiles using headspace-gas chromatographic techniques. In: Marsili, R. Flavor, Fragrance, and Odor Analysis. CRC Press, 25–54.
- Wardencki, W., Chmiel, T., Dymerski, T., , Paulina, B., & Beata, P. (2009). Application of gas chromatography, mass spectrometry and olfactometry for quality assessment of selected food products. *Ecological Chemistry and Engineering*, 16(3), 287–300.
- Yang, X., & Peppard, T. (1994). Solid-Phase Microextraction for flavor analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(9), 1925–30.
- Zhou, Q., Wintersteen, C.L., & Cadwallader, K.R. (2002). Identification and quantification of aroma-active components that contribute to the distinct malty flavor of buckwheat honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 2016–21.

Capítulo IV

ESTUDIO DEL PERFIL POLIFENÓLICO Y MINERALES PRESENTES EN MIEL. ESTUDIO DE PROPIEDADES NUTRACÉUTICAS

Introducción:

Importancia de los polifenoles

Los compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides) son sintetizados por las plantas como producto de su metabolismo secundario. Las plantas los utilizan tanto para sus funciones fisiológicas como en defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso) (Quiñones et al., 2012). La biosíntesis de los polifenoles puede darse a través de dos rutas primarias: la ruta del ácido shikimico y la ruta de los poliacetatos (Santos-Buelga et al., 2023). Cada una de estas proporciona diferentes estructuras, la ruta del ácido shikimico proporciona la síntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina), ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y sus derivados del fenilpropano) mientras que la ruta de los poliacetatos proporciona quinonas y xantonas (Dewick, 2002). Estas estructuras forman parte del metabolismo secundario formándose por la acción de enzimas o reacciones redox dando lugar a diversos flavonoides (Quiñones et al., 2012). Según la estructura básica de los polifenoles pueden agruparse en diferentes clases: ácidos fenólicos (no flavonoides) y los flavonoides (flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, antocianinas, isoflavones y chalconas) (Quiñones et al., 2012).

Los ácidos fenólicos actúan como antioxidantes, eliminando los radicales libres e inhibiendo la oxidación lipídica (Challacombe et al., 2012). Según su estructura se dividen en dos subgrupo: ácidos hidroxibenzoicos con estructura C1-C6 (derivan de ácido benzoico), como por ejemplo los ácidos vanílico, gálico, siríngico, salicílico y los ácidos hidroxicinámicos con estructura C3-C6 (derivan de ácido cinámico), como por ejemplo ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico (Galanakis, 2018) (Figura 4.1). Los ácidos fenólicos pueden estar presentes de forma libre en frutas y vegetales, mientras que en granos y semillas se encuentran normalmente unidos y pueden ser liberados mediante hidrólisis ácida, alcalina o enzimática (Tsao, 2010).

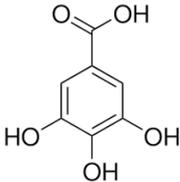
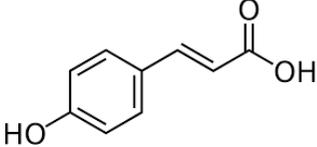
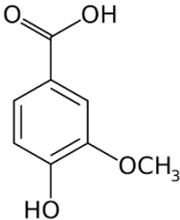
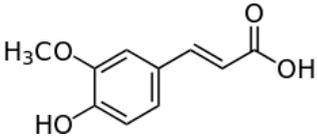
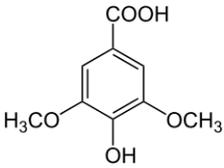
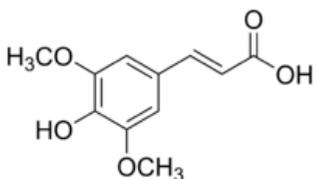
Ácidos hidroxibenzoicos	Ácidos hidroxicinámicos
Ácido gálico 	Ácido p-cumárico 
Ácido vanílico 	Ácido ferúlico 
Ácido sirínico 	Ácido sinápico 

Figura 4.1. Polifenoles: ácidos fenólicos

Los flavonoides poseen un núcleo estructural común: difenilpirano C6-C3-C6 que involucra dos anillos fenilo (A y B), conectados por un anillo C pirano heterocíclico. El anillo A se biosintetiza a través de la ruta de los poliacetatos y el anillo B junto con la unidad C3 proceden de la ruta del ácido shikimico (Figura 4.2). Todos los flavonoides son estructuras hidroxiladas en sus anillos aromáticos, por lo tanto, son estructuras polifenólicas (Figura 4.3). Las sustituciones en los anillos dan como resultado distintas clases de flavonoides, que se diferencian entre sí por el número y posición de los grupos hidroxilo y por los distintos sustituyentes que puedan presentar (metilos, azúcares, ácidos orgánicos) (Quiñones et al., 2012). Los flavonoides representan el grupo más grande de compuestos fenólicos naturales y se distribuyen ampliamente en semillas, corteza, hojas, flores de plantas y árboles a los que proveen de protección contra la radiación ultravioleta, patógenos y herbívoros (Da Silva et al., 2016; Watson, 2019). Las isoflavonas poseen su anillo B enlazado al C3 del anillo C. Se pueden presentar como agliconas o conjugadas con glucosa. Se encuentran mayormente en plantas leguminosas como la soja y tienen gran impacto en la salud humana. Las chalconas presentan el anillo C abierto, son frecuentes en frutas como manzana y lúpulo de cerveza (Tsao, 2010). Los subgrupos de flavonoides más comunes, presentes en todo el reino vegetal son las flavonas y los flavonoles (derivados 3-hidroxilados), incluidos sus glucósidos, metoxidos y otros productos acilados en los tres anillos, se caracterizan por poseer un grupo ceto en carbono C4 y una insaturación entre los carbonos C2 y C3. Quercitina y kaempferol son los flavonoles agliconas más comunes, están presentes principalmente en frutas, verduras, te y vino.

Las flavanonas y sus derivados 3-hidroxi, flavanoles han aumentado significativamente su identificación en los últimos años. Los flavanoles o flavan-3-oles son comúnmente llamados catequinas (monómeros), procianidinas (oligómeros), o proantocianidinas (polímeros). Se diferencian de los demás flavonoides en su estructura, dado que no poseen un doble enlace entre C2 y C3 ni carbonilo en el C4 del anillo C.

Los flavonoles (derivados 3-hidroxilados) poseen dos centros quirales en la molécula dando lugar a los isómeros con configuración *trans*, *cis*, (catequina y epicatequina respectivamente) y cada uno con sus dos estereoisómeros (+)-catequina, (-)-catequina, (+)-epicatequina y (-)-epicatequina. Según su configuración son encontrados en frutas, principalmente en la piel de uvas, manzanas o en hojas de té y grano de cacao (Watson, 2019). Las antocianidinas son compuestos hidrosolubles y constituyen uno de los grupos más importantes de pigmentos rojo, azul y púrpura de la mayoría de los pétalos de flores. Se presentan principalmente con los tres anillos de su estructura conjugados y la glicosilación ocurre en la posición 3 del anillo C o en las posiciones 5 y 7 del anillo A. Se pueden encontrar en ciertas variedades de cereales, vino tinto, fruta y algunos vegetales. (Quiñones et al., 2012; Tsao, 2010).

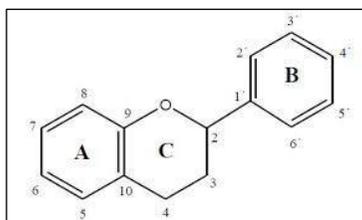


Figura 4.2 Estructura básica de los flavonoides

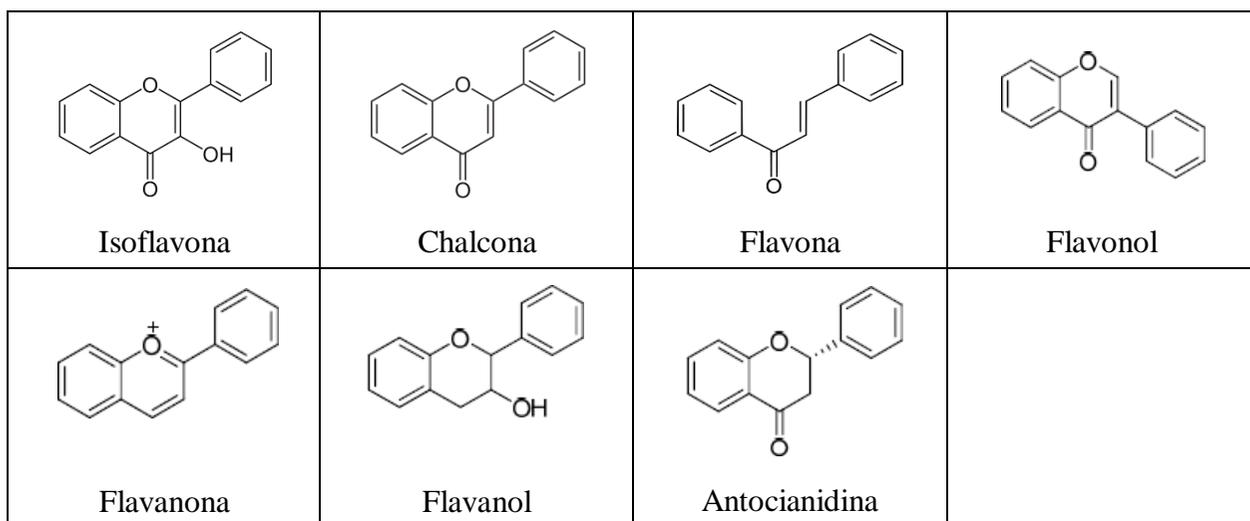


Figura 4.3. Tipos de flavonoides, estructuras generales

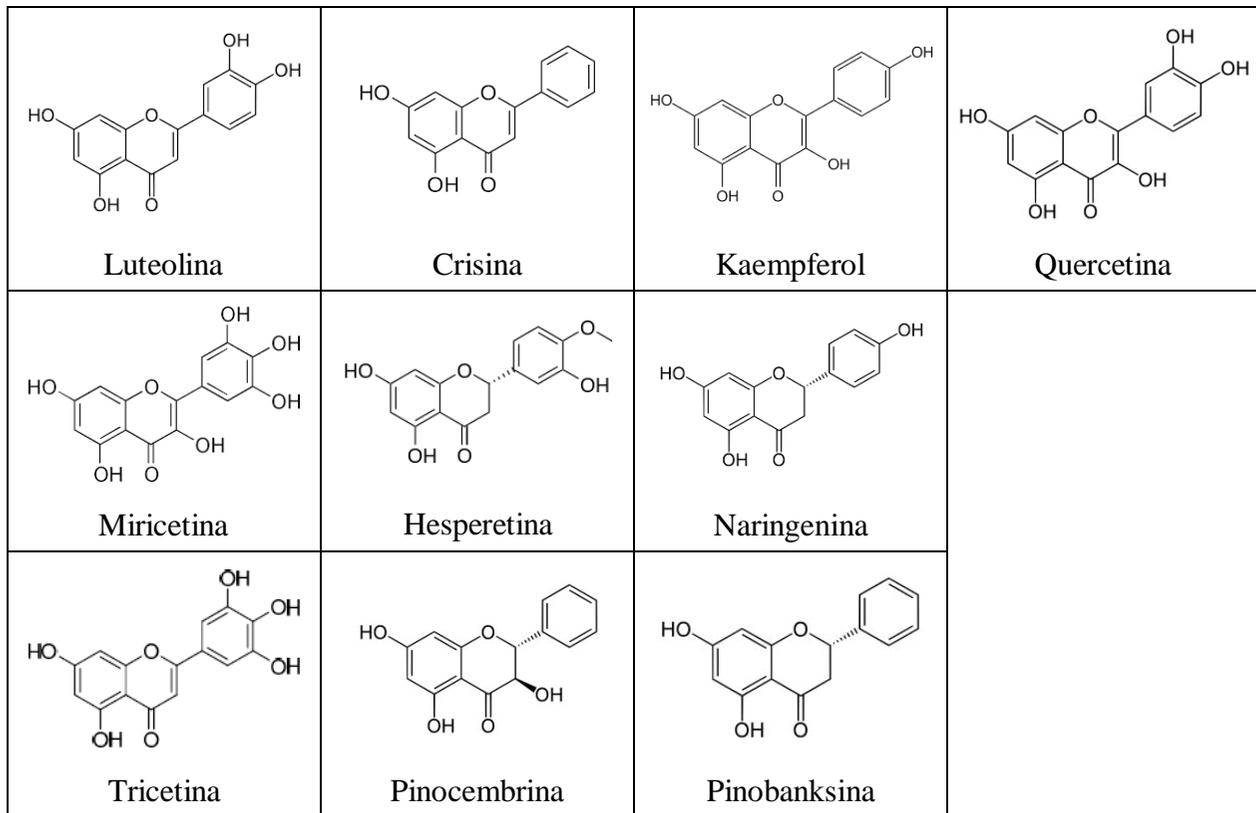


Figura 4.4 Polifenoles: Flavonoides encontrados en miel

En las últimas décadas los polifenoles han recibido mucha atención debido a su rol en la salud humana como la prevención de enfermedades degenerativas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas (Rice-Evans, 2003; Galanakis, 2018). Los polifenoles son fuertes antioxidantes que complementan a las vitaminas y enzimas como defensa contra el estrés oxidativo causado por el exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Tsao, 2010). Estos compuestos fenólicos están presentes en cantidades significativas en muchas frutas, verduras, granos, hierbas y bebidas comúnmente consumidas y dada la diversidad estructural de los polifenoles exhiben una gama de actividades biológicas in vitro que pueden explicar sus posibles propiedades cardioprotectoras incluidos los efectos antioxidantes, antiinflamatorios y la inducción de apoptosis (Hooper et al., 2008; Bartosz, 2014).

Polifenoles en la miel

La miel es producida por la evaporación del néctar colectado por las abejas de las diferentes plantas, por lo que la composición final de la miel dependerá principalmente de la fuente floral utilizada así como de la temporada y de las condiciones climáticas (Baltrušaityte et al., 2007). Dentro de los componentes presentes en el néctar que son transferidos desde la planta original a la

miel se encuentran una cantidad de compuestos minoritarios, los polifenoles, que son los que le otorgan las propiedades bioactivas a la miel (Al et al., 2009). Dada la importancia de los polifenoles por su rol potencial como antioxidantes y su estrecha conexión a la fuente floral de la que provienen, es que muchos autores han estudiado el perfil polifenólico de la miel con el propósito de encontrar compuestos polifenólicos que puedan utilizarse como marcadores florales (Alvarez-Suarez et al., 2010; Tomás-Barberán et al., 2001; Cianciosi et al., 2018). Además, entre los compuestos fenólicos, los flavonoides han sido tradicionalmente los componentes especialmente apropiados entre los metabolitos secundarios para ser utilizados como marcadores quimiotaxonómicos de plantas (Harborne y Turner, 1984). Varios estudios han propuesto diferentes flavonoides como marcadores para la detección del origen botánico de la miel, como es el caso de los flavonoides miricetina, tricetina y luteolina marcadores de mieles monoflorales de *Eucaliptus* europeo (Martos et al., 2000), o el flavonoide hesperetina como marcador de origen floral de mieles cítricas (Ferrerres et al., 1993), el flavonol kaempferol ha sido identificado como marcador de origen floral para mieles de romero (Gil et al., 1995). (Figura 4.4).

