



ESTUDIO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS NO AROMÁTICOS EN LA MIEL

INÉS MATO NAVEIRA

FEBRERO, 2004





FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Analítica,
Nutrición y Bromatología
Área de Nutrición y Bromatología

ESTUDIO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS NO AROMÁTICOS EN LA MIEL

INÉS MATO NAVEIRA

FEBRERO, 2004

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

AREA DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA



**ESTUDIO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS
NO AROMÁTICOS EN LA MIEL**

INÉS MATO NAVEIRA

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor

Universidad de Santiago de Compostela, febrero de 2004

Dña. **PILAR BERMEJO BARRERA**, Catedrática de Universidad y Directora del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela.

INFORMA que Dña. *INÉS MATO NAVEIRA* presenta el trabajo titulado "**Estudio de los ácidos orgánicos no aromáticos en la miel**" realizado bajo la dirección del Profesor Titular de Universidad D. José Francisco Huidobro Canales, del Catedrático de Universidad D. Jesús Simal Lozano y de la Profesora Titular de Universidad Dña. María Teresa Sancho Ortiz, en el Área de Nutrición y Bromatología del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que conste, firmo el presente informe en Santiago de Compostela, febrero de 2004.

Fdo.: **Dra. Dña. Pilar Bermejo Barrera**

D. JOSÉ FRANCISCO HUIDOBRO CANALES, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela, **D. JESÚS SIMAL LOZANO**, Catedrático de Universidad del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela y **DÑA. MARÍA TERESA SANCHO ORTIZ**, Profesora Titular de Universidad del Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Burgos,

AUTORIZAN a Dña. *INÉS MATO NAVEIRA* a presentar la memoria titulada "**Estudio de los ácidos orgánicos no aromáticos en la miel**" para optar al Grado de Doctor, la cual ha sido realizada bajo nuestra dirección en el laboratorio del Área de Nutrición y Bromatología del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que conste, se expide la presente en Santiago de Compostela, febrero de 2004.

Fdo.: **Dr. D. José Francisco Huidobro Canales**

Fdo.: **Dr. D. Jesús Simal Lozano**

Fdo.: **Dra. Dña. María Teresa Sancho Ortiz**



A mis padres y a Alfonso



AGRADECIMIENTOS

Si difícil ha sido condensar todo el estudio y trabajo realizado a lo largo de estos años, no menos complicado se hace el reflejar en unas cuantas líneas el agradecimiento que siento a toda la gente que me ha ayudado con sus consejos, orientaciones, colaboraciones, ánimos, etc. Esta Tesis Doctoral no sólo me ha formado como investigadora sino que a la vez, y tan o más importante, me ha ayudado a crecer como persona.

En primer lugar, comenzaré por expresar mi agradecimiento a los Directores de este trabajo, Prof. Dr. José Francisco Huidobro Canales, Prof. Dr. Jesús Simal Lozano y Profa. Dra. María Teresa Sancho Ortiz por las orientaciones científicas y por el apoyo que me han demostrado a lo largo de estos años. Especialmente quiero agradecer al Prof. Dr. José Francisco Huidobro Canales su paciencia, comprensión y constante dedicación durante la realización y escritura de este trabajo.

A todos los profesores del Área de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia, por su interés en el desarrollo de esta Tesis y, en especial, al Prof. Dr. José María Creus Vidal por tener la palabra de aliento adecuada en cada momento y por arrancarme siempre una sonrisa.

Al Prof. Dr. Rafael Cela Torrijos del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Facultad de Química porque, gracias a sus explicaciones, el tratamiento estadístico de los resultados parece sencillo.

Al Prof. Dr. Juan Carlos García Monteagudo del Departamento de Química Física de la Facultad de Farmacia por su colaboración en la resolución de algunos problemas informáticos y por sus valiosas orientaciones científicas.

A los Prof. Dr. Arturo Suárez Varela del Departamento de Química Física, Prof. Dr. José Sordo Rodríguez y Prof. Dr. Alfonso Castiñeiras Campos del Departamento de Química Inorgánica, Prof. Dr. Óscar García Martín y Prof. Dr. José Luis Sánchez López del Departamento de Bioquímica, todos ellos de la Facultad de Farmacia, por la ayuda material prestada en diferentes momentos de este trabajo.

Al Prof. Dr. Jesús Simal Gándara de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Vigo por estar siempre dispuesto a resolver cualquier duda que se plantease y por su constante ánimo para que continúe en el campo de la investigación.

A Rosa María Brunet de la empresa Waters Cromatografía S.A., por todo el apoyo recibido en el desarrollo de la electroforesis capilar ya que consiguió que los problemas que surgían tuvieran siempre solución.

A la Consellería de Educación e Ordenación Universitaria de la Xunta de Galicia y al Ministerio de Educación y Ciencia, por las becas de Tercer Ciclo y Predoctoral (1995-1997) y de Formación del Profesorado Universitario (FPU) (1998-2001), respectivamente, que me han permitido realizar este trabajo.

A la Consellería de Educación e Ordenación Universitaria y a la Secretaría Xeral de Investigación e Desenvolvemento de la Xunta de Galicia por la concesión de los proyectos *XUGA 20308B96* (1996-1998) y *PGIDT99PXI20307B* (1999-2001), respectivamente, los cuales han permitido financiar este estudio.

A los presidentes de la Asociación Galega de Apicultores (AGA), D. Abel Yáñez Armesto y D. José Manuel Durán Orus, a D. Xesús María Asorey Martínez, entonces presidente del Consello Regulador “Denominación Específica –Mel de Galicia” y a los envasadores “Producto Galego de Calidade-Mel de Galicia” por su interés en las investigaciones realizadas y por facilitarnos las muestras de Galicia con Denominación “Producto Galego de Calidade-Mel de Galicia”.

A lo largo de este tiempo, muchas han sido las compañeras del grupo de la miel con las que he compartido momentos de complicidad y de amistad. Ana, Sandra, Mercedes y, sobre todo, M^a Pilar, Verónica, Silvia, Cristina y Gloria han hecho que la investigación fuese mucho más, el ánimo en los malos momentos y las risas en los buenos, es algo que jamás olvidaré. Especialmente me gustaría agradecer a Silvia su colaboración, ayuda y apoyo incondicional durante estos años.

A mis amigos, en especial, a Dolores y a Yasmin por saber escuchar en todos aquellos momentos en los que lo he necesitado. Gracias a ellas he descubierto que la palabra amistad se escribe con mayúsculas.

A mi familia por estar siempre a mi lado.

A mis padres, a los que no puedo expresar con palabras todo el agradecimiento que siento. A ellos les debo que hoy me encuentre aquí, ellos fueron los que me animaron a iniciarme en el campo de la investigación y sus palabras de ánimo no decayeron en ningún momento. Gracias por vuestra ayuda, por vuestro apoyo y por los buenos consejos que tanto bien me han hecho pero, sobre todo, gracias porque durante todos estos años me habéis demostrado que vuestro cariño es ilimitado.

A Alfonso porque durante este tiempo ha demostrado que la paciencia es una de sus virtudes. Con su optimismo y su comprensión he conseguido que aquello que parecía difícil se transformase en fácil. Gracias por ser como eres y, sobre todo, por compartir tu vida conmigo.

Por último, a todas aquellas personas que, directa o indirectamente, en algún instante de mi vida me han ayudado a conseguir este objetivo.

A todos y a todas, por fin, os puedo decir **MUCHAS GRACIAS**.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS _____ **XI**

ÍNDICE DE TABLAS _____ **XV**

ÍNDICE DE FIGURAS _____ **XXIII**

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. La miel	3
1.1.1. Definición	3
1.1.2. Tipos	3
1.1.3. Origen	5
1.1.3.1. Fuentes	5
1.1.3.1.1. Néctar	5
1.1.3.1.2. Mielato	6
1.1.3.2. Transformación del néctar y/o mielato en miel	7
1.1.4. Etapas en el procesado de la miel	8
1.1.4.1. Castra	10
1.1.4.2. Desoperculación	10
1.1.4.3. Extracción	10
1.1.4.4. Filtración	11
1.1.4.5. Decantación	11
1.1.4.6. Envasado	11
1.1.5. Estado actual de la Apicultura	12
1.1.5.1. España	12
1.1.5.2. Galicia	13
1.1.6. Composición química	16
1.1.7. Factores esenciales de composición y calidad	19
1.1.8. Alteraciones biológicas: fermentación	21

1.2.	Características organolépticas y parámetros físico químicos relacionados con los ácidos orgánicos	22
1.2.1.	Características organolépticas	22
1.2.1.1.	Color	22
1.2.1.2.	Aroma y sabor	22
1.2.2.	Parámetros físico químicos	22
1.2.2.1.	Conductividad eléctrica	22
1.2.2.2.	pH	23
1.2.2.3.	Acidez	23
1.3.	Ácidos orgánicos en la miel	24
1.4.	Referencias bibliográficas	26
2.	OBJETO DEL TRABAJO	29
3.	MUESTRAS	33
3.1.	Origen geográfico y botánico de las muestras	35
3.1.1.	Mieles de Galicia con Denominación	35
3.1.2.	Mieles procedentes de otras zonas de España	39
3.2.	Conservación y almacenamiento de las muestras	41
3.3.	Toma de muestra	41
3.3.1.	Homogenización	41
3.3.2.	Licuación	41
3.3.3.	Limpieza	42
3.4.	Referencias bibliográficas	43
4.	PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS RELACIONADOS CON LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS	45
4.1.	Conductividad eléctrica	47
4.1.1.	Introducción	47
4.1.2.	Antecedentes bibliográficos	48
4.1.3.	Parte experimental	49
4.1.3.1.	Fundamento	49
4.1.3.2.	Material y aparatos	49

4.1.3.3.	Reactivos.....	49
4.1.3.4.	Procedimiento.....	50
4.1.3.5.	Cálculos y expresión de resultados.....	50
4.1.3.6.	Precisión.....	50
4.1.4.	Resultados y Discusión.....	50
4.1.4.1.	Mieles de Galicia con Denominación.....	50
4.1.4.1.1.	Influencia de la provincia de procedencia del envasador en la conductividad eléctrica.....	52
4.1.4.1.2.	Influencia del espectro polínico en la conductividad eléctrica.....	53
4.1.4.2.	Mieles procedentes de otras zonas de España.....	55
4.2.	pH y tipos de acidez.....	58
4.2.1.	Introducción.....	58
4.2.2.	Antecedentes bibliográficos.....	60
4.2.3.	Parte experimental.....	61
4.2.3.1.	Fundamento.....	61
4.2.3.2.	Material y aparatos.....	61
4.2.3.3.	Reactivos.....	61
4.2.3.4.	Procedimiento.....	62
4.2.3.5.	Cálculos y expresión de resultados.....	62
4.2.3.6.	Precisión.....	62
4.2.4.	Resultados y Discusión.....	63
4.2.4.1.	Mieles de Galicia con Denominación.....	63
4.2.4.1.1.	Influencia de la provincia de procedencia del envasador en el pH y los tipos de acidez.....	66
4.2.4.1.2.	Influencia del espectro polínico en el pH y los tipos de acidez.....	69
4.2.4.2.	Mieles procedentes de otras zonas de España.....	72
4.3.	Referencias bibliográficas.....	77
5.	DETERMINACIÓN DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS NO AROMÁTICOS	83
5.1.	Introducción.....	85
5.1.1.	Importancia de los ácidos orgánicos en la miel.....	85
5.1.1.1.	Actividad antibacteriana.....	85
5.1.1.2.	Actividad antioxidante.....	86

5.1.1.3.	Indicadores de fermentación.....	87
5.1.1.4.	Tratamiento contra la varroasis.....	87
5.1.1.4.1.	Ácido fórmico.....	87
5.1.1.4.2.	Ácido láctico.....	88
5.1.1.4.3.	Ácido oxálico.....	89
5.1.1.5.	Factores discriminantes del origen botánico y/o geográfico.....	89
5.1.2.	Características de los ácidos orgánicos de la miel determinados en este trabajo.....	91
5.2.	Antecedentes bibliográficos.....	92
5.2.1.	Métodos enzimáticos.....	92
5.2.2.	Métodos cromatográficos.....	94
5.2.2.1.	Cromatografía gaseosa (GC).....	95
5.2.2.2.	Cromatografía líquida (HPLC, IC).....	95
5.2.3.	Métodos electroforéticos.....	98
5.3.	Métodos enzimáticos.....	102
5.3.1.	Parte experimental.....	103
5.3.1.1.	Ácido D-glucónico total.....	103
5.3.1.1.1.	Fundamento.....	103
5.3.1.1.2.	Material y aparatos.....	103
5.3.1.1.3.	Reactivos.....	104
5.3.1.1.4.	Procedimiento.....	104
5.3.1.1.4.1.	Preparación de la disolución de miel.....	104
5.3.1.1.4.2.	Medida espectrofotométrica.....	105
5.3.1.1.5.	Cálculos y expresión de resultados.....	105
5.3.1.1.6.	Límite de detección.....	107
5.3.1.1.7.	Precisión.....	107
5.3.1.1.8.	Recuperación.....	107
5.3.1.1.9.	Especificidad.....	107
5.3.1.2.	Ácido cítrico.....	107
5.3.1.2.1.	Fundamento.....	107
5.3.1.2.2.	Material y aparatos.....	108

5.3.1.2.3.	Reactivos.....	108
5.3.1.2.4.	Procedimiento.....	109
5.3.1.2.4.1.	Preparación de la disolución de miel.....	109
5.3.1.2.4.2.	Medida espectrofotométrica.....	109
5.3.1.2.5.	Cálculos y expresión de resultados.....	111
5.3.1.2.6.	Límite de detección.....	111
5.3.1.2.7.	Precisión.....	111
5.3.1.2.8.	Recuperación.....	112
5.3.1.2.9.	Especificidad.....	112
5.3.1.3.	Ácido L-málico.....	112
5.3.1.3.1.	Fundamento.....	112
5.3.1.3.2.	Material y aparatos.....	113
5.3.1.3.3.	Reactivos.....	113
5.3.1.3.4.	Procedimiento.....	113
5.3.1.3.4.1.	Preparación de la disolución de miel.....	113
5.3.1.3.4.2.	Medida espectrofotométrica.....	114
5.3.1.3.5.	Cálculos y expresión de resultados.....	116
5.3.1.3.6.	Límite de detección.....	116
5.3.1.3.7.	Precisión.....	116
5.3.1.3.8.	Recuperación.....	117
5.3.1.3.9.	Especificidad.....	117
5.3.2.	Resultados y discusión.....	117
5.3.2.1.	Mieles de Galicia con Denominación.....	117
5.3.2.1.1.	Influencia de la provincia de procedencia del envasador en el contenido de los ácidos orgánicos determinados por el método enzimático.....	120
5.3.2.1.2.	Influencia del espectro polínico en el contenido de los ácidos orgánicos determinados por el método enzimático.....	122
5.3.2.2.	Mieles procedentes de otras zonas de España.....	126
5.4.	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	131
5.4.1.	Parte experimental.....	131
5.4.1.1.	Material y aparatos.....	131

5.4.1.2.	Reactivos.....	132
5.4.1.3.	Procedimiento.....	132
5.4.1.3.1.	Preparación de las disoluciones de los patrones.....	132
5.4.1.3.2.	Preparación de la disolución de miel.....	132
5.4.1.3.3.	Condiciones cromatográficas.....	133
5.4.2.	Resultados y discusión.....	133
5.4.2.1.	Puesta a punto del método.....	133
5.4.2.1.1.	Resultados.....	133
5.4.2.1.1.1.	Límites de detección y cuantificación.....	134
5.4.2.1.1.2.	Rectas de calibrado.....	135
5.4.2.1.1.3.	Precisión.....	135
5.4.2.1.1.3.1.	Repetibilidad.....	136
5.4.2.1.1.3.2.	Reproducibilidad.....	136
5.4.2.1.1.4.	Recuperación.....	137
5.4.2.1.2.	Discusión.....	138
5.4.2.1.2.1.	Condiciones cromatográficas.....	139
5.4.2.1.2.1.1.	Influencia del tipo de columna.....	139
5.4.2.1.2.1.2.	Influencia de la temperatura de la columna.....	139
5.4.2.1.2.1.3.	Influencia de la fase móvil.....	139
5.4.2.1.2.2.	Preparación de la muestra.....	140
5.4.2.1.2.2.1.	Procedimiento de extracción en fase sólida.....	140
5.4.2.2.	Muestras.....	144
5.4.2.2.1.	Mieles de Galicia con Denominación.....	144
5.4.2.2.1.1.	Influencia de la provincia de procedencia del envasador en el contenido de los ácidos orgánicos determinados por HPLC.....	147
5.4.2.2.1.2.	Influencia del espectro polínico en el contenido de los ácidos orgánicos determinados por HPLC.....	150
5.4.2.2.2.	Mieles procedentes de otras zonas de España.....	155
5.5.	Electroforesis capilar (CE).....	162
5.5.1.	Parte experimental.....	164
5.5.1.1.	Fundamento.....	164

5.5.1.2.	Material y aparatos.....	167
5.5.1.3.	Reactivos.....	168
5.5.1.4.	Procedimiento.....	168
5.5.1.4.1.	Preparación de las disoluciones de los patrones.....	168
5.5.1.4.2.	Preparación de la disolución de miel.....	169
5.5.1.4.3.	Condiciones electroforéticas.....	169
5.5.1.4.3.1.	Preparación del electrolito.....	169
5.5.1.4.3.2.	Acondicionamiento del capilar.....	170
5.5.1.4.3.3.	Condiciones de separación.....	170
5.5.2.	Resultados y discusión.....	171
5.5.2.1.	Puesta a punto del método.....	171
5.5.2.1.1.	Resultados.....	171
5.5.2.1.1.1.	Límites de detección y cuantificación.....	173
5.5.2.1.1.2.	Rectas de calibrado.....	174
5.5.2.1.1.3.	Precisión.....	175
5.5.2.1.1.3.1.	Repetibilidad.....	175
5.5.2.1.1.3.2.	Reproducibilidad.....	175
5.5.2.1.1.4.	Recuperación.....	176
5.5.2.1.2.	Discusión.....	177
5.5.2.1.2.1.	Condiciones electroforéticas.....	179
5.5.2.1.2.1.1.	Elección del electrolito.....	179
5.5.2.1.2.1.2.	Influencia del pH del electrolito.....	181
5.5.2.1.2.1.3.	Influencia de la concentración del modificador del flujo electroosmótico.....	182
5.5.2.1.2.1.4.	Influencia de la concentración de iones Ca^{2+}	184
5.5.2.1.2.1.5.	Influencia de la temperatura.....	186
5.5.2.1.2.1.6.	Influencia del voltaje.....	188
5.5.2.1.2.2.	Preparación de la muestra.....	189
5.5.2.2.	Muestras.....	190
5.5.2.2.1.	Mieles de Galicia con Denominación.....	190

5.5.2.2.1.1.	Influencia de la provincia de procedencia del envasador en el contenido de los ácidos orgánicos determinados por electroforesis capilar (CE).....	194
5.5.2.2.1.2.	Influencia del espectro polínico en el contenido de los ácidos orgánicos determinados por electroforesis capilar (CE).....	197
5.5.2.2.2.	Mieles procedentes de otras zonas de España.....	203
5.6.	Referencias bibliográficas.....	212
6.	<u>EFFECTO DEL ALMACENAMIENTO SOBRE LOS PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS Y SOBRE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS</u>	227
6.1.	Introducción.....	229
6.2.	Parámetros físico químicos relacionados con los ácidos orgánicos.....	230
6.2.1.	Conductividad eléctrica.....	230
6.2.1.1.	Antecedentes bibliográficos.....	230
6.2.1.2.	Parte experimental.....	230
6.2.1.3.	Resultados y discusión.....	230
6.2.2.	pH y tipos de acidez.....	233
6.2.2.1.	Antecedentes bibliográficos.....	233
6.2.2.2.	Parte experimental.....	236
6.2.2.3.	Resultados y discusión.....	236
6.2.2.3.1.	Predicción del pH y los tipos de acidez con el tiempo.....	246
6.2.2.3.2.	Influencia de los valores iniciales de pH y de los tipos de acidez en su evolución durante el almacenamiento.....	256
6.2.2.3.3.	Fecha de consumo preferente para la miel según la acidez libre.....	258
6.3.	Ácidos orgánicos.....	259
6.3.1.	Antecedentes bibliográficos.....	259
6.3.2.	Parte experimental.....	259
6.3.3.	Resultados y discusión.....	260
6.3.3.1.	Predicción del contenido de los ácidos D-glucónico total, cítrico y L-málico con el tiempo.....	268
6.3.3.2.	Influencia del contenido inicial de los ácidos D-glucónico total, cítrico y L-málico en su evolución durante el almacenamiento.....	276
6.4.	Referencias bibliográficas.....	278

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	281
7.1. Comparación de métodos	283
7.1.1. Ácido glucónico	283
7.1.2. Ácido cítrico	286
7.1.3. Ácido málico	290
7.1.4. Ácido succínico	294
7.2. Relaciones entre los parámetros analizados	295
7.2.1. Relaciones entre los parámetros físico químicos	295
7.2.2. Relaciones entre los parámetros físico químicos y los ácidos orgánicos no aromáticos	298
7.2.3. Relaciones entre los ácidos orgánicos	304
7.3. Análisis multivariante	307
7.3.1. Introducción	307
7.3.1.1. Técnicas de clasificación	307
7.3.1.1.1. Análisis no supervisado: Técnicas cluster	307
7.3.1.1.2. Análisis supervisado	307
7.3.1.2. Técnicas de reducción de datos	308
7.3.2. Antecedentes bibliográficos	308
7.3.3. Parte experimental	310
7.3.4. Resultados y discusión	312
7.3.4.1. Diferenciación de las mieles de Galicia con Denominación según la provincia de procedencia del envasador	312
7.3.4.1.1. Análisis cluster aglomerativo	312
7.3.4.1.2. Análisis de componentes principales	313
7.3.4.1.3. Método de los K vecinos más próximos	317
7.3.4.2. Diferenciación de las mieles de Galicia con Denominación según el espectro polínico	317
7.3.4.2.1. Análisis cluster aglomerativo	317
7.3.4.2.2. Análisis de componentes principales	319
7.3.4.2.3. Método de los K vecinos más próximos	321
7.3.4.3. Diferenciación entre las mieles de Galicia con Denominación y las Procedentes de otras zonas de España	321

7.3.4.3.1. Análisis cluster aglomerativo.....	321
7.3.4.3.2. Análisis de componentes principales.....	323
7.3.4.3.3. Método de los K vecinos más próximos.....	327
7.4. Referencias bibliográficas.....	328
8. CONCLUSIONES.....	333
ANEXO. RELACIÓN DE PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS.....	343



ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACS	American Chemical Society
ADP	Adenosina-5'-difosfato
AGA	Asociación Galega de Apicultura
ANOVA	Análisis de la varianza
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
Art.	Artículo
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
BOE	Boletín Oficial del Estado
CAS	Chemical Abstracts Service
Cat.	Catálogo
CE	Capillary Electrophoresis (Electroforesis capilar)
CEC	Capillary Electrochromatography (Electrocromatografía capilar)
CEE	Comunidad Económica Europea
CGE	Capillary Gel Electrophoresis (Electroforesis capilar en gel)
CIA	Capillary Ion Analyzer
CIEF	Capillary Isoelectric Focusing (Isoelectroenfoque capilar)
CITP	Capillary Isotachopheresis (Isotacoforesis capilar)
CL	Citrato liasa
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
CTAOH	Hidróxido de cetiltrimetilamonio
CZE	Capillary Zone Electrophoresis (Electroforesis capilar en zona)
d	Paso de luz
DOCE	Diario Oficial de las Comunidades Europeas
DOCM	Diario Oficial de Castilla-La Mancha
DOE	Diario Oficial de Extremadura
DOG	Diario Oficial de Galicia
DTAOH	Hidróxido de dodeciltrimetilamonio
e	Coefficiente de extinción molar
Ed.	Editorial
EOF	Electroosmotic Flow (Flujo electroosmótico)
et al.	<i>et alii</i> (y otros)
FAO	Food and Agriculture Organization (Organización de los alimentos y de la agricultura)
GC	Gas Chromatography (Cromatografía gaseosa)

GntK	Gluconato quinasa
GOT	Glutamato oxalacetato transaminasa
HMF	Hidroximetilfurfural
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta resolución)
IC	Ionic Chromatography (Cromatografía iónica)
ID	Internal Diameter (Diámetro interno)
ISO	International Organization for Standarization
L.	Linneo
L-LDH	L-lactato deshidrogenasa
L-MDH	L-malato deshidrogenasa
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
M	Molar
mM	Milimolar
MAPA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
MECC o MEKC	Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography (Cromatografía capilar electrocinética micelar)
meq	Miliequivalente
min.	Minuto
MS	Mass Spectrometry (Espectrometría de masas)
MTAB	Bromuro de miristiltrimetilamonio
N	Número de muestras
N	Normalidad
Nº	Número
NAD	Dinucleótido de adenina y nicotinamida
NADH	Dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido
NADP	Dinucleótido de adenina y nicotinamida fosfato
NADPH	Dinucleótido de adenina y nicotinamida fosfato reducido
NC	No cuantificable
ND	No detectable
P	Peso en gramos de muestra
p.a.	para analisis
p/v	peso/volumen
PAB	p-Aminobenzoico
PDC	Ácido 2,6-piridinodicarboxílico

6-PGDH	6-Fosfogluconato deshidrogenasa
PM	Peso molecular
PMA	Ácido piromelítico
ppm	Parte por millón
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
q/r	Carga/radio
r	Coeficiente de correlación
rpm	Revoluciones por minuto
RSD%	Relative Standard Deviation (Desviación estándar relativa, en tanto por ciento)
sp.	Especie
SPE	Solid Phase Extraction (Extracción en fase sólida)
SPME	Solid Phase Micro Extraction (Microextracción en fase sólida)
T^a	Temperatura
tm	Tiempo de migración
TMA	Ácido trimelítico
TMS	Trimetilsilil
TRIS	tris[hidroximetil]aminometano
TTAB	Bromuro de tetradeciltrimetilamonio
TTAOH	Hidróxido de tetradeciltrimetilamonio
U	Unidad de actividad enzimática
UV	Ultravioleta
vis	Visible
V_{máx}	Valor máximo
V_{mín}	Valor mínimo

No se incluyen las abreviaturas correspondientes al Sistema Internacional de Unidades (Decreto 1257/74, de 25 de abril de 1974, publicado en el BOE N° 110 de 08/05/1974), ni las estadísticas ni las interpretables por su contexto.

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Tabla I. Composición promedio y fluctuación de valores de la miel floral y de mielada. Modificación realizada sobre dicha tabla separando los componentes mayoritarios de los minoritarios.....	18
Tabla II. Comparación de los criterios de calidad de la miel en las diferentes reglamentaciones.....	20
Tabla III. Ácidos orgánicos en la miel.....	24

CAPÍTULO 3. MUESTRAS

Tabla IV. Origen geográfico del envasador y espectro polínico de las mieles de Galicia con Denominación ordenadas según su espectro polínico.....	38
Tabla V. Origen geográfico del envasador y espectro polínico de las mieles procedentes de otras zonas de España ordenadas según su espectro polínico.....	40

CAPÍTULO 4. PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS RELACIONADOS CON LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS

Tabla VI. Estudios de conductividad eléctrica en mieles monoflorales.....	48
Tabla VII. Conductividad eléctrica (10^{-4} S cm^{-1}) de las mieles de Galicia con Denominación ordenadas según su espectro polínico.....	51
Tabla VIII. Estadísticos de la conductividad eléctrica (10^{-4} S cm^{-1}) en las mieles de Galicia con Denominación agrupados según la provincia de procedencia del envasador.....	53
Tabla IX. Estadísticos de la conductividad eléctrica (10^{-4} S cm^{-1}) en las mieles de Galicia con Denominación agrupados según el espectro polínico.....	54
Tabla X. Conductividad eléctrica (10^{-4} S cm^{-1}) de las mieles procedentes de otras zonas de España ordenadas según su espectro polínico.....	55
Tabla XI. Estadísticos de la conductividad eléctrica (10^{-4} S cm^{-1}) en las mieles procedentes de otras zonas de España agrupados según el espectro polínico.....	57
Tabla XII. Estudios de pH y tipos de acidez en mieles florales españolas.....	59
Tabla XIII. Estudios de pH y tipos de acidez en mieles florales extranjeras.....	59
Tabla XIV. pH y tipos de acidez (libre, láctónica y total expresadas en meq/kg) de las mieles de Galicia con Denominación ordenadas según su espectro polínico.....	64
Tabla XV. Estadísticos del pH y de los tipos de acidez (libre, láctónica y total expresadas en meq/kg) en las mieles de Galicia con Denominación agrupados según la provincia de procedencia del envasador.....	67

Tabla XVI. Estadísticos del pH y de los tipos de acidez (libre, láctónica y total expresadas en meq/kg) en las mieles de Galicia con Denominación agrupados según el espectro polínico.....	69
Tabla XVII. pH y tipos de acidez (libre, láctónica y total expresadas en meq/kg) de las mieles procedentes de otras zonas de España ordenadas según su espectro polínico.....	72
Tabla XVIII. Estadísticos del pH y tipos de acidez (libre, láctónica y total expresadas en meq/kg) en las mieles procedentes de otras zonas de España agrupados según el espectro polínico.....	74
 <u>CAPÍTULO 5. DETERMINACIÓN DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS NO AROMÁTICOS</u>	
Tabla XIX. Relación de las estructuras, números CAS, pesos moleculares y constantes de disociación de los ácidos orgánicos objeto de estudio en este trabajo.....	91
Tabla XX. Métodos de análisis en la miel utilizados para la cuantificación de los ácidos orgánicos objeto de estudio en este trabajo.....	100-101
Tabla XXI. Contenido de los ácidos orgánicos determinados por el método enzimático en las mieles de Galicia con Denominación ordenadas según su espectro polínico.....	118
Tabla XXII. Estadísticos del contenido de los ácidos orgánicos determinados por el método enzimático en las mieles de Galicia con Denominación agrupados según la provincia de procedencia del envasador.....	120
Tabla XXIII. Estadísticos del contenido de los ácidos orgánicos determinados por el método enzimático en las mieles de Galicia con Denominación agrupados según el espectro polínico.....	122
Tabla XXIV. Contenido de los ácidos orgánicos determinados por el método enzimático en las mieles procedentes de otras zonas de España ordenadas según su espectro polínico.....	126
Tabla XXV. Estadísticos del contenido de los ácidos orgánicos determinados por el método enzimático en las mieles procedentes de otras zonas de España agrupados según el espectro polínico.....	128
Tabla XXVI. Tiempos de retención de los ácidos orgánicos determinados por el método propuesto de HPLC.....	133
Tabla XXVII. Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) en mg/kg del método propuesto de HPLC para la determinación de los ácidos orgánicos en la miel.....	134
Tabla XXVIII. Parámetros y coeficientes de correlación (r) de las rectas de calibrado del método propuesto de HPLC para la determinación de los ácidos orgánicos en la miel.....	135
Tabla XXIX. Repetibilidad del método propuesto de HPLC para la determinación de los ácidos orgánicos en la miel.....	136
Tabla XXX. Reproducibilidad del método propuesto de HPLC para la determinación de los ácidos orgánicos en la miel.....	136

Tabla XXXI. Recuperaciones medias obtenidas al someter una mezcla de patrones de los ácidos orgánicos estudiados a todo el proceso analítico.....	137
Tabla XXXII. Recuperaciones medias obtenidas al someter a una muestra de miel sobrecargada con concentraciones crecientes de una mezcla de patrones de ácidos orgánicos a todo el proceso analítico....	137
Tabla XXXIII. Contenido de los ácidos orgánicos determinados por HPLC en las mieles de Galicia con Denominación ordenadas según su espectro polínico.....	145
Tabla XXXIV. Estadísticos del contenido de los ácidos orgánicos determinados por HPLC en las mieles de Galicia con Denominación agrupados según la provincia de procedencia del envasador.....	147
Tabla XXXV. Estadísticos del contenido de los ácidos orgánicos determinados por HPLC en las mieles de Galicia con Denominación agrupados según el espectro polínico.....	150
Tabla XXXVI. Contenido de los ácidos orgánicos determinados por HPLC en las mieles procedentes de otras zonas de España ordenadas según su espectro polínico.....	155
Tabla XXXVII. Estadísticos del contenido de los ácidos orgánicos determinados por HPLC en las mieles procedentes de otras zonas de España agrupados según el espectro polínico.....	158
Tabla XXXVIII. Tiempos de migración absolutos y relativos de los ácidos orgánicos determinados por el método propuesto de electroforesis capilar (CE) en una mezcla de patrones.....	172
Tabla XXXIX. Tiempos de migración absolutos y relativos de los ácidos orgánicos determinados por el método propuesto de electroforesis capilar (CE) en la miel.....	172
Tabla XL. Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) en mg/kg del método propuesto de electroforesis capilar (CE) para la determinación de los ácidos orgánicos en la miel.....	173
Tabla XLI. Parámetros y coeficientes de correlación (r) de las rectas de calibrado del método propuesto de electroforesis capilar (CE) para la determinación de los ácidos orgánicos en la miel.....	174
Tabla XLII. Repetibilidad del método propuesto de electroforesis capilar (CE) para la determinación de los ácidos orgánicos en la miel.....	175
Tabla XLIII. Reproducibilidad del método propuesto de electroforesis capilar (CE) para la determinación de los ácidos orgánicos en la miel.....	176
Tabla XLIV. Recuperaciones medias obtenidas al someter a dos muestras de miel sobrecargadas con concentraciones crecientes de una mezcla de patrones de ácidos orgánicos a todo el proceso analítico....	177
Tabla XLV. Tiempos de migración absolutos y relativos, límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) y rectas de calibrado del método propuesto de electroforesis capilar (CE) para la determinación de los ácidos tartárico y maleico en la miel.....	178
Tabla XLVI. Electrolitos empleados por algunos autores en la determinación de los ácidos orgánicos en diferentes alimentos por electroforesis capilar (CE).....	179

Tabla XLVII. Modificadores del flujo electroosmótico empleados por algunos autores en la determinación de los ácidos orgánicos en diferentes alimentos por electroforesis capilar (CE).....	183
Tabla XLVIII. Contenido de los ácidos orgánicos determinados por electroforesis capilar (CE) en las mieles de Galicia con Denominación ordenadas según su espectro polínico.....	191
Tabla XLIX. Estadísticos del contenido de los ácidos orgánicos determinados por electroforesis capilar (CE) en las mieles de Galicia con Denominación agrupados según la provincia de procedencia del envasador.....	194
Tabla L. Estadísticos del contenido de los ácidos orgánicos determinados por electroforesis capilar (CE) en las mieles de Galicia con Denominación agrupados según el espectro polínico.....	197
Tabla LI. Contenido de los ácidos orgánicos determinados por electroforesis capilar (CE) en las mieles procedentes de otras zonas de España ordenadas según su espectro polínico.....	203
Tabla LII. Estadísticos del contenido de los ácidos orgánicos determinados por electroforesis capilar (CE) en las mieles procedentes de otras zonas de España agrupados según el espectro polínico.....	207
 <u>CAPÍTULO 6. EFECTO DEL ALMACENAMIENTO SOBRE LOS PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS Y SOBRE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS</u>	
Tabla LIII. Evolución de la conductividad eléctrica (10^{-4} S cm^{-1}) en las mieles de Galicia con Denominación a lo largo de 24 meses.....	231
Tabla LIV. Evolución del pH en las mieles de Galicia con Denominación a lo largo de 24 meses.....	237
Tabla LV. Evolución de la acidez libre (meq/kg) en las mieles de Galicia con Denominación a lo largo de 24 meses.....	238
Tabla LVI. Evolución de la acidez láctica (meq/kg) en las mieles de Galicia con Denominación a lo largo de 24 meses.....	239
Tabla LVII. Evolución de la acidez total (meq/kg) en las mieles de Galicia con Denominación a lo largo de 24 meses.....	240
Tabla LVIII. Tipos de ajustes a una determinada función de los resultados obtenidos en la evolución de los valores de pH y tipos de acidez (libre, láctica y total expresadas en meq/kg) con el tiempo (en días) en las mieles de Galicia con Denominación.....	243
Tabla LIX. Correlaciones lineales entre el valor inicial de pH y los valores experimentales obtenidos a los 4, 8, 12, 16, 20 y 24 meses.....	247
Tabla LX. Correlaciones lineales entre el valor inicial de acidez libre y los valores experimentales obtenidos a los 4, 8, 12, 16, 20 y 24 meses.....	248
Tabla LXI. Correlaciones lineales entre el valor inicial de acidez láctica y los valores experimentales obtenidos a los 4, 8, 12, 16, 20 y 24 meses.....	249

Tabla LXII. Correlaciones lineales entre el valor inicial de acidez total y los valores experimentales obtenidos a los 4, 8, 12, 16, 20 y 24 meses.....	250
Tabla LXIII. Prueba de ANOVA para determinar la significación de las regresiones lineales entre los valores de pH experimentales (V12e y V24e) y calculados (V12c y V24c), ambos a los 12 y 24 meses.....	252
Tabla LXIV. Coeficientes e intervalos de confianza de las rectas de regresión lineal entre los valores de pH experimentales (V12e y V24e) y calculados (V12c y V24c), ambos a los 12 y 24 meses.....	252
Tabla LXV. Prueba de ANOVA para determinar la significación de las regresiones lineales entre los valores de acidez libre experimentales (V12e y V24e) y calculados (V12c y V24c), ambos a los 12 y 24 meses.....	253
Tabla LXVI. Coeficientes e intervalos de confianza de las rectas de regresión lineal entre los valores de acidez libre experimentales (V12e y V24e) y calculados (V12c y V24c), ambos a los 12 y 24 meses.....	253
Tabla LXVII. Prueba de ANOVA para determinar la significación de las regresiones lineales entre los valores de acidez láctica experimentales (V12e y V24e) y calculados (V12c y V24c), ambos a los 12 y 24 meses.....	254
Tabla LXVIII. Coeficientes e intervalos de confianza de las rectas de regresión lineal entre los valores de acidez láctica experimentales (V12e y V24e) y calculados (V12c y V24c), ambos a los 12 y 24 meses.....	254
Tabla LXIX. Prueba de ANOVA para determinar la significación de las regresiones lineales entre los valores de acidez total experimentales (V12e y V24e) y calculados (V12c y V24c), ambos a los 12 y 24 meses.....	255
Tabla LXX. Coeficientes e intervalos de confianza de las rectas de regresión lineal entre los valores de acidez total experimentales (V12e y V24e) y calculados (V12c y V24c), ambos a los 12 y 24 meses.....	256
Tabla LXXI. Correlaciones lineales entre el valor inicial de pH y el porcentaje de variación que experimenta este parámetro en cada análisis.....	257
Tabla LXXII. Correlaciones lineales entre el valor inicial de acidez libre y el porcentaje de variación que experimenta este parámetro en cada análisis.....	257
Tabla LXXIII. Correlaciones lineales entre el valor inicial de acidez láctica y el porcentaje de variación que experimenta este parámetro en cada análisis.....	257
Tabla LXXIV. Correlaciones lineales entre el valor inicial de acidez total y el porcentaje de variación que experimenta este parámetro en cada análisis.....	258
Tabla LXXV. Evolución del contenido de ácido D-glucónico total (g/kg) en las mieles de Galicia con Denominación a lo largo de 24 meses.....	261
Tabla LXXVI. Evolución del contenido de ácido cítrico (mg/kg) en las mieles de Galicia con Denominación a lo largo de 24 meses.....	262

Tabla LXXVII. Evolución del contenido de ácido L-málico (mg/kg) en las mieles de Galicia con Denominación a lo largo de 24 meses.....	263
Tabla LXXVIII. Tipos de ajustes a una determinada función de los resultados obtenidos en la evolución del contenido del ácido D-glucónico total (g/kg) con el tiempo (en días) en las mieles de Galicia con Denominación.....	265
Tabla LXXIX. Tipos de ajustes a una determinada función de los resultados obtenidos en la evolución del contenido de los ácidos cítrico y L-málico (mg/kg) con el tiempo (en días) en las mieles de Galicia con Denominación.....	266
Tabla LXXX. Correlaciones lineales entre el contenido inicial de ácido D-glucónico total y los valores experimentales obtenidos a los 4, 8, 12, 16, 20 y 24 meses.....	269
Tabla LXXXI. Correlaciones lineales entre el contenido inicial de ácido cítrico y los valores experimentales obtenidos a los 4, 8, 12, 16, 20 y 24 meses.....	270
Tabla LXXXII. Correlaciones lineales entre el contenido inicial de ácido L-málico y los valores experimentales obtenidos a los 4, 8, 12, 16, 20 y 24 meses.....	271
Tabla LXXXIII. Prueba de ANOVA para determinar la significación de las regresiones lineales entre los valores del contenido de ácido D-glucónico total experimentales (V12e y V24e) y calculados (V12c y V24c), ambos a los 12 y 24 meses.....	272
Tabla LXXXIV. Coeficientes e intervalos de confianza de las rectas de regresión lineal entre los valores del contenido de ácido D-glucónico total experimentales (V12e y V24e) y calculados (V12c y V24c), ambos a los 12 y 24 meses.....	273
Tabla LXXXV. Prueba de ANOVA para determinar la significación de las regresiones lineales entre los valores del contenido de ácido cítrico experimentales (V12e y V24e) y calculados (V12c y V24c), ambos a los 12 y 24 meses.....	274
Tabla LXXXVI. Coeficientes e intervalos de confianza de las rectas de regresión lineal entre los valores del contenido de ácido cítrico experimentales (V12e y V24e) y calculados (V12c y V24c), ambos a los 12 y 24 meses.....	274
Tabla LXXXVII. Prueba de ANOVA para determinar la significación de las regresiones lineales entre los valores del contenido de ácido L-málico experimentales (V12e y V24e) y calculados (V12c y V24c), ambos a los 12 y 24 meses.....	275
Tabla LXXXVIII. Coeficientes e intervalos de confianza de las rectas de regresión lineal entre los valores del contenido de ácido L-málico experimentales (V12e y V24e) y calculados (V12c y V24c), ambos a los 12 y 24 meses.....	275
Tabla LXXXIX. Correlaciones lineales entre el contenido inicial de ácido D-glucónico total y el porcentaje de variación que experimenta este parámetro en cada análisis.....	276
Tabla XC. Correlaciones lineales entre el contenido inicial de ácido cítrico y el porcentaje de variación que experimenta este parámetro en cada análisis.....	277

Tabla XCI. Correlaciones lineales entre el contenido inicial de ácido L-málico y el porcentaje de variación que experimenta este parámetro en cada análisis.....	277
<u>CAPÍTULO 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</u>	
Tabla XCII. Contenido de ácido glucónico (g/kg) determinado por los métodos enzimático y CE.....	284
Tabla XCIII. Resultados de la prueba t de Student para muestras relacionadas con el fin de determinar si los dos métodos de análisis del contenido de ácido glucónico en la miel son comparables...	285
Tabla XCIV. Contenido de ácido cítrico (mg/kg) determinado por los métodos enzimático, HPLC y CE...	287
Tabla XCV. Resultados de las pruebas t de Student para muestras relacionadas con el fin de determinar si los tres métodos de análisis del contenido de ácido cítrico en la miel son comparables.....	289
Tabla XCVI. Resultados de las pruebas t de Student para muestras relacionadas con el fin de determinar si los tres métodos de análisis del contenido de ácido cítrico en la miel son comparables cuando la concentración de ácido cítrico es inferior a 250 mg/kg.....	290
Tabla XCVII. Contenido de ácido málico (mg/kg) determinado por los métodos enzimático, HPLC y CE.	291
Tabla XCVIII. Resultados de las pruebas t de Student para muestras relacionadas con el fin de determinar si los tres métodos de análisis del contenido de ácido málico en la miel son comparables.....	293
Tabla XCIX. Contenido de ácido succínico (mg/kg) determinado por los métodos HPLC y CE.....	294
Tabla C. Correlaciones lineales significativas a un nivel de 0.01 (bilateral) entre los parámetros físico químicos determinados en las muestras analizadas en este trabajo (mieles de Galicia con Denominación y mieles procedentes de otras zonas de España).....	296
Tabla CI. Correlaciones lineales significativas a un nivel de 0.01 (bilateral) entre los parámetros físico químicos y los ácidos orgánicos determinados por el método enzimático en las muestras analizadas (mieles de Galicia con Denominación y mieles procedentes de otras zonas de España).....	299
Tabla CII. Correlaciones lineales significativas a un nivel de 0.01 (bilateral) entre los parámetros físico químicos y los ácidos orgánicos determinados por HPLC y CE en las muestras analizadas (mieles de Galicia con Denominación y mieles procedentes de otras zonas de España).....	303
Tabla CIII. Correlaciones lineales significativas a un nivel de 0.01 (bilateral) entre los ácidos orgánicos en las mieles de Galicia con Denominación.....	304
Tabla CIV. Correlaciones lineales significativas a un nivel de 0.01 (bilateral) entre los ácidos orgánicos en las mieles procedentes de otras zonas de España.....	305
Tabla CV. Estudios de aplicación de diversas técnicas multivariantes a la miel con el fin de caracterizarla desde el punto de vista botánico o geográfico.....	309
Tabla CVI. Pesos de las variables en los componentes principales rotados en el estudio de las mieles de Galicia con Denominación.....	315

Tabla CVII. Matriz de clasificación según el método de los K vecinos más próximos (KNN) para las mieles de Galicia con Denominación usando todas las variables (factor de clasificación: provincia de procedencia del envasador).....	317
Tabla CVIII. Matriz de clasificación según el método de los K vecinos más próximos (KNN) para las mieles de Galicia con Denominación usando todas las variables (factor de clasificación: espectro polínico).....	321
Tabla CIX. Pesos de las variables en los componentes principales rotados en el estudio de todas las mieles analizadas.....	325
Tabla CX. Matriz de clasificación según el método de los K vecinos más próximos (KNN) para todas las mieles analizadas usando todas las variables (factor de clasificación: mieles de Galicia frente a las de otras zonas de España).....	327



ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Figura 1. Miel líquida.....	3
Figura 2. Localización de los nectarios en la flor de colza.....	5
Figura 3. Formación del mielato.....	6
Figura 4. Abeja libando el néctar de una flor de eucalipto.....	7
Figura 5. Abejas depositando la mezcla melífera en las celdillas del panal.....	8
Figura 6. Esquema del procesado de la miel.....	9
Figura 7. Número de colmenas (miles) en las diferentes Comunidades Autónomas. Datos de 2000..	12
Figura 8. Producción de miel (Tm) en las diferentes Comunidades Autónomas. Datos de 2000.....	12
Figura 9. Proporción del número de colmenas en Galicia (%) dividida por provincias. Datos de 2000.....	14
Figura 10. Proporción de la producción de miel en Galicia (%) dividida por provincias. Datos de 2000.....	14
Figura 11. Contraetiquetas de los envases de miel producida en Galicia.	
A) Miel "Producto Galego de Calidade–Mel de Galicia".	
B) Miel "Denominación Específica–Mel de Galicia".	
C) Miel "Indicación Xeográfica Protexida–Mel de Galicia".....	15
Figura 12. Reacción de formación del ácido D-glucónico en la miel.....	25

CAPÍTULO 3. MUESTRAS

Figura 13. Distribución geográfica de las mieles de Galicia con Denominación.....	35
Figura 14. Distribución geográfica de las mieles procedentes de otras zonas de España.....	39

CAPÍTULO 4. PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS RELACIONADOS CON LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS

Figura 15. Distribución de la conductividad eléctrica (10^{-4} S cm^{-1}) en las mieles de Galicia con Denominación.....	52
Figura 16. Distribuciones de la conductividad eléctrica (10^{-4} S cm^{-1}) en las mieles de Galicia con Denominación según la provincia de procedencia del envasador.....	53

Figura 17. Distribuciones de la conductividad eléctrica (10^{-4} S cm^{-1}) en las mieles de Galicia con Denominación según el espectro polínico.....	54
Figura 18. Distribución de la conductividad eléctrica (10^{-4} S cm^{-1}) en las mieles procedentes de otras zonas de España.....	56
Figura 19. Distribuciones del pH y de los tipos de acidez (libre, láctónica y total expresadas en meq/kg) en las mieles de Galicia con Denominación.....	66
Figura 20. Distribuciones del pH y de los tipos de acidez (libre, láctónica y total expresadas en meq/kg) en las mieles de Galicia con Denominación según la provincia de procedencia del envasador.....	68
Figura 21. Distribuciones del pH y de los tipos de acidez (libre, láctónica y total expresadas en meq/kg) en las mieles de Galicia con Denominación según el espectro polínico.....	70
Figura 22. Distribuciones del pH y de los tipos de acidez (libre, láctónica y total expresadas en meq/kg) en las mieles procedentes de otras zonas de España.....	73
 <u>CAPÍTULO 5. DETERMINACIÓN DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS NO AROMÁTICOS</u>	
Figura 23. Espectros de absorción del NADH y del NAD.....	102
Figura 24. Reacciones de fosforilación (1) y descarboxilación oxidativa (2) en la determinación del ácido D-glucónico total.....	103
Figura 25. Absorbancias medidas a 340 nm en la determinación del ácido D-glucónico total en la miel por el método enzimático.....	106
Figura 26. Reacciones de ruptura oxidativa (1) y reducción (2 y 3) en la determinación del ácido cítrico.....	108
Figura 27. Absorbancias medidas a 340 nm en la determinación del ácido cítrico en la miel por el método enzimático clarificando con PVPP.....	110
Figura 28. Reacciones de oxidación (1) y transaminación (2) en la determinación del ácido L-málico.....	112
Figura 29. Absorbancias medidas a 340 nm en la determinación del ácido L-málico en la miel por el método enzimático.....	115
Figura 30. Distribuciones del contenido de los ácidos orgánicos determinados por el método enzimático en las mieles de Galicia con Denominación.....	119
Figura 31. Distribuciones del contenido de los ácidos orgánicos determinados por el método enzimático en las mieles de Galicia con Denominación según la provincia de procedencia del envasador.....	121
Figura 32. Distribuciones del contenido de los ácidos orgánicos determinados por el método enzimático en las mieles de Galicia con Denominación según el espectro polínico.....	123

Figura 33. Distribuciones del contenido de los ácidos orgánicos determinados por el método enzimático en las mieles procedentes de otras zonas de España.....	127
Figura 34. Cromatograma de una mezcla de patrones de los ácidos orgánicos separados por el método propuesto de HPLC.....	138
Figura 35. Recuperaciones obtenidas (%) al utilizar un cartucho C ₁₈ y uno de intercambio aniónico en el proceso de extracción en fase sólida.....	141
Figura 36. Recuperaciones obtenidas (%) al utilizar diferentes procedimientos de lavado y/o secado en el proceso de extracción en fase sólida.....	142
Figura 37. Recuperaciones obtenidas (%) al utilizar diferentes volúmenes de ácido sulfúrico en la etapa de elución del proceso de extracción en fase sólida.....	143
Figura 38. Distribuciones del contenido de los ácidos orgánicos determinados por HPLC en las mieles de Galicia con Denominación.....	146
Figura 39. Distribuciones del contenido de los ácidos orgánicos determinados por HPLC en las mieles de Galicia con Denominación según la provincia de procedencia del envasador.....	148
Figura 40. Distribuciones del contenido de los ácidos orgánicos determinados por HPLC en las mieles de Galicia con Denominación según el espectro polínico.....	151
Figura 41. Cromatogramas de los ácidos orgánicos determinados por HPLC en las mieles de Galicia con Denominación de diferentes orígenes botánicos.....	153
Figura 42. Distribuciones del contenido de los ácidos orgánicos determinados por HPLC en las mieles procedentes de otras zonas de España.....	157
Figura 43. Cromatogramas de los ácidos orgánicos determinados por HPLC en las mieles procedentes de otras zonas de España de diferentes orígenes botánicos.....	160
Figura 44. Representación esquemática de la instrumentación básica de electroforesis capilar.....	162
Figura 45. Movimiento del flujo electroosmótico (EOF) y movilidad de aniones y cationes en el interior de un capilar de sílice fundida con una fuente de alimentación positiva.....	165
Figura 46. Inversión del flujo electroosmótico (EOF) y movilidad de aniones y cationes en el interior de un capilar de sílice fundida con una fuente de alimentación negativa.....	166
Figura 47. Electroferograma de una mezcla de patrones de los ácidos orgánicos separados mediante el método propuesto de electroforesis capilar (CE).....	177
Figura 48. Variación de los tiempos de migración absolutos y relativos de una mezcla de patrones de los ácidos orgánicos con el pH del electrolito (fosfato; [OFM-OH]=2.5 mM; [Ca ²⁺]=0 mM).....	181
Figura 49. Variación de los tiempos de migración absolutos y relativos de una mezcla de patrones de los ácidos orgánicos con la concentración de OFM-OH (mM) (fosfato; pH=6.40; [Ca ²⁺]=0 mM).....	183