La necesidad de buscar alternativas y complementos a los análisis palinológicos tradicionales o análisis fisicoquímicos ha sido manifestada por diferentes autores como un complemento al estudio de la autenticidad de la miel, como análisis de rutina. Esta situación ha conducido a la búsqueda de marcadores específicos como es el caso de los compuestos fenólicos (Truchado et al., 2008; Pyrzyńska et al., 2009).

Minerales presentes en la miel

La miel es concebida tradicionalmente como un producto natural, complejo y dulce producido a partir de componentes de la naturaleza colectados por la abeja *Apis mellifera*. Es considerada un producto de alta calidad rico en sustancias beneficiosas y con un potencial funcional interesante que ha atraído la atención de los investigadores de un tiempo a esta parte. Si bien la miel es apreciada por ser un importante alimento energético no puede ser considerada como un alimento completo para los estándares nutricionales humanos, sino que constituye un suplemento dietético potencial (Muñoz et al., 2007). La miel, aunque está principalmente compuesta de azúcares (mayoritariamente fructosa y glucosa) contiene una amplia gama de componentes minoritarios como ácidos fenólicos, flavonoides, enzimas, sustancias similares a carotenoides, aminoácidos, ácidos orgánicos, productos de reacción de Maillard, vitaminas y minerales. La miel es un alimento que el organismo es capaz de asimilar fácilmente, es una fuente de alta energía por su aporte en carbohidratos fácilmente digeribles como muchas frutas (White et al., 1980; Alvarez-Suarez, 2010). Además de su uso como edulcorante natural la miel ha sido utilizada en medicina tradicional por

sus propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antitumorales y antiinflamatorias (Viuda-Martos et al., 2008). Numerosos estudios han investigado acerca de estas propiedades y han encontrado que existe una fuerte correlación entre la actividad antioxidante de la miel y su composición fenólica (Gheldof y Engeseth, 2002; Lachman et al., 2010). Por otro lado, también se ha investigado acerca de la relación entre el contenido mineral y la propiedad antioxidante, desarrollando una posible sinergia, dado que los metales presentes en la miel pueden funcionar como donante de electrones al acomplejarse con el compuesto fenólico, mientras que su carga se estabiliza fácilmente por la estructura fenólica (Sant'Ana et al., 2012). Otros autores han propuesto a la alta actividad antioxidante y el alto contenido mineral como una combinación de propiedades de alto poder discriminante, es decir como una herramienta útil para caracterizar diferentes tipos de miel (Nayik et al., 2016). Los metales presentes en la miel provienen del suelo en el que las plantas crecen y se alimentan y es a través de la raíz que estos elementos esenciales son absorbidos y transportados a las distintas estructuras de la planta incluida las flores y néctar. Estos minerales variaran dependiendo de la composición del suelo en el que las plantas crecen y también según el tipo botánico al que pertenece la planta de la cual la abeja toma el néctar (Matei et al., 2004; Bogdanov et al., 2007). La importancia en este tipo de elementos se debe al rol fundamental que desempeñan en los sistemas biológicos, como el mantenimiento de reacciones fisiológicas normales, la inducción del metabolismo en general, la germinación, los sistemas circulatorios y la influencia en la reproducción como catalizadores de diversas reacciones bioquímicas (Celli y Maccagnani, 2003). Por otro lado, el contenido mineral de la miel puede ser un indicador de contaminación ambiental y de origen geográfico de la miel, debido a la actividad pecoreadora de la abeja. Couvillon et al. (2015) sugieren que la distancia que las abejas melíferas deben volar en busca de alimento varía con la estación, siendo el verano en general la temporada en la que las abejas deben volar más lejos para recolectar alimento en comparación con la primavera o el otoño. Según la experiencia llevada a cabo por Silliman et al. (2022) las abejas recolectoras de polen recorrieron en promedio 1400 m (con un rango de 0,05 a 8,28 km) este recorrido puede incluir diferentes ambientes, en los que tienen contacto con plantas, aire, agua y tierra, con diverso grado de contaminación ambiental. Los contaminantes del ambiente las abejas pueden transportarlo hacia la colmena y transferirlos a la miel (Couvillon et al., 2015; Chua et al., 2012). Algunas propiedades fisicoquímicas se relacionan con el contenido mineral, como por ejemplo, el color. Mieles más oscuras contienen mayor cantidad de metales como Al, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Zn que las mieles claras (Pohl, 2009). Además, como ya fue mencionado en el capítulo 2, el contenido de cenizas y la conductividad eléctrica están relacionados con el contenido mineral de la miel, en general mieles con mayor contenido de ceniza presentan valores superiores de conductividad eléctrica y alto contenido mineral (Pires et al., 2009; Santos et al., 2014; Terrab et al., 2003). Es así como en los últimos

años el contenido mineral ha sido utilizado para la clasificación de los orígenes botánicos y geográficos de la miel (Lobos, 2022). A pesar del bajo contenido de oligoelementos en la miel, es un parámetro utilizado en la investigación sobre la autenticidad de la miel en el mundo (Fernández-Torres et al., 2005; Madejczyk y Baralkiewicz, 2008).

Sección 1- Análisis de composición polifenólica

Objetivo

En esta sección se pretende determinar la composición polifenólica de mieles seleccionadas mediante UHPLC-MS. Conjuntamente se evaluará qué componentes polifenólicos pueden ser utilizados como marcadores específicos de mieles nativas del Uruguay.

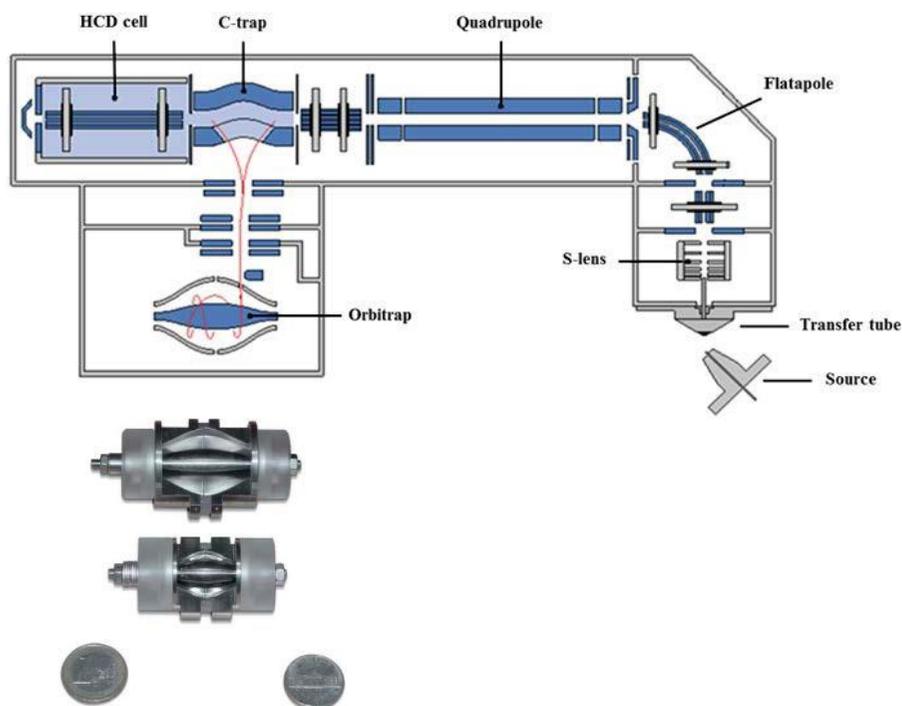
Materiales y Métodos

Extracción de compuestos polifenólicos

Para la extracción de los compuestos polifenólicos se utilizó el método descrito por Trautvetter et al. (2009) y modificado por Kečkeš et al. (2013), por el cual 50g de miel previamente homogenizada se diluyó en 50 mL de solución cloruro de sodio al 2% (p/v), la solución de miel se extrajo cinco veces con 50mL de acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron con sulfato de sodio y el solvente se rotaevaporó a 40°C hasta un volumen de aproximadamente 1mL. Previo a su análisis, el residuo se disolvió en 5 mL de metanol/agua (3:2, v/v) y se filtró a través de un filtro de membrana de 0,22 µm para analizar mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (HPLC-MS).

Análisis de la composición polifenólica

La composición polifenólica se estudió utilizando un equipo de HPLC Thermo Ultimate™ 3000 (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masa híbrido cuadrupolo-orbitrap (Q-Exactive™; Thermo Scientific, Bremen, Germany) equipado con fuente de electropray (HESI-II) (Figura 4.5) .



Orbitrap

Cuando es necesaria la fragmentación, la trampa C se conecta directamente a la célula HCD llena de gas, donde se fragmentan a su energía de colisión óptima, sin comprometer la fragmentación y el almacenamiento de iones de inyecciones anteriores..

Cuando se encuentran en la trampa C, los iones pierden energía en colisión con el gas nitrógeno, sin fragmentarse gracias a la presión relativamente baja del nitrógeno

Los grupos de iones de la lente S vuelan sin obstáculos fuera del flatapole hacia un octapolo corto que lleva los iones a un cuadrupolo curvado sólo de RF, cuyo eje central sigue un arco en forma de C.

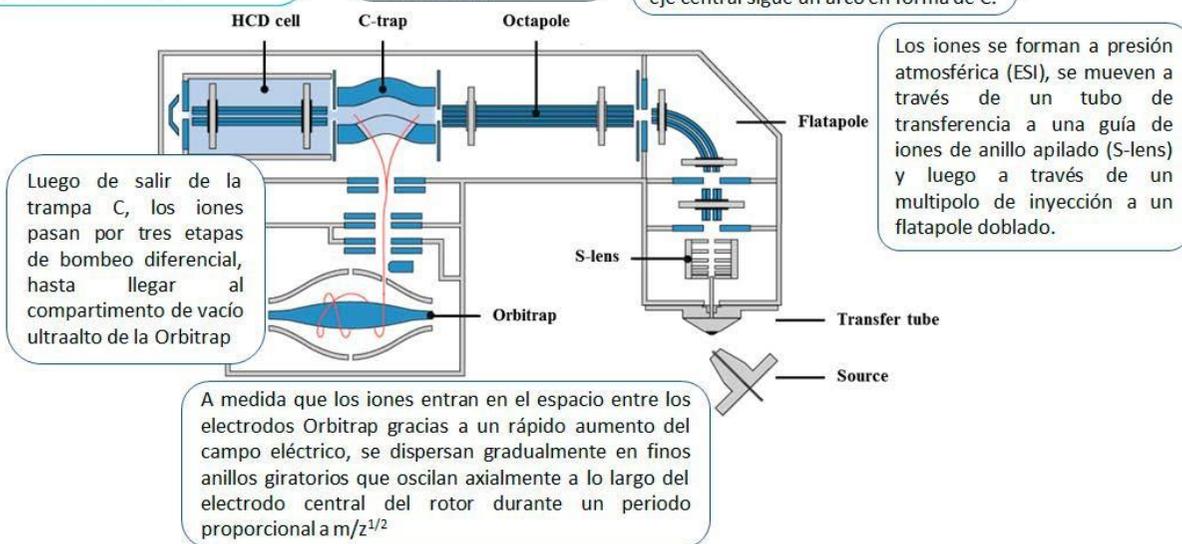


Figura 4.5. Esquema de un analizador de MS/MS de tipo Orbitrap

La separación cromatográfica se realizó utilizando una columna Accucore™ Polar Premium LC (150mm × 3mm, 2,6 μm tamaño de partícula Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)

para la que la fase móvil fue una mezcla de H₂O y acetonitrilo (ACN) con un flujo de 0,3 mL/min. Para optimizar la resolución cromatográfica buscando la separación de potenciales compuestos isobáricos, utilizó el siguiente gradiente: agua-ACN, 6%, 0-6 min; 6-7%, 4-8 min; 7-10%, 8-14 min; 14-24 min; 15%; 16-26 min, 20%; 26-32 min, 25%; 32-38 min, 35%; 38-44 min, 50%; 44-50 min, 100%; 50-51 min, 6%; 51-55 min, la columna de equilibró con ACN-ácido fórmico (0,1%, v/v) 6:94 (v/v).

Volumen de inyección, 10 µL. El inyector automático se mantuvo a 5°C y el compartimiento de la columna se calentó a 40°C. El análisis de masa se realizó en modo de ionización negativa utilizando un experimento MS/MS en modalidad data dependent (MS-dd completo MS/MS),

En espectrometría de masas, la adquisición independiente de datos (data-independent acquisition, DIA) es un método de determinación de estructuras moleculares en el que todos los iones dentro de un rango de m/z seleccionado se fragmentan y analizan en una segunda etapa de espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Los espectros de masas en tándem se adquieren fragmentando todos los iones que entran en el espectrómetro de masas en un momento dado (lo que se denomina DIA de banda ancha) o aislando y fragmentando secuencialmente rangos de m/z . La DIA es una alternativa a la adquisición dependiente de datos (data-dependent acquisition, DDA), en la que se selecciona un número fijo de iones precursores y se analizan mediante espectrometría de masas en tándem.

En este trabajo la resolución de masa se estableció en 140.000 del ancho del pico del fragmento (calculado para m/z 200, 1.5 Hz) considerado a la mitad del máximo (FWHM,) para espectros completos (full MS spectra) y a 17.500 FWHM (12 Hz) para dd-MS².

Los iones con la respuesta más intensa ($>1,1 \times 10^5$) se fragmentaron con energía de colisión normalizada escalonada (NCE) donde la rampa de energía se estableció en 25, 35 y 45 unidades arbitrarias. Mientras que los experimentos dd-MS², una vez realizados, se repitieron después de 6s. La fuente de ionización por electrospray (Heated Electrospray Ionization, HESI) se configuro de la siguiente manera: voltaje de spray, 2,80 kV; velocidad de flujo del gas, 30 unidades arbitrarias; caudal de gas auxiliar, 20 unidades arbitrarias; temperatura del capilar, 310°C; temperatura del calentador de gas capilar, 280°C. Para la sincronización de la cromatografía y la adquisición de masa se usó el software Thermo Scientific™ Dionex™ Chromeleon™ 7.2 CHromatography Data System (CDS). Para el procesamiento y evaluación de datos se utilizaron el software Thermo Fisher Scientific Xcalibur y TraceFinder™ (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Perfil polifenólico

Para identificar los compuestos fenólicos libres en las muestras de miel, se utilizó una coincidencia de valores m/z de alta resolución [tolerancia de masa < 5 ppm (Reynolds et al.,

2013)], tiempos de retención y patrones de isotopos al comparar los datos experimentales de la muestra y los obtenidos del análisis de los estándares disponibles comercialmente. La conformidad de los espectros de la muestra dd- MS/MS con los recogidos de los estándares disponibles se utilizó como evidencia adicional de la presencia de los compuestos objetivo en matrices reales. Para proceder con la identificación tentativa de compuestos fenólicos unidos a residuos de azúcar (glicósidos), se utilizó también la coincidencia potencial de masas exactas [tolerancia de masa < 5 ppm (Reynolds et al., 2013)] con los espectros experimentales MS/MS así como con los patrones exactos de masa y las fragmentaciones de glucósidos disponibles en la literatura (Alakolanga et al., 2014; Amessis-Ouchemoukh et al., 2014; Beelders et al., 2014; Benayad et al., 2014; Bravo et al., 2006; Fabre et al., 2001; Fang et al., 2002; Hjelmeland et al., 2015; Qiu et al., 2013). La detección de la pérdida neutra del residuo de azúcar en el espectro MS/MS se utilizó como información adicional (Barnaba et al., 2018) y al comparar el espaciamento isotópico experimental y la abundancia relativa con valores teóricos basados en formulas químicas.