Figura 50. Variación de los tiempos de migración absolutos y relativos de una mezcla de patrones de los ácidos orgánicos con la concentración de Ca^{2+} (mM) (fosfato; pH=6.40; [OFM-OH]=2.5 mM)..	186
Figura 51. Variación de los tiempos de migración absolutos y relativos de una mezcla de patrones de los ácidos orgánicos con la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) (fosfato, pH=6.40; [OFM-OH]=2.5 mM; $[\text{Ca}^{2+}]$ =0.24 mM).....	187
Figura 52. Variación de los tiempos de migración absolutos y relativos de los ácidos orgánicos con el voltaje aplicado (kV) (fosfato, pH=6.40; [OFM-OH]=2.5 mM; $[\text{Ca}^{2+}]$ =0.24 mM; T^{a} 25 $^{\circ}\text{C}$).....	188
Figura 53. Porcentaje de muestras de Galicia con Denominación en las que cada uno de los ácidos orgánicos determinados por el método de electroforesis capilar (CE) aparece como no detectable (ND), no cuantificable (NC) y presente.....	192
Figura 54. Distribuciones del contenido de los ácidos orgánicos determinados por electroforesis capilar (CE) en las mieles de Galicia con Denominación.....	193
Figura 55. Distribuciones del contenido de los ácidos orgánicos determinados por electroforesis capilar (CE) en las mieles de Galicia con Denominación según la provincia de procedencia del envasador.....	195
Figura 56. Distribuciones del contenido de los ácidos orgánicos determinados por electroforesis capilar (CE) en las mieles de Galicia con Denominación según el espectro polínico.....	198
Figura 57. Electroferogramas de los ácidos orgánicos determinados por electroforesis capilar (CE) en las mieles de Galicia con Denominación de diferentes orígenes botánicos (el ácido glutámico se ha añadido a las muestras para realizar el cálculo de los tiempos de migración relativos).....	201
Figura 58. Porcentaje de muestras procedentes de otras zonas de España en las que cada uno de los ácidos orgánicos determinados por el método de electroforesis capilar (CE) aparece como no detectable (ND), no cuantificable (NC) y presente.....	204
Figura 59. Distribuciones del contenido de los ácidos orgánicos determinados por electroforesis capilar (CE) en las mieles procedentes de otras zonas de España.....	206
Figura 60. Electroferogramas de los ácidos orgánicos determinados por electroforesis capilar (CE) en las mieles procedentes de otras zonas de España de diferentes orígenes botánicos (el ácido glutámico se ha añadido a las muestras para realizar el cálculo de los tiempos de migración relativos).....	210

CAPÍTULO 6. EFECTO DEL ALMACENAMIENTO SOBRE LOS PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS Y SOBRE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS

Figura 61. Evolución con el tiempo del valor medio de la conductividad eléctrica (10^{-4} S cm^{-1}) en las mieles de Galicia con Denominación agrupadas según la provincia de procedencia del envasador.....	232
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Figura 62. Evolución con el tiempo del valor medio de la conductividad eléctrica (10^{-4} S cm^{-1}) en las mieles de Galicia con Denominación agrupadas según el espectro polínico.....	232
Figura 63. Evolución con el tiempo del valor medio de pH y de los tipos de acidez (libre, láctónica y total expresadas en meq/kg) en las mieles de Galicia con Denominación agrupadas según la provincia de procedencia del envasador.....	244
Figura 64. Evolución con el tiempo del valor medio de pH y de los tipos de acidez (libre, láctónica y total expresadas en meq/kg) en las mieles de Galicia con Denominación agrupadas según el espectro polínico.....	245
Figura 65. Representación gráfica de las correlaciones lineales entre el valor inicial de pH y los valores experimentales obtenidos a los 12 y 24 meses (V12e y V24e).....	247
Figura 66. Representación gráfica de las correlaciones lineales entre el valor inicial de acidez libre y los valores experimentales obtenidos a los 12 y 24 meses (V12e y V24e).....	248
Figura 67. Representación gráfica de las correlaciones lineales entre el valor inicial de acidez láctónica y los valores experimentales obtenidos a los 12 y 24 meses (V12e y V24e).....	249
Figura 68. Representación gráfica de las correlaciones lineales entre el valor inicial de acidez total y los valores experimentales obtenidos a los 12 y 24 meses (V12e y V24e).....	250
Figura 69. Porcentaje de muestras que superan los límites de 40 meq/kg y 50 meq/kg de acidez libre en los distintos análisis realizados.....	259
Figura 70. Porcentaje de cada uno de los tipos de ajustes a una determinada función de los resultados obtenidos en la evolución del contenido de ácido D-glucónico total en las mieles analizadas.....	264
Figura 71. Evolución con el tiempo del contenido medio de los ácidos D-glucónico total (g/kg), cítrico (mg/kg) y L-málico (mg/kg) en las mieles de Galicia con Denominación agrupadas según la provincia de procedencia del envasador.....	267
Figura 72. Evolución con el tiempo del contenido medio de los ácidos D-glucónico total (g/kg), cítrico (mg/kg) y L-málico (mg/kg) en las mieles de Galicia con Denominación agrupadas según el espectro polínico.....	268
Figura 73. Representación gráfica de las correlaciones lineales entre el contenido inicial de ácido D-glucónico total y los valores experimentales obtenidos a los 12 y 24 meses (V12e y V24e).....	269
Figura 74. Representación gráfica de las correlaciones lineales entre el contenido inicial de ácido cítrico y los valores experimentales obtenidos a los 12 y 24 meses (V12e y V24e).....	270
Figura 75. Representación gráfica de las correlaciones lineales entre el contenido inicial de ácido L-málico y los valores experimentales obtenidos a los 12 y 24 meses (V12e y V24e).....	271

CAPÍTULO 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Figura 76. Correlación lineal entre el contenido en ácido glucónico (g/kg) determinado por el método enzimático y por el método CE..... 285

Figura 77. Gráfico draftsman para los valores del contenido en ácido cítrico determinados por los tres métodos de análisis desarrollados en este trabajo (enzimático, HPLC y CE)..... 288

Figura 78. Correlación lineal entre el contenido en ácido cítrico (mg/kg) determinado por el método enzimático y por el método HPLC..... 288

Figura 79. Correlación lineal entre el contenido en ácido cítrico (mg/kg) determinado por el método enzimático y por el método CE..... 289

Figura 80. Correlación lineal entre el contenido en ácido cítrico (mg/kg) determinado por el método HPLC y por el método CE..... 289

Figura 81. Gráfico draftsman para los valores del contenido en ácido málico determinados por los tres métodos de análisis desarrollados en este trabajo (enzimático, HPLC y CE)..... 292

Figura 82. Correlación lineal entre el contenido en ácido málico (mg/kg) determinado por el método enzimático y por el método HPLC..... 292

Figura 83. Correlación lineal entre el contenido en ácido málico (mg/kg) determinado por el método enzimático y por el método CE..... 293

Figura 84. Correlación lineal entre el contenido en ácido málico (mg/kg) determinado por el método HPLC y por el método CE..... 293

Figura 85. Gráfico de dispersión entre el contenido en ácido succínico (mg/kg) determinado por el método HPLC y por el método CE..... 295

Figura 86. Relaciones lineales del ácido D-glucónico total con la acidez libre (A) y la acidez total (B) en las muestras de Galicia con Denominación (punto inicial)..... 301

Figura 87. Relaciones lineales del ácido D-glucónico total con la acidez libre (A) y la acidez total (B) en las muestras de Galicia con Denominación (punto inicial) después de eliminar tres muestras con alto contenido en Castanea sativa Miller..... 301

Figura 88. Relaciones lineales del ácido D-glucónico total con la acidez libre (A) y la acidez total (B) en las muestras procedentes de otras zonas de España..... 301

Figura 89. Gráfico draftsman para los datos de los ácidos cítrico, L-málico, fumárico y succínico en las mieles de Galicia con Denominación..... 306

Figura 90. Gráfico draftsman para los datos de los ácidos D-glucónico total, fórmico y acético en las mieles procedentes de otras zonas de España..... 306

Figura 91. Dendograma del análisis cluster realizado en las mieles de Galicia con Denominación agrupadas según la provincia de procedencia del envasador..... 312

Figura 92. Proyección en el espacio de los tres primeros componentes principales del análisis de componentes principales aplicado a las muestras de Galicia con Denominación, agrupadas según la provincia de procedencia del envasador.....	313
Figura 93. Proyecciones parciales en espacios de dos factores o componentes principales del análisis de componentes principales aplicado a las muestras de Galicia con Denominación, agrupadas según la provincia de procedencia del envasador.....	314
Figura 94. Gráficos de outliers del análisis de componentes principales aplicado a las muestras de Galicia con Denominación, agrupadas según la provincia de procedencia del envasador.....	316
Figura 95. Dendograma del análisis cluster realizado en las mieles de Galicia con Denominación agrupadas según el espectro polínico.....	318
Figura 96. Proyección en el espacio de los dos primeros componentes principales del análisis de componentes principales aplicado a las muestras de Galicia con Denominación, agrupadas según el espectro polínico.....	319
Figura 97. Gráfico de variables proyectadas en el espacio de los dos primeros componentes principales del análisis de componentes principales aplicado a las muestras de Galicia con Denominación.....	320
Figura 98. Dendograma del análisis cluster realizado en todas las mieles analizadas.....	322
Figura 99. Proyección en el espacio de los tres primeros componentes principales del análisis de componentes principales aplicado a todas las muestras analizadas.....	323
Figura 100. Proyecciones parciales en espacios de dos factores o componentes principales del análisis de componentes principales aplicado a todas las muestras analizadas.....	324
Figura 101. Gráfico de variables proyectadas en el espacio de los dos primeros componentes principales del análisis de componentes principales aplicado a todas las muestras analizadas.....	326
Figura 102. Gráficos de outliers del análisis de componentes principales aplicado a todas las muestras analizadas.....	326

ESTUDIO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS
NO AROMÁTICOS EN LA MIEL



CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL



1.1. LA MIEL

1.1.1. DEFINICIÓN




Figura 1. Miel líquida.

Se entiende por **miel** la sustancia natural dulce producida por la abeja *Apis mellifera* a partir del néctar de las plantas, de secreciones de partes vivas de plantas o de excreciones de insectos chupadores presentes en las partes vivas de plantas, que las abejas recolectan, transforman combinándolas con sustancias específicas propias, depositan, deshidratan, almacenan y dejan en colmenas para que madure (Figura 1) (BOE, 2003).


1.1.2. TIPOS

Existen diferentes tipos de miel, lo que da lugar a poder establecer diferentes clasificaciones (Codex Alimentarius, 1996; DOCE, 2002; BOE, 2003):




SEGÚN ORIGEN BOTÁNICO:

 **Miel de flores:** Es la miel obtenida principalmente de los néctares de las plantas. Se distinguen dos grupos:






- ✓ *Miel unifloral o monofloral:* Cuando el producto proceda primordialmente del origen indicado y posea sus características organolépticas, físico químicas y microscópicas.
- ✓ *Miel multifloral, polifloral o milfloral:* Cuando en la mezcla de pólenes no hay una especie floral predominante.

 **Miel de mielada:** Es la miel que procede en su mayor parte de excreciones de insectos chupadores de plantas (hemípteros) presentes en las partes vivas de las plantas o de secreciones de las plantas vivas de las plantas. Su color varía del pardo claro o pardo verdoso a casi negro.



SEGÚN PRESENTACIÓN:

-  **Miel:** Es la miel en estado líquido, cristalizado o una mezcla de ambas.
-  **Miel en panal:** Es la miel almacenada por las abejas en alvéolos operculados de panales recién contruidos por ellas mismas, que no contengan larvas y vendida en panales enteros cerrados o en secciones de estos panales.
-  **Miel con trozos de panal:** Es la miel que contiene uno o más trozos de panales, exentos de larvas.

SEGÚN MÉTODO DE ELABORACIÓN:

-  **Miel decantada, escurrida o de gota:** Es la miel obtenida mediante decantación de los panales desoperculados que no contengan larvas.
-  **Miel centrifugada:** Es la miel obtenida mediante la centrifugación de los panales desoperculados, sin larvas.
-  **Miel prensada:** Es la miel obtenida mediante la compresión de los panales, sin larvas, con o sin aplicación de calor moderado, máximo 45 °C.
-  **Miel filtrada:** Es la miel que se obtiene eliminando materia orgánica o inorgánica ajena a la miel de manera tal que se genere una importante eliminación de polen.
-  **Miel cremosa:** Es la miel que tiene una apariencia untuosa obtenida por un proceso físico de cristalización provocado y controlado que le confiera esa estructura.

SEGÚN DESTINO:

-  **Miel para consumo directo.**
-  **Miel para uso industrial:** Es la miel apropiada para usos industriales o para su utilización como ingrediente de otros productos alimenticios que se elaboran ulteriormente. Puede presentar un sabor y olor extraño, no característico, fermentación o sobrecalentamiento. Por estas razones no cumple las exigencias citadas para la miel destinada al consumo directo en cuanto a contenido en enzimas, hidroximetilfurfural y humedad.

1.1.3. ORIGEN

1.1.3.1. FUENTES

1.1.3.1.1. NÉCTAR

El **néctar** es la fuente principal de la que proviene la miel. Se produce a partir de la savia en unas glándulas especializadas de las plantas denominadas *nectarios* (Figura 2). Éstos se encuentran situados generalmente en las flores, más concretamente en la base de la corola (nectarios florales) pero en algunos casos están en otras zonas de las plantas, como por ejemplo en las hojas (nectarios extraflorales) (Piana et al., 1989).

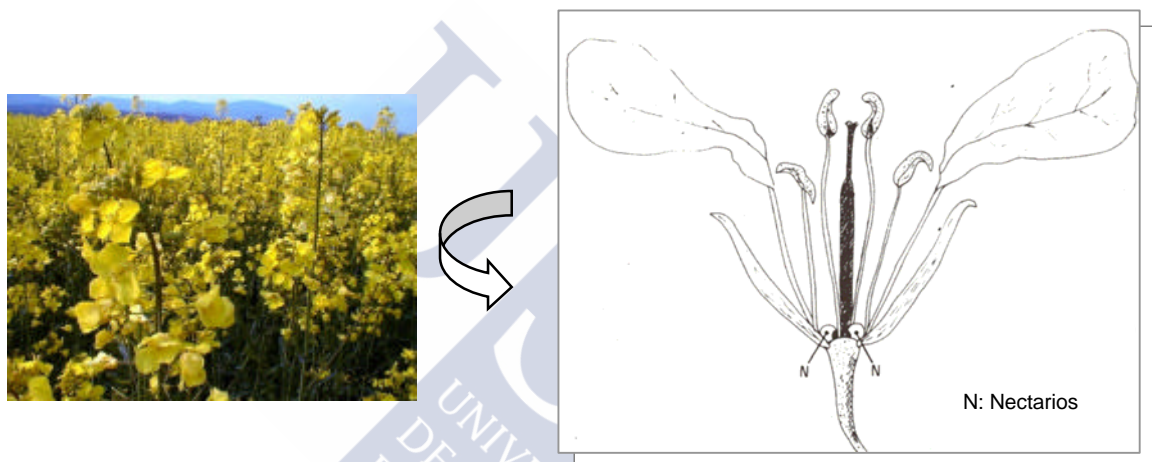


Figura 2. Localización de los nectarios en la flor de colza (Gonnet, 1982).

En cuanto a su composición, el néctar está constituido por una solución de varios azúcares en agua, oscilando su contenido, entre el 4% y el 70%, en función de la especie botánica de que se trate y de las condiciones edáficas y climáticas. Este porcentaje se sitúa en torno al 40% en la mayoría de la flora de nuestro entorno (Gonnet, 1982; Louveaux, 1985). También contiene pequeñas cantidades de otras sustancias como aminoácidos, sales minerales, **ácidos orgánicos**, vitaminas, enzimas, sustancias aromáticas, etc. La mayoría de los néctares son ácidos o neutros (pH entre 2.7 y 6.4) aunque también existen alcalinos (pH hasta 9.1), debido a la concentración de sales minerales (Maurizio, 1979).

El néctar se clasifica en tres grupos en función del azúcar que predomine en su composición (Louveaux, 1985):

- ✓ Néctar con predominio de la sacarosa.
- ✓ Néctar en el que existe una mezcla equilibrada de sacarosa, fructosa y glucosa.

- ✓ Néctar en el que existe una proporción igual de fructosa y glucosa o con predominio bien de la fructosa o bien de la glucosa.

Las abejas suelen frecuentar las mismas especies botánicas aunque si tienen la posibilidad, eligen nectarios de elevada concentración azucarada y prefieren aquellos que contienen, junto a la sacarosa, los monosacáridos glucosa y fructosa (*Piana et al., 1989*).

1.1.3.1.2. MIELATO

El **mielato** es producido por numerosos insectos hemípteros pertenecientes al Orden Rhynchota (principalmente pulgones y cochinillas de los géneros *Coccina*, *Psylles* y *Psyllina*) y que se caracterizan porque poseen una estructura bucal que les permite romper la superficie del vegetal y llegar al floema, succionando la savia. Esta savia pasa a través del conducto digestivo del insecto donde sufre diferentes transformaciones y es, posteriormente, expulsado en forma de pequeñas gotitas sobre las hojas y otras partes del vegetal, constituyendo lo que se denomina mielato. Este mielato será recogido por la abeja que lo transformará en miel de mielato o mielada (Figura 3).

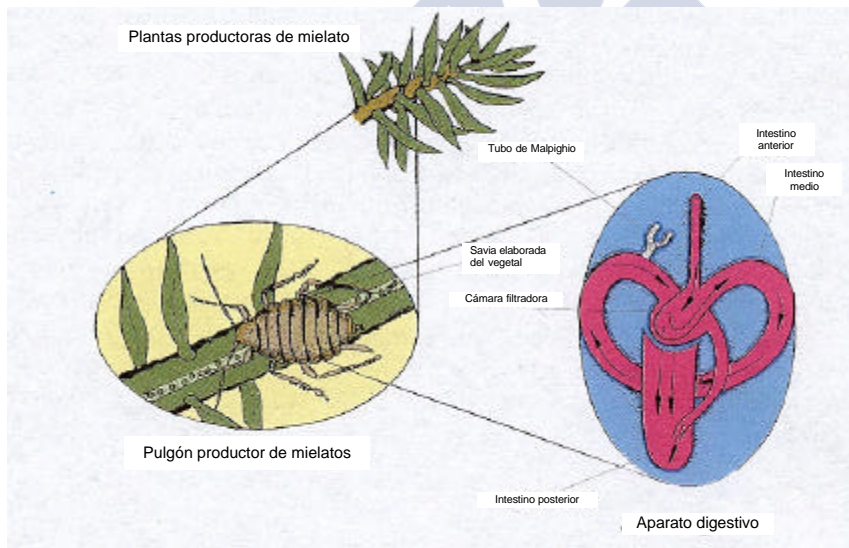


Figura 3. Formación del mielato (Robles y Salvachúa, 1999).

Los principales vegetales productores de mielato son las coníferas como abeto (*Abies* sp.) o alerce (*Larix* sp.) y los árboles forestales de hoja caduca del género *Quercus* sp. o tilos (*Tilia* sp.) (*Loveaux, 1985*).

En cuanto a la composición del mielato, ésta es diferente a la de la savia, a la del néctar o a la de la miel de mielada. Los componentes mayoritarios son los azúcares y, en algunas ocasiones, presenta sorbitol, inositol, ribitol y fosfatos de azúcares que son

aportados por los insectos a la miel de mielada y que permiten identificar a este tipo de miel. El mielato también contiene **ácidos orgánicos**, principalmente *ácido cítrico*. Presenta mayor cantidad de aminoácidos y de sales minerales que el néctar, lo que contribuye a que el pH del mielato oscile entre 3.2 y 4.5 (Maurizio, 1979).

1.1.3.2. TRANSFORMACIÓN DEL NÉCTAR Y/O MIELATO EN MIEL

Las abejas pecoreadoras liban el *néctar* y/o *mielato* (Figura 4) durante la primavera y el verano y lo transportan en el saco mielario, mezclado con la saliva, donde la abeja añade secreciones glandulares ricas en enzimas, cuyo fin es transformar unos azúcares en otros.



Figura 4. Abeja libando el néctar de una flor de eucalipto.

Una vez en la colmena, la abeja regurgita la mezcla anterior al ser estimulada a ello por sus compañeras, de forma que el alimento pasa de buche en buche (entre 3-10 transferencias), enriqueciéndose en sustancias segregadas por las abejas y sufriendo transformaciones químicas. Si el volumen de néctar o mielato es alto, deberá ser almacenado rápidamente y el número de intercambios será menor con lo que las secreciones enzimáticas añadidas serán también menores. Antes de depositar la *mezcla melífera* en la celdilla, la abeja rebaja su contenido en agua hasta un 40-50%, aumentando indirectamente la concentración de las enzimas presentes. En este momento la mezcla se considera *miel no madura* (Figura 5). La transformación completa se realiza gracias a diversos procesos bioquímicos y a un proceso físico de evaporación llevado a cabo por numerosas abejas al agitar sus alas.

Cuando el contenido en agua queda reducido aproximadamente a un 18%, la miel puede ser considerada *madura*. La celdilla se cierra con un opérculo de cera hermético para impedir, por una parte el contacto con el aire del que podría absorber agua y por otra, para evitar una posible fermentación.

En esas condiciones, la miel permanece en las celdas del panal hasta ser recogida por el apicultor o por las mismas abejas para su propia alimentación (Root, 1976; Piana et al., 1989).



Figura 5. Abejas depositando la mezcla melífera en las celdillas del panal.

1.1.4. ETAPAS EN EL PROCESADO DE LA MIEL

La miel es un producto alimenticio, y como tal, requiere una higiene muy cuidadosa. Este alimento tiende a absorber del ambiente tanto la humedad como los olores y a retener polvo u otro material con el que llegue a estar en contacto. Por ello, durante su procesado, la miel no deberá estar en contacto con el cuerpo humano, ni con metales que puedan reaccionar con ella, ni con cualquier otro tipo de sustancia contaminante y/o polucionante (Piana et al., 1989).

En la obtención de la miel se distinguen las etapas que se muestran en la Figura 6 y que posteriormente se comentan (Piana et al., 1989).

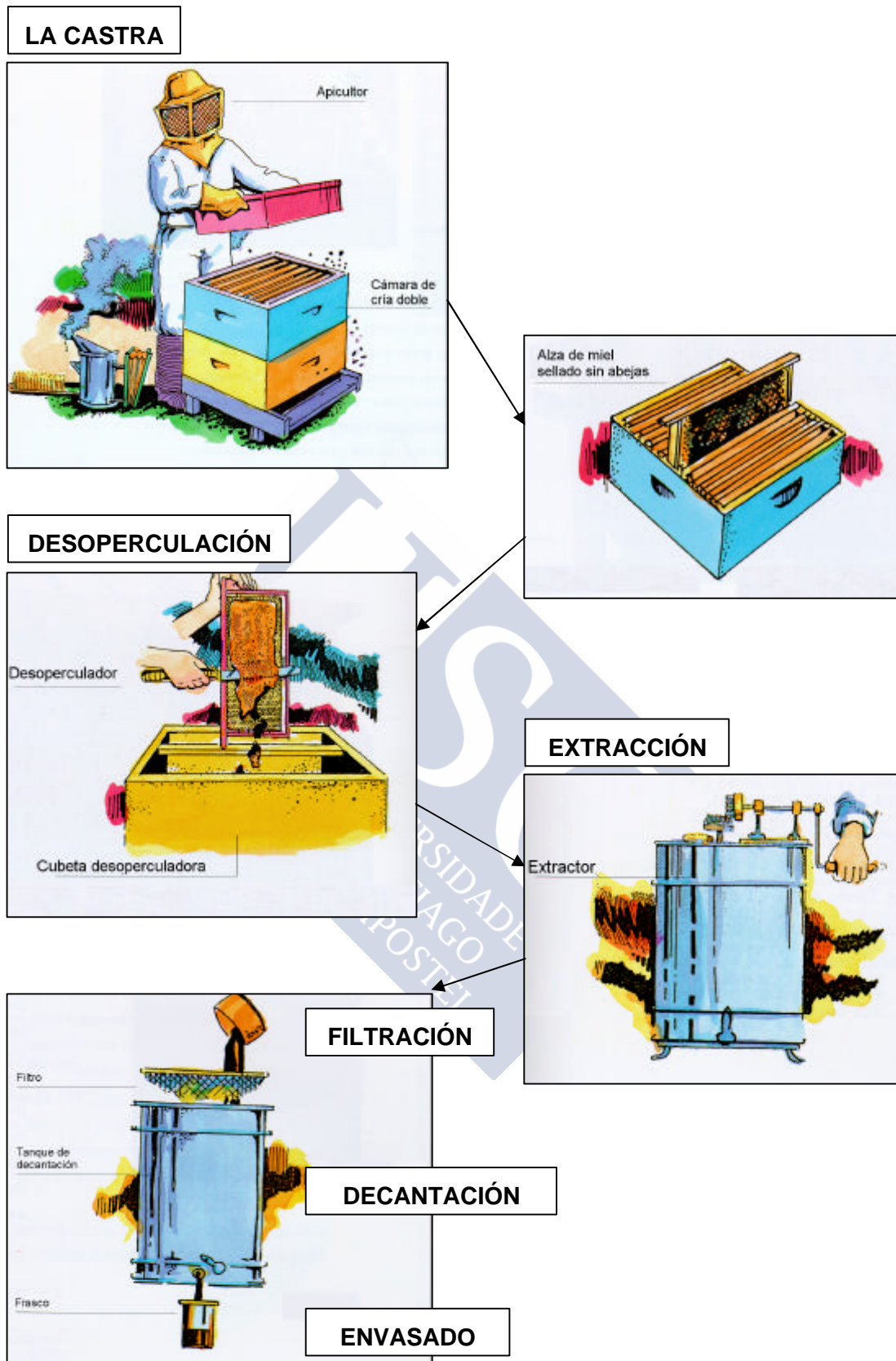


Figura 6. Esquema del procesado de la miel (AGA, 1998).