Resultados y discusión

En la actualidad, se suele distinguir entre análisis *target* o dirigido y análisis de *screening* (barrido). En el análisis dirigido, se dispone de una lista fija de compuestos que deben detectarse en la muestra y su concentración ser determinada. En esta opción, se utilizan inicialmente patrones de referencia para optimizar los parámetros cromatográficos y de espectrometría de masas específico (Tabla 4.1, Figura 4.6).

Suspected-Target Screening (screening de compuestos sospechosos)

En el análisis por Suspected-Target Screening se realiza una búsqueda de sustancias potencialmente esperables. En primera instancia, esta definición parece incoherente porque, por un lado se trata de un concepto de screening y, por otro, de la detección de compuestos conocidos o sospechosos. A diferencia del análisis target (dirigido), que se centra principalmente en la cuantificación de los componentes que deben determinarse en una muestra, en el Suspected-Target Screening se realiza una comparación con el patrón de referencia para crear una lista de criterios de identificación como el tiempo de retención, el ion precursor, el patrón isotópico o la fórmula molecular que puede calcularse a partir de él, así como el patrón de fragmentación (espectros MS/MS). A continuación, la información generada se compara con una base de datos de referencia. Cuanto mayor sea el número de criterios de identificación, mayor será la probabilidad de que se pueda confirmar la identidad del compuesto (Moschet et al., 2013).

Non-target Screening (screening no dirigido)

En principio, *screening no dirigido* no se dispone de información *a priori* sobre los componentes presentes en la muestra.

El primer paso para la identificación de un compuesto es la determinación de la masa exacta del ion molecular. La composición elemental y una posible fórmula mínima pueden determinarse utilizando el patrón isotópico.

El siguiente paso, la asignación de una fórmula mínima a una fórmula estructural, se considera extremadamente difícil. Por lo tanto, es esencial que los espectros de fragmentación de los compuestos detectados sean determinados, además de la determinación de la masa exacta. Para ello se utilizan diferentes espectrómetros de masas híbridos de alta resolución, como los espectrómetros de masas cuadrupolares de tiempo de vuelo (QToF) o los Orbitraps. Estos ofrecen la posibilidad de fragmentación, así como la funcionalidad de barrido completo de espectrometría de masa de alta resolución para determinar la masa exacta del ion cuasi molecular.

Se selecciona el ion precursor, se fragmenta y se registran los iones producto resultantes. Los espectros de iones producto ayudan a determinar la estructura de los compuestos. Es importante destacar que el *screening no dirigido* es extremadamente complicado y, en lo que respecta a la identificación fiable de un compuesto desconocido, muy susceptible a errores (Zedda y Zwiener, 2012).

Tabla 4.1. Esquema general de los diferentes flujos de trabajo LC/MS

Target analysis	Suspected-target screening	Non-target screening
<ul style="list-style-type: none">-Compuestos conocidos-Comparación directa con compuesto de referencia-Identificación utilizando el tiempo de retención, al menos dos transiciones de masa específicas, ion precursor y/o patrón de fragmentación-Cuantificación	<ul style="list-style-type: none">-Compuestos sospechosos-Fórmula de suma conocida y/o patrón de fragmentación conocido-Verificación por comparación del ion precursor, fórmula molecular y/o espectros MS/MS con espectros obtenidos de bases de datos comerciales o de libre acceso	<ul style="list-style-type: none">-Sustancias no previstas-No hay información <i>a priori</i> sobre la composición-Determinación de la fórmula mínima-Reducción de las posibles estructuras químicas mediante la evaluación de la fragmentación patrón-Verificación adicional mediante fragmentación <i>in silico</i>* y/o transformación/ metabolismo mediante software especial (Wolf et al., 2010)-Evaluación estadística por componentes principales (PCA)

*La fórmula de suma y los espectros de iones producto determinados experimentalmente se comparan con el patrón de fragmentación simulado para una mayor caracterización de las sustancias desconocidas.

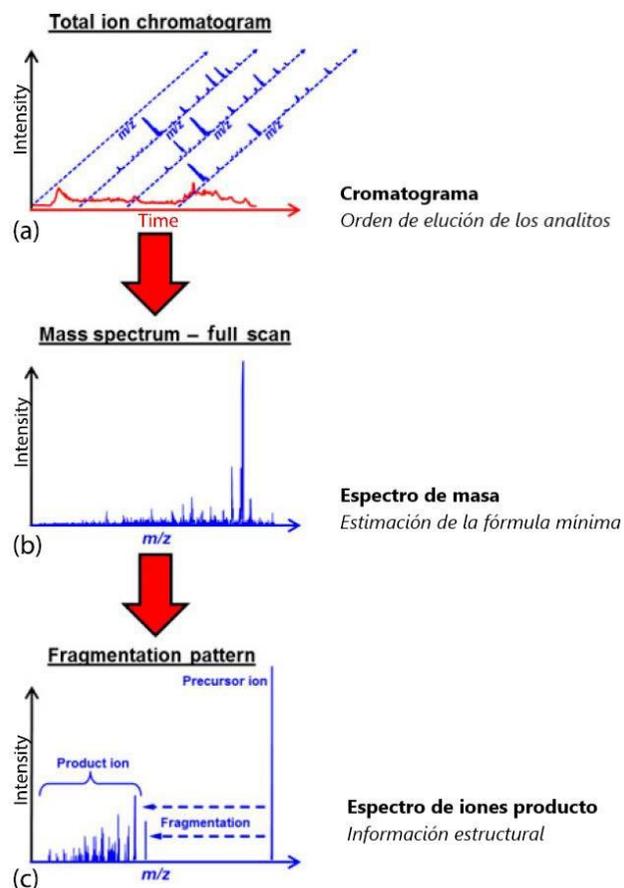


Figura 4.6. Flujo de trabajo general para un análisis de screening por LC/MS y MS/MS (extraído de Teutenberg et al., 2017)

El enfoque utilizado en este trabajo permitió, mediante el uso de estándares y curvas de calibración obtener la información que se presenta en la Tabla 4.2 (resultados del análisis en modalidad target o dirigida).

Tabla 4.2. Compuestos confirmados mediante la modalidad target (dirigida).

Compuesto (µg/kg miel)	Muestra														
	Lm01	Sbp02	SMm03	Sbm04	Sbm05	Sbm06	Ep07	Ep08	Sbm09	Ep10	Ep11	Tp12	Lm13	Lm14	Sbp15
vainillato de metilo	190	109	62	5	-	-	-	78	-	124	310	439	134	24	62
esculetina	1055	641	128	337	145	435	503	395	313	1197	70	741	639	227	189
ácido vainílico	3012	1991	809	1720	880	1884	2573	3589	499	1003	1121	1839	7999	532	760
tirosol	-	45774	6602	8089	6963	80998	75638	12580	5784	-	-	-	-	-	-
triptofol	-	911	247	747	2394	613	917	907	1106	2	tr	tr	tr	tr	146
ácido siríngico	1675	1564	168	502	143	855	699	938	102	316	356	520	977	131	247
siringetina	90	42	-	123	35	-	-	45	-	tr	7	tr	7	16	0
ácido sinápico	64	215	-	-	-	-	196	305	45	44	18	169	88	5	21
ácido salicílico	1854	4434	7839	7591	5423	5275	7714	2303	10166	3769	8817	368	611	77	6
quercetina	3859	2206	3344	3546	323	1804	3479	4848	1102	8608	6409	6888	4692	5230	3552
ácido protocatéquico	-	9591	2193	4152	-	-	-	-	762	448	233	285	195	110	384
pirocatecol	230	249	445	582	130	173	192	390	227	221	204	246	231	190	294
ácido p-cumárico	13834	10606	4229	5915	5595	4845	7074	12149	5067	8118	39279	19606	16348	36728	17281
ácido p-carboxifenol	8635	17982	4102	6095	14647	13305	15543	18093	6681	101353	39897	45136	50510	46373	63340
o-vanillina	10417	3629	2140	3071	4959	-	6440	4864	-	528	1553	tr	17	82	27
miricetina	114	104	81	234	-	57	473	2930	69	1205	2	69	88	276	85
laricitrina	197	40	28	82	-	-	-	-	-	69	83	68	109	152	68
kaempferol	4587	2090	2990	4390	470	1200	1719	2519	1016	6137	19314	25262	28469	29791	19971
isoacetovanillona	20	tr	102	71	-	39	-	16	-	tr	9540	53	10290	9	43
hidroxitirosol	529	1031	125	380	182	822	1216	1020	440	2108	2947	5340	2002	1306	2348
ácido gentísico	-	343	161	255	35	189	305	482	99	694	549	414	168	173	281
ácido gálico	465	4495	13843	14108	41	6409	1852	2219	295	3494	1896	659	755	1303	695
ácido ferúlico	2921	4875	2180	3257	918	1723	2042	5281	1787	3727	11375	9118	7246	8497	5164
eugenol	159	tr	-	382	397	510	-	-	-	7	58	16	12	11	1
ácido cafeíco	10495	18431	2031	6978	1186	4094	5097	18299	2682	3416	20901	168	5	6327	4403
4-etilcatecol	65	70	62	83	53	55	67	63	54	tr	tr	tr	16	tr	4
4-metilcatecol	65	102	57	124	44	63	66	76	51	31	46	58	33	26	53

Mediante el uso de herramientas estadísticas multivariantes se realizó un análisis de componentes principales (PCA) donde es posible observar la distribución de las muestras a través de las variables proyectadas (en este caso, los polifenoles determinados en modalidad target) a través de la utilización del software InfoStat. En la Figura 4.7 se observa el PCA donde los dos primeros componentes explican más del 50% de la variabilidad del sistema. Hacia valores negativos del eje x, se ubican las mieles no nativas monoflorales de *Lotus spp.* (Lm13, Lm14), polifloral con predominancia de *Trifolium repens* y *Trifolium pratense* (Tp12), poliflorales con mayor predominancia de *Eucalyptus spp.* (Ep10 y Ep11) y una miel nativa polifloral con predominancia de *Scutia buxifolia* (Sbp15). Que esta miel se haya ubicado próxima a las mieles no nativas puede deberse a que presenta cierto aporte de polen de *Echium sp* y *Lotus sp* los cuales corresponden a especies no nativas. Mientras que, hacia valores positivos del eje x, se ubicaron las mieles nativas monoflorales de *Scutia buxifolia* (Sbm04, Sbm05, Sbm06, Sbm09), *Schinus molle* (SMm03), polifloral con predominancia de *Scutia buxifolia* (Sbp02) y las mieles no nativas: una monofloral de *Lotus spp.* (Lm01) junto a dos poliflorales con mayor predominancia de *Eucalyptus spp.* (Ep08 y Ep07). La explicación de porqué estas dos mieles de *Eucalyptus spp.* (Ep08 y Ep07) se hayan ubicado próximas a las mieles nativas puede deberse al contenido polínico secundario el cual corresponde a especies nativas *Schinus molle* y *Scutia buxifolia* respectivamente. De la misma manera podemos inferir entonces que la miel monofloral de *Lotus spp.* (Lm01) se haya ubicado próxima a las mieles Ep08, Ep07 y Sbp02 puede deberse al aporte polínico secundario de la misma ya que contiene polen de las especies *Eucalyptus* y *Scutia buxifolia*. En cuanto a la distribución de los compuestos polifenólicos se observa una correlación positiva entre un grupo de mieles nativas (Sbm04, Sbm05, Sbm06, Sbm09) que presentó un apartamiento notorio del resto de las mieles correlacionando positivamente con los compuestos polifenólicos: eugenol, triptofol y ácido salicílico, siendo este último reportado anteriormente en mieles de castaño, trigo sarraceno, brezo, trébol y girasol (Dimitrova et al., 2007; Koulis et al., 2021; Mattonai et al., 2016). También puede observarse la amplia variedad de compuestos polifenólicos que se distribuyen hacia valores negativos del eje x correlacionando de forma positiva con las mieles no nativas. Los compuestos polifenólicos identificados se lograron cuantificar dentro de un amplio rango que va desde (1 – 101353) $\mu\text{g}/\text{Kg}$ siendo el identificado en menor cantidad el eugenol y el compuesto que se cuantificó en mayor cantidad es el ácido p-carboxifenol. Estos resultados se encuentran dentro de un rango informado previamente por otros investigadores como es el caso de un estudio realizado por Biesaga and Pyrzyńska, 2009 en el que se observa un rango de cuantificación de 90 - 173800 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. En línea con muchos estudios previos varios de los compuestos identificados en este trabajo ya han sido reportados por otros autores en mieles de orígenes florales y geográficos diferentes. Los compuestos polifenólicos más encontrados en la bibliografía son ácido vainílico, ácido sirínico,

quercetina, ácido protocatéuico, ácido p-cumárico, ácido p-carboxifenol, kaempferol, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido cafeíco (Biesaga and Pyrzynska, 2009; Can et al., 2015; Devi et al., 2018; Lo Dico et al., 2019; Dimitrova et al., 2007; Koulis et al., 2021). En cualquier caso, es importante tener en cuenta que en los estudios mencionados existe una gran cantidad de combinaciones en las técnicas de preparación, extracción y análisis de polifenoles en esta matriz tan compleja como lo es la miel, por lo que resulta muy difícil la comparación de estos resultados con estudios reportados previamente.

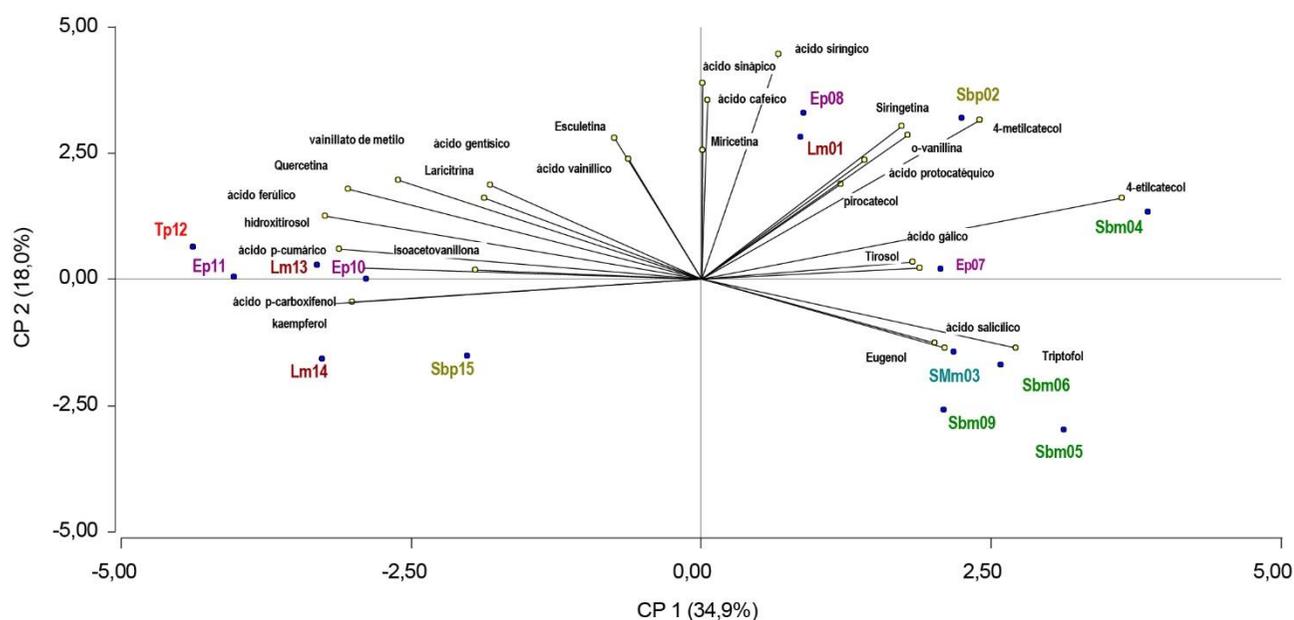


Figura 4.7. Análisis de componentes principales donde se relacionan los compuestos procesados por la modalidad target con las muestras estudiadas

Estos resultados en los que se observa una clara diferenciación de las mieles estudiadas en dos grandes grupos: nativas y no nativas, incluso aquellas mieles que se apartan del comportamiento observado Sbp15, Ep08 y Ep07, coinciden con los resultados obtenidos en el capítulo anterior en el que se estudió el perfil volátil. Esto nos sugiere que tenemos una potencial herramienta capaz de distinguir mieles nativas de no nativas por su composición volátil, o composición polifenólica.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta sección videncian que las mieles estudiadas (representativas de la producción vinculada a la flora nativa de Uruguay) son una fuente destacable de compuestos polifenólicos, través de los cuales es posible diferenciar mieles nativas de no nativas. También se pudo demostrar que para aquellos compuestos polifenólicos que fue posible identificar y cuantificar

aplicando la metodología target (dirigida), existe una correlación estadísticamente demostrable con grupos definidos de muestras como es el caso de los compuestos ácido salicílico, triptofol y eugenol que presentan una correlación positiva con las mieles monoflorales nativas. El contenido polifenólico debe ser considerado tanto como una forma adicional de caracterizar las mieles estudiadas como de poner de manifiesto la presencia de compuestos capaces de atribuirles propiedades funcionales a estas mieles debido al interés que ha ido en aumento en este tipo de compuestos con potencial actividad antioxidante.