1.1.4.1. LA CASTRA

La miel está seguramente madura tres o cuatro días después del final de la floración dominante en la zona de pecoreo o bien si se encuentra en celdas operculadas. En nuestro entorno, suele ser entre los meses de julio, agosto y septiembre. Como regla general se aconseja recoger los cuadros y sustituirlos por otros vacíos cuando se encuentren operculados en sus 2/3 partes (en el caso de climas mediterráneos) o casi totalmente operculados (en el caso de regiones húmedas como la de Galicia).

Para retirar las abejas de los panales se pueden utilizar varios métodos desde cepillos hasta máquinas de aire o humo. Se pretende que el método sea eficaz de forma que tanto las abejas como el propio apicultor sufran el menor riesgo.

Por último, también es importante calcular cuidadosamente la provisión de miel que se deja a la colonia, de forma que esta sea suficiente (para permitir a las abejas superar sin daños la carencia más o menos prolongada de cosecha) pero no excesiva (para que las obreras no transporten la cría al alza, contaminando y despreciando la miel de la floración inmediata).

1.1.4.2. DESOPERCULACIÓN

Para extraer la miel, es necesario desopercular el panal previamente. El desoperculado consiste en la eliminación de los opérculos con los que las abejas han cerrado las celdas del panal cuando la miel está madura. Esta operación se lleva a cabo con diversos utensilios que van desde un cuchillo hasta máquinas que pasan los paneles por un dispositivo desoperculador.

Antes de proceder a la desoperculación es bueno controlar el grado de humedad de la miel, para ello se toman diferentes muestras de las celdas del panal en posición central y periférica, efectuándose su lectura con el refractómetro y calculando la media de los valores obtenidos. Si ésta es inferior al 18% se puede proceder al desoperculado; en caso contrario es necesario deshumidificar mediante una corriente de aire seco.

1.1.4.3. EXTRACCIÓN

La extracción de la miel se puede realizar por varios mecanismos:

CENTRIFUGACIÓN

La mayor parte de la miel comercializada actualmente se extrae de los panales por un mecanismo de centrifugación. Este sistema de extracción posee la ventaja de que es rápido y los panales no sufren ningún daño. Existen dos tipos de centrifugas

según la posición de los cuadros: *radiales* y *tangenciales*. Para las mieles fluidas se deben utilizar centrífugas radiales y para las más densas centrífugas tangenciales, comenzando a velocidad moderada y aumentándola progresivamente.

ESCURRIDO

Consiste en colocar los panales o sus trozos en una rejilla dejando escurrir la miel por gravedad sobre unos recipientes. Es un método de extracción poco utilizado porque presenta varios inconvenientes. Entre ellos se encuentra que es un sistema que requiere bastante tiempo, lo que aumenta los intercambios higrométricos con el ambiente.

PRENSADO

Este sistema de extracción está desapareciendo debido a que las mieles así obtenidas presentan un acentuado sabor a polen y a cera, sobre todo si provienen de panales viejos. También presentan impurezas, que, debido a su naturaleza y cantidad, las hacen inviables para la comercialización y consumo. Por último, presentan otro inconveniente y es que se destruye el panal.

1.1.4.4. FILTRACIÓN

Sirve para eliminar las impurezas de la miel como fragmentos de panal, de abejas, de polen, de cera o de otras impurezas que se mezclan con la miel en el proceso de centrifugación. Los filtros o tamices se colocan después del extractor ordenados de mayor a menor tamaño de malla, siendo el último tamiz de 0.5 mm de luz.

1.1.4.5. DECANTACIÓN

Se utiliza para eliminar las burbujas de aire y algunas impurezas que hayan atravesado los filtros anteriores. El tiempo de decantación oscila desde pocos días hasta un mes, dependiendo del tipo de miel y de la temperatura.

1.1.4.6. ENVASADO

Es la última operación a la que se somete la miel antes de ser presentada al consumidor. Los criterios a los que debe responder un "buen envase" son, entre otros: peso reducido, bajo precio, resistencia a la rotura, cierre hermético, aspecto atrayente, higiene, vaciado fácil y completo y conservación del producto.

El envase que presenta mayor número de requisitos exigidos es el vidrio. El envase de plástico resulta adecuado para pequeñas partidas con tiempos de venta no superiores a 6 meses.

1.1.5. ESTADO ACTUAL DE LA APICULTURA

1.1.5.1. ESPAÑA

La apicultura en España es un sector de importancia como lo demuestran sus cifras: más de 2 millones de colmenas y una producción estimada en casi 29000 toneladas de miel/año. Los beneficios obtenidos por este sector se sitúan, aproximadamente, en unos 60 millones de euros (MAPA, 2001). Sin embargo, en estas cifras no se incluyen otros beneficios derivados de la misma como la polinización y cuya cuantía es aún mayor (McGregor, 1979).

En las Figuras 7 y 8 se muestran los datos del número de colmenas y de la producción de miel en las diferentes Comunidades Autónomas de España, respectivamente.

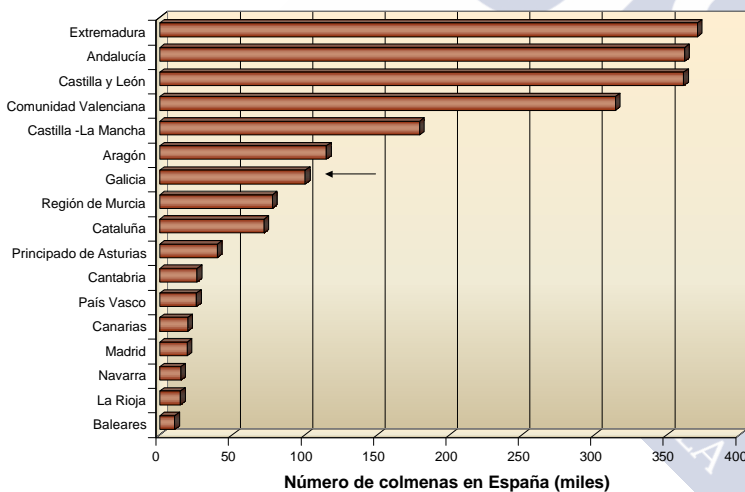


Figura 7. Número de colmenas (miles) en las diferentes Comunidades Autónomas. Datos de 2000 (MAPA, 2001).

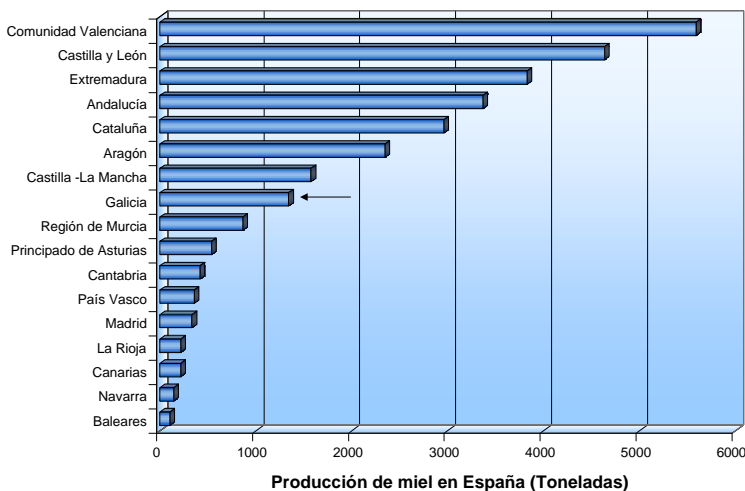


Figura 8. Producción de miel (Tm) en las diferentes Comunidades Autónomas. Datos de 2000 (MAPA, 2001).

La miel es un producto alimenticio tradicional de reconocido prestigio en algunas zonas de España, por lo que debe ser objeto de estudios que permitan conocer y evaluar su calidad. Como calidad en sentido amplio, se pueden diferenciar dos conceptos:

1. La propia inherente al alimento, que se corresponde con unos parámetros analíticos generales, contemplados en la legislación mediante Reglamentaciones Técnico Sanitarias.
2. La caracterización, concepto más avanzado pero menos desarrollado, es consecuencia de la calidad inherente al alimento. Permite, en el caso de la miel, establecer distintas Denominaciones en función de las diferencias geográficas y botánicas.

Las Denominaciones son un instrumento de prestigio y revaloración que permiten certificar un determinado origen y calidad de la miel. Por esta razón, el sector productor, envasador e industrial, de las diferentes zonas de España, mantienen un interés creciente por abordar los estudios de caracterización que permitan el establecimiento de estas Denominaciones.

En este ámbito cabe destacar la aparición del Real Decreto 251/1990 de 23 de febrero que incluye a la miel (junto con los frutos secos y turrónes) en el régimen de Denominaciones de Origen, Genéricas y Específicas de España. Igualmente de la legislación comunitaria debemos mencionar los Reglamentos (CEE) del Consejo N° 2081/92 relativo a la protección de las indicaciones geográficas y de las denominaciones de origen de los productos agrícolas y alimenticios y el N° 2082/92 relativo a la certificación de las características específicas de los productos agrícolas y alimenticios (*Ortiz et al., 1996*).

1.1.5.2. GALICIA

En el caso de la Comunidad Autónoma Gallega, el número de colmenas es de poco más de cien mil, lo que representa un 4.7% del total de España. Asimismo, la producción actual en Galicia oscila entre los 1.2 y los 2.0 millones de kg miel/año, lo que supone aproximadamente una producción media de 17 kg miel/colmena. Esto ha llevado a nuestra comunidad a situarse con respecto al resto de España, según datos de 2000, en el puesto 7 en cuanto al número de colmenas y en el 8 en cuanto a producción de miel (Figuras 7 y 8). Los beneficios por venta de miel obtenidos por este sector se calculan, aproximadamente, en unos 7.8 millones de euros (*MAPA, 2001; Yáñez, 2001*).

Por provincias, en la Figura 9, se puede observar como la provincia de Lugo es la que mayor número de colmenas presenta, a bastante distancia de las demás. En cuanto a la

producción (Figura 10), la diferencia no es tan marcada, y aunque Lugo sigue siendo la provincia de mayor producción, lo es a muy poca distancia de la provincia de A Coruña (MAPA, 2001).

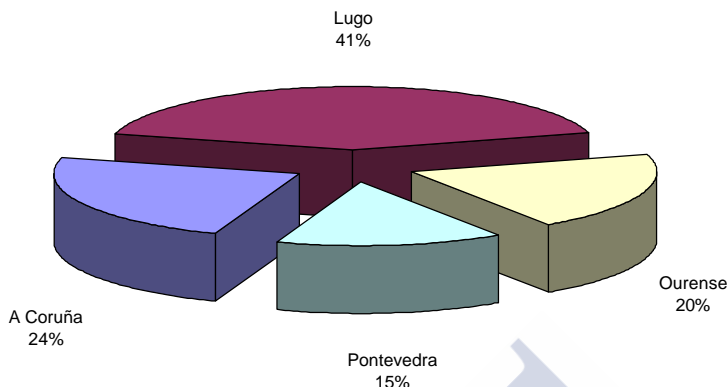
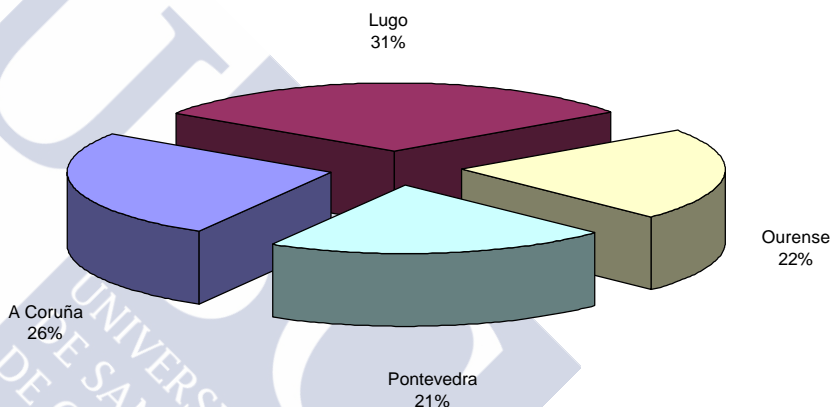


Figura 9. Proporción del número de colmenas en Galicia (%) dividida por provincias. Datos de 2000 (MAPA, 2001).

Figura 10. Proporción de la producción de miel en Galicia (%) dividida por provincias. Datos de 2000 (MAPA, 2001).



Desde hace catorce años la importancia y el interés del sector apícola en nuestra región ha quedado reflejado en la aparición de distintos Reglamentos cuyo objetivo es mejorar la promoción de la miel producida, envasada y elaborada en el ámbito geográfico de Galicia para permitir una mejor comercialización y la entrada de este producto gallego en el Mercado Europeo como producto de mayor calidad. El primer Reglamento de Denominación fue el Reglamento “Producto Galego de Calidade–Mel de Galicia” (DOG, 1989). En 1997 pasó a denominarse “Denominación Específica–Mel de Galicia” (DOG, 1997) y en la actualidad, a partir de marzo del 2003, se ha transformado en “Indicación Xeográfica Protexida–Mel de Galicia” (DOG, 2003). En la Figura 11 se muestran las contraetiquetas identificativas de la miel producida en Galicia bajo las anteriores denominaciones “Producto Galego de Calidade–Mel de Galicia” y “Denominación Específica–Mel de Galicia” y bajo la actual “Indicación Xeográfica Protexida–Mel de Galicia”.



Figura 11. Contraetiquetas de los envases de miel producida en Galicia.

- A) Miel “Producto Galego de Calidade–Mel de Galicia”
- B) Miel “Denominación Específica–Mel de Galicia”
- C) Miel “Indicación Xeográfica Protexida–Mel de Galicia”

El Consejo Regulador de la “Indicación Xeográfica Protexida–Mel de Galicia”, como anteriormente los consejos de las denominaciones “Producto Galego de Calidade–Mel de Galicia” y “Denominación Específica–Mel de Galicia”, controla, ampara y certifica el producto que lleva la etiqueta identificativa de Mel de Galicia desde la producción hasta su presentación en el punto de venta. Periódicamente se realizan controles del producto en origen con el fin de comprobar que las técnicas con las que los productores tratan la miel sean las correctas. En las plantas de envasado acogidas a la Denominación se vigila además el procesado de la miel y se establecen controles externos para que este producto cumpla las especificaciones de calidad exigidas por el Reglamento del Consejo (DOG 1989, 1997 y 2003).

1.1.6. COMPOSICIÓN QUÍMICA

La miel se ha utilizado desde los tiempos más remotos y, sin embargo, aún hoy en día se desconoce, en su totalidad, su composición. Se trata de un producto biológico muy complejo cuya composición varía como consecuencia de dos factores fundamentales (*White, 1979a*):

- ↳ Composición del néctar o mielato del que procede.
- ↳ Factores externos que afectan a la composición en una menor proporción como las condiciones climáticas, la zona geográfica, la maduración o las prácticas de los apicultores en la extracción de la miel.

Por estas razones, seguramente sería más apropiado hablar de mieles que de miel (*Piana et al., 1989*).

La miel puede tener un color que va desde un tono casi incoloro a un tono pardo oscuro. Su consistencia puede ser fluida, espesa o cristalizada (en parte o en su totalidad). Tanto el sabor como el aroma pueden variar pero se derivan del origen vegetal (*BOE, 2003*).

Los componentes principales de la miel son los **azúcares**, representando los monosacáridos *fructosa* y *glucosa*, el 85% de los sólidos totales. También existen disacáridos (*maltosa, sacarosa, isomaltosa*, etc.), trisacáridos (*melecitosa, erlosa, rafinosa*, etc.) y azúcares superiores como las *dextrinas*. Algunos de estos azúcares ya existen en las materias precursoras de la miel pero otros se forman durante el proceso de maduración (*White, 1979a*).

Además de los azúcares, la miel contiene *agua*, oscilando su porcentaje entre el 16 y el 18%, aproximadamente. Este parámetro influye decisivamente en la estabilidad de la miel frente a la fermentación y la granulación, así como en otras propiedades como la viscosidad, densidad y características organolépticas (*White, 1979b*).

Por último y no menos importante, es la presencia de compuestos, que aunque se encuentran en pequeñas proporciones (aproximadamente el 1%), van a determinar gran parte de las características que distinguen a la miel tales como el color, el aroma y el sabor. Entre estos compuestos se encuentran los **ácidos orgánicos** (los cuales son objeto de este trabajo), *sustancias minerales, aminoácidos, proteínas, enzimas, vitaminas, lípidos, sustancias volátiles aromáticas* y un sinnúmero de residuos sólidos insolubles en agua como el *polen, indicadores de mielada* (principalmente esporas de hongos e hifas, algas verdes y elementos céricos de los insectos productores de mielato), etc.

En cuanto a las *sustancias minerales*, el elemento más abundante es el *potasio* (representando el 80% del total), aunque también hay, entre otros, *sodio*, *calcio*, *magnesio*, *manganeso*, *hierro*, *cobre* y *silicio*. El contenido mineral de una miel varía con las condiciones edáficas y climáticas, el origen botánico y la técnica de extracción utilizada. Las sales minerales influyen en propiedades tales como el color, la conductividad eléctrica y el pH. De forma global, el contenido en sustancias minerales se expresa como porcentaje en cenizas (*White, 1978; Gonnet, 1982*).

Por su parte el contenido en nitrógeno de la miel es bajo, englobándose en el mismo tanto las sustancias proteicas como las no proteicas. De entre los *aminoácidos* presentes en la miel, la *prolina* es el más importante y le siguen la *lisina*, *ácido glutámico* y la *alanina* (*White, 1978; Gonnet, 1982*). Durante el almacenamiento y/o con el calentamiento, los aminoácidos reaccionan con los azúcares dando lugar a sustancias responsables del progresivo pardeamiento y oscurecimiento de la miel (reacciones de Maillard). Las *proteínas* provocan la disminución de la tensión superficial, siendo ésta la responsable de la capacidad que algunas mieles tienen para formar espuma. Por último y dentro del contenido en nitrógeno, se debe citar que la miel contiene *enzimas* que son ampliamente utilizadas como índice de frescura y criterio de calidad. Estas enzimas proceden en su mayor parte de la abeja, aunque también pueden tener un origen floral. La presencia de enzimas es una de las características que diferencian a la miel de otros edulcorantes, siendo la *invertasa*, la *diastasa* y la *glucosa-oxidasa*, las que poseen una mayor actividad. También están presentes aunque han sido menos estudiadas la *catalasa*, *fosfatasa ácida* y *b-glucosidasa* (*White 1979b; Sánchez, 1999*).

En la Tabla I se indican los valores promedio y extremos de algunos de estos parámetros, tanto en mieles florales como en mieles de mielada.

Tabla I. Composición promedio y fluctuación de valores de la miel floral y de mielada¹ (White, 1978 y White, 1979b). Modificación realizada sobre dicha tabla separando los componentes mayoritarios de los minoritarios

CARACTERÍSTICA O COMPONENTE	MIEL FLORAL		MIEL DE MIELADA	
	Promedio	Rango	Promedio	Rango
COMPONENTES MAYORITARIOS (@99%)				
HUMEDAD (%)	17.20	13.40 - 22.90	16.30	12.20 - 18.20
FRUCTOSA (%)	38.19	27.25 - 44.26	31.80	23.91 - 38.12
GLUCOSA (%)	31.28	22.03 - 40.75	26.08	19.23 - 31.86
MALTOSA (%)	7.31	2.74-15.98	8.80	5.11 - 12.48
SACAROSA (%)	1.31	0.25 - 7.57	0.80	0.44 - 1.14
A. SUPERIORES (%)	1.50	0.13-8.49	4.70	1.28 - 11.50
COMPONENTES MINORITARIOS (@1%)				
ACIDEZ LIBRE (meq/kg)	22.03	6.75 - 47.19	49.07	30.29 - 66.02
ACIDEZ LACTÓNICA (meq/kg)	7.11	0.00 - 18.76	5.80	0.36 - 14.09
ACIDEZ TOTAL (meq/kg)	29.12	8.68 - 59.49	54.88	34.62 - 76.49
AC. LACTÓNICA / AC. LIBRE	0.335	0.000 - 0.950	0.127	0.007 - 0.385
CENIZAS (%)	0.169	0.020 - 1.028	0.736	0.212 - 1.185
N ₂ (AMINOÁCIDOS Y PROTEÍNAS) (%)	0.041	0.000 - 0.133	0.100	0.047 - 0.223
ÍNDICE DE DIASTASAS (Escala de Gothe)	20.8	2.10 - 61.20	31.9	6.70 - 48.40

¹Basado en 490 muestras de miel floral y 14 de miel de mielada.

1.1.7. FACTORES ESENCIALES DE COMPOSICIÓN Y CALIDAD

La miel, cuando se comercialice como tal o se utilice en cualquier producto destinado al consumo humano, no deberá tener ningún sabor, aroma o color desagradable, procedentes de la absorción de materias extrañas durante la elaboración, envasado y/o almacenamiento. No habrá comenzado a fermentar ni presentará efervescencia. Tampoco se modificará artificialmente la acidez de la miel ni se calentará hasta el grado de que se inactiven, totalmente o en gran parte, las enzimas naturales que contiene.

Está prohibida la adición de cualquier ingrediente o aditivo alimentario, así como de sustancias destinadas al aumento de peso.

Por último, la miel deberá estar exenta de sustancias inorgánicas y organismos extraños a su composición, tales como mohos, insectos, restos de insectos, larvas o granos de arena. Además, la miel no deberá contener sustancias tóxicas que deriven de microorganismos o plantas en cantidades que puedan constituir un peligro para la salud (FAO, 1990; Codex Alimentarius, 1996; DOCE, 2002; BOE, 2003).

Hasta el 1 de agosto de 2003 los criterios de calidad que debían reunir las mieles comercializadas en España eran los especificados en la *Norma de calidad para la miel destinada al mercado interior* (BOE, 1983). A partir de esta fecha, ha entrado en vigor la Directiva 2001/110/CE, del Consejo de 20 de diciembre de 2001, relativa a la miel (DOCE, 2002) por la que se establecen unos nuevos criterios de calidad. Esta directiva está recogida en nuestra legislación en el Real Decreto 1049/2003 de 1 de agosto, por el que se aprueba la *Norma de calidad relativa a la miel* (BOE, 2003). Esta nueva reglamentación supone, por una parte, modificaciones en los límites de algunos parámetros y por otra, la inclusión de dos nuevas características de composición: la conductividad eléctrica y el contenido de glucosa + fructosa en sustitución del contenido en cenizas y del contenido en azúcares reductores, respectivamente. Además, si una miel está bajo una Denominación de Origen o Indicación Geográfica determinada, como es el caso de las mieles “Indicación Xeográfica Protexida-Mel de Galicia” (DOG, 2003) o el de las anteriores “Producto Galego de Calidade-Mel de Galicia” (DOG, 1989), cumplirán además unos requisitos propios que, por lo general, son más restrictivos y están adaptados a su zona de influencia. En la Tabla II se relacionan las características propias de las reglamentaciones anteriormente citadas.

Tabla II. Comparación de los criterios de calidad de la miel en las diferentes reglamentaciones

CRITERIOS DE CALIDAD	BOE (1983)	DOG (1989)	DOG (1997)	DOG (2003)	DOCE (2002) BOE (2003)
AZÚCARES REDUCTORES					
Miel de flores en general	≈ 65%	≈ 65%	≈ 65%	¾	¾
Miel de mielada y su mezcla con miel de flores	≈ 60%	≈ 60%	≈ 60%	¾	¾
SACAROSA APARENTE					
Miel de flores en general	£ 5%	£ 5%	£ 5%	£ 5%	£ 5%
Miel de acacia (<i>Robinia sp.</i>) y miel de mielada y sus mezclas	£ 10%	£ 10%	£ 10%	£ 10%	£ 10%
Miel de espliego (<i>Lavándula sp.</i>)	£ 10%	£ 10%	£ 10%	£ 15% ¹	£ 15% ¹
Miel de alfalfa (<i>Medicago sp.</i>), azahar (<i>Citrus sp.</i>), <i>Hedysarum sp.</i> , <i>Banksia menziesii</i> , <i>Eucalyptus camaldulensis</i> ; <i>Eucryphia lucida</i> ; <i>Eucryphia milliganii</i>	¾	¾	¾	£ 10%	£ 10%
FRUCTOSA + GLUCOSA					
Miel de flores en general	¾	¾	¾	≈ 60%	≈ 60%
Miel de mielada y su mezcla con miel de flores	¾	¾	¾	≈ 45%	≈ 45%
HUMEDAD O CONTENIDO EN AGUA					
Miel en general	£ 20%	£ 18.5%	£ 18.5%	£ 18.5%	£ 20%
Miel de brezo (<i>Calluna sp.</i>)	£ 23%	£ 21%	£ 21%	—	£ 23%
SÓLIDOS INSOLUBLES EN AGUA					
Miel en general	£ 0.1%	£ 0.1%	£ 0.1%	£ 0.1%	£ 0.1%
Miel prensada	£ 0.5%	£ 0.5%	£ 0.5%	£ 0.5%	£ 0.5%
CENIZAS					
Miel de flores en general	£ 0.6%	£ 0.6%	£ 0.6%	¾	¾
Miel de mielada y su mezcla con miel de flores	£ 1%	£ 1%	£ 1%	¾	¾
CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA					
Miel de flores en general	¾	¾	¾	£ 0.8 mS/cm	£ 0.8 mS/cm
Miel de mielada, miel de castaño (<i>Castanea sativa</i> Miller) y/o sus mezclas	¾	¾	¾	≈ 0.8 mS/cm	≈ 0.8 mS/cm
Excepciones: <i>Arbutus sp.</i> , <i>Erica sp.</i> , <i>Eucalyptus sp.</i> ; <i>Tilia sp.</i> , <i>Calluna sp.</i> , <i>Leptospermum sp.</i> , <i>Melaleuca sp.</i>	¾	¾	¾	variable	variable
ACIDEZ LIBRE					
Miel en general	£ 40 meq/kg	£ 40 meq/kg	£ 40 meq/kg	£ 50 meq/kg	£ 50 meq/kg
ACTIVIDAD DIASTÁSICA²					
Miel en general	≈ 8	≈ 15	≈ 9	≈ 9	≈ 8
Miel con bajo contenido en enzimas naturales	≈ 3 (si HMF £ 15 mg/kg)		≈ 4 (si HMF £ 10 mg/kg)	≈ 4 (si HMF £ 10 mg/kg)	≈ 3 (si HMF £ 15 mg/kg)
HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)					
Miel en general	£ 40 mg/kg	£ 28 mg/kg	£ 28 mg/kg	£ 28 mg/kg	£ 40 mg/kg

¹ En este caso también se incluye la miel de borraja (*Borago officinalis*).² Unidades: Escala de Gothe (BOE, 1983; DOG, 1989, 1997 y 2003) y Escala de Schade (DOCE, 2002; BOE, 2003).

1.1.8. ALTERACIONES BIOLÓGICAS: FERMENTACIÓN

Entre las degradaciones biológicas que ocurren en la miel, la más grave y frecuente es la fermentación. Ésta se produce cuando se reúnen una serie de factores como son:

- ↪ Elevado contenido en agua, superior al 18%.
- ↪ Presencia de levaduras en cantidad suficiente.
- ↪ Temperatura ambiente comprendida entre 15-25 °C.

El elevado contenido en agua es un factor determinante; así, cuando éste es superior a un 19% los riesgos de fermentación son muy elevados, mientras que mieles con un contenido en agua inferior a 17% raramente sufren estos procesos. Por este motivo, es muy importante la recogida de la miel cuando esté madura y controlar la humedad relativa de la atmósfera en los lugares de procesado y almacenamiento, para impedir la absorción de agua por parte de la miel.

Las levaduras capaces de desarrollarse en un ambiente tan concentrado en azúcares como la miel, se denominan osmófilas o sacarófilas (pertenecen a diferentes géneros como *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Torula*, etc.). Estos microorganismos provienen de las flores, del terreno, del aire o del equipo utilizado para la extracción y acondicionamiento de la miel. Son muy sensibles al calor, de ahí que para prevenir la fermentación en muchas mieles comerciales se lleve a cabo una pasteurización (*Piana et al.*, 1989). La acción de las levaduras provoca la formación de alcoholes y **ácidos orgánicos** a partir de los azúcares presentes. En el proceso se libera etanol y si la reacción continúa se origina **ácido acético** (*Gonnet*, 1982).

A temperaturas inferiores a 10 °C se retrasa este proceso, al igual que por encima de 38 °C, pero esta última temperatura nunca es aconsejable puesto que facilita el deterioro de la miel por oscurecimiento, pérdida de aroma, sabor, actividad de enzimas y aumento de hidroximetilfurfural.

La cristalización o granulación de la miel va a favorecer la fermentación, porque mientras el soluto (glucosa) se deshidrata al cristalizar, la fase líquida se enriquece en agua convirtiéndose en un medio apto para la multiplicación de las levaduras (*Gonnet*, 1982).

Los procesos fermentativos, como se ha visto, provocan daños irreversibles en la miel, presentando ésta unas características propias como el olor "vinoso", sabor algo ácido y presencia de numerosas burbujas de CO₂ que la hacen un producto no apto para el consumo humano. En este caso se puede utilizar para la alimentación artificial de las abejas si se mezcla con azúcar y se calienta para destruir las levaduras (*Piana et al.*, 1989).

1.2. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS Y PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS RELACIONADOS CON LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS

1.2.1. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

1.2.1.1. COLOR

El color es una propiedad óptica de la miel, resultado de los distintos grados de absorción de luz a diferentes longitudes de onda por parte de los componentes de este alimento (FAO, 1990).

El color de la miel varía mucho, desde prácticamente incoloro a casi negro. Esta variabilidad va a depender fundamentalmente de su origen, y en consecuencia, de su composición. Las mieles más oscuras, entre las que se encuentran las de mielada, son las que presentan una acidez más elevada (mayor contenido en **ácidos orgánicos**), un mayor contenido en sustancias minerales, aminoácidos (sobre todo tirosina y triptófano) y compuestos polifenólicos (White, 1979a; Crane, 1990).

1.2.1.2. AROMA Y SABOR

El aroma y sabor de la miel se debe fundamentalmente a una mezcla compleja de sustancias que dependen en gran medida del origen botánico, aunque también influyen las condiciones de procesamiento y almacenamiento de la miel (Anklam, 1998). De entre estas sustancias hay que destacar azúcares y aminoácidos (reacciones de Maillard), **ácidos orgánicos**, taninos, compuestos glucosídicos y diversas sustancias volátiles de bajo peso molecular como alcoholes, cetonas, aldehidos, ésteres, etc (Louveaux, 1985; Crane, 1990).

En general, las mieles oscuras y de mielada presentan aromas y sabores más fuertes que las mieles claras, con aromas y sabores más suaves (White, 1979a).

1.2.2. PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS

1.2.2.1. CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA

La conductividad eléctrica es una propiedad física de la miel relacionada, fundamentalmente, con el contenido en sales minerales, y, en menor medida, con el contenido en **ácidos orgánicos**, proteínas, azúcares y polioles de la miel (Crane, 1990). Por ello, se ha comprobado que la conductividad eléctrica es directamente proporcional al contenido en cenizas y a la acidez de la miel, siendo tanto mayor cuanto más elevados son

estos valores (Vorwohl, 1964). En este sentido, Sancho et al. (1991) establecieron una relación entre la conductividad eléctrica (C en 10^{-4} S cm^{-1}) y el contenido en cenizas (A en g/100g miel):

$$C = 1.11 + 12.05 A \quad (r = 0.9637)$$

Posteriormente, Bianchi (1992) y Sanz et al. (1994) encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre ambos parámetros de 0.9889 y 0.89, respectivamente.

El contenido en cenizas es un criterio de calidad que depende del origen botánico de la miel. Actualmente en la legislación, este análisis se ha reemplazado por la conductividad eléctrica, determinación más rápida, menos tediosa y con instrumentación más sencilla (Comisión Internacional de la Miel, 2000; DOCE, 2002; BOE, 2003).

1.2.2.2. pH

El pH indica la acidez actual de la miel. Éste es función de la cantidad de **ácidos ionizados** que presenta, aunque su valor también se va a ver afectado por el contenido en sales minerales, especialmente potasio, sodio y calcio (White, 1979a).

1.2.2.3. ACIDEZ

La acidez proviene fundamentalmente de dos vías: una, la mayoritaria, causada por los **ácidos orgánicos libres** y otra, la minoritaria, debida a la presencia de iones inorgánicos como fosfatos, cloruros y sulfatos que pueden formar los correspondientes ácidos con otros elementos presentes en la miel (White, 1979a).

La acidez permite, en general, conocer si este alimento ha fermentado. Esto es debido a que el alcohol producido en la fermentación se transforma en ácido acético por acción de levaduras, lo que produce un aumento considerable de la acidez.

En la miel se distinguen tres tipos de acidez:

- ↪ **ACIDEZ LIBRE:** es un parámetro que puede variar ampliamente. Su determinación se encuentra incluida en las normas de calidad de la miel de numerosos países, entre ellos España (BOE, 2003).
- ↪ **ACIDEZ LACTÓNICA:** constituye una reserva de acidez. Las lactonas son ésteres intramoleculares de los ácidos que con el tiempo se van hidrolizando aumentando así la acidez libre de la miel.
- ↪ **ACIDEZ TOTAL:** se considera la suma de la acidez libre y de la acidez lactónica.

1.3. ÁCIDOS ORGÁNICOS EN LA MIEL

Los ácidos orgánicos se encuentran en una pequeña proporción (< 0.5%), sin embargo su estudio es importante porque son uno de los grupos de constituyentes que contribuyen a muchas de las propiedades de la miel, como su sabor y aroma particular, color, acidez o, en menor medida, conductividad eléctrica.

Además son, junto con la concentración de azúcares y el peróxido de hidrógeno (producido en la formación del ácido glucónico), la causa de la excelente resistencia de la miel al ataque de los microorganismos (*White, 1979b*).

En la miel se han identificado, por lo menos, 19 ácidos, con grados variables de certidumbre, conocidos y probablemente presentes (*Crane, 1990*). En la Tabla III se recoge una relación de los mismos.

Tabla III. Ácidos orgánicos en la miel (*Crane, 1990*)

CONOCIDOS	PROBABLEMENTE PRESENTES
ACÉTICO	α - o β -GLICEROFOSFATO
BUTÍRICO	GLICÓLICO
CÍTRICO	GLUCOSA-6-FOSFATO
FÓRMICO	2- ó 3-FOSFOGLICÉRICO
FUMÁRICO	PIRÚVICO
GLUCÓNICO	
α -KETOGLUTÁRICO	
LÁCTICO	
MALEICO	
MÁLICO	
OXÁLICO	
PIROGLUTÁMICO	
SUCCÍNICO	
TARTÁRICO	

De todos estos ácidos orgánicos, el ácido glucónico es el predominante en la miel (*Stinson et al., 1960*) y no el cítrico ni el málico como se pensaba anteriormente (*Nelson y Mottern, 1931*). El ácido glucónico, en equilibrio con la gluconolactona, se encuentra presente en todas las mieles, en unas concentraciones muy superiores a los demás, del orden de g/kg de miel frente a los mg/kg de los restantes (*White, 1978*).

Por tanto, al hablar del origen de los ácidos orgánicos se va a distinguir entre el ácido glucónico y el resto de los ácidos.

En cuanto al **origen del ácido glucónico**, éste se produce por 2 fuentes principales:

- ↪ Por la acción de la enzima glucosa oxidasa, aportada por la abeja, sobre la glucosa del néctar, según se muestra en la Figura 12 (*White, 1978*).

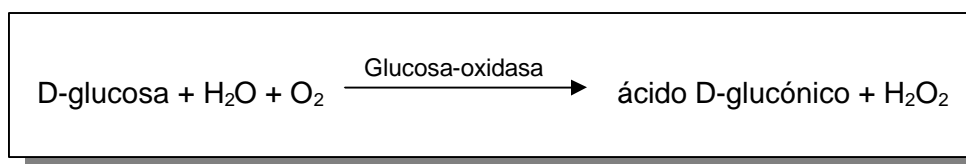

















Figura 12. Reacción de formación del ácido D-glucónico en la miel.

- ↪ Por la actividad metabólica de ciertas bacterias del género *Gluconobacter*, presentes en el intestino de la abeja y en la miel en maduración que son capaces de producir grandes cantidades de ácido glucónico a elevadas concentraciones de glucosa y en ambientes aerobios. Por tanto, parte de este ácido tiene un origen bacteriano (*Ruiz-Argüeso y Rodríguez-Navarro, 1973*).

La variación en las cantidades del ácido glucónico depende del tiempo necesario para que el néctar se transforme completamente en miel, cuanto mayor sea éste, mayor será la adición de glucosa oxidasa por parte de la abeja, y mayor será, por tanto, la cantidad de ácido glucónico. Otros factores interrelacionados que también influyen son: la fortaleza de la colonia y la calidad y cantidad del néctar que llega a la colmena (*White, 1979a*).

El **origen de los otros ácidos orgánicos** de la miel no es del todo conocido, aunque parece que muchos de ellos son intermediarios del Ciclo de Krebs o de otras rutas enzimáticas similares, en donde sufren diferentes procesos de oxidación. Se forman a partir de la glucosa, fructosa y sacarosa del néctar, mediante la acción de enzimas secretadas por las abejas obreras. También pueden proceder directamente del néctar o del mielato (*Echigo y Takenaka, 1974; White, 1979a; FAO 1990*).

1.4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-  <http://www.mielso.es/es/lamiel.htm> (Figura 1)
-  <http://www.honeybee.com.au/Images/page2/lmgP27.html> (Figura 4)
-  <http://www.ameritech.net/users/xmeraw/bees.html> (Figura 5)
-  http://www.mapya.es/info/pags/anuar_01
-  <http://www.xunta.es/conselle/ag/orixe/meldegalicia/esp/nuestramiel.html>
-  AGA (ASOCIACIÓN GALEGA DE APICULTORES). Mel de calidade. *Abelleira*. **1998**. N° especial de invierno. pp. 60.
-  ANKLAM, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem.* **1998**, 63 (4), 549-562.
-  BOE (BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO). Orden del 5 de agosto, por la que se aprueba la norma de calidad para la miel destinada al mercado interior. Madrid. España. **1983**.
-  BOE (BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO). Real Decreto 1049/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Norma de calidad relativa a la miel. Madrid. España. **2003**.
-  BIANCHI, E. M. Determining the mineral (ash, %) content in honey by conductometric analysis. *Apiacta*. **1992**, XXVII, 19-24.
-  CODEX ALIMENTARIUS (FAO / WHO). Norma del Codex para la miel. CODEX STAN 12-1981. **1996** ver. 2.3 (Versión interna 2.04.03). GTI Publisher. Jouve S. A. París. Francia.
-  COMISIÓN INTERNACIONAL DE LA MIEL. La calidad de la miel y las normas internacionales. *Vida apícola*. **2000**, 100 (3-4), 48-55.
-  CRANE, E. The traditional hive products: honey and beeswax. En: *Bees and Beekeeping. Science, practice and world resources*. Ed. Heinemann Newnes. Oxford. UK. **1990**. pp. 388-451.
-  DOCE (DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS). Reglamento (CEE) 2081/92 del Consejo de 14 de julio de 1992, relativo a la protección de las indicaciones geográficas y las denominaciones de origen de los productos agrícolas y alimenticios. Bruselas. Bélgica. **1992**.
-  DOCE (DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS). Directiva 2001/110/CE del Consejo de 20 de diciembre de 2001, relativa a la miel. Bruselas. Bélgica. **2002**.
-  DOG (DIARIO OFICIAL DE GALICIA). Orden del 8 de febrero de 1989, por la que se aprueba el Reglamento de la Denominación "Producto Galego de Calidade-Mel de Galicia". Santiago de Compostela (A Coruña). España. **1989**. Corrección de errores (DOG del 14 de abril de 1989).

- DOG (DIARIO OFICIAL DE GALICIA). Orden del 1 de octubre de 1997, por la que se reconoce la Denominación Específica "Mel de Galicia" y se nombra su Consejo Regulador Provisional. Santiago de Compostela (A Coruña). España. **1997**.
- DOG (DIARIO OFICIAL DE GALICIA). Orden del 19 de febrero de 2003, por la que se aprueba el Reglamento de "Indicación Xeográfica Protexida Mel de Galicia" y su consejo regulador. Santiago de Compostela (A Coruña). España. **2003**.
- ECHIGO, T.; TAKENAKA, T. Production of organic acids in honey by honeybees. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*. **1974**, 48 (4), 225-230.
- FAO. *Control de calidad de la miel y la cera*. Boletín de Servicios Agrarios 68/3, Roma. Italia. **1990**.
- GONNET, M. *Le miel. Composition, propriétés et conservation*. 2^{ème} edition. Ed. Opida, I.N.R.A. Station expérimentale d'apiculture. Montfavet. La France. **1982**. pp. 1-30.
- LOUVEAUX, J. Le miel. *Cah. Nutr. Diet*. **1985**, 20 (1), 57-70.
- MAURIZIO, A. How bees make honey. En: *Honey: A Comprehensive Survey*. (Crane, E.). Ed. Heinemann. London. UK. **1979**. pp 83-97.
- MAPA (MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN). *Anuario de Estadísticas Agroalimentarias*. Ed. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. España. **2001**.
- McGREGOR, S. E. *La Apicultura en los Estados Unidos*. Ed. Limusa. México. **1979**.
- NELSON, E. K.; MOTTERN, H. H. Some organic acids in honey. *Ind. Eng. Chem*. **1931**, 23 (3), 335.
- ORTIZ, A.; FERNÁNDEZ, M. C.; SUBRÁ, E. *Principales Características de la Miel de la Alcarria*. Ed. Consejería de Agricultura y Medio Ambiente de la Junta de Comunidades de Castilla – La Mancha. Toledo. España. **1996**.
- PIANA, G.; RICCIARDELLI D'ALBORE, G.; ISOLA, A. *La miel*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. España. **1989**. pp. 14-67.
- ROBLES, E. M.; SALVACHÚA, J. C. Los alimentos de las abejas. En: *Alimentación de las abejas. Aplicación práctica de los fundamentos fisiológicos de la nutrición*. Ed. Egido – Almazán. España. **1999**. pp. 61.
- ROOT, A. I. *ABC y XYZ de la apicultura*. 10 ed. Ed. Librería Hachette, S. A. Buenos Aires. Argentina. **1976**. pp. 129, 368-374
- RUIZ-ARGÜESO, T.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. Gluconic acid-producing bacteria from honeybees and ripening honeys. *J. Gen. Microbiol*. **1973**, 76 (Pt.1), 211-216.
- SANCHO, M. T.; MUNIATEGUI, S.; SÁNCHEZ, M. P.; HUIDOBRO, J. F.; SIMAL, J. Relationships between electrical conductivity and total and sulphated ash contents in Basque honeys. *Apidologie*. **1991**, 22, 487-494.

- 📖 SÁNCHEZ, M. P. *Evolución de la actividad de las principales enzimas de la miel "Producto Galego de Calidade-Mel de Galicia"*. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Área de Nutrición y Bromatología. Universidad de Santiago de Compostela. España. **1999**.
- 📖 SANZ, S.; PÉREZ, C.; HERRERA, A.; SANZ, M.; JUAN, T. Composición de las mieles de la Rioja. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. **1994**, 34 (5), 540-552.
- 📖 STINSON, E. E.; SUBERS, M. H.; PETTY, J.; WHITE, J. W. Jr. The composition of honey. V. Separation and identification of the organic acids. *Arch. of Biochem. and Biophys.* **1960**, 89, 6-12.
- 📖 VORWOHL, G. Die Beziehung zwischen der elektrischen Leitfähigkeit der Honige und ihrer trachtmässigen Herkunft. En: *Ann. de Abeille*. **1964**. vol 7 (4), pp. 301-309.
- 📖 WHITE, J. W. Jr. Honey. En: *Advances in Food Research*. Ed. Board. Academic Press. New York. USA. **1978**. vol. 24, pp. 287-364.
- 📖 WHITE, J. W. Jr. Composition of honey. En: *Honey: A Comprehensive Survey*. (Crane, E.). Ed. Heinemann. London. UK. **1979a**. pp 157-206.
- 📖 WHITE, J. W. Jr. Composición y propiedades de la miel. En: *La Apicultura en los Estados Unidos*. (McGregor, S. E.) Ed. Limusa. México. **1979b**. pp 57-66.
- 📖 YÁÑEZ, A. *Apicultura e produción apícola en Galicia*. Tesis Doctoral. Escuela Politécnica Superior de Lugo. Departamento de Producción Vegetal. Universidad de Santiago de Compostela. España. **2001**.

ESTUDIO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS
NO AROMÁTICOS EN LA MIEL



CAPÍTULO 2

OBJETO DEL TRABAJO



- ❑ Poner a punto técnicas de determinación de ácidos orgánicos no aromáticos: métodos enzimáticos, de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y de electroforesis capilar (CE).
- ❑ Comparar las técnicas de análisis de los ácidos orgánicos no aromáticos con el fin de determinar cual es la más apropiada para la cuantificación de cada ácido en particular.
- ❑ Determinar parámetros físico químicos relacionados, según la bibliografía, con los ácidos orgánicos: conductividad eléctrica, pH y tipos de acidez (acidez libre, lactónica y total) en mieles de diferentes orígenes botánicos y geográficos.
- ❑ Determinar el contenido de los ácidos orgánicos no aromáticos en mieles de diferentes orígenes botánicos y geográficos.
- ❑ Estudiar el efecto del almacenamiento sobre los ácidos orgánicos no aromáticos y sobre los parámetros físico químicos relacionados con ellos, durante un período de dos años y a intervalos de cuatro meses para establecer, si es posible, una cinética a la que se ajusten los resultados obtenidos.
- ❑ Comparar los diferentes parámetros analizados con el fin de encontrar relaciones entre los mismos.
- ❑ Llevar a cabo un análisis multivariante utilizando los resultados obtenidos en la determinación de los ácidos orgánicos no aromáticos y parámetros físico químicos relacionados con ellos para:
 - Diferenciar mieles de Galicia con Denominación según la provincia de procedencia del envasador, por una parte, y según su espectro polínico, por otra.
 - Diferenciar mieles de Galicia con Denominación de las procedentes de otras zonas de España.

ESTUDIO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS
NO AROMÁTICOS EN LA MIEL



CAPÍTULO 3

MUESTRAS



3.1. ORIGEN GEOGRÁFICO Y BOTÁNICO DE LAS MUESTRAS

3.1.1. *MIELES DE GALICIA CON DENOMINACIÓN*

El estudio se ha realizado en **50 muestras** de miel, todas ellas, con Denominación “Producto Galego de Calidade-Mel de Galicia” (DOG, 1989), lo que garantiza su origen. Las muestras corresponden a la cosecha de 1997. No se dispuso de las mieles para el análisis hasta finales del mes de diciembre.

En la Figura 13 aparece recogida la procedencia geográfica de los envasadores de las mieles gallegas analizadas. Se observa que **15** muestras proceden de la provincia de **A Coruña**, **17** de la provincia de **Lugo**, **8** de la provincia de **Ourense** y **10** de la provincia de **Pontevedra**.



Figura 13. Distribución geográfica de las mieles de Galicia con Denominación.

El espectro polínico se ha determinado de acuerdo con el procedimiento seguido por *Louveaux et al. (1978)*, después de tratar el sedimento de las mieles usando el método de *Terradillos et al. (1994)*.

Según *Louveaux et al. (1978)* una miel se considera *monofloral* cuando tiene al menos un 45% de pólenes de una misma planta. Sin embargo, en algunos casos, es necesario corregir este porcentaje por la relación entre el polen y el néctar aportados, tanto para aumentarlo (*Castanea sativa* Miller, monofloral si presenta un porcentaje de pólenes mayor de 90%) como para disminuirlo (*Salvia* sp. o *Citrus* sp., monoflorales si presentan un porcentaje de pólenes entre 10 y 20%). Por el contrario, si no existe ningún polen predominante, la miel se considerará *multifloral*.

El análisis del polen de las mieles de Galicia con Denominación mostró que todas son florales, siendo la mitad de las mieles, 25 muestras, monoflorales (**3 de *Castanea sativa* Miller, 21 de *Eucalyptus* sp. y 1 de *Trifolium* sp.**) y la otra mitad, **multiflorales** (Tabla IV).

A la vista de los resultados, hay que destacar, por una parte, que las mieles monoflorales más abundantes en Galicia son las de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) y que proceden de todas las provincias gallegas excepto de la de Ourense. Este aumento en la producción de miel de eucalipto puede ser resultado de las intensivas repoblaciones practicadas, sobre todo, en la costa gallega y que han supuesto el desplazamiento de especies autóctonas (*Jato et al., 1991; Seijo et al., 1997*).

Por otra parte, se observa que las 3 únicas mieles monoflorales de castaño (*Castanea sativa* Miller) proceden de la provincia de Ourense. En general, las mieles de castaño son propias de las regiones montañosas de la zona este del interior de Galicia, en particular, de las zonas del Caurel, del valle del Sil y del Miño y de la zona este de la provincia de Ourense (*Jato et al., 1991; Seijo et al., 1997*).

Ambas situaciones no son exclusivas de esta cosecha sino que se han repetido en cosechas anteriores de mieles con Denominación "Producto Galego de Calidade-Mel de Galicia" como, por ejemplo, en la cosecha de 1992 (*Val et al., 1998*) y en la de 1995 (*Sánchez, 1999*). Estos estudios junto con otros llevados a cabo, en mieles gallegas, por diferentes autores como *Terradillos (1988)*, *Seijo (1994)* y *Seijo et al. (1997)* ponen de manifiesto que existe una clara diferencia entre la flora de la zona costera y la del interior de Galicia.

Las mieles monoflorales de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) y las de castaño (*Castanea sativa* Miller) procedentes de Galicia se pueden diferenciar de las de otras regiones de España, por la ausencia o baja presencia de pólenes comunes de especies mediterráneas como *Lavandula stoechas*, *Cistus ladanifer*, *Olea europaea* y *Citrus* sp. (Seijo et al., 1997).

Según consta en el último Reglamento de la “Indicación Xeográfica Protexida-Mel de Galicia”, el espectro polínico de las mieles amparadas a este Reglamento deberá corresponder al propio de la flora de Galicia (DOG, 2003). Las mieles gallegas presentan como pólenes más característicos los de *Castanea sativa*, *Eucalyptus* sp., *Rubus* sp., *Cytisus* sp., *Ericaceae*, *Campanula*, *Scrophularia*, *Echium*, *Lotus* sp., *Centaurea*, *Quercus* sp. o *Trifolium* sp. que en su conjunto representan más del 90% del espectro polínico (Seijo et al., 1995). En ningún caso la combinación polínica *Helianthus annuus*-*Olea europaea*-*Cistus ladanifer*, típica de otras mieles españolas, superará el 5% del espectro polínico total (DOG, 2003). Esto se cumple en todas las muestras de Galicia con Denominación analizadas en este trabajo, ya que no se observa ningún polen de *Lavandula* sp., *Olea europaea* ni de *Citrus* sp. Sólo aparecen pólenes de *Cistus ladanifer* en 4 de las 50 mieles, aunque su proporción es inferior al 1%.



Tabla IV. Origen geográfico del envasador y espectro polínico de las mieles de Galicia con Denominación ordenadas según su espectro polínico

NÚMERO DE MUESTRA	ORIGEN GEOGRÁFICO DEL ENVASADOR		ESPECTRO POLÍNICO
	LOCALIDAD	PROVINCIA	
1	Viana do Bolo	Ourense	<i>Castanea sativa</i> Miller
2	Rubia	Ourense	<i>Castanea sativa</i> Miller
3	Rubia	Ourense	<i>Castanea sativa</i> Miller
4	A Coruña	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.
5	Melide	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.
6	Negreira	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.
7	Ferrol	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.
8	Ordes	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.
9	A Capela	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.
10	Arzua	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.
11	Frades	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.
12	Santiago	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.
13	Ames	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.
14	Mondoñedo	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.
15	Mondoñedo	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.
16	Barreiros	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.
17	Burela	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.
18	Lourenzá	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.
19	Barreiros	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.
20	Vigo	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.
21	Poio	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.
22	Moaña	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.
23	Pontevedra	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.
24	Vigo	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.
25	As Nogais	Lugo	<i>Trifolium</i> L. sp.
26	Fene	A Coruña	multifloral
27	Santiago	A Coruña	multifloral
28	Santiago	A Coruña	multifloral
29	Ortigueira	A Coruña	multifloral
30	A Coruña	A Coruña	multifloral
31	Lugo	Lugo	multifloral
32	Chantada	Lugo	multifloral
33	Cervantes	Lugo	multifloral
34	Quiroga	Lugo	multifloral
35	Xermade	Lugo	multifloral
36	Barreiros	Lugo	multifloral
37	Cospeito	Lugo	multifloral
38	Portomarín	Lugo	multifloral
39	Taboada	Lugo	multifloral
40	Quiroga	Lugo	multifloral
41	Ourense	Ourense	multifloral
42	Rios	Ourense	multifloral
43	A Gudiña	Ourense	multifloral
44	Rubia	Ourense	multifloral
45	Baltar	Ourense	multifloral
46	A Golada	Pontevedra	multifloral
47	Lalín	Pontevedra	multifloral
48	Poio	Pontevedra	multifloral
49	Nigrán	Pontevedra	multifloral
50	Lalín	Pontevedra	multifloral

3.1.2. MIELES PROCEDENTES DE OTRAS ZONAS DE ESPAÑA

Se han analizado **25 muestras** de otras regiones de España con una importante producción como son Castilla y León, Castilla La Mancha, Comunidad Valenciana y Extremadura. Las muestras se han elegido siempre y cuando en su etiqueta se indicara que la miel era producida en España y no era “mezcla de mieles de diferentes países”. Para realizar este trabajo, se han adquirido todas las mieles de la cosecha de 1999 disponibles por el consumidor durante el mes de enero del año 2000 en establecimientos comerciales de Santiago de Compostela.