Sección 2- Evaluación de propiedades nutraceuticas de la miel

Objetivo

El objetivo de esta sección es obtener una aproximación a las propiedades nutraceuticas de la miel producida en Uruguay mediante el estudio de la composición mineral, análisis de la actividad antioxidante y contenido de polifenoles totales.

Materiales y Métodos

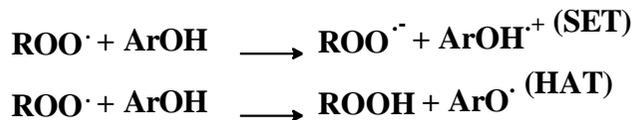
Contenido de metales

La determinación del contenido de metales fue realizada en el Grupo de Análisis de Elementos Traza y Desarrollo de Estrategias Simples para Preparación de Muestras (GATPREM, Departamento Estrella Campos, Facultad de Química-UdelaR). Para minimizar los efectos de la matriz orgánica, se realizó una digestión de la muestra asistida por microondas según (Chudzinska y Baralkiewicz, 2011) antes del análisis. Para la descomposición ácida se pesó 1g de miel, se disolvió en 7mL de ácido nítrico y la digestión se llevó a cabo en horno microondas. La determinación de Na, K, Ca y Mg se realizó mediante absorción atómica con llama de aire de acetileno utilizando un espectrómetro Analyst 200 (PerkinElmer, Inc.MA, USA)

Actividad antioxidante

Para todas las muestras de miel se evaluó la actividad antioxidante por medio de dos métodos diferentes: ABTS y ORAC. Estos métodos se diferencian en el mecanismo de acción por el cual se evalúa el efecto antioxidante. Estos mecanismos se basan en una reacción de transferencia de electrones individuales (SET) o una reacción de transferencia de átomos de hidrogeno (HAT) entre el oxidante (radical libre) y antioxidante (polifenol). En el mecanismo SET, el antioxidante (ArOH) puede donar un electrón al radical peróxilo, formando entre los productos un anión peroxilo y un catión radical del antioxidante (ArO^{•+}); y en el mecanismo HAT, el antioxidante (ArOH) atrapa un radical peróxilo por donación de átomos de hidrógeno, generando un hidroperóxido y un radical

antioxidante químicamente más estable (ArO^\bullet) (Prior et al., 2005):



Para los métodos basados en SET los antioxidantes son oxidados por oxidantes como $\text{ABTS}^{+\bullet}$ [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfónico)] y como resultado se transfiere un solo electrón de la molécula antioxidante al oxidante (Figura 4.9).

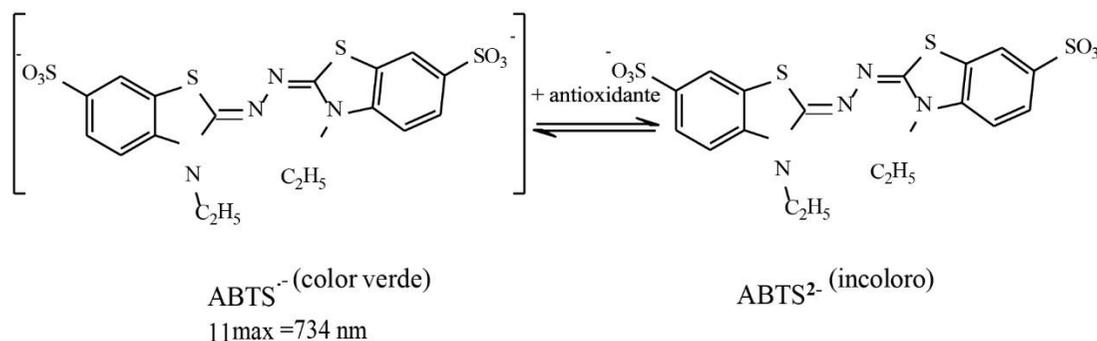


Figura 4.9. Esquema de la reacción de ABTS (Ilyasov et al., 2020).

Los métodos basados en HAT, como *oxygen radical absorbance capacity* (ORAC), utilizan un iniciador radical para generar el radical peroxilo (ROO^\bullet). Este radical secuestra un átomo de hidrogeno del antioxidante en forma preferente, dando como resultado que la reacción entre ROO^\bullet y la sonda de la molécula objetivo se retarda o inhibe (Ou et al., 2002).

Por una parte, se evaluó la actividad antioxidante total con el método reportado por Re et al. (1999), el cual consiste en la medición de las capacidades relativas de los antioxidantes presentes en la muestra para atrapar el radical catiónico $\text{ABTS}^{+\bullet}$, (formando el complejo reducido ABTS^{2-} incoloro), en comparación con el potencial antioxidante Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametil-cromano-2-carboxílico, antioxidante análogo de la vitamina E), en cantidades estándar. La reacción redox, se sigue midiendo la decoloración de la solución mediante espectrofotometría UV-Vis a 750nm.

Para el análisis se prepararon soluciones de cada muestra de miel pesando 1 g de miel, llevando a 10 mL con agua destilada. Se preparó una solución de ABTS 7mM manteniéndola protegida de la luz. Para activar dicha solución se agregaron 44 μL de persulfato potásico 140mM y se mantuvo a temperatura ambiente en oscuridad durante 14-16hrs para la formación del radical. Luego se diluyo la solución de ABTS en buffer fosfato 5mM pH 7,4, hasta alcanzar una absorbancia de 0,7 a 750nm. Para la curva de calibración de Trolox se prepararon soluciones de diferentes concentraciones (1,5; 1,0; 0,8; 0,5; 0,25 mM) del patrón en buffer fosfato. En placa de 96 pocillos se agregó 10 μL de

Trolox (puntos de la curva de calibración) y 10 μL de cada muestra por triplicado, se le agregó 190 μL de solución de trabajo de ABTS y luego de transcurridos 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente se procedió a medir en el lector de placas a 750nm. Los resultados se expresaron como μmol Trolox (TE)/100g de muestra. Este método es de los más rápidos, económicos, confiables y de uso frecuente en laboratorios para el análisis de actividad antioxidante en alimentos.

Por otro lado, se evaluó la capacidad antioxidante ORAC según lo reportado por Ou et al. (2001). En este ensayo el efecto protector de un antioxidante se mide evaluando el área bajo la curva de descomposición de una sonda fluorescente estable (fluoresceína) de la muestra en comparación con la del blanco en la que no hay antioxidante. La fluoresceína se oxida por ROO^\cdot y pierde fluorescencia. El antioxidante (flavonoide) es el que reacciona con ROO^\cdot por mecanismo HAT y protege a la fluoresceína de la oxidación por ROO^\cdot . Para el análisis se prepararon soluciones de cada muestra de miel de 1 mg/mL en buffer fosfato 35mM, pH 7,8. Como sustrato se utilizó fluoresceína 53 nM. El radical peroxilo se generó utilizando AAPH [dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)] 160 mM. Para la curva de calibración de Trolox se preparó soluciones de diferentes concentraciones (4, 10, 30, 50, 60, 80 μM) del patrón en buffer fosfato. La mezcla de reacción se llevó a cabo en placas de 96 pocillos, se agregó 150 μL de la solución de fluoresceína, 25 μL de muestra, buffer fosfato (control negativo) o Trolox (puntos de la curva de calibración), al blanco se agregaron 150 μL de fluoresceína y 50 μL de buffer fosfato. Se incubó a 37°C con agitación continua, luego de transcurridos 10 minutos se agregaron 25 μL de AAPH. Las lecturas de fluoresceína (11 excitación: 485nm, 11 emisión: 535nm) se realizaron a intervalos de 1 minuto durante 45 minutos en lector de microplacas (SYNERGY HT- SIAFRT, Biotek Instruments). Los resultados se expresaron como $\mu\text{L mol}$ Trolox (TE)/g de muestra.

Polifenoles totales

El contenido total de polifenoles fue determinado utilizando una modificación del método de Folin Ciocalteu (FC) propuesto por Singleton y Rossi, (1965). El método consiste en una reacción redox entre los polifenoles presentes en la muestra y el reactivo de FC donde los resultados se expresan por comparación con la reacción del ácido gálico (patrón) y el reactivo de FC. Esta reacción se sigue mediante espectrofotometría UV-Vis a 750nm. Para el análisis se prepararon 1 g de cada muestra de miel en 3 mL de agua destilada. Se preparó el reactivo de FC (2 mL de reactivo en 8 mL de agua destilada). Para la curva de calibración se prepararon soluciones de diferentes concentraciones de ácido gálico (1,0; 0,8; 0,4; 0,2; 0,05 mg/mL). Además, se preparó la solución de Na_2CO_3 al 20% (p/v). En placa de 96 pocillos se agregó 10 μL de patrón (puntos de la curva de calibración) y 10 μL de cada muestra por triplicado, se le agregó 200 μL de solución 20% Na_2CO_3 ,

y luego de transcurridos 2 minutos se agregan 50 μL de solución de Folin (1:5), se esperó 30 minutos en oscuridad para medir en el lector de placas a 750nm. Los resultados se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) en 100g de muestra.

Análisis estadístico

Mediante la utilización del software STATISTICA 7.0 (2002-2007, StatSoft) para Windows se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para la comparación de medias. A continuación, y para evaluar la existencia de diferencias significativas entre las mieles, se realizó un test de Tukey. Se consideró que habían diferencias significativas cuando p fue menor a 0,05. En la representación gráfica obtenida, letras iguales significa resultados que no son significativamente diferentes por el test de Tukey $p < 0,05$.

Resultados y Discusión

Minerales

En la Tabla 4.3 se observa el contenido mineral de las mieles estudiadas. El macromineral más abundante en todas las muestras de miel fue el potasio (K) oscilando en valores entre 582,3 - 3585,5 mg/Kg miel; seguido de sodio (Na) o calcio (Ca), según la miel considerada, con valores entre 36,4 - 608,7 y 63,5 - 209,4 mg/Kg miel respectivamente. Para todas las mieles el macromineral menos abundante fue el magnesio (Mg), con valores entre 16,1 - 57,7 mg/Kg. En las Figuras 4.10a, 4.10b y 4.10c se puede observar la proporción de los metales para cada muestra de miel. Estos resultados concuerdan con resultados reportados en la bibliografía, en los que el K es el mineral más abundante (aproximadamente 80% del total de los metales determinados), seguido en menor proporción por Na o Ca y por último Mg (Nayik et al., 2016; Terrab et al., 2003). Por otra parte, puede verse la concordancia con la conductividad (Figura 4.10a), con el color (Figura 4.10b) y con el contenido de cenizas (Figura 4.10c) lo cual también está de acuerdo con la bibliografía citada. Mieles con mayor contenido de metales presentan colores más oscuros, mayor contenido de cenizas y valores superiores de conductividad (Pires et al., 2009; Pohl, 2009; Santos et al., 2014; Terrab et al., 2003).

Para confirmar si la relación entre la composición mineral y parámetros como el color, la conductividad eléctrica y el contenido de ceniza son factores capaces de diferenciar las muestras de miel estudiadas, se emplearon herramientas estadísticas multivariantes para realizar un análisis de componentes principales (PCA) donde es posible observar la distribución de las muestras a través de las variables proyectadas (metales, conductividad eléctrica, cenizas y color) mediante la utilización del software InfoStat. En la Figura 4.11 se observa el PCA donde los dos primeros componentes explican más del 83% de la variabilidad del sistema. Hacia valores negativos del eje

x, encerradas en círculo verde, se ubican las mieles no nativas monoflorales de *Lotus spp.* (Lm01, Lm13, Lm14) y polifloral con predominancia de *Trifolium repens* y *Trifolium pratense* (Tp12), que presentaron colores claros, bajo contenido de ceniza, valores de conductividad bajo y bajo contenido de metales. Mientras que, hacia valores positivos del eje x y encerradas en círculo rojo, se ubicaron las mieles nativas monoflorales de *Scutia buxifolia* (Sbm04, Sbm05, Sbm06, Sbm09), *Schinus molle* (SMm03) y poliflorales con predominancia de *Scutia buxifolia* (Sbp02, Sbp15) que presentan colores oscuros, alto contenido de ceniza, mayor valor de conductividad y alto contenido de metales. En tanto las mieles Ep07, Ep08, Ep10 y Ep11 poliflorales con mayor predominancia de *Eucalyptus spp.* se distribuyeron en este análisis según su contenido de polen menos abundante. Ep07 y Ep08 presentan un contenido polínico menos abundante de *Schinus molle* y *Scutia buxifolia* respectivamente y se ubican en el PCA hacia el eje positivo de las x próximas a las mieles nativas, presentando también color oscuro, alto contenido de ceniza, mayor valor de conductividad y alto contenido de metales. Ep10 y Ep11 presentan contenido polínico menos abundante de *Acacia longifolia* y *Lotus sp* respectivamente y se ubican en el PCA hacia valores negativos del eje x, próximas a las mieles no nativas que presentaron colores claros, bajo contenido de ceniza y bajo contenido de metales.

Tabla 4.3 Contenido mineral (Na, K, Ca y Mg) en 15 muestras de miel

Muestras de miel	Minerales mg/kg			
	Na	K	Ca	Mg
Lm01	114,5	783,3	63,5	16,1
Sbp02	67,8	3265,6	68,6	43,9
SMm03	46,3	2647,8	69,9	51,9
Sbm04	61,1	3137,2	195,9	57,7
Sbm05	40,0	3585,5	79,1	35,8
Sbm06	36,4	3081,0	132,9	33,5
Ep07	278,4	2931,1	169,0	53,5
Ep08	497,5	3542,6	209,4	49,6
Sbm09	57,8	3042,0	122,8	36,7
Ep10	608,7	1014,7	124,8	53,3
Ep11	127,6	892,6	148,6	31,5
Tp12	117,2	582,3	114,6	20,0
Lm13	148,3	618,8	105,1	18,6
Lm14	106,4	642,9	129,1	23,6
Sbp15	117,8	1948,2	130,8	31,1

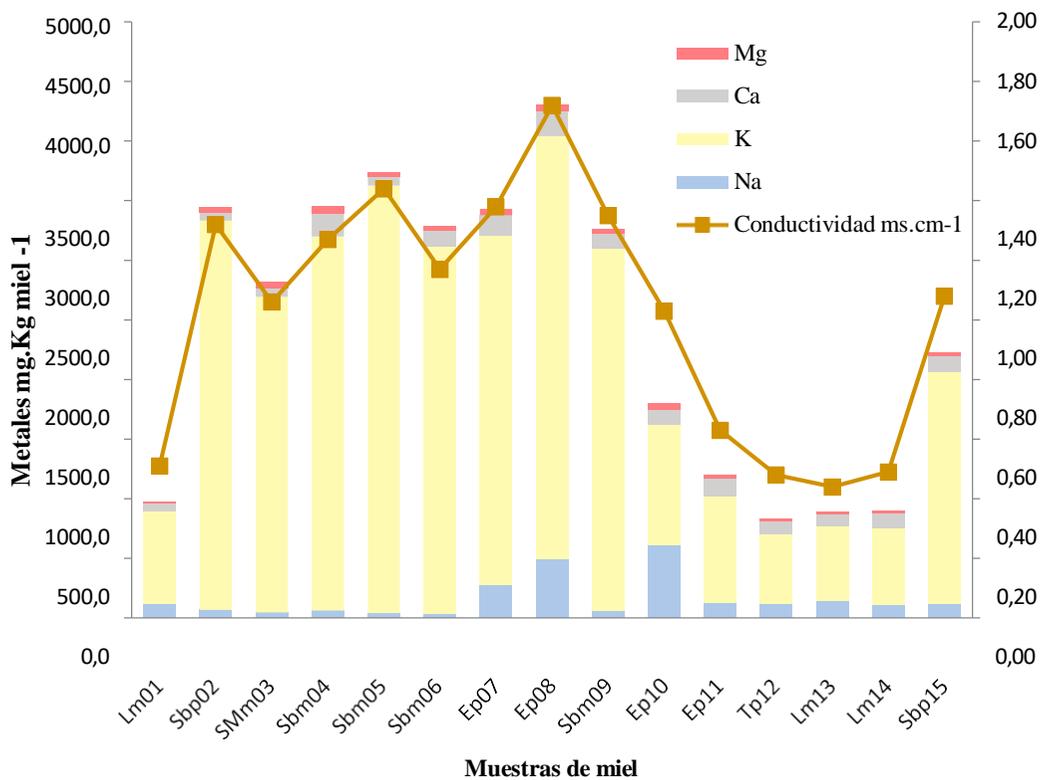


Figura 4.10a. Contenido de metales para cada muestra de miel y su relación con la conductividad.

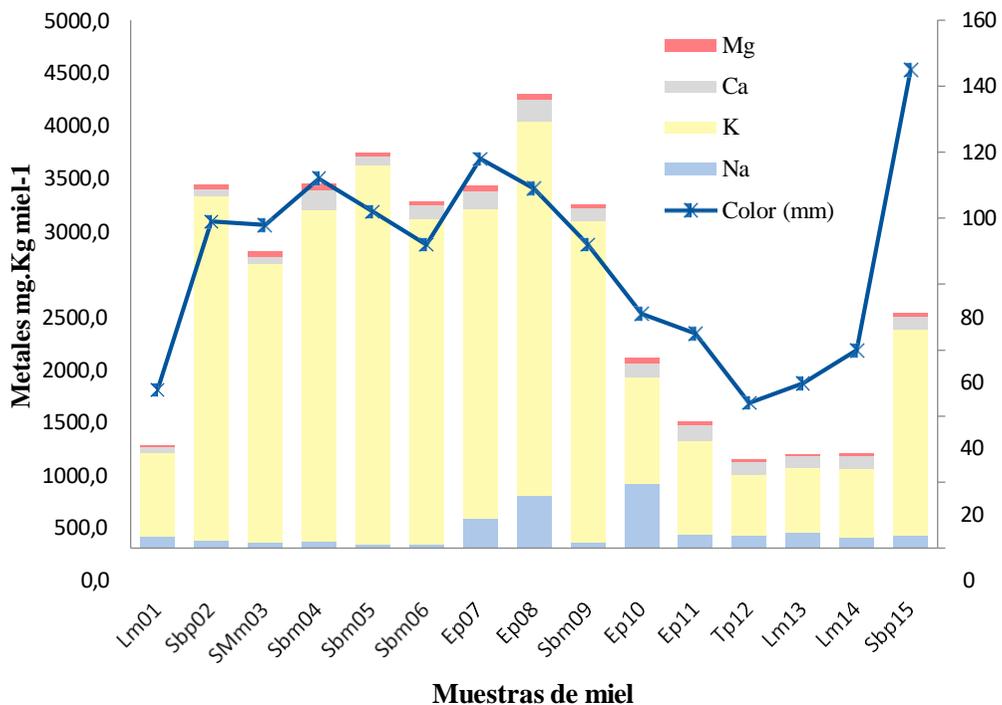


Figura 4.10b. Contenido de metales para cada muestra de miel y su relación con el color

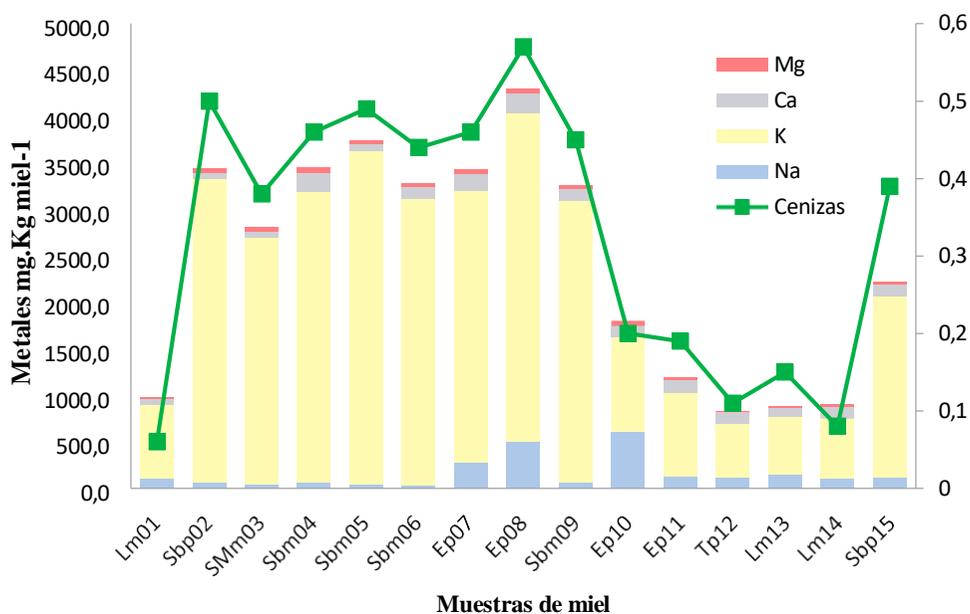


Figura 4.10c. Contenido de metales para cada muestra de miel y su relación con el contenido de cenizas

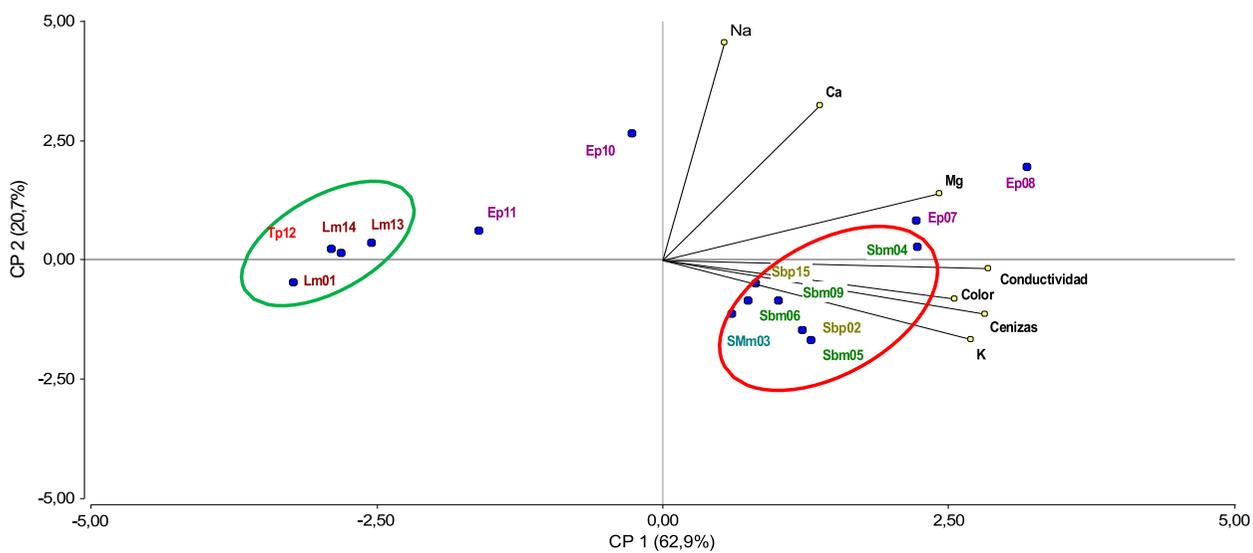


Figura 4.11. Análisis de compuestos principales donde se relacionan los parámetros color, conductividad, cenizas y los metales Na, Ca, Mg y K con las muestras estudiadas.

Actividad antioxidante y polifenoles totales

Tabla 4.4. Actividad antioxidante ABTS, ORAC y polifenoles totales para las 15 muestras de miel.

Muestra de miel	ABTS μmolTE/100g	ORAC μmolTE/g	Polifenoles totales mgGAE/100g
Lm01	1569,3 ± 99,2 a	16,6 ± 1,3 bcd	140,8 ± 10,3 c
Sbp02	1287,5 ± 41,6 b	14,9 ± 2,5 cde	178,2 ± 4,4 a
SMm03	1119,9 ± 39,0 e	19,3 ± 0,8 ab	143,8 ± 8,5 c
Sbm04	1225,7 ± 12,7 cd	17,4 ± 1,0 abc	179,6 ± 5,7 a
Sbm05	1078,4 ± 20,6 e	16,9 ± 0,6 bcd	150,3 ± 5,5 c
Sbm06	1136,7 ± 24,9 de	13,9 ± 0,9 cdef	116,1 ± 4,8 d
Ep07	1132,2 ± 38,7 de	21,6 ± 2,1 a	118,8 ± 3,0 d
Ep08	1356,8 ± 49,0 b	19,2 ± 0,6 ab	138,8 ± 14,2 c
Sbm09	1094,1 ± 13,2 e	16,5 ± 1,6 bcd	139,1 ± 2,8 c
Ep10	920,7 ± 29,8 f	12,8 ± 1,1 defg	105,7 ± 5,2 d
Ep11	761,1 ± 37,4 g	6,6 ± 1,9 h	101,2 ± 4,5 d
Tp12	636,2 ± 40,9 h	10,1 ± 1,8 fgh	104,7 ± 4,9 d
Lm13	864,9 ± 18,3 fg	12,0 ± 0,3 efg	111,3 ± 6,1 d
Lm14	1256,1 ± 33,3 bc	9,4 ± 1,0 gh	152,6 ± 4,3 bc
Sbp15	1249,3 ± 24,0 c	17,0 ± 1,4 bcd	171,1 ± 2,2 ab

Los datos representan valores medios ± S.D. de tres determinaciones independientes. Las medias dentro de una columna que comparten la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Tukey (p<0,05).

La actividad antioxidante y el contenido de polifenoles totales se describen en la Tabla 4.4. En la Figura 4.12 se presentan los resultados obtenidos para la actividad antioxidante de las mieles medida por el método ABTS, representada en gráfico de cajas. Se obtuvieron valores altos de actividad antioxidante comprendidos en el rango de 636,2 – 1569,3 μmol TE/100g de miel. Estos resultados son concordantes con los reportados recientemente para mieles de australianas (1360-3072 μmol TE/100g) (Anand et al., 2018) y los obtenidos en otro estudio para mieles de África (536 - 2084

μmol TE/100g) (Serem y Bester, 2012). Sin embargo, estos valores son notoriamente mayores a los resultados comúnmente reportados en mieles, como es el caso de un estudio en mieles de Brasil, que presentaron valores de 70-700 μmol TE/100g (Sant'Ana et al., 2012), otro estudio realizado en mieles checas en el que se obtuvieron valores de 60,12 - 287,55 μmol TE/100g (Vit et al., 2008), o un estudio realizado en mieles de México que presentaron valores 91- 293 μmol TE/100g

(Rodríguez et al., 2012). Lo que sugiere la influencia de las características geográficas y el perfil floral de una zona de forrajeo para las mieles producidas por las abejas de la región.

Se encontraron diferencias significativas que permitieron separar las mieles en 11 grupos diferentes según el test de Tukey. La miel Lm01, monofloral de *Lotus spp*, presentó actividad antioxidante significativamente mayor (1569,3 $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$) respecto de las demás. Por otro lado, la miel Tp12 (polifloral con predominancia de *Trifolium repens* y *Trifolium pratense*) mostró la menor actividad antioxidante (636,2 $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$). Dentro de este rango de valores se encuentra el resto de las mieles que, si bien mostraron resultados cercanos entre sí, fueron significativamente diferentes.

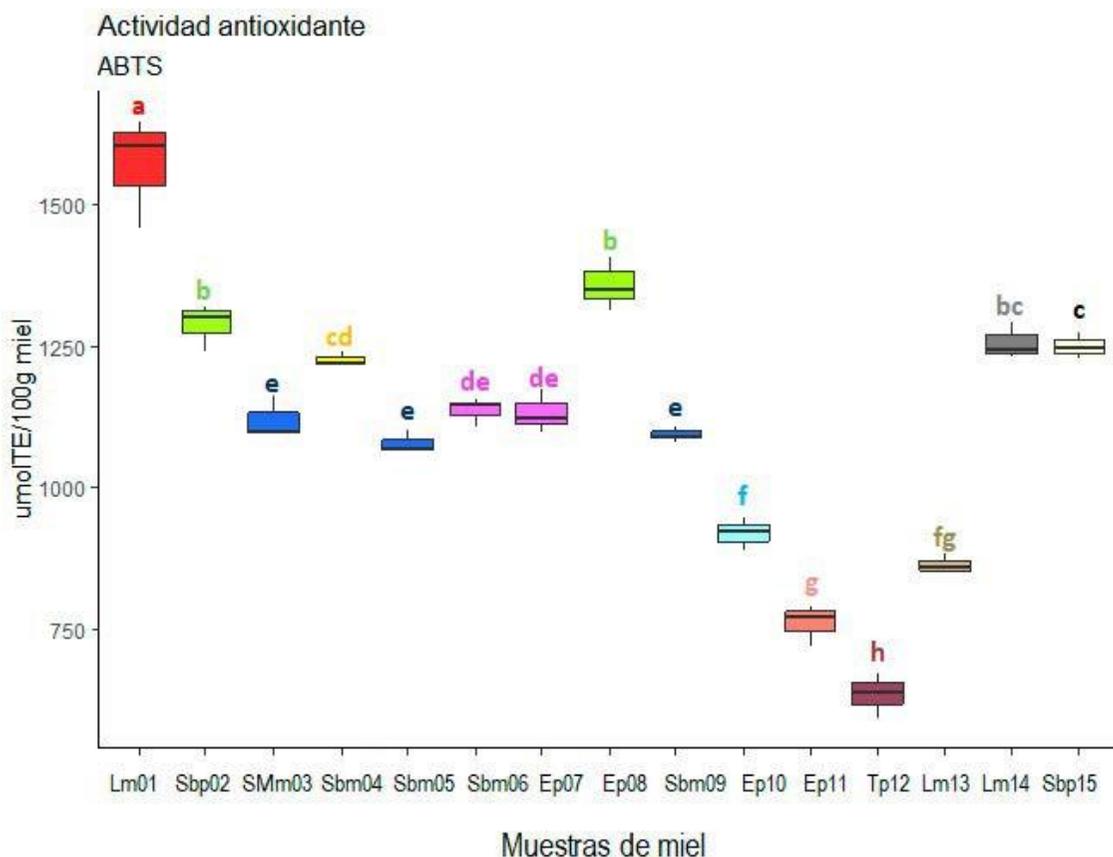


Figura 4.12. Actividad antioxidante de las mieles por método ABTS. Mismo color de las cajas significan resultados similares, colores diferentes significan resultados diferentes, mismas letras indican que esas muestras no presentan diferencias significativas, letras diferentes indican que esas muestras presentan diferencias significativas.