En la Figura 14 se indica la procedencia de los envasadores de las mieles analizadas de diferentes zonas de España. Si se agrupan las muestras por comunidades autónomas, se observa que **8** muestras proceden de la Comunidad Autónoma de **Castilla y León**, **7** de **Castilla La Mancha**, **8** de la **Comunidad Valenciana** y **2** de **Extremadura**.



Figura 14. Distribución geográfica de las mieles procedentes de otras zonas de España.

Tanto las mieles procedentes de Castilla La Mancha como las de Extremadura pertenecen a Denominaciones de Origen y más concretamente a las Denominaciones de Origen “Miel de la Alcarria” (DOCM, 1992; BOE, 1993) y “Villuercas-Ibores” (DOE, 1987 y 1999), respectivamente.

Para la determinación del espectro polínico se ha seguido, al igual que en las mieles de Galicia con Denominación, el procedimiento desarrollado por Louveaux *et al.* (1978), después de tratar el sedimento de las mieles usando el método de Terradillos *et al.* (1994).

En el caso de las mieles procedentes de otras regiones de España, el análisis polínico determinó que **23** muestras son **florales** y **2** son de **bosque** (mezcla de miel de flores y miel de mielada). Entre las muestras de origen floral, hay 17 monoflorales y 6 multiflorales. En la Tabla V se puede observar la gran variedad de especies dentro del grupo de las mieles monoflorales, siendo las de *Rosmarinus* sp. (romero) y de *Lavandula* sp. (espliego, lavanda, etc) las predominantes, ya que representan algo más del 50% de las mieles monoflorales analizadas y del 36% del total de muestras.

Tabla V. Origen geográfico del envasador y espectro polínico de las mieles procedentes de otras zonas de España ordenadas según su espectro polínico

NÚMERO DE MUESTRA	ORIGEN GEOGRÁFICO DEL ENVASADOR			ESPECTRO POLÍNICO
	LOCALIDAD	PROVINCIA	COMUNIDAD AUTÓNOMA	
1	Cebreros	Ávila	Castilla y León	<i>Citrus</i> sp.
2	Alzamora	Castellón	Comunidad Valenciana	<i>Citrus</i> sp.
3	Moraleja del Vino	Zamora	Castilla y León	<i>Diploaxis</i> sp.
4	Humanes de Mohernando	Guadalajara	Castilla La Mancha	<i>Echium</i> sp.
5	Cebreros	Ávila	Castilla y León	<i>Erica</i> sp.
6	Alzamora	Castellón	Comunidad Valenciana	<i>Eucalyptus</i> sp.
7	Alzamora	Castellón	Comunidad Valenciana	<i>Eucalyptus</i> sp.
8	Humanes de Mohernando	Guadalajara	Castilla La Mancha	<i>Lavandula</i> sp.
9	Huelves	Cuenca	Castilla La Mancha	<i>Lavandula</i> sp.
10	Cebreros	Ávila	Castilla y León	<i>Lavandula</i> sp.
11	Humanes de Mohernando	Guadalajara	Castilla La Mancha	<i>Rosmarinus</i> sp.
12	Peñalver	Guadalajara	Castilla La Mancha	<i>Rosmarinus</i> sp.
13	Huelves	Cuenca	Castilla La Mancha	<i>Rosmarinus</i> sp.
14	Cebreros	Ávila	Castilla y León	<i>Rosmarinus</i> sp.
15	Alzamora	Castellón	Comunidad Valenciana	<i>Rosmarinus</i> sp.
16	Alzamora	Castellón	Comunidad Valenciana	<i>Rosmarinus</i> sp.
17	Caspueñas	Guadalajara	Castilla La Mancha	<i>Rosmarinus</i> sp. y <i>Trifolium</i> L. sp.
18	Cebreros	Ávila	Castilla y León	multifloral
19	Matarrosa del Sil	León	Castilla y León	multifloral
20	Alzamora	Castellón	Comunidad Valenciana	multifloral
21	Alzamora	Castellón	Comunidad Valenciana	multifloral
22	Cañamero	Cáceres	Extremadura	multifloral
23	Cañamero	Cáceres	Extremadura	multifloral
24	Cebreros	Ávila	Castilla y León	multifloral y de mielada
25	Alzamora	Castellón	Comunidad Valenciana	multifloral y de mielada

3.2. CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Todas las muestras, tanto las procedentes de Galicia como las de otras zonas de España, han sido suministradas en frascos de vidrio de 500 g o 1000 g con cierre hermético. Para facilitar tanto la toma de muestra para los diferentes análisis como la conservación, se han trasvasado porciones de aproximadamente 200 g a frascos de vidrio de 250 g de capacidad con tapón de plástico, perfectamente etiquetados, limpios y secos. El trasvase de la muestra se ha realizado tras una homogeneización mecánica de la miel, en ningún caso se ha llevado a cabo un calentamiento de la misma.

Durante todo el tiempo del estudio, las muestras han sido almacenadas en el laboratorio a una temperatura media de 20 °C (15-25 °C), en un ambiente libre de olores intensos y en la oscuridad.

3.3. TOMA DE MUESTRA

3.3.1. HOMOGENIZACIÓN

Esta etapa es fundamental para la obtención de unos resultados representativos por lo que debe llevarse a cabo en todos los análisis que se realicen en la miel.

Si la miel se encuentra totalmente líquida, basta con agitar con una espátula adecuada al tamaño de la muestra durante el tiempo suficiente. Si la miel se encuentra parcial o totalmente cristalizada es conveniente agitar, pero no durante un tiempo muy largo, usando para ello una espátula adecuada al tamaño de muestra. En el caso de que la miel se encuentre excesivamente consistente es necesario reblandecerla previamente en recipiente cerrado a una temperatura comprendida entre 25 y 30 °C, ambas inclusive (BOE, 1986).

3.3.2. LICUACIÓN

La licuación debe realizarse obligatoriamente cuando se lleven a cabo análisis de humedad y/o composición de azúcares. Para el resto de los análisis no es necesario. Hay que hacer constar que no debe practicarse bajo ningún concepto cuando se pretenda determinar el contenido en hidroximetilfurfural y/o la actividad enzimática.

Se toma una fracción de la muestra homogenizada, de tamaño adecuado, se introduce en un recipiente de vidrio pequeño y provisto de cierre hermético en donde se calienta hasta la fusión a la temperatura de 50 °C durante el mínimo tiempo necesario. Agitar de vez en cuando para favorecerla. Cuando la fusión se consiga, se saca del baño María en el que se encontraba la muestra y se enfría rápidamente (BOE, 1986).

3.3.3. LIMPIEZA

La limpieza de la miel debe realizarse cuando ésta se ve excesivamente sucia por trozos de cera, piedras, tierra, restos de insectos, etc. No debe practicarse en el caso de pretender determinar el contenido de sólidos insolubles.

Se calienta la muestra en baño María a unos 40 °C en recipiente de vidrio herméticamente cerrado. Posteriormente se filtra a través de una malla de luz de 200-250 µm por 200-250 µm, enfriando rápidamente el filtrado recogido.

Si se ha practicado anteriormente la licuación puede aprovecharse cuando la muestra se encuentre caliente para filtrarla y no volver a repetir el calentamiento. Cuando la miel se encuentra parcial o totalmente solidificada es necesario licuarla previamente a la filtración (BOE, 1986).

Hay que resaltar que en las muestras objeto de esta Tesis Doctoral no fue necesario realizar ninguna limpieza de la miel.



3.4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOE (BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO). Orden del 12 de junio, por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis para la miel. Madrid. España. **1986**.
- BOE (BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO). Orden del 3 de noviembre, por la que se ratifica el Reglamento de la Denominación de Origen "Miel de la Alcarria" y de su Consejo Regulador. Madrid. España. **1993**.
- DOCM (DIARIO OFICIAL DE CASTILLA LA MANCHA). Orden del 11 de noviembre de 1992, por la que se aprueba el Reglamento de la Denominación de Origen "Miel de la Alcarria" y de su Consejo Regulador. Toledo. España. **1992**.
- DOE (DIARIO OFICIAL DE EXTREMADURA). Orden del 16 de diciembre de 1987, por la que se reconoce con carácter provisional la Denominación de calidad de la miel "Villuercas-Ibores". Mérida (Badajoz). España. **1987**.
- DOE (DIARIO OFICIAL DE EXTREMADURA). Orden del 11 de enero de 1999, por la que se reconoce con carácter provisional la Denominación de Origen de Miel "Villuercas-Ibores". Mérida (Badajoz). España. **1999**.
- DOG (DIARIO OFICIAL DE GALICIA). Orden del 8 de febrero de 1989, por la que se aprueba el Reglamento de la Denominación "Producto Galego de Calidade-Mel de Galicia". Santiago de Compostela (A Coruña). España. **1989**. Corrección de errores (DOG del 14 de abril de 1989).
- DOG (DIARIO OFICIAL DE GALICIA). Orden del 19 de febrero de 2003, por la que se aprueba el Reglamento de "Indicación Xeográfica Protexida Mel de Galicia" y su consejo regulador. Santiago de Compostela (A Coruña). España. **2003**.
- JATO, M. V.; SALA-LLINARES, A.; IGLESIAS, M. I.; SUÁREZ-CERVERA, M. Pollens of honeys from north-western Spain. *J. Apic. Res.* **1991**, 30 (2), 69-73.
- LOUVEAUX, J.; MAURIZIO, A.; VORWOHL, G. Methods of Melissopalynology. *Bee World*. **1978**, 59 (4), 139-157.
- SÁNCHEZ, M. P. *Evolución de la actividad de las principales enzimas de la miel "Producto Galego de Calidade-Mel de Galicia"*. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Área de Nutrición y Bromatología. Universidad de Santiago de Compostela. España. **1999**.
- SEIJO, M. C. *Caracterización de la miel de Galicia a través del análisis polínico*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Departamento de Recursos Naturales y Medio Ambiente. Universidad de Vigo. España. **1994**.
- SEIJO, M. C.; AIRA, M. J.; JATO, M. V. *Así son os nosos meles*. Órgano Rector do Mel de Galicia "Producto Galego de Calidade" y Consellería de Agricultura, Gandería e Montes. Xunta de Galicia. España. **1995**.

- SEIJO, M. C.; JATO, M. V.; AIRA, M. J.; IGLESIAS, I. Unifloral honeys of Galicia (north-west Spain). *J. Apic. Res.* **1997**, 36 (2-3), 1331-1339.
- TERRADILLOS, L. A. *Estudio microscópico del sedimento de la miel y su aplicación en la caracterización de la miel en Galicia*. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Área de Nutrición y Bromatología. Universidad de Santiago de Compostela. España. **1988**.
- TERRADILLOS, L. A.; MUNIATEGUI, S.; SANCHO, M. T.; HUIDOBRO, J. F.; SIMAL-LOZANO, J. An alternative method for analysis of honey sediment. *Bee Science*. **1994**, 3 (2), 86-93.
- VAL, A; HUIDOBRO, J. F.; SÁNCHEZ, M. P.; MUNIATEGUI, S.; FERNÁNDEZ-MUIÑO, M. A.; SANCHO, M. T. Enzymatic determination of galactose and lactose in honey. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 1381-1385.



ESTUDIO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS
NO AROMÁTICOS EN LA MIEL



CAPÍTULO 4

**PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS
RELACIONADOS CON LOS ÁCIDOS
ORGÁNICOS**



4.1. CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA

4.1.1. INTRODUCCIÓN

La conductividad eléctrica es una propiedad física en la que se determina la capacidad de una solución de miel para conducir la corriente eléctrica. Como ya se ha comentado depende del contenido en sales minerales, y, en menor medida, del contenido en **ácidos orgánicos**, proteínas, azúcares y polioles de la miel (Crane, 1990).

La importancia de la conductividad eléctrica radica en que se relaciona con el contenido en cenizas, lo que permitiría estimar el origen botánico de la miel (floral o de mielada), orientar sobre cual ha sido la fuente de néctar y detectar si las abejas han sido alimentadas artificialmente con azúcar (Vorwohl, 1964; White, 1979a). Esto ha llevado a que muchos autores considerasen que la medida de la conductividad eléctrica debía introducirse en las normas internacionales de calidad de la miel. Bogdanov (1999) y el grupo de expertos que él coordina, la Comisión Internacional de la Miel, plantearon una nueva propuesta que recientemente ha sido adoptada por la legislación europea (DOCE, 2002) y posteriormente transpuesta a la legislación española (BOE, 2003). Como ya se ha comentado en el capítulo 1, en esta reglamentación se establecen nuevos criterios de calidad para la miel, entre los que se incluye la conductividad eléctrica. En las mieles de flores y en sus mezclas con miel de mielato se establecen unos valores de conductividad eléctrica $\leq 8.0 \cdot 10^{-4} \text{ S cm}^{-1}$, excepto en las mieles con una elevada variabilidad en los valores de conductividad eléctrica como son las de *Arbutus* sp., *Erica* sp., *Eucalyptus* sp., *Tilia* sp., *Calluna* sp., *Leptospermum* sp. y *Melaleuca* sp. o sus mezclas. Mientras que las mieles de mielada, así como las de castaño (*Castanea sativa* Miller) o sus mezclas presentan valores $\geq 8.0 \cdot 10^{-4} \text{ S cm}^{-1}$.

Vorwohl (1964) observó que mieles de un mismo origen floral tienen conductividades eléctricas muy semejantes a pesar de tener orígenes geográficos y condiciones climáticas diferentes. Esta gran similitud en los promedios de la conductividad eléctrica se puede comprobar en la Tabla VI donde aparecen recogidos datos de conductividad eléctrica en algunas mieles monoflorales obtenidos por diferentes autores y clasificados según su origen botánico. En dicha tabla, se observa, como las mieles de castaño (*Castanea sativa* Miller) poseen valores promedios superiores a $8.0 \cdot 10^{-4} \text{ S cm}^{-1}$ mientras que las mieles de brezo (*Erica* sp.) presentan una gran variabilidad de valores medios (5.4 a $9.8 \cdot 10^{-4} \text{ S cm}^{-1}$). El resto de las mieles monoflorales, incluidas las de eucalipto (*Eucalyptus* sp.), presentan valores de conductividad eléctrica media $\leq 8.0 \cdot 10^{-4} \text{ S cm}^{-1}$, lo que está de acuerdo con lo establecido en la legislación (DOCE, 2002; BOE, 2003).

Tabla VI. Estudios de conductividad eléctrica en mieles monoflorales

Origen botánico	Número de muestras	Conductividad eléctrica (10^{-4} S cm^{-1}) ^a	Procedencia geográfica	Autor/es
<i>Castanea sativa</i> Miller	200	14.1 ± 2.6	Italia	Accorti et al. (1986)
	35	15.1 ± 2.3	Italia	Piazza et al. (1986)
	180	14.1 ± 2.4	Italia	Persano Oddo et al. (1995)
	13	15.4 ± 3.2	Grecia	Thrasylvoulou y Manikis (1995)
<i>Citrus</i> sp.	23	1.8 ± 0.4	España	Bosch y Mateo (1984)
	40	1.7 ± 0.4	Italia	Accorti et al. (1986)
	22	2.1 ± 0.3	España	Serra-Bonheví et al. (1987)
	105	1.7 ± 0.4	Italia	Persano Oddo et al. (1995)
	17	1.9 ± 3.8	Grecia	Thrasylvoulou y Manikis (1995)
	15	1.8 ± 0.1	España	Mateo y Bosch-Reig (1998)
<i>Echium</i> sp.	1	3.8	España	Sanz et al. (1994)
	1	4.0	España	Pérez-Arquillué et al. (1995)
<i>Erica</i> sp.	11	7.8 ± 0.9	España	Bosch y Mateo (1984)
	28	6.7 ± 1.1	Italia	Accorti et al. (1986)
	20	5.4 ± 1.1	Portugal	Andrade (1995)
	31	6.7 ± 1.0	Italia	Andrade et al. (1999)
	20	6.7 ± 1.6	Italia	Persano Oddo et al. (1995)
	12	9.8 ± 0.3	Grecia	Thrasylvoulou y Manikis (1995)
<i>Eucalyptus</i> sp.	10	4.4 ± 1.1	España	Mateo y Bosch-Reig (1998)
	65	5.1 ± 0.9	Italia	Bosch y Mateo (1984)
	36	5.9 ± 1.0	Italia	Accorti et al. (1986)
	25	4.5 ± 0.6	España	Serra-Bonheví (1989)
	86	5.0 ± 0.8	España	Martínez Gómez et al. (1993)
	12	4.7 ± 0.3	Italia	Persano Oddo et al. (1995)
<i>Lavandula latifolia</i> Med.	9	2.7 ± 0.9	España	Mateo y Bosch-Reig (1998)
	22	4.2 ± 1.7	España	Bosch y Mateo (1984)
	12	2.7 ± 0.3	España	Serra-Bonheví et al. (1987)
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	11	1.4 ± 0.4	España	Mateo y Bosch-Reig (1998)
	17	2.2 ± 0.7	España	Bosch y Mateo (1984)
	19	1.6 ± 0.1	España	Serra-Bonheví et al. (1987)
	27	1.6 ± 0.1	España	Pérez et al. (1990)
	13	1.7 ± 0.1	España	Pérez-Arquillué et al. (1994)

^a Media ± SD

4.1.2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

En 1931, Stitz y Szigvárt midieron la conductividad eléctrica de diversas mieles en soluciones al 50% a 20.5 °C y encontraron rangos de 0.9 a 3.6 10^{-4} S cm^{-1} . En general, los valores de este parámetro se incrementaban con los contenidos en sales minerales. Estos autores también estudiaron los efectos de la temperatura y concentración observando que

los valores máximos de conductividad eléctrica se presentaban con valores de 30-35% de sólidos.

Vorwohl (1964), sin embargo, propuso la medida de la conductividad eléctrica a 20 °C en soluciones al 20% en materia seca ya que encontró valores máximos de este parámetro cuando la solución contenía entre el 20 y el 25% de sólidos. A partir de entonces, otros investigadores han medido la conductividad eléctrica de la miel siguiendo el procedimiento recomendado por *Vorwohl (1964)* que hoy es oficial en numerosos países (*Codex Alimentarius, 1996*), entre ellos España (*BOE, 1986*).

Sancho et al. (1991a) simplificaron la medida de la conductividad eléctrica, al relacionar la conductividad eléctrica de la solución obtenida al disolver 10.00 g de miel en 75 mL de agua, que es la empleada para la determinación del pH y tipos de acidez (*AOAC, 1999*), con la conductividad eléctrica de la miel al 20% en materia seca (*Vorwohl, 1964*). La relación encontrada entre ambos métodos fue de $y = 1.50 x$ con un coeficiente de correlación de 0.9998 (donde y = conductividad en materia seca; x = conductividad en materia húmeda). De esta forma se pueden determinar la conductividad eléctrica, el pH y los tipos de acidez en la misma disolución sin necesidad de determinar el contenido en agua de la miel.

4.1.3. PARTE EXPERIMENTAL

4.1.3.1. FUNDAMENTO

Mediante un puente de Wheatstone y una célula de conductividad apropiada se determina a 20 °C la conductividad eléctrica, por comparación, de la muestra con una solución de cloruro potásico.

4.1.3.2. MATERIAL Y APARATOS

- ✓ Conductímetro Radiometer Copenhagen CDM 2e N° 187049.
- ✓ Electrodo Radiometer Copenhagen Tipo CDC 104 de 1.0 cm.
- ✓ Baño ultratermostático Haake Tipo NBS.
- ✓ Termómetro Jeaner Normalglas de 100 °C con sensibilidad de ± 0.1 °C.
- ✓ Material de vidrio de uso común en el laboratorio.

4.1.3.3. REACTIVOS

- ↪ Cloruro de potasio p.a. ACS ISO Merck Art. 104933.
- ↪ Agua Milli-Q Millipore.

4.1.3.4. PROCEDIMIENTO

Se ha utilizado el método desarrollado por *Sancho et al. (1991a)* que consiste en disolver 10.00 g de miel en 75 mL de agua Milli-Q y medir directamente la conductividad eléctrica a 20 °C. Previamente se ha calibrado el conductímetro a 20 °C con soluciones de cloruro de potasio siguiendo el procedimiento de la Comisión Internacional de la Miel (*Bogdanov et al., 1997*).

4.1.3.5. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Para comparar los resultados obtenidos con los de otros autores se ha multiplicado la conductividad en materia húmeda por 1.50, expresándose la conductividad eléctrica en materia seca, según la relación encontrada por *Sancho et al. (1991a)*.

La conductividad eléctrica en la miel se expresa en 10^{-4} S cm^{-1} equivalente a 0.1 mS cm^{-1} , unidades utilizadas en la reciente legislación europea (*DOCE, 2002*).

4.1.3.6. PRECISIÓN

Sancho et al. (1991a) comprobaron la precisión del método, obteniendo un coeficiente de variación (RSD%) de 0.86%, para una muestra cuyo valor medio era $3.7 \cdot 10^{-4}$ S cm^{-1} .

4.1.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.4.1. MIELES DE GALICIA CON DENOMINACIÓN

En la Tabla VII se encuentran recogidos los resultados de la determinación de la conductividad eléctrica (10^{-4} S cm^{-1}) en las 50 mieles de Galicia con Denominación analizadas. El promedio obtenido ha sido de $6.6 \cdot 10^{-4}$ S cm^{-1} , con una desviación estándar de $3.5 \cdot 10^{-4}$ S cm^{-1} y con un valor mínimo y máximo de 3.6 y $19.9 \cdot 10^{-4}$ S cm^{-1} , respectivamente.

Estos valores de conductividad eléctrica son semejantes a los encontrados por *Sancho et al. (1991a)*, con un valor medio de $6.7 \cdot 10^{-4}$ S cm^{-1} en mieles del País Vasco y por *Kohlich y Krenn (1985)* y *Accorti et al. (1986)* en mieles de otros países, con valores medios de 6.9 y $6.3 \cdot 10^{-4}$ S cm^{-1} , respectivamente. Sin embargo son superiores a los obtenidos en mieles de Extremadura, con un valor medio de $5.0 \cdot 10^{-4}$ S cm^{-1} (*Riolobos, 1990*); en mieles de La Rioja, con un valor medio de $4.4 \cdot 10^{-4}$ S cm^{-1} (*Sanz et al., 1994*); en mieles de Castilla-La Mancha (La Alcarria) con un valor medio de $2.4 \cdot 10^{-4}$ S cm^{-1} (*Ortiz et al., 1996*) y en mieles de las Islas Canarias, con un valor medio de $4.9 \cdot 10^{-4}$ S cm^{-1} (*Sanjuán et al., 1997*).

Tabla VII. Conductividad eléctrica (10^{-4} S cm^{-1}) de las mieles de Galicia con Denominación ordenadas según su espectro polínico

Número de muestra	Provincia del envasador	Espectro polínico	Conductividad eléctrica (10^{-4} S cm^{-1})
1	Ourense	<i>Castanea sativa</i> Miller	10.3
2	Ourense	<i>Castanea sativa</i> Miller	19.9
3	Ourense	<i>Castanea sativa</i> Miller	17.9
4	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	4.5
5	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	4.3
6	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	4.3
7	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	4.5
8	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	4.4
9	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	4.7
10	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	4.4
11	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	4.4
12	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	4.1
13	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	3.6
14	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	5.3
15	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	5.0
16	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	5.3
17	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	5.4
18	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	5.6
19	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	5.5
20	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.	3.9
21	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.	4.5
22	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.	4.3
23	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.	3.6
24	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.	4.3
25	Lugo	<i>Trifolium</i> L. sp.	4.0
26	A Coruña	multifloral	6.4
27	A Coruña	multifloral	7.1
28	A Coruña	multifloral	7.1
29	A Coruña	multifloral	6.4
30	A Coruña	multifloral	6.4
31	Lugo	multifloral	5.1
32	Lugo	multifloral	9.0
33	Lugo	multifloral	7.7
34	Lugo	multifloral	6.6
35	Lugo	multifloral	4.9
36	Lugo	multifloral	3.6
37	Lugo	multifloral	6.1
38	Lugo	multifloral	5.5
39	Lugo	multifloral	6.2
40	Lugo	multifloral	6.6
41	Ourense	multifloral	6.1
42	Ourense	multifloral	10.8
43	Ourense	multifloral	8.9
44	Ourense	multifloral	17.2
45	Ourense	multifloral	9.4
46	Pontevedra	multifloral	5.4
47	Pontevedra	multifloral	7.2
48	Pontevedra	multifloral	7.5
49	Pontevedra	multifloral	7.1
50	Pontevedra	multifloral	5.6
MEDIA			6.6
SD			3.5
RSD%			52.9
V _{mín}			3.6
V _{máx}			19.9

En la Figura 15 se representa la distribución de conductividad eléctrica de las mieles analizadas. En dicha figura se observa como la mayor parte de las muestras presentan una conductividad eléctrica comprendida entre 4.0 y 8.0 10^{-4} S cm^{-1} .

Ninguna miel presenta valores de conductividad eléctrica menores de 1.0 10^{-4} S cm^{-1} , lo que indica que las abejas no han sido alimentadas artificialmente con jarabes azucarados (White, 1979a).