En la Figura 4.13 se observa la capacidad antioxidante de las mieles obtenidas por el método ORAC. Se obtuvieron valores comprendidos en el rango de 6,6 - 21,6 $\mu\text{mol TE}/\text{g}$ los cuales son similares a los obtenidos en estudios para mieles de Rio Grande do Sul (1,28 - 18,48 $\mu\text{mol TE}/\text{g}$)

(Nascimento et al., 2018), o los reportados para mieles de Burkina Faso (2,12 – 21,07 $\mu\text{molTE/g}$) (Beretta et al., 2005). La miel Ep07, polifloral con predominancia de *Eucalyptus*, mostró una capacidad antioxidante significativamente mayor (21,6 $\mu\text{molTE/g}$) respecto de las demás; mientras que la miel Ep11, también polifloral con predominancia de *Eucalyptus*, presentó la menor capacidad antioxidante (6,6 $\mu\text{molTE/g}$) de todas las mieles estudiadas. En este rango de valores se encuentra el resto de las mieles con valores significativamente diferentes pero cercanos entre sí.

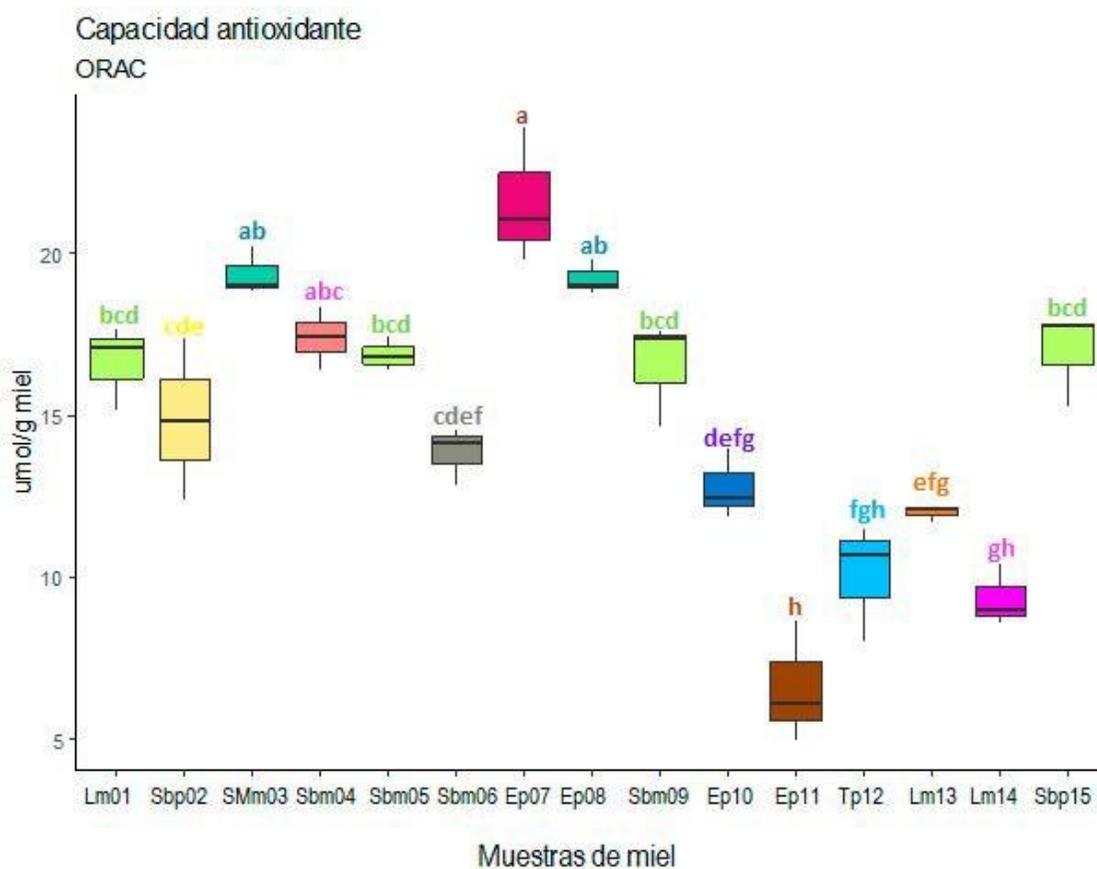


Figura 4.13. Capacidad antioxidante de las mieles por método ORAC

Como se mencionó anteriormente los principios de los ensayos para ABTS y ORAC son distintos ya que cada uno mide aspectos ligeramente diferentes de la actividad antioxidante. Además, los antioxidantes naturales a menudo son multifuncionales y la actividad y el mecanismo que dominan en un sistema de prueba particular dependen de las condiciones de oxidación, que afectan tanto la cinética de la oxidación como la composición del sistema. Por lo que los resultados obtenidos por un método no son necesariamente comparables a los obtenidos por otro método, debido a las condiciones y al tipo de mecanismo de acción, o al límite de detección del ensayo, colorimétrico para ABTS vs. fluorimétrico para ORAC (Frankel y Meyer, 2000). En cualquier caso, resulta importante combinar los resultados obtenidos con los diferentes métodos para tener una

visión más amplia que no deja de ser apenas una aproximación de la actividad antioxidante según el tipo de mecanismo utilizado. De hecho, es imposible medir la actividad antioxidante total usando un solo ensayo. Para dilucidar un perfil completo de actividad antioxidante contra varias especies reactivas de oxígeno / nitrógeno (ROS / RNS), como $O^{\cdot -}$, HO^{\cdot} y NO^{\cdot} , se necesita el desarrollo de diferentes métodos específicos para cada ROS / RNS (Ou et al., 2001).

En el Figura 4.14 se observa el contenido total de polifenoles de las mieles obtenidas por el método Folin Ciocalteu. Se obtuvieron valores comprendidos en el rango de 101,2 - 179,6 mgGAE/100g los cuales son similares a los reportados recientemente para mieles de Omán (162 – 289 mgGAE/100g) (Al-Farsi et al., 2018) o los obtenidos para mieles de Argentina (40,2 – 119,0 mgGAE/100g) (Cabrera et al., 2017), así como los reportados para mieles de Malasia (110 – 196 mgGAE/100g) (Chua et al., 2013). La miel Sbp02, polifloral con predominancia de *Scutia buxifolia*, y la Sbm04, monofloral de *Scutia buxifolia*, mostraron un contenido de polifenoles mayor y significativamente diferente al resto de las mieles, seguido por la miel Sbp15 también polifloral con predominancia de *Scutia buxifolia*.

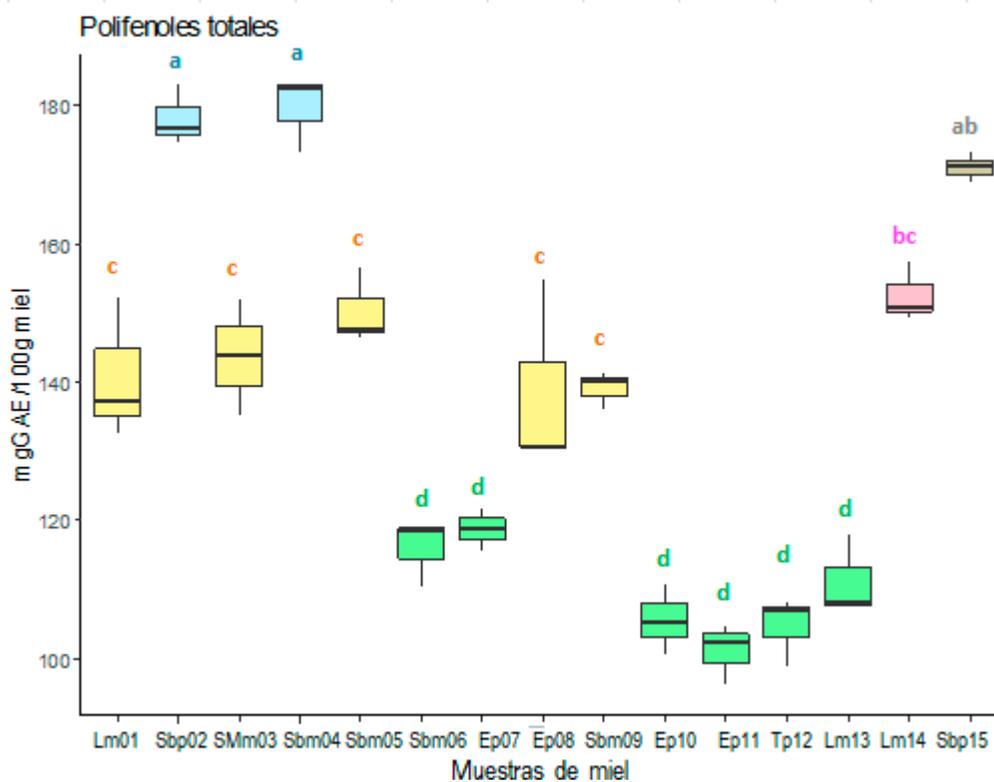


Figura 4.14. Contenido de polifenoles totales por el método Folin Ciocalteu

Mediante el uso del software InfoStat se realizó un análisis de componentes principales, con el fin de estudiar la relación entre los diferentes orígenes florales con el potencial carácter nutricional y algunas propiedades fisicoquímicas (color y conductividad).

En la Figura 4.15 se observa el PCA de los dos primeros componentes que explican el 84,5% de la variabilidad del sistema. En este caso las variables proyectadas fueron la actividad antioxidante por el método ABTS y ORAC, el contenido de polifenoles totales (PT), contenido de metales, color y conductividad.

En el PCA se puede observar una separación clara de las muestras, hacia valores positivos del eje x dentro del círculo rojo se encuentran las mieles de flora nativas, que poseen mayor contenido de PT, valores altos de actividad antioxidante, conductividad eléctrica contenido de metales y colores oscuros. Cerca de estas mieles se ubican las mieles Ep07 y Ep08 poliflorales con predominancia de polen de *Eucalyptus spp.* y polen secundario *Schinus molle* y *Scutia buxifolia*, respectivamente, Estas mieles no nativas presentaron características similares a las mieles nativas como es la capacidad antioxidante ORAC elevada y valores altos de conductividad y contenido de metales. Hacia valores negativos del eje x se distribuyen las mieles no nativas, que en general presentaron valores inferiores de conductividad eléctrica, colores claros, bajo contenido de metales, menor contenido de polifenoles totales y menor actividad antioxidante por ABTS y ORAC. Dentro de las mieles de flora no nativa se agrupan en el círculo verde las mieles monoflares de *Lotus spp.*, dentro de las cuales la Lm01 y Lm14 se diferenciaron un poco de las mieles no nativas al presentar valores de actividad antioxidante por ABTS y contenido de polifenoles totales elevados.

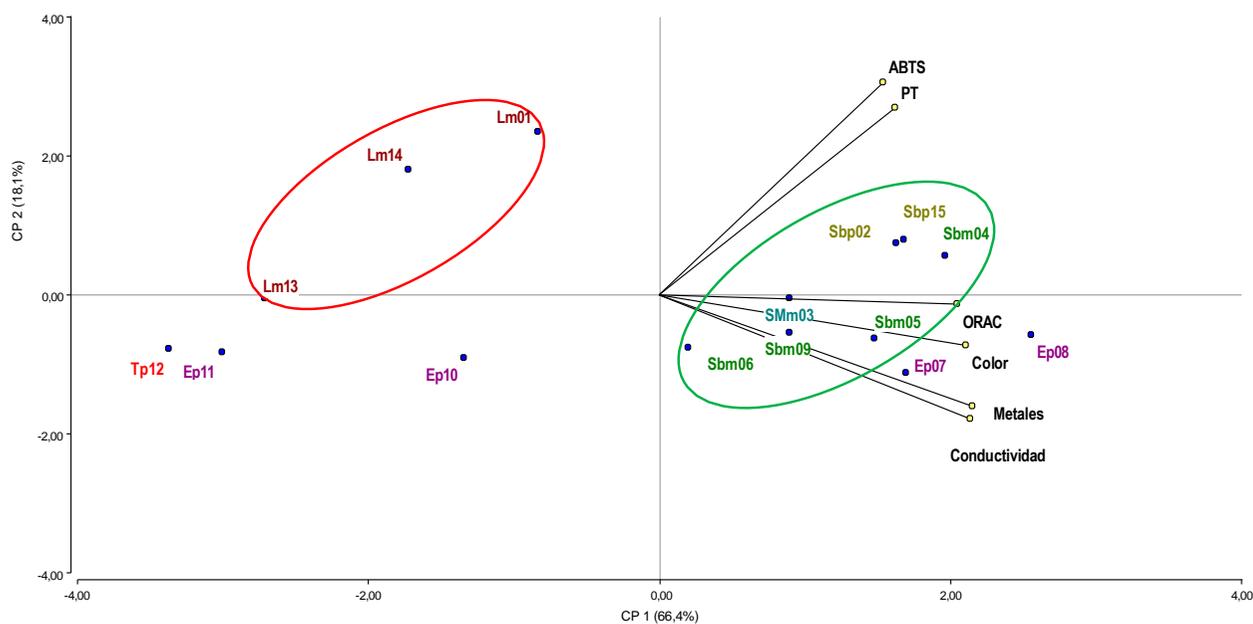


Figura 4.15. Análisis de compuestos principales donde se relacionan la actividad antioxidante mediante ABTS y ORAC, el contenido de polifenoles totales (PT), los parámetros color, metales y conductividad con las muestras estudiadas.