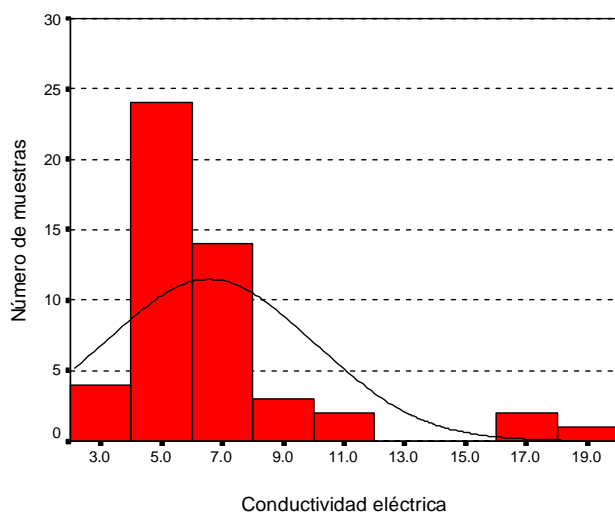


Figura 15. Distribución de la conductividad eléctrica (10^{-4} S cm^{-1}) en las mieles de Galicia con Denominación.

4.1.4.1.1. INFLUENCIA DE LA PROVINCIA DE PROCEDENCIA DEL ENVASADOR EN LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA

Se comprueba que las provincias de A Coruña, Lugo y Pontevedra poseen una conductividad eléctrica media similar en tanto que la provincia de Ourense presenta una mayor conductividad eléctrica media, concretamente más del doble. Esta misma tendencia se observa también en los valores mínimo y máximo. Asimismo, se puede destacar que la mayor variabilidad en la conductividad eléctrica la presenta la provincia de Ourense (Tabla VIII y Figura 16).

Provincia procedencia envasador	N	Conductividad eléctrica (10^{-4} S cm^{-1}) [*]
A Coruña	15	5.1 ± 1.2 (3.6-7.1)
Lugo	17	5.7 ± 1.3 (3.6-9.0)
Ourense	8	12.6 ± 5.0 (6.1-19.9)
Pontevedra	10	5.3 ± 1.5 (3.6-7.5)

* MEDIA \pm SD (V_{mín}-V_{máx})

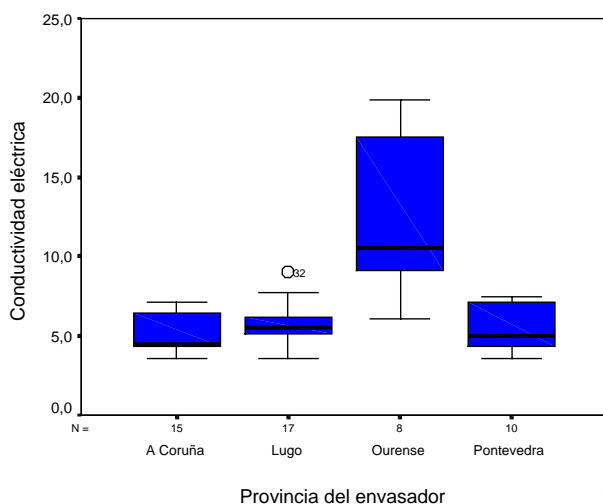


Figura 16. Distribuciones de la conductividad eléctrica (10^{-4} S cm^{-1}) en las mieles de Galicia con Denominación según la provincia de procedencia del envasador.

4.1.4.1.2. INFLUENCIA DEL ESPECTRO POLÍNICO EN LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA

En la Tabla IX y en la Figura 17 se observa que las mieles de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) presentan los valores más bajos de conductividad eléctrica. Por el contrario, las mieles de castaño (*Castanea sativa* Miller) son las que presentan los mayores valores, siendo todos ellos superiores a $8.0 \cdot 10^{-4}$ S cm^{-1} , como indica la legislación actualmente vigente (DOCE, 2002; BOE, 2003).

El valor medio de conductividad eléctrica de las mieles de *Castanea sativa* Miller obtenido en este trabajo es ligeramente superior al de la bibliografía consultada (Tabla VI), con valores medios comprendidos entre 14.1 y $15.4 \cdot 10^{-4}$ S cm^{-1} mientras que el valor medio de conductividad eléctrica de las mieles de *Eucalyptus* sp. se encuentra entre los obtenidos por otros autores (Tabla VI), con valores medios entre 4.4 y $5.9 \cdot 10^{-4}$ S cm^{-1} . No se han encontrado datos en la bibliografía consultada de conductividad eléctrica en las mieles monoflorales de trébol (*Trifolium L. sp.*). En el caso de las mieles multiflorales, el rango de

conductividad eléctrica es bastante amplio, como corresponde a un grupo más heterogéneo de mieles. Todas ellas presentan valores inferiores a $8.0 \cdot 10^{-4} \text{ S cm}^{-1}$ (DOCE, 2002; BOE, 2003), con excepción de las muestras 32, 42, 43, 44 y 45 que, aunque son multiflorales, presentan una elevada proporción de pólenes de *Castanea sativa* Miller. Concretamente la muestra 44, que posee una conductividad eléctrica similar a la de las muestras de castaño ($17.2 \cdot 10^{-4} \text{ S cm}^{-1}$), y que en la Figura 17 aparece como un valor extremo u “outlier”, tiene una proporción de pólenes de *Castanea sativa* Miller de aproximadamente el 87%. Por tanto estas muestras multiflorales cumplirían la legislación vigente ya que se pueden englobar en el grupo de mieles con mezcla de castaño, lo que implica que su conductividad eléctrica debe ser superior a $8.0 \cdot 10^{-4} \text{ S cm}^{-1}$ (DOCE, 2002; BOE, 2003).

Espectro polínico	N	Conductividad eléctrica ($10^{-4} \text{ S cm}^{-1}$) [*]
<i>Castanea sativa</i> Miller	3	16.0 ± 5.1 (10.3-19.9)
<i>Eucalyptus</i> sp.	21	4.6 ± 0.6 (3.6-5.6)
<i>Trifolium</i> L. sp.	1	4.0
multifloral	25	7.2 ± 2.6 (3.6-17.2)

^{*} MEDIA ± SD (V_{mín}-V_{máx})

Tabla IX. Estadísticos de la conductividad eléctrica ($10^{-4} \text{ S cm}^{-1}$) en las mieles de Galicia con Denominación agrupados según el espectro polínico

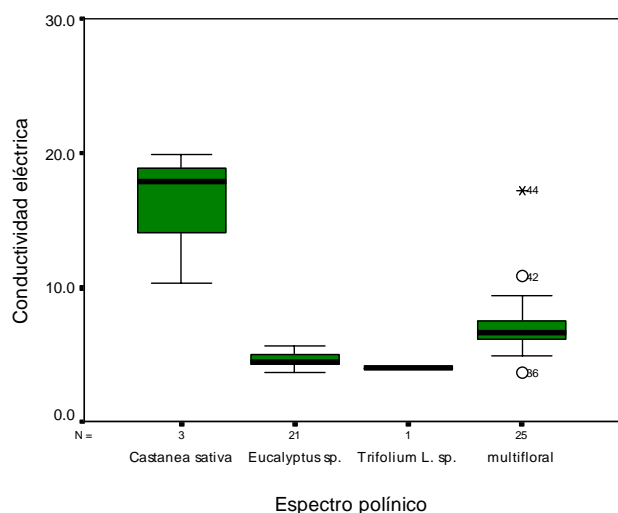


Figura 17. Distribuciones de la conductividad eléctrica ($10^{-4} \text{ S cm}^{-1}$) en las mieles de Galicia con Denominación según el espectro polínico.

Por último, se debe destacar la relación existente entre la zona geográfica y el espectro polínico ya que, por ejemplo, las 3 muestras con mayor conductividad son de *Castanea sativa* Miller y pertenecen a envasadores de la provincia de Ourense. Asimismo las muestras con mayor conductividad dentro de las mieles multiflorales también pertenecen a la provincia de Ourense.

4.1.4.2. MIELES PROCEDENTES DE OTRAS ZONAS DE ESPAÑA

En la Tabla X se encuentran recogidos los resultados de la determinación de la conductividad eléctrica (10^{-4} S cm^{-1}) en las 25 mieles analizadas procedentes de otras zonas de España. El promedio obtenido ha sido de $5.2 \cdot 10^{-4}$ S cm^{-1} , con una desviación estándar de $3.2 \cdot 10^{-4}$ S cm^{-1} y con un valor mínimo y máximo de 1.5 y $11.3 \cdot 10^{-4}$ S cm^{-1} , respectivamente.

Este valor medio de conductividad eléctrica, al igual que los valores mínimo y máximo, son *menores* que los obtenidos en las mieles de Galicia con Denominación analizadas, con valores de 6.6, 3.6 y $19.9 \cdot 10^{-4}$ S cm^{-1} , respectivamente.

Tabla X. Conductividad eléctrica (10^{-4} S cm^{-1}) de las mieles procedentes de otras zonas de España ordenadas según su espectro polínico

Número de muestra	Comunidad Autónoma	Espectro polínico	Conductividad eléctrica (10^{-4} S cm^{-1})
1	Castilla y León	<i>Citrus</i> sp.	1.8
2	Comunidad Valenciana	<i>Citrus</i> sp.	1.8
3	Castilla y León	<i>Diplotaxis</i> sp.	2.7
4	Castilla La Mancha	<i>Echium</i> sp.	2.7
5	Castilla y León	<i>Erica</i> sp.	10.8
6	Comunidad Valenciana	<i>Eucalyptus</i> sp.	7.2
7	Comunidad Valenciana	<i>Eucalyptus</i> sp.	6.6
8	Castilla La Mancha	<i>Lavandula</i> sp.	4.9
9	Castilla La Mancha	<i>Lavandula</i> sp.	3.3
10	Castilla y León	<i>Lavandula</i> sp.	7.2
11	Castilla La Mancha	<i>Rosmarinus</i> sp.	4.1
12	Castilla La Mancha	<i>Rosmarinus</i> sp.	3.4
13	Castilla La Mancha	<i>Rosmarinus</i> sp.	1.9
14	Castilla y León	<i>Rosmarinus</i> sp.	1.5
15	Comunidad Valenciana	<i>Rosmarinus</i> sp.	2.1
16	Comunidad Valenciana	<i>Rosmarinus</i> sp.	2.1
17	Castilla La Mancha	<i>Rosmarinus</i> sp. y <i>Trifolium</i> L. sp.	7.6
18	Castilla y León	multifloral	3.2
19	Castilla y León	multifloral	9.0
20	Comunidad Valenciana	multifloral	9.7
21	Comunidad Valenciana	multifloral	2.4
22	Extremadura	multifloral	4.9
23	Extremadura	multifloral	11.3
24	Castilla y León	multifloral y de mielada	10.0
25	Comunidad Valenciana	multifloral y de mielada	7.7
MEDIA			5.2
SD			3.2
RSD%			61.8
V _{mín}			1.5
V _{máx}			11.3

Como se puede observar sólo cinco mieles presentan un valor superior a $8.0 \cdot 10^{-4} \text{ S cm}^{-1}$. Una de ellas es la muestra N° 5 de brezo (*Erica* sp.), otra es la número N° 24 de bosque (mezcla multifloral y de mielada) y las tres restantes son multiflorales (muestras N° 19, 20 y 23). Estas últimas presentan una gran proporción de pólenes de castaño (*Castanea sativa* Miller) por lo que estas muestras se pueden englobar en el grupo de mieles con mezcla de castaño, lo que implica que su conductividad eléctrica debe ser superior a $8.0 \cdot 10^{-4} \text{ S cm}^{-1}$, cumpliendo de esta forma la legislación vigente (DOCE, 2002; BOE, 2003).

En la Figura 18 se representa la distribución de la conductividad eléctrica de las mieles analizadas procedentes de otras zonas de España.

Al igual que en las mieles gallegas, ninguna miel presenta valores de conductividad eléctrica menores de $1.0 \cdot 10^{-4} \text{ S cm}^{-1}$, lo que indica que las abejas no han sido alimentadas artificialmente con jarabes azucarados (White, 1979a).

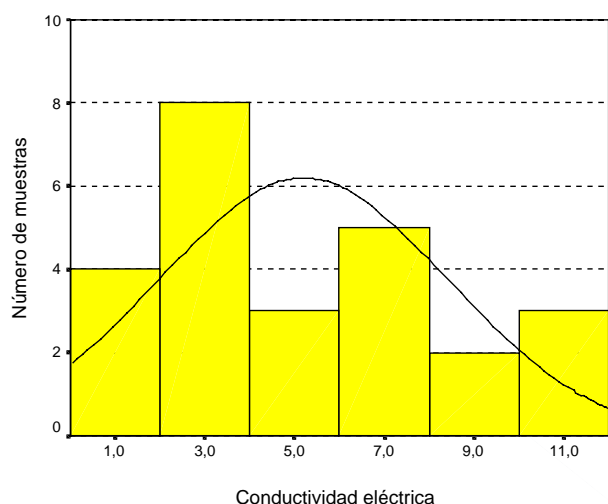


Figura 18. Distribución de la conductividad eléctrica ($10^{-4} \text{ S cm}^{-1}$) en las mieles procedentes de otras zonas de España.

La Tabla XI muestra los resultados de conductividad eléctrica agrupados según el espectro polínico. Como se puede observar los valores medios más bajos de conductividad eléctrica se corresponden con las mieles de azahar (*Citrus* sp.) seguidos por las mieles de romero (*Rosmarinus* sp.). Por el contrario, y como cabía esperar, la miel de brezo (*Erica* sp.) y las de bosque (mezcla de multifloral y de mielada) son las muestras que presentan mayor valor medio de conductividad eléctrica. En la muestra doblemente floral de *Rosmarinus* sp. y de *Trifolium* L. sp., la presencia de pólenes de esta última especie hace que aumente, de forma considerable, la conductividad eléctrica de la muestra con respecto a las muestras monoflorales de romero. Esto contrasta con lo descrito por Vorwohl (1964) que indicó que la presencia de néctar de *Trifolium* L. sp. hacía disminuir la conductividad eléctrica.

Al igual que ocurría con las mieles de Galicia con Denominación, en lo que respecta a las mieles multiflorales el rango de valores encontrados es bastante amplio, concretamente va desde 2.4 a 11.3 10^{-4} S cm^{-1} .

Tabla XI. Estadísticos de la conductividad eléctrica (10^{-4} S cm^{-1}) en las mieles procedentes de otras zonas de España agrupados según el espectro polínico

Espectro polínico	N	Conductividad eléctrica (10^{-4} S cm^{-1}) [*]
<i>Citrus</i> sp.	2	1.8 ± 0.0 (1.8-1.8)
<i>Diplotaxis</i> sp.	1	2.7
<i>Echium</i> sp.	1	2.7
<i>Erica</i> sp.	1	10.8
<i>Eucalyptus</i> sp.	2	6.9 ± 0.4 (6.6-7.2)
<i>Lavandula</i> sp.	3	5.1 ± 2.0 (3.3-7.2)
<i>Rosmarinus</i> sp.	6	2.5 ± 1.0 (1.5-4.1)
<i>Rosmarinus</i> sp. y <i>Trifolium</i> L. sp.	1	7.6
multifloral	6	6.8 ± 3.7 (2.4-11.3)
multifloral y de mielada	2	8.9 ± 1.6 (7.7-10.0)

^{*} MEDIA ± SD (Vmin-Vmáx)

Si se comparan los resultados obtenidos en este trabajo con los de la bibliografía consultada (Tabla VI), el valor medio de conductividad eléctrica para las mieles de *Citrus* sp. se encuentra entre los obtenidos por otros autores, con valores medios comprendidos entre 1.7 y 2.1 10^{-4} S cm^{-1} . No se han encontrado datos de conductividad eléctrica de las mieles monoflorales de *Diplotaxis* sp. en la bibliografía consultada. La miel de *Echium* sp. analizada posee una conductividad eléctrica inferior a la encontrada por *Sanz et al. (1994)* y *Pérez-Arquillué et al. (1995)*, con valores de 3.8 y 4.0 10^{-4} S cm^{-1} , respectivamente. Por el contrario para la miel de *Erica* sp. el valor de conductividad eléctrica es superior al determinado por otros autores, con valores medios que oscilan entre 5.4 y 9.8 10^{-4} S cm^{-1} . En el caso de las mieles de *Eucalyptus* sp., *Lavandula* sp. y *Rosmarinus* sp. la conductividad eléctrica media obtenida es mayor que la encontrada en la bibliografía consultada, con valores medios comprendidos entre 4.4 - 5.9 10^{-4} S cm^{-1} , 2.7 - 4.2 10^{-4} S cm^{-1} y 1.4 - 2.2 10^{-4} S cm^{-1} , respectivamente.

4.2. pH Y TIPOS DE ACIDEZ

4.2.1. INTRODUCCIÓN

La medida del pH es de gran importancia durante la obtención y almacenamiento de los alimentos en general, y en la miel en particular, por su influencia sobre el desarrollo de microorganismos y enzimas. Además influye en propiedades físicas como la textura, estabilidad y resistencia (*Estupiñán et al., 1998*). El pH o acidez actual de la miel varía según la procedencia botánica, floral o de mielada, de las muestras. En general, el pH de las mieles de mielada es superior al de las mieles florales debido, seguramente, al efecto regulador de las sales minerales (*Manuel Suisse Des Denrées Alimentaires, 1974*).

Riolobos (1990) analizó 100 mieles extremeñas, 50 correspondientes a la primera castra (Abril-Junio) denominadas mieles de primavera, y 50 correspondientes a la segunda castra (Agosto-Septiembre) denominadas mieles de mielada. En las primeras el pH medio fue de 3.67 (3.20 – 4.20) y en las segundas este pH medio fue superior, de 4.27 (3.70 – 5.30). Para el *Manuel Suisse Des Denrées Alimentaires (1974)* el pH promedio de las mieles florales fue de 3.9 (3.2 – 4.5), en tanto que en las mieles de mielada este valor puede llegar a 5.5. Según *White (1979b)*, el valor medio de pH en las mieles florales fue de 3.91 (3.42 – 6.10), mientras que en las mieles de mielada éste fue superior (4.45) con cifras comprendidas entre 3.90 y 4.88. Este estudio fue realizado sobre 490 muestras de miel floral y 14 de miel no floral. *Maurizio (1985)*, en un trabajo realizado sobre 1.152 mieles florales y 415 mieles de mielada, obtuvo los valores promedio de 3.9 y 4.5, respectivamente.

En cuanto a la acidez, en la miel se distinguen tres tipos: libre, láctónica y total. La acidez es un parámetro que varía dependiendo, entre otros factores, del origen de la miel. Las mieles de mielada, en general, presentan mayor acidez libre y total que las florales aunque su acidez láctónica es baja (*Persano Oddo et al., 1986*).

En mieles españolas, *Riolobos (1990)* encontró que las muestras florales analizadas tenían un valor medio de acidez libre de 34.79 meq/kg (18.50 – 49.00 meq/kg) frente al 46.55 meq/kg (30.00 – 65.00 meq/kg) de las mieles de mielada. Lo mismo sucedía para los valores medios de la acidez total (40.62 y 52.52 meq/kg, respectivamente). Sin embargo, los valores medios de acidez láctónica coinciden en ambos tipos de mieles (5.82 y 5.80 meq/kg, respectivamente). En mieles extranjeras, el valor medio de acidez libre obtenido en las mieles florales fue de 22.03 meq/kg, el de acidez láctónica de 7.11 meq/kg y el de acidez total de 29.12 meq/kg, mientras que estos valores en las mieles de mielada fueron de 49.07, 5.80 y 54.88 meq/kg, respectivamente (*White, 1979b*).

En las Tablas XII y XIII se muestran los valores del pH y de los diferentes tipos de acidez en mieles florales de algunas regiones españolas y extranjeras, respectivamente.

Tabla XII. Estudios de pH y tipos de acidez en mieles florales españolas

Autor/es	Número de muestras	pH ^a	Acidez libre (meq/kg) ^a	Acidez láctica (meq/kg) ^a	Acidez total (meq/kg) ^a	Procedencia geográfica
Sanz y Triguero (1970)	23	4.2 ± 0.45	22.88 ± 12.04	7.38 ± 3.35	30.65 ± 13.67	Varias regiones
Huidobro y Simal (1984a y b; 1985)	91	4.3 ± 0.39	34.40 ± 9.85	5.75 ± 3.67	40.15 ± 12.51	Galicia
	24	4.1 ± 0.25	22.48 ± 5.55	5.44 ± 1.20	27.92 ± 5.58	Otras regiones
Pérez et al. (1990)	27	3.72 ± 0.03	17.38 ± 0.44	1.06 ± 0.20	19.45 ± 0.5	Zaragoza
Riolobos (1990)	50	3.67 ± 0.28	34.79 ± 6.74	5.82 ± 3.05	40.62 ± 8.13	Extremadura
Frías et al. (1991)	38	4.02 ± 0.51	30.0 ± 10.1	6.99 ± 6.05	37.0 ± 13.4	Tenerife
Pardo (1991)	49	4.34 ± 0.41	24.45 ± 6.32	7.59 ± 2.69	32.04 ± 7.17	Galicia
Sancho et al. (1991b)	115	4.10 ± 0.19	30.49 ± 6.94	10.74 ± 3.19	41.23 ± 8.88	País Vasco
Mateos-Nevado et al. (1992a; b y c)	16	3.89 ± 0.13	32.52 ± 4.52	7.23 ± 1.00	39.75 ± 4.54	Sevilla
	24	3.87 ± 0.18	25.24 ± 5.16	8.31 ± 0.94	33.55 ± 5.22	
	18	3.84 ± 0.11	27.87 ± 6.16	7.19 ± 0.86	35.06 ± 5.91	
Sanz et al. (1994)	48	4.18 ± 0.32	32.92 ± 8.43	8.05 ± 3.60	41.18 ± 9.58	La Rioja
Ortiz et al. (1996)	88	4.0 ± 0.28	16.5 ± 4.82	3.4 ± 1.65	20.6 ± 5.85	La Alcarria (Castilla La Mancha)
Cavia (2002)	35	4.1 ± 0.34	26.6 ± 9.3	9.2 ± 4.2	35.8 ± 11.2	Burgos
	25	4.2 ± 0.32	29.2 ± 6.2	10.8 ± 3.6	40.1 ± 8.1	Galicia

^a Media ± SD

Tabla XIII. Estudios de pH y tipos de acidez en mieles florales extranjeras

Autor/es	Número de muestras	pH ^a	Acidez libre (meq/kg) ^a	Acidez láctica (meq/kg) ^a	Acidez total (meq/kg) ^a	Procedencia geográfica
White (1979b)	490	3.91	22.03 ± 8.22	7.11 ± 3.52	29.12 ± 10.33	Estados Unidos
Kohlich y Krenn (1985)	144	4.3 ± 0.37	20.4 ± 9.5	2.5 ± 1.7	22.61 ± 6.24	Austria
Accorti et al. (1986)	750	--	--	--	24.4 ± 11.5	Italia
Esti et al. (1997)	55	3.50 ± 0.27	--	--	25.8 ± 5.95	Molise (Italia)

^a Media ± SD

Como se comprueba en las tablas anteriores, los diferentes tipos de acidez varían ampliamente. La acidez libre junto con el hidroximetilfurfural y la actividad diastásica son los parámetros que indican el grado de deterioro o envejecimiento de la miel (*Martínez-Gómez et al., 1993*). El proceso de fermentación de la miel causa un incremento de acidez, por lo que es necesario fijar un valor máximo de acidez libre. En España, hasta hace unos meses, se seguían las recomendaciones de *Hadorn y Zürcher (1963)*, que establecían un límite máximo de 40 meq/kg para este parámetro (*BOE, 1983; DOG, 1989; Codex Alimentarius, 1996*). Sin embargo, ya entonces se describían mieles, entre ellas las de *Erica sp.* o *Arbutus sp.* (*Accorti et al., 1986; Serra-Bonheví y Granados-Tarrés, 1993*) que de forma natural y recién extraídas presentan una acidez libre mayor que este límite legal sin que por ello plantearan problemas de fermentación, conservación ni alteración. Esto llevó a que muchos autores (*Huidobro y Simal, 1984a y b; Huidobro y Simal, 1985; Riobos, 1990; Sancho, 1990; Sancho et al., 1991b; Serra-Bonheví y Granados-Tarrés, 1993; Sanz et al., 1994; Bogdanov et al., 1997; Bogdanov, 1999; Comisión Internacional de la Miel, 2000*) consideraran que el límite de 40 meq/kg era demasiado bajo, haciéndose necesario un incremento del mismo. Actualmente, tanto en la legislación europea (*DOCE, 2002*) como en su transposición a la legislación española (*BOE, 2003*) se ha aumentado este valor límite de acidez libre a 50 meq/kg para todas las muestras de uso no industrial.

4.2.2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Los procedimientos aplicados al estudio de estos parámetros son fundamentalmente potenciométricos.

White, en sus trabajos, *White et al. (1958)* y *White (1962)*, propuso un método de cuantificación del pH y los tipos de acidez que es oficial "Final Action" en la AOAC (1999) y oficial en España (*BOE, 1986*). El propio *White (1978)* indicó que la valoración de la acidez libre debía ser realizada con rapidez ya que la gluconolactona se hidroliza durante el transcurso de la determinación y por tanto, el punto final se desvanece. En la actualidad la gran mayoría de los investigadores siguen utilizando esta técnica.

Otro método menos utilizado consiste en la valoración del punto de equivalencia. En este método se va a obtener un gráfico de neutralización de la miel por valoración con hidróxido sódico, representándose el cambio de pH frente al volumen del reactivo valorante. La acidez se calcula a partir del volumen de hidróxido sódico en el punto de equivalencia (*Lord et al., 1988; Bogdanov et al., 1997*).

En un trabajo realizado entre varios países se comprobó que existe una buena correlación ($r = 0.999$) entre los valores de acidez obtenidos por ambos métodos en las

mismas muestras de miel. Los valores determinados utilizando el método de punto de equivalencia son un 35% de media menores que los obtenidos por el método "Final Action" de la AOAC. Asimismo se constató que la reproducibilidad es bastante mala en ambos métodos, sobre todo en el caso de las mieles con una baja acidez (Bogdanov, 1999).

En todos los métodos anteriores la medida del pH es efectuada en materia húmeda, sin embargo, Sancho *et al.* (1991b) demuestran, en un estudio sobre 115 mieles del País Vasco, que la medida del pH en materia seca conduce estadísticamente a los mismos resultados que en materia húmeda.

4.2.3. PARTE EXPERIMENTAL

4.2.3.1. FUNDAMENTO

El pH se determina midiendo el potencial eléctrico que se crea en la membrana de un electrodo de vidrio, que es función de la actividad de los iones hidrógeno a ambos lados de la membrana, usando como referencia un electrodo de calomelanos.

La acidez libre se determina por valoración potenciométrica con álcali hasta pH 8.50 y la acidez láctica por valoración de retroceso tras la adición de un exceso conocido de base. La acidez total se calcula como la suma de la acidez libre y láctica (BOE, 1986).