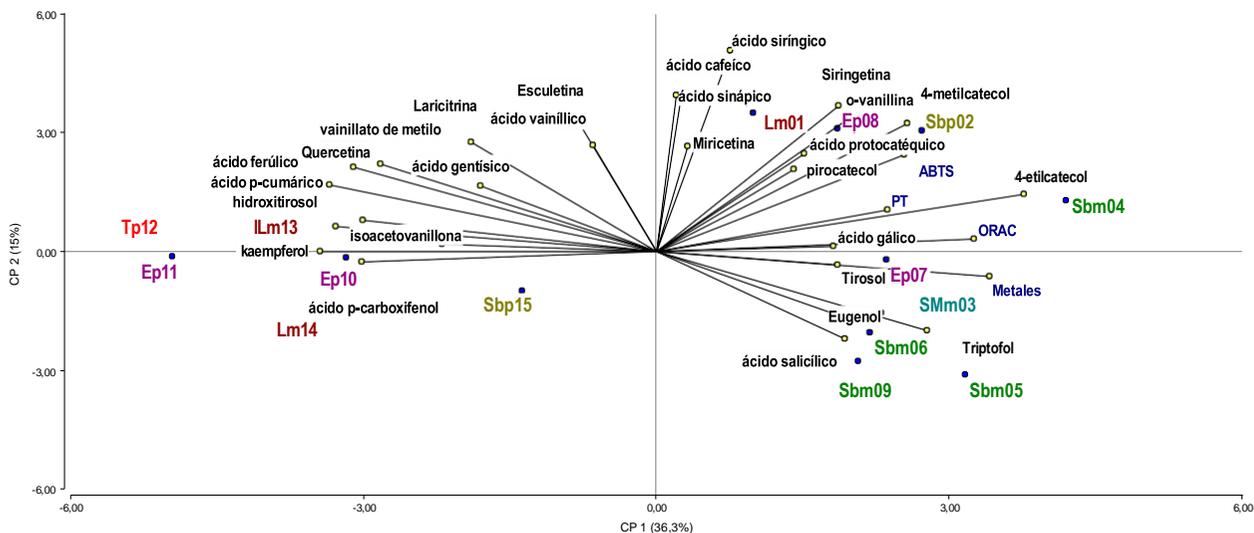


Figura 4.16 Análisis de compuestos principales donde se relacionan los compuestos procesados por la modalidad target con la actividad antioxidante mediante ABTS y ORAC, el contenido de polifenoles totales (PT) y las muestras estudiadas

Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran que es posible diferenciar mieles nativas de no nativas en cuanto a su composición la cual podría tener impacto en la calidad nutricional de las mismas, dado que las mieles nativas analizadas presentaron mayor actividad antioxidante y mayor contenido de polifenoles totales y de metales. Resulta interesante destacar la correlación de las mieles nativas con la actividad antioxidante mediante ORAC, lo que podría sugerir que el mecanismo de acción de los antioxidantes de las mieles nativas se da aparentemente por un mecanismo basado en la transferencia de átomos de hidrogeno entre los antioxidantes de la muestra y los radicales libres. Además, estos resultados confirman lo reportado en la bibliografía acerca de la relación entre ciertas propiedades fisicoquímicas, como es el del color de la miel y su conductividad que sugiere que las mieles oscuras presentan mayor contenido mineral (Pohl, 2009) y mayor contenido de polifenoles y actividad antioxidante (Al-Farsi et al., 2018; Cabrera et al., 2017; Gheldof y Engeseth, 2002).

Con el fin de ilustrar el potencial que guardan las mieles nativas de nuestro país se realizó un análisis de componentes principales (PCA) (Figura 4.16) para analizar la distribución de las muestras a través de las variables proyectadas (en este caso, los polifenoles determinados en modalidad target, Actividad antioxidante ABTS, ORAC, contenido de metales y polifenoles totales (PT)), en este análisis en que dos primeros componentes explican más del 50% de la variabilidad del sistema se observa la separación de las muestras, hacia valores negativos del eje x, se ubican las

mieles no nativas monoflorales de *Lotus spp.* (Lm13, Lm14), polifloral con predominancia de *Trifolium repens* y *Trifolium pratense* (Tp12), poliflorales con mayor predominancia de *Eucalyptus* (Ep10 y Ep11). Mientras que, hacia valores positivos del eje x, se ubicaron las mieles nativas monoflorales de *Scutia buxifolia* (Sbm04, Sbm05, Sbm06, Sbm09), *Schinus molle* (SMm03), polifloral con predominancia de *Scutia buxifolia* (Sbp02). Siendo las mieles nativas las que correlacionan de manera positiva con el contenido de metales, la actividad antioxidante y los polifenoles totales. Evidenciando de esta forma el potencial de las mieles nativas frente a las no nativas ya que posiblemente la presencia de algunos compuestos polifenólicos y contenido de metales contribuyan a la actividad antioxidante de estas mieles. Siendo esto un atributo diferencial para destacar nuestras mieles y promover la producción local.

Como se ha mencionado, la miel es un edulcorante natural utilizado desde hace siglos en la medicina tradicional por sus propiedades terapéuticas. Es decir que, además de su sabor dulce, la miel es también una fuente de polifenoles, minerales y antioxidantes a los que se atribuyen diversos beneficios para la salud. De ahí la importancia de proponer estudiar los polifenoles, el contenido mineral y la actividad antioxidante de la miel. Esto es particularmente relevante para una región como Uruguay, donde por su pequeña extensión, pero gran diversidad en su flora y distribución en la producción de miel es importante verificar si las diferentes variables que pueden influenciar la composición minoritaria de la miel se refleja efectivamente en sus componentes. A su vez, los polifenoles, los minerales y la actividad antioxidante están interrelacionados en la miel, y sus niveles se ven influidos por diversos factores como la fuente floral, la localización geográfica y los métodos de procesado. Por tanto, el contenido en polifenoles, minerales y antioxidantes de la miel está estrechamente relacionado, y cuanto más altos sean los niveles de estos componentes, mayores serán los beneficios potenciales de la miel para la salud.

En resumen, los resultados obtenidos permiten:

- demostrar la utilidad de las herramientas analíticas propuestas para disponer de información detallada acerca de la composición polifenólica y mineral de las mieles estudiadas

- disponer de información que puede ser utilizada como marcadores químicos para los diferentes tipos de mieles

- correlacionar la actividad antioxidante de las mieles en estudio con la presencia de marcadores químicos objetivos y por lo tanto disponer de elementos primarios de calificación acerca del valor nutricional de los diferentes tipos de miel estudiadas.

Bibliografía:

- Al-Farsi, M., Al-Amri, A., Al-Hadhrami, A. & Al-Belushi, S. (2018). Color, flavonoids, phenolics and antioxidants of Omani honey. *Heliyon* 4(10), e00874. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00874>.
- Al-Liviu, M., Daniel, D., Moise, A., Bobis, O., Laslo, L., & Bogdanov, S. (2009). Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chemistry* 112(4), 863–867.
- Alakolanga, A. G.A.W., Siriwardane, A.M.D.A., Savitri Kumar, N., Jayasinghe, L., Jaiswal, R., & Kuhnert, N. (2014). LC-MSn Identification and characterization of the phenolic compounds from the fruits of *Flacourtia indica* (Burm. F.) Merr. and *Flacourtia Inermis* Roxb. *Food Research International* 62, 388–396.
- Alvarez-Suarez, J.M., Tulipani, S., Romandini, S., Bertoli, E., & Battino, M. (2010). Contribution of honey in nutrition and human health, a review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism* 3(1), 15–23.
- Amessis-Ouchemoukh, N., Abu-Reidah, I.M., Quirantes-Piné, R., Rodríguez-Pérez, C., Madani, K., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A. (2014). Tentative Characterisation of iridoids, phenylethanoid glycosides and flavonoid derivatives from *Globularia alypum* L. (Globulariaceae) Leaves by LC-ESI-QTOF-MS. *Phytochemical Analysis* 25(5), 389–98.
- Anand, S., Pang, E., Livanos, G. and Mantri, N. (2018). Characterization of physico-chemical properties and antioxidant capacities of bioactive honey produced from Australian grown *Agastache rugosa* and its correlation with colour and poly-phenol content. *Molecules* 23(1), 108; <https://doi.org/10.3390/molecules23010108>
- Baltrušaityte, V., Venskutonis, P.R., and Čeksteryte, V. (2007). Radical Scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chemistry*, 101(2), 502–514.
- Beelders, T., De Beer, D., Stander, M.A., and Joubert, E. (2014) Comprehensive phenolic profiling of *Cyclopia genistoides* (L.) Vent. by LC-DAD-MS and -MS/MS reveals novel xanthone and benzophenone constituents. *Molecules*, 19(8), 11760-11790.
- Benayad, Z., Gómez-Cordovés, C., and Es-Safi, N.E. (2014) Characterization of Flavonoid glycosides from fenugreek (*Trigonella Foenum-graecum*) crude seeds by HPLC-DAD-ESI/MS Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(11), 20668–20685.
- Beretta, G., Granata, p., Ferrero, M., Orioli, M., Maffei Facino, R. (2005) Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays

and chemometrics, *Analitica Chimica Acta*, 533(2), 185-191.

- Biesaga, M., and Pyrzynska, K. (2009). Liquid chromatography/tandem mass spectrometry studies of the phenolic compounds in Honey. *Journal of Chromatography A* 1216(38), 6620–6626.
- Bravo, M.N., Silva, S., Coelho, A.V., Boas, L.V., Bronze, M.R. (2006). Analysis of phenolic compounds in muscatel wines produced in Portugal. *Analytica Chimica Acta* 563(1-2), 84–92.
- Cabrera Perez, M., Gallez, L., Andrada, A., Balbarrey, G. (2017). Colour, Antioxidant capacity, phenolic and flavonoid content of honey from the humid Chaco region, Argentina. *Phyton* 86, 124–130.
- Can, Z., Yildiz, O., Sahin, H., Akyuz Turumtay, E., Silici, S., Kolayli, S. (2015). An Investigation of Turkish honeys, their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. *Food Chemistry* 180, 133–141.
- Challacombe, C.A., Abdel-Aal, E.S.M., Seetharaman, K., Duizer, L.M. (2012). Influence of phenolic acid content on sensory perception of bread and crackers made from red or white wheat. *Journal of Cereal Science* 56(2), 181–188.
- Chua, L.S., Abdul-Rahaman, N.L., Sarmidi, M.R., and Aziz, R. (2012). Multi-Elemental composition and physical properties of honey samples from Malaysia. *Food Chemistry* 135(3), 880–887.
- Chua, L.S., Rahaman, N.L., Adnan, N.A., and Eddie Tan, T.T. (2013). Antioxidant Activity of Three Honey Samples in Relation with Their Biochemical Components. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*.
- Chudzinska, M., and Baralkiewicz, D. (2011). Application of ICP-MS Method of Determination of 15 Elements in Honey with Chemometric Approach for the Verification of Their Authenticity. *Food and Chemical Toxicology* 49(11), 2741–49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.08.014>.
- Devi, A., Jangir, J., and K.A., A.A. (2018). Chemical Characterization Complemented with Chemometrics for the Botanical Origin Identification of Unifloral and Multifloral Honeys from India. *Food Research International* 107, 216–26. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.017>.
- Lo Dico, G.M., Ulrici, A., Pulvirenti, A., Cammilleri, G., Macaluso, A., Vella, A., Giaccone, V., Lo Cascio, G., Graci, S., Scuto, M., Trovato Salinaro, A., Calabrese, V., Lo Dico, R., Ferrantelli, V. (2019). Multivariate Statistical Analysis of the Polyphenols Content for the Discrimination of Honey Produced in Sicily (Southern Italy). *Journal of Food Composition and Analysis* 82(October 2018), 103225. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.05.008>.
- Dimitrova, B., Gevrenova, R., and Anklam, E. (2007). Analysis of Phenolic Acids in Honeys

of Different Floral Origin by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography. *Phytochemical Analysis* 18(1), 24–32.

- Fabre, N., Rustan, I., De Hoffmann, E., and Quetin-Leclercq, J. (2001). Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. In *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*,.
- Fang, N., Yu, S., and Prior, R.L. (2002). LC/MS/MS Characterization of Phenolic Constituents in Dried Plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(12), 3579–85.
- Fernández-Torres, R., Pérez-Bernal, J.L., Bello-López, M.A., Callejón-Mochón, M., Jiménez-Sánchez, J.C., Guiraúm-Pérez, A. (2005). Mineral Content and Botanical Origin of Spanish Honeys. *Talanta* 65(3), 686–91.
- Ferreres, F., García-Viguera, C., Tomás-Lorente, F., and Tomás-Barberán, F.A. (1993). Hesperetin, A Marker of the Floral Origin of Citrus Honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 61(1), 121–23.
- Frankel, E.N., and Meyer, A.S. (2000). The Problems of Using One-Dimensional Methods to Evaluate Multifunctional Food and Biological Antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80(13), 1925–41.
- Gheldof, N., and Engeseth, N.J. (2002). Antioxidant Capacity of Honeys from Various Floral Sources Based on the Determination of Oxygen Radical Absorbance Capacity and Inhibition of in Vitro Lipoprotein Oxidation in Human Serum Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(10), 3050–55.
- Gil, M.I., Ferreres, F., Ortiz, A., Subra, E., and Tomas-Barberan, F.A. (1995). Plant Phenolic Metabolites and Floral Origin of Rosemary Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43(11), 2833–38.
- Harborne, J.B., and Turner, B.L. (1984). Plant Chemosystematics. *Academic Press, London* 128, 179.
- Hjelmeland, A.K., Zweigenbaum, J., and Ebeler, S.E. (2015). Profiling Monoterpenol Glycoconjugation in *Vitis Vinifera* L. Cv. Muscat of Alexandria Using a Novel Putative Compound Database Approach, High Resolution Mass Spectrometry and Collision Induced Dissociation Fragmentation Analysis. *Analytica Chimica Acta* 887, 138–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.06.026>.
- Hooper, L., Kroon, P.A., Rimm, E.B., Cohn, J.S., Harvey, I., Le Cornu, K.A., Ryder, J.J., Hall, W.L., Cassidy, A. (2008). Flavonoids, Flavonoid-Rich Foods, and Cardiovascular Risk, A Meta-

- Analysis of Randomized Controlled Trials. *American Journal of Clinical Nutrition* 88(1), 38–50.
- Kečkeš, S., Gašić, U., Ćirković Veličković, T., Milojković-Opsenica, D., Natić, M., Tešić, Ž. (2013). The Determination of Phenolic Profiles of Serbian Unifloral honeys Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography/High Resolution Accurate Mass Spectrometry. *Food Chemistry* 138(1), 32–40.
- Koulis, G.A., Tsagkaris, A.S., Aalizadeh, R., Dasenaki, M.E., Panagopoulou, E.I., Drivelos, S., Halagarda, M., Georgiou, C.A., Proestos, C., Thomaidis, N.S. (2021). Honey Phenolic Compound Profiling and Authenticity Assessment Using Hrms Targeted and Untargeted Metabolomics. *Molecules* 26(9), 1–21.
- Lachman, J., Orsák, M., Hejtmánková, A., and Kovářová, E. (2010). Evaluation of Antioxidant Activity and Total Phenolics of Selected Czech honeys. *LWT - Food Science and Technology* 43(1), 52–58.
- Madejczyk, M., and Baralkiewicz, D. (2008). Characterization of Polish Rape and Honeydew Honey According to Their Mineral Contents Using ICP-MS and F-AAS/AES. *Analytica Chimica Acta* 617(1–2), 11–17.
- Martos, I., Ferreres, F., and Tomás-Barberán, F.A. (2000). Identification of Flavonoid Markers for the Botanical Origin of Eucalyptus Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(5), 1498–1502.
- Matej, N., Birghila, S., Dobrinas, S., and Capota, P. (2004). Determination of C Vitamin and Some Essential Trace Elements (Ni, Mn, Fe, Cr) in Bee Products. *Acta Chimica Slovenica* 51(1 SPEC. ISS.), 169–75.
- Mattonai, M., Parri, E., Querci, D., Degano, I., Ribechini, E. (2016). Development and Validation of an HPLC-DAD and HPLC/ESI-MS2 Method for the Determination of Polyphenols in Monofloral honeys from Tuscany (Italy). *Microchemical Journal* 126, 220–29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2015.12.013>.
- Muñoz, O., Copaja, S.V., Speisky, H.C., Peña, R.C., Montenegro, G. (2007). Contenido de Flavonoides y Compuestos Fenólicos de Mielles Chilenas e Índice Antioxidante. *Química Nova* 30(4), 848–51.
- Nascimento do, K.S., Gasparotto Sattler, J.A., Lauer, L., Serna Gonzáles, C.V., Pereira de Melo, I.L., da Silva Araujo, E., Granato, D., Sattler, A., Almeida-Muradian, L. (2018). Phenolic Compounds, Antioxidant Capacity and Physicochemical Properties of Brazilian *Apis Mellifera* honeys. *LWT - Food Science and Technology* 91(January), 85–94.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.016>.

- Nayik, G.A., Suhag, Y., Majid, I., and Nanda, N. (2016). Discrimination of High Altitude Indian Honey by Chemometric Approach According to Their Antioxidant Properties and Macro Minerals. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 17(2), 200–207.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., and Prior, R.L. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(10), 4619–26.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Deemer, E.K. (2002). Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays, A Comparative Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(11), 3122–28.
- Pires, J., Estevinho, M.L., Feás, X., Cantalapiedra, J., and Iglesias, A. (2009). Pollen Spectrum and Physico-Chemical Attributes of Heather (*Erica* Sp.) Honeys of North Portugal. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89(11), 1862–70.
- Pawel, P. (2009). Determination of Metal Content in Honey by Atomic Absorption and Emission Spectrometries. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 28(1), 117–28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.015>.
- Qiu, X., Zhang, J., Huang, Z., Zhu, D., Xu, W. (2013). Profiling of Phenolic Constituents in *Polygonum Multiflorum* Thunb. by Combination of Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography with Linear Ion Trap-Orbitrap Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1292, 121–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.11.051>.
- Quiñones, M., Miguel, M., and Aleixandre, A. (2012). The polyphenols, naturally occurring compounds with beneficial effects on cardiovascular disEASE. *Nutr Hosp.Nutr Hosp* 2727(1), 76–8976.
- Reynolds, S., Fussell, J.R., Kok, A., and Anastassiades, M. (2013). *European Commission Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. SANCO/12571*.
- Rice-Evans, C.A., and Packer, L. (2003). New York, Marcel Dekker. *Flavonoids in Health and Disease*.
- Rodríguez, B.A., Mendoza, S., Iturriga, M.H., and Castaño-Tostado E. (2012). Quality Parameters and Antioxidant and Antibacterial Properties of Some Mexican Honeys. *Journal of Food Science* 77(1).
- Sant’Ana, L.D., Sousa, J.P., Salgueiro F.B., Lorenzon, M.C., Castro, R.N. (2012). Characterization

of Monofloral honeys with Multivariate Analysis of Their Chemical Profile and Antioxidant Activity. *Journal of Food Science* 77(1).

- Santos-Buelga, C., González-Paramás, A. M., & González-Manzano, S. (2023). Phenolic Acids and Derivatives: Description, Sources, Properties, and Applications. In *Natural Secondary Metabolites: From Nature, Through Science, to Industry* (37-72). Cham: Springer International Publishing.
- Santos, F.K.G., Dantas Filho, A.N., Leite, R.H.L., Aroucha, E.M.M., Santos, A.G., Olivera, T.A. (2014). Rheological and Some Physicochemical Characteristics of Selected Floral honeys from Plants of Caatinga. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 86(2), 981–94.
- Serem, J.C., and Bester, M.J. (2012). Physicochemical Properties, Antioxidant Activity and Cellular Protective Effects of honeys from Southern Africa. *Food Chemistry* 133(4), 1544–50.
- Silliman, M.R., Schurch, R., Malone, S., Taylor, S.V, Couvillon, M.J. (2022). Row Crop Fields Provide Mid-Summer Forage for Honey Bees. *Ecology and Evolution* 12(6), 1–13.
- Da Silva, P.M., Gauche, C., Gonzaga, L.V., Costa, A.C., Fett, R. (2016). Honey, Chemical Composition, Stability and Authenticity. *Food Chemistry* 196, 309–23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>.
- Staniškienė, B., Matusevičius, P., and Būdrekiėnė, R. (2006). Honey as an Indicator of Environmental Pollution. *Environmental Research, Engineering & Management* 36(2).
- Terrab, A., González, A., Díez, M.J., and Heredia, F.J. (2003). Mineral Content and Electrical Conductivity of the honeys Produced in Northwest Morocco and Their Contribution to the Characterisation of Unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83(7), 637–43.
- Tomás-Barberán, F.A., Martos, I., Ferreres, F., Radovic, B.S., Anklam, E. (2001). HPLC Flavonoid Profiles as Markers for the Botanical Origin of European Unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81(5), 485–96.
- Trautvetter, S., Koelling-Speer, I., and Speer, K. (2009). Confirmation of Phenolic Acids and Flavonoids in honeys by UPLC-MS. *Apidologie* 40(2), 140–50.
- Truchado, P., Ferreres F., Bortolotti, L., Sabatini, A.G., Tomás-Barberán, F.A. (2008). Nectar Flavonol Rhamnosides Are Floral Markers of Acacia (Robinia Pseudacacia) Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(19), 8815–24.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* 2(12), 1231–46.
- Vit, P., Gutierrez M.G., Titera, D., Bednar, M., Rodríguez-Malaver, A.J. (2008). Mielles Checas Categorizadas Según Su Actividad Antioxidante. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*

42(2), 237–44.

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., and Pérez-Álvarez, J.A. (2008). Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. *Journal of Food Science* 73(9). 117–24.

White, J.W., and Doner, L.W. (1980). Honey Composition and Properties, Beekeeping in the United States. In *Agriculture Handbook* 335, 82–91.

Wolf, S., Schmidt, S., Müller-Hannemann, M., Neumann, S. (2010). In silico fragmentation for computer assisted identification of metabolite mass spectra. *BMC Bioinformatics* 11, 148.

Zedda, M., Zwiener, C. (2012). Is non-target screening of emerging contaminants by LC-HRMS successful? A plea for compound libraries and computer tools. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403, 2493-2502.

Capítulo V

CONCLUSIONES

Quince muestras de miel provenientes de distintas regiones del sureste de Uruguay fueron estudiadas aplicando diferentes enfoques que van desde su composición polínica pasando por la caracterización fisicoquímica hasta su perfil volátil y polifenólico. A partir de los resultados obtenidos se concluye que es posible caracterizar mieles monoflorales producidas a partir de flora nativa del Uruguay y que estas mieles presentan propiedades destacables que permiten verificar su origen y genuinidad.

Por otra parte, este tipo de mieles poseen además cualidades consideradas como criterios de calidad y estabilidad deseables en una miel, como por ejemplo su tendencia a la cristalización lenta y el alto contenido mineral constatado en las mieles monoflorales nativas de *Scutia buxifolia* y *Schinus molle*.

Mediante HS-SPME-GC-MS se lograron identificar y cuantificar un total de 77 compuestos volátiles en las diferentes muestras analizadas. Estos resultados dan una visión de la riqueza y variedad de compuestos presentes en esta matriz tan compleja como es la miel y nos permiten realizar una separación por su origen botánico. Pero para poder postular compuestos que resulten marcador específico de cada tipo de miel, es necesario estudiar con mayor detalle la variabilidad anual asociada a estas mieles y, por lo tanto sería necesario analizar un mayor número de muestras de cada origen polínico.

De las siete muestras evaluadas mediante análisis sensorial obtuvimos información acerca de cuán similares o semejantes se perciben las mismas, además de reunir descriptores asociados a las mismas. Donde las mieles monoflorales nativas *Schinus molle*: SMm03, *Scutia buxifolia*: Sbm04 y la miel polifloral no nativa con predominancia de polen de *Eucalyptus*: Ep07, fueron asociaron a descriptores agradables como “floral”, “miel”, “caramelo”.

El análisis de GC-O de tres muestras seleccionadas en base a los resultados del análisis sensorial y polínico proporcionó información acerca de que compuestos volátiles son sensorialmente activos y cuáles podrían ser responsables de los descriptores aromáticos presentes en las mieles. Se identificaron los compuestos fenilacetaldehído, anisaldehído y bencilacetona como posibles responsables de la percepción similar de las mieles SMm03 y Ep07 por parte de los consumidores. Además, se identificaron algunos compuestos presentes en un solo tipo de miel por lo que podrían ser evaluados en un número mayor de muestras y sumar estos resultados al estudio de su eventual identificación como marcadores florales.

Para la miel monofloral de *Schinus molle* se lograron identificar cinco compuestos que no fueron detectados en las otras dos mieles, donde que cuatro de ellos (nonanoato de metilo (fruta, dulce), (2Z, 6Z)-farnesol (frutal, vainilla), 6-caprolactama (caramelo, dulce) y tricosano (tilo) no se encontraban reportados previamente en la bibliografía.

Mientras que para la miel monofloral de *Scutia buxifolia*, se logró identificar tres compuestos que no fueron detectados en las otras dos mieles ni se encontraron reportados en la bibliografía: 2-octanona (herbal), 3,5,5-trimetil-1,4-ciclohexadiona (rancio, goma)] y el ácido bencenacético (floral, miel, dulce).

Mediante el análisis por HPLC-MS/MS de alta resolución en la modalidad target (modalidad dirigida o diana) fue posible identificar y cuantificar 27 compuestos polifenólicos. Esos compuestos se encontraron en un amplio rango de concentraciones en las mieles estudiadas. Tres compuestos (eugenol, triptofol y ácido salicílico) correlacionaron de forma positiva con un grupo de mieles nativas (Sbm04, Sbm05, Sbm06, Sbm09) lo que podría ser un punto de partida para estudiarlos como posibles marcadores de estas mieles.

Finalmente, el estudio de las propiedades nutraceuticas permitió obtener resultados positivos para las mieles nativas dado que se diferenciaron de las no nativas por presentar mayor actividad antioxidante, mayor contenido de polifenoles totales y metales. Esto resulta de gran interés para que productores puedan enfocarse en la producción de estas mieles revalorizando el producto desde el punto de vista nutricional acentuando a la hora de comercializar las mieles en la importancia de estas propiedades a cuyo consumo se le atribuye diversos beneficios para salud.

En resumen, el estudio de las características químicas y sensoriales de una miel es de suma importancia debido a la gran cantidad de información que se puede relacionar con los diversos beneficios que ofrece. Desde el punto de vista químico, conocer su composición nos permite identificar los compuestos presentes, lo que proporciona información sobre su calidad nutricional y sus propiedades fisicoquímicas. Además, comprender su perfil sensorial, que incluye aroma y sabor, nos permite evaluar su calidad organoléptica y distinguir entre diferentes variedades de miel. Estas características sensoriales también influyen en su aceptabilidad y preferencia por parte de los consumidores. Por lo tanto, el estudio de las características químicas y sensoriales de la miel es esencial para garantizar su autenticidad, calidad y valor comercial, así como para aprovechar al máximo sus beneficios para la salud y su consumo.

Finalmente, es de destacar que el conjunto de componentes presentes en una miel ofrece una diversidad química tal que hace necesaria la aplicación de diferentes enfoques y herramientas analíticas, como las que aquí se han presentado. Lo que implica un trabajo necesariamente interdisciplinario y, por lo tanto, una oportunidad de desarrollo poco frecuente en matrices alimentarias.

ANEXO

Tabla: compuestos volátiles identificados en las muestras de miel estudiadas

Grupo de compuestos	Compuesto	IK	Nomenclatura utilizada
Monoterpenos	β-Pineno	1110	T1
	Mirceno	1235	T3
	Limoneno	1269	T5
	p-Cimeno	1339	T7
	Perilleno	1495	T11
	trans-Oxido de linalol (furanoide)	1516	T12
	cis-Oxido de linalol (furanoide)	1545	T13
	α-Camfolenal	1557	T14
	Aldehído de Lilac A	1612	T16
	Aldehído de Lilac B	1623	T17
	Linalol	1635	T18
	Isoforona	1652	T19
	Aldehído de Lilac C	1655	T20
	p-Ment-1-en-9-al	1679	T23
	Mirtenal	1684	T24
	Hotrienol	1693	T25
	trans-Pinocarveol	1719	T26
	cis-Verbenol	1726	T27
	Carveol	1747	T28
	Verbenona	1758	T29
α-Terpineol	1771	T31	
Sesquiterpenos	Espatulanol	2180	S9
	β-Eudesmol	2281	S10
Compuestos carbonílicos	Aldehído de Lilac D	1786	T32
	p-Menta-1,5-dien-8-ol	1801	T33
	trans-Oxido de linalol (piranoide)	1810	T35
	cis-Oxido de linalol (piranoide)	1840	T37
	Neril acetona	1927	T41
	(E)-8-Hidroxilinalol	2212	T43
	(Z)-8-Hidroxilinalol	2383	T45
	Octanal	1367	CC6
	Hidroxiacetona	1376	CC7
	3-Hidroxi-2-pentanona	1411	CC8
	Nonanal	1471	CC11
	Oct-(2E)-enal	1503	CC12
	3-hidroxi-4-fenil-2-butanona	2310	CC15

Grupo de compuestos	Compuesto	IK	Nomenclatura utilizada
Alcoholes	3-metil-1-butanol	1295	AL1
	2-Heptanol	1407	AL2
	2,3-Butanodiol	1662	AL8
	Nonanol	1744	AL9
Esteres	Nonanoato de metilo	1573	E3
	Decanoato de metilo	1675	E4
	2,8-Nonadienoato de metilo	1738	E5
	Dodecanoato de metilo	1880	E6
	Hexadecanoato de metilo	2294	E7
	Linolenato de metilo	2626	E9
Furanos y piranos	5-Metil furfural	1648	PIF2
	2-Furanmetanol	1742	PIF3
	2,3-Dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona	2322	PIF5
	Hidroxi methyl furfural	2564	PIF6
	Dihidro-4-hidroxi-2(3H)-furanona	2654	PIF7
Compuestos fenólicos	Benzaldehído	1590	CF1
	Safranal	1704	CF3
	Bencenacetaldehído	1707	CF4
	Acetofenona	1714	CF5
	Acetato de metilbenceno	1826	CF7
	Hidroxicinamato de metilo	1907	CF10
	Alcohol bencílico	1945	CF11
	Alcohol 2-feniletílico	1976	CF12
	p-Anisaldehído	2082	CF14
	(E)-Cinamaldehído	2101	CF15
	Eugenol	2228	CF19
	Metil 4-metoxifenilacetato	2245	CF20
Lactonas	2-Hidroxi- γ -butirolactona	2230	L3
	Massoilactona	2285	L4
Ácidos grasos	Ácido 2-metilbutanoico	1752	AG1
	Ácido heptanoico	1931	AG2
	Ácido octanoico	2142	AG3
	Ácido nonanoico	2247	AG4
	Ácido decanoico	2351	AG5
Compuestos indólicos	3-Metil 1H-indol	2536	I2
Otros	Oxophorone	1755	O2
	(Z)-Jasmona	1999	O3