4.2.3.2. MATERIAL Y APARATOS

- ✓ pHmetro Sentron 1001.
- ✓ Dosimat 665 como dispositivo de valoración compuesto por:
 - Dosimat Metrohm 665.
 - Agitador magnético Metrohm 649.
 - Unidad intercambiable con botella de reactivo de 1 L y bureta de 20.00 mL (± 0.01 mL) Metrohm modelo 3007.
- ✓ Material de vidrio de uso común en el laboratorio.

4.2.3.3. REACTIVOS

- ↪ Hidróxido de sodio en lentejas p.a. ISO Merck Art. 106498.
- ↪ Ácido clorhídrico fumante 37% p.a. ISO Merck Art. 100317.
- ↪ Agua destilada exenta de dióxido de carbono.

4.2.3.4. PROCEDIMIENTO

Se ha utilizado el procedimiento descrito por *White (1962)*, recogido como método "Final Action" N° 962.19 en la *AOAC (1999)* y como método oficial en España (*BOE, 1986*). Se disuelven 10.00 g de miel en 75 mL de agua destilada exenta de dióxido de carbono en un vaso de precipitados de 250 mL. Se agita con un agitador magnético y se introduce el electrodo de pH, midiéndose éste. A continuación, se añade NaOH 0.05 N a una velocidad de 5 mL/min hasta llegar a pH 8.50. Inmediatamente se añaden 10.00 mL de NaOH 0.05 N y posteriormente se realiza una valoración por retroceso con HCl 0.05 N hasta pH 8.30. Las determinaciones tanto para el pH como para los tipos de acidez se han realizado por duplicado.

4.2.3.5. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Los cálculos realizados para la obtención de la acidez libre, acidez láctónica y acidez total son los siguientes:

$$\text{Acidez libre} = \frac{f_{\text{NaOH}} \times (V_{\text{NaOH}} - V_b) \times 50}{P}$$

$$\text{Acidez láctónica} = \frac{(f_{\text{NaOH}} \times 10.00 - f_{\text{HCl}} \times V_{\text{HCl}}) \times 50}{P}$$

$$\text{Acidez total} = \text{Acidez libre} + \text{Acidez láctónica}$$

f_{NaOH} = Factor de la disolución de NaOH 0.05 N.

V_{NaOH} = Volumen (mL) de NaOH 0.05 N consumido hasta alcanzar pH de 8.50 en la muestra de miel.

V_b = Volumen (mL) de NaOH 0.05 N consumido por 75 mL de agua destilada hasta alcanzar pH de 8.50 (blanco).

f_{HCl} = Factor de la disolución de HCl 0.05N.

V_{HCl} = Volumen (mL) de HCl 0.05 N consumido por retroceso hasta alcanzar pH de 8.30, en la muestra de miel.

P = Peso (g) de la muestra de miel.

Los resultados obtenidos de acidez libre, acidez láctónica y acidez total en las mieles analizadas, se expresan en meq/kg de miel.

4.2.3.6. PRECISIÓN

Huidobro y Simal (1984b) comprobaron la precisión de este método para todos los parámetros estudiados, en una muestra de miel, obteniendo los siguientes coeficientes de variación (RSD%): 0.60% para el pH, 0.38% para la acidez libre, 1.13% para la acidez láctónica y 0.44% para la acidez total.

4.2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.4.1. MIELES DE GALICIA CON DENOMINACIÓN

En la Tabla XIV se encuentran recogidos los resultados de la determinación del pH y de los tipos de acidez (libre, láctica y total) en las 50 mieles de Galicia con Denominación analizadas. Los promedios obtenidos para el pH, acidez libre, acidez láctica y acidez total han sido de 4.18, 28.9 meq/kg, 5.4 meq/kg y 34.3 meq/kg, respectivamente, con unas desviaciones estándares de 0.41, 10.4 meq/kg, 4.7 meq/kg y 14.3 meq/kg, respectivamente.

Al comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los de otros autores (Tablas XII y XIII) se observa que:

El valor medio de **pH** encontrado en este trabajo es semejante, en las *mieles gallegas*, al obtenido por *Cavia (2002) (4.2)* e inferior a los de *Huidobro y Simal (1984a)* y *Pardo (1991)*, con valores medios de 4.3 y 4.34, respectivamente. Si se compara con *otras regiones de España*, el valor medio de pH está entre los encontrados por *Sanz y Triguero (1970)*, *Huidobro y Simal (1984b)*, *Huidobro y Simal (1985)*, *Frías et al. (1991)*, *Sancho et al. (1991b)*, *Sanz et al. (1994)*, *Ortiz et al. (1996)* y *Cavia (2002)*, con valores medios que oscilan entre 4.00 y 4.20, pero es superior a los obtenidos por *Pérez et al. (1990)*, *Riolobos (1990)* y *Mateos-Nevado et al. (1992 a, b y c)*, con valores medios comprendidos entre 3.67 y 3.89. Al comparar los resultados con *mieles de otros países*, el valor medio de pH es inferior al obtenido por *Kohlich y Krenn (1985) (4.3)* y superior al encontrado por *White (1979b)* y *Esti et al. (1997)* con valores medios de pH de 3.91 y 3.50, respectivamente.

En cuanto a la **acidez libre**, el valor medio encontrado en este trabajo está entre los obtenidos en *mieles gallegas* por *Huidobro y Simal (1984a)*, *Pardo (1991)* y *Cavia (2002)*, con valores medios comprendidos entre 24.45 y 34.40 meq/kg. Si se compara con *otras regiones de España*, el valor medio de acidez libre se encuentra entre los obtenidos por *Sanz y Triguero (1970)*, *Huidobro y Simal (1984b)*, *Huidobro y Simal (1985)*, *Riolobos (1990)*, *Frías et al. (1991)*, *Sancho et al. (1991b)*, *Mateos-Nevado et al. (1992a, b y c)*, *Sanz et al. (1994)* y *Cavia (2002)*, con valores medios que oscilan entre 22.48 y 34.79 meq/kg y claramente superior a los obtenidos por *Pérez et al. (1990)* y *Ortiz et al. (1996)*, con valores medios de 17.38 y 16.5 meq/kg, respectivamente. Al comparar los resultados con *mieles de otros países*, el valor medio de acidez libre encontrado es superior a los obtenidos por *White (1979b)* y *Kohlich y Krenn (1985)*, con valores medios de 22.03 y 20.4 meq/kg, respectivamente.

Tabla XIV. pH y tipos de acidez (libre, láctónica y total expresadas en meq/kg) de las mieles de Galicia con Denominación ordenadas según su espectro polínico

Número de muestra	Provincia del envasador	Espectro polínico	pH	Acidez libre (meq/kg)	Acidez láctónica (meq/kg)	Acidez total (meq/kg)
1	Ourense	<i>Castanea sativa</i> Miller	4.57	42.0	3.9	45.9
2	Ourense	<i>Castanea sativa</i> Miller	5.36	34.4	1.4	35.8
3	Ourense	<i>Castanea sativa</i> Miller	5.44	22.9	0.0	22.9
4	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	4.06	16.7	0.3	17.0
5	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	3.80	23.8	2.0	25.8
6	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	3.94	23.0	0.0	23.0
7	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	4.09	18.4	0.5	18.9
8	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	3.99	24.5	0.0	24.5
9	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	4.27	21.4	0.0	21.4
10	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	4.45	15.4	0.3	15.7
11	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	4.38	14.4	0.6	15.0
12	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	4.03	16.6	2.9	19.5
13	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	4.21	14.8	0.0	14.8
14	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	3.95	25.0	6.3	31.3
15	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	4.02	23.6	4.2	27.8
16	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	3.75	43.1	8.7	51.8
17	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	3.82	23.6	7.8	31.4
18	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	3.92	26.3	6.7	33.0
19	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	3.72	37.8	9.8	47.6
20	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.	4.43	9.2	0.0	9.2
21	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.	4.07	16.4	4.1	20.5
22	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.	4.31	11.7	0.9	12.6
23	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.	5.00	7.2	0.0	7.2
24	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.	4.66	10.2	0.0	10.2
25	Lugo	<i>Trifolium</i> L. sp.	3.59	37.2	13.9	51.1
26	A Coruña	multifloral	4.38	23.0	2.4	25.4
27	A Coruña	multifloral	4.29	29.0	2.2	31.2
28	A Coruña	multifloral	4.32	28.8	4.3	33.1
29	A Coruña	multifloral	3.95	30.6	7.5	38.1
30	A Coruña	multifloral	4.16	29.6	8.2	37.8
31	Lugo	multifloral	3.89	38.5	13.0	51.5
32	Lugo	multifloral	4.48	32.0	2.9	34.9
33	Lugo	multifloral	4.14	35.9	6.0	41.9
34	Lugo	multifloral	3.80	44.4	16.0	60.4
35	Lugo	multifloral	3.74	36.8	13.2	50.0
36	Lugo	multifloral	3.68	28.1	4.5	32.6
37	Lugo	multifloral	3.90	39.3	9.7	49.0
38	Lugo	multifloral	3.76	39.2	11.8	51.0
39	Lugo	multifloral	3.92	36.6	10.4	47.0
40	Lugo	multifloral	3.96	38.2	9.3	47.5
41	Ourense	multifloral	4.01	41.3	13.6	54.9
42	Ourense	multifloral	4.62	39.9	3.9	43.8
43	Ourense	multifloral	4.55	34.4	1.9	36.3
44	Ourense	multifloral	5.12	28.4	4.4	32.8
45	Ourense	multifloral	4.51	44.8	2.7	47.5
46	Pontevedra	multifloral	3.86	35.2	10.0	45.2
47	Pontevedra	multifloral	3.87	44.4	9.7	54.1
48	Pontevedra	multifloral	4.25	34.4	5.0	39.4
49	Pontevedra	multifloral	4.09	31.0	6.6	37.6
50	Pontevedra	multifloral	4.02	41.0	15.1	56.1
MEDIA			4.18	28.9	5.4	34.3
SD			0.41	10.4	4.7	14.3
RSD%			9.9	36.1	88.1	41.6
V _{mín}			3.59	7.2	0.0	7.2
V _{máx}			5.44	44.8	16.0	60.4

En lo que se refiere a la **acidez láctónica**, el valor medio obtenido en este trabajo es inferior a los encontrados en las *mieles gallegas* por Huidobro y Simal (1984a), Pardo (1991) y Cavia (2002), con valores medios comprendidos entre 5.75 y 10.8 meq/kg. Si se compara con *otras regiones de España*, el valor medio de acidez láctónica encontrado es similar a los obtenidos por Huidobro y Simal (1984b) y Huidobro y Simal (1985) (5.44 meq/kg), superior a los obtenidos por Pérez et al. (1990) y Ortiz et al. (1996), con valores medios de 1.06 y 3.4 meq/kg, respectivamente, e inferior a los encontrados por Sanz y Triguero (1970), Riobobos (1990), Frías et al. (1991), Sancho et al. (1991b), Mateos-Nevado et al. (1992a, b y c), Sanz et al. (1994) y Cavia (2002), con valores medios que oscilan entre 5.82 y 10.74 meq/kg. Al comparar los resultados con *mieles de otros países*, el valor medio de acidez láctónica se encuentra entre los obtenidos por Kohlich y Krenn (1985) (2.5 meq/kg) y por White (1979b) (7.11 meq/kg).

Por último en el caso de la **acidez total**, el valor medio obtenido en este trabajo se encuentra entre los determinados en *mieles gallegas* por Huidobro y Simal (1984a), Pardo (1991) y Cavia (2002), con valores medios que oscilan entre 32.04 y 40.15 meq/kg. Si se compara con *otras regiones de España*, el valor medio de acidez total se encuentra entre los obtenidos por Sanz y Triguero (1970), Huidobro y Simal (1984b), Huidobro y Simal (1985), Riobobos (1990), Frías et al. (1991), Sancho et al. (1991b), Mateos-Nevado et al. (1992a, b y c), Sanz et al. (1994) y Cavia (2002), con valores medios comprendidos entre 27.92 y 41.23 meq/kg y superior a los obtenidos por Pérez et al. (1990) y Ortiz et al. (1996), con valores medios de 19.45 y 20.6 meq/kg, respectivamente. Al comparar los resultados con *mieles de otros países*, el valor medio de acidez total encontrado es superior a los obtenidos por White (1979b), Kohlich y Krenn (1985), Accorti et al. (1986) y Esti et al. (1997), con valores medios que oscilan entre 22.61 y 29.12 meq/kg.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el único tipo de acidez incluido en la legislación es la acidez libre. El 14% de las muestras analizadas, es decir, 7 muestras, poseen una acidez libre natural mayor que el antiguo límite de 40 meq/kg (BOE, 1983) sin que por ello presenten problemas de fermentación. Si se considera el nuevo límite legal de 50 meq/kg todas estas muestras cumplirían la legislación vigente (DOCE, 2002; BOE, 2003).

En la Figura 19 se representan las distribuciones del pH y de los tipos de acidez en las muestras de Galicia con Denominación analizadas. En la gráfica de distribución del pH existen dos partes bien diferenciadas, ya que cuatro de las muestras poseen un pH muy elevado. Por su parte, en la gráfica de distribución de la acidez láctónica se puede ver como prácticamente la mitad de las muestras presentan una acidez láctónica ≤ 4.0 meq/kg.

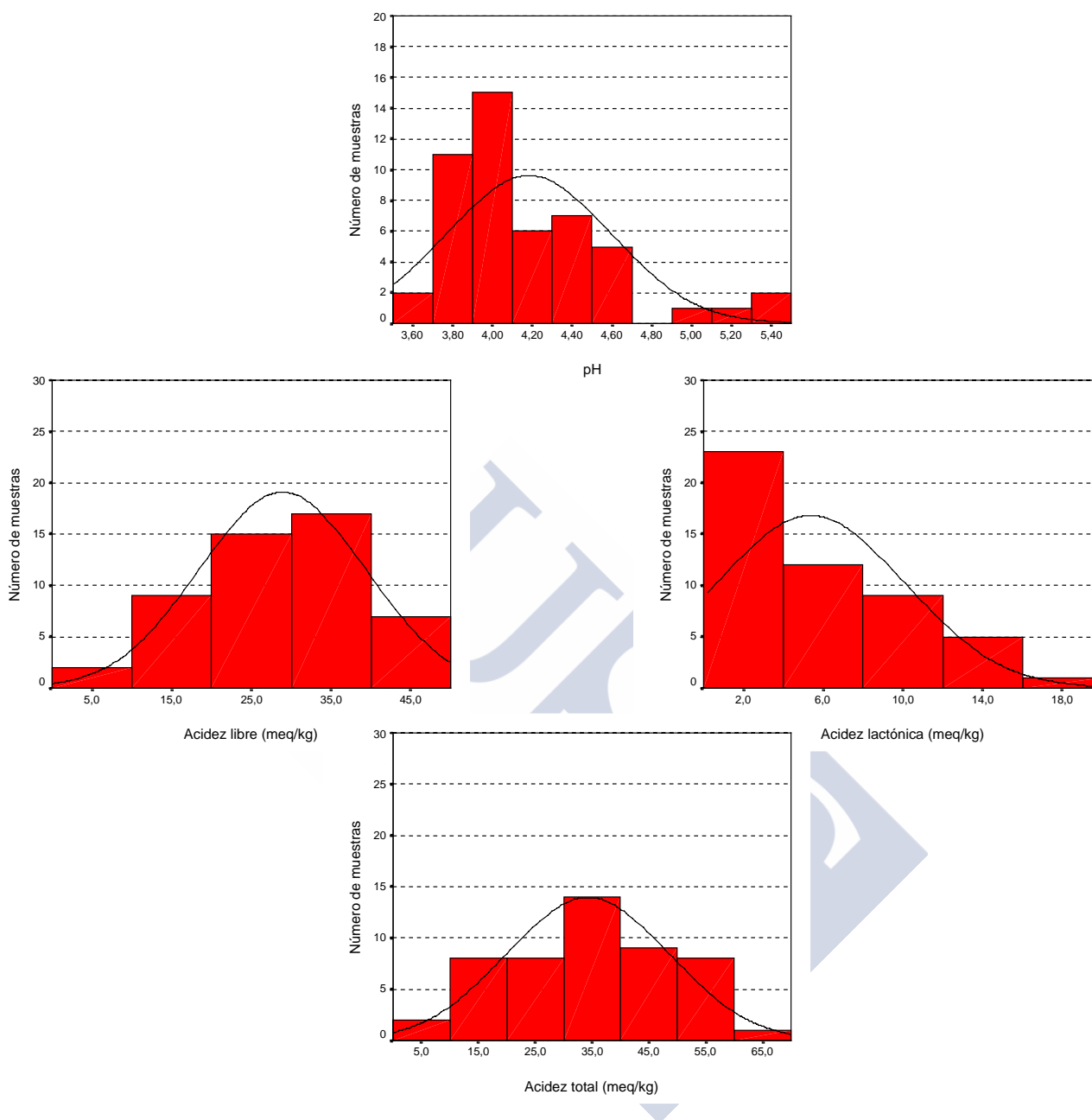


Figura 19. Distribuciones del pH y de los tipos de acidez (libre, láctica y total expresadas en meq/kg) en las mieles de Galicia con Denominación.

4.2.4.1.1. INFLUENCIA DE LA PROVINCIA DE PROCEDENCIA DEL ENVASADOR EN EL pH Y TIPOS DE ACIDEZ

Las muestras que presentan un mayor valor medio de pH son las de la provincia de Ourense, con valores mínimo y máximo también superiores a los de las otras provincias, mientras que las mieles de la provincia de Lugo son las que tienen el pH medio más bajo. En cuanto a los tipos de acidez, se puede destacar que las provincias más occidentales (A

Coruña y Pontevedra) presentan un valor medio de acidez libre semejante y marcadamente inferior al que tienen las provincias más orientales (Lugo y Ourense). En lo que se refiere a la acidez láctica, la provincia de A Coruña, al igual que sucede con los otros tipos de acidez, presenta el valor medio más bajo, siendo la provincia de Lugo, la que tiene el mayor valor de acidez láctica media. En el caso de la acidez total, al igual que sucedía con la acidez libre, las provincias más occidentales (Pontevedra y A Coruña) presentan una acidez total media muy inferior a la de las provincias de Lugo y Ourense (Tabla XV y Figura 20).

Tabla XV. Estadísticos del pH y de los tipos de acidez (libre, láctica y total expresadas en meq/kg) en las mieles de Galicia con Denominación agrupados según la provincia de procedencia del envasador

Provincia procedencia envasador	N	pH*	Acidez libre (meq/kg)*	Acidez láctica (meq/kg)*	Acidez total (meq/kg)*
A Coruña	15	4.15 ± 0.19 (3.80-4.45)	22.0 ± 5.7 (14.4-30.6)	2.1 ± 2.7 (0.0-8.2)	24.1 ± 7.9 (14.8-38.1)
Lugo	17	3.88 ± 0.21 (3.59-4.48)	34.4 ± 6.7 (23.6-44.4)	9.1 ± 3.7 (2.9-16.0)	43.5 ± 9.7 (27.8-60.4)
Ourense	8	4.77 ± 0.49 (4.01-5.44)	36.0 ± 7.5 (22.9-44.8)	4.0 ± 4.2 (0.0-13.6)	40.0 ± 10.0 (22.9-54.9)
Pontevedra	10	4.26 ± 0.36 (3.86-5.00)	24.1 ± 14.5 (7.2-44.4)	5.1 ± 5.2 (0.0-15.1)	29.2 ± 19.4 (7.2-56.1)

* MEDIA ± SD (V_{mín}-V_{máx})

En la Figura 20 se observa como, en la provincia de Pontevedra, existe una gran dispersión de resultados en lo que se refiere a los tres tipos de acidez. Asimismo en dicha gráfica se puede ver como no hay una diferencia clara en los valores de pH y tipos de acidez de una provincia frente a todas las demás, al contrario de lo que sucedía con la conductividad eléctrica.

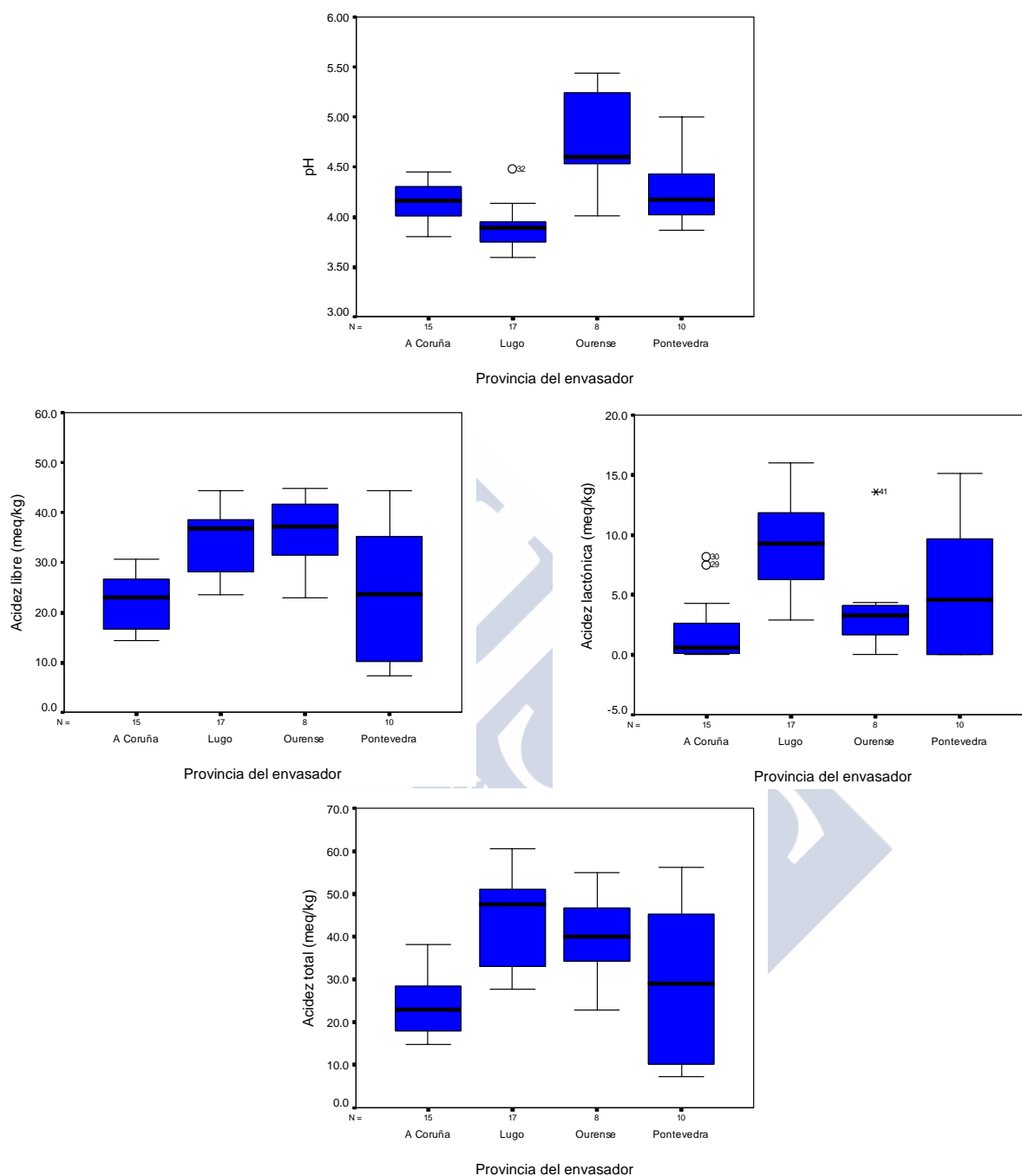


Figura 20. Distribuciones del pH y de los tipos de acidez (libre, láctica y total expresadas en meq/kg) en las mieles de Galicia con Denominación según la provincia de procedencia del envasador.

4.2.4.1.2. INFLUENCIA DEL ESPECTRO POLÍNICO EN EL pH Y TIPOS DE ACIDEZ

En la Tabla XVI y Figura 21 se observa que las muestras que presentan un mayor valor medio de pH son las de castaño (*Castanea sativa* Miller), mientras que la de trébol (*Trifolium* L. sp.) es la que presenta el pH más bajo. El valor medio de la acidez libre de las mieles de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) es, al menos, 10 meq/kg menor que el del resto de mieles, con unos valores medios similares entre ellas. Las muestras Nº 16 y 19 tienen una acidez tanto libre como total muy elevada en comparación con las otras muestras de *Eucalyptus* sp. analizadas, lo que queda de manifiesto en la Figura 22 pues aparecen como outliers. La acidez láctónica de la miel de *Trifolium* L. sp. es muy superior a los valores medios de las mieles de *Castanea sativa* Miller, *Eucalyptus* sp. y multiflorales. Por el contrario, la acidez láctónica media más baja la presentan las mieles de *Castanea sativa* Miller. Esto coincide con lo observado por White (1962) al encontrar valores extremadamente altos de pH en dos mieles de Estados Unidos que no presentaban acidez láctónica. Por último, en el caso de la acidez total, al igual que en los dos tipos de acidez anteriores, la miel de *Trifolium* L. sp. es la que mayor valor presenta en tanto que las mieles con menor acidez total media son las de *Eucalyptus* sp.

Tabla XVI. Estadísticos del pH y de los tipos de acidez (libre, láctónica y total expresadas en meq/kg) en las mieles de Galicia con Denominación agrupados según el espectro polínico

Espectro polínico	N	pH [*]	Acidez libre (meq/kg) [*]	Acidez láctónica (meq/kg) [*]	Acidez total (meq/kg) [*]
<i>Castanea sativa</i> Miller	3	5.12 ± 0.48 (4.57-5.44)	33.1 ± 9.6 (22.9-42.0)	1.8 ± 2.0 (0.0-3.9)	34.9 ± 11.5 (22.9-45.9)
<i>Eucalyptus</i> sp.	21	4.14 ± 0.32 (3.72-5.00)	20.2 ± 8.8 (7.2-43.1)	2.6 ± 3.3 (0.0-9.8)	22.8 ± 11.6 (7.2-51.8)
<i>Trifolium</i> L. sp.	1	3.59	37.2	13.9	51.1
multifloral	25	4.13 ± 0.34 (3.68-5.12)	35.4 ± 5.8 (23.0-44.8)	7.8 ± 4.4 (1.9-16.0)	43.2 ± 9.1 (25.4-60.4)

^{*} MEDIA ± SD (V_{min}-V_{máx})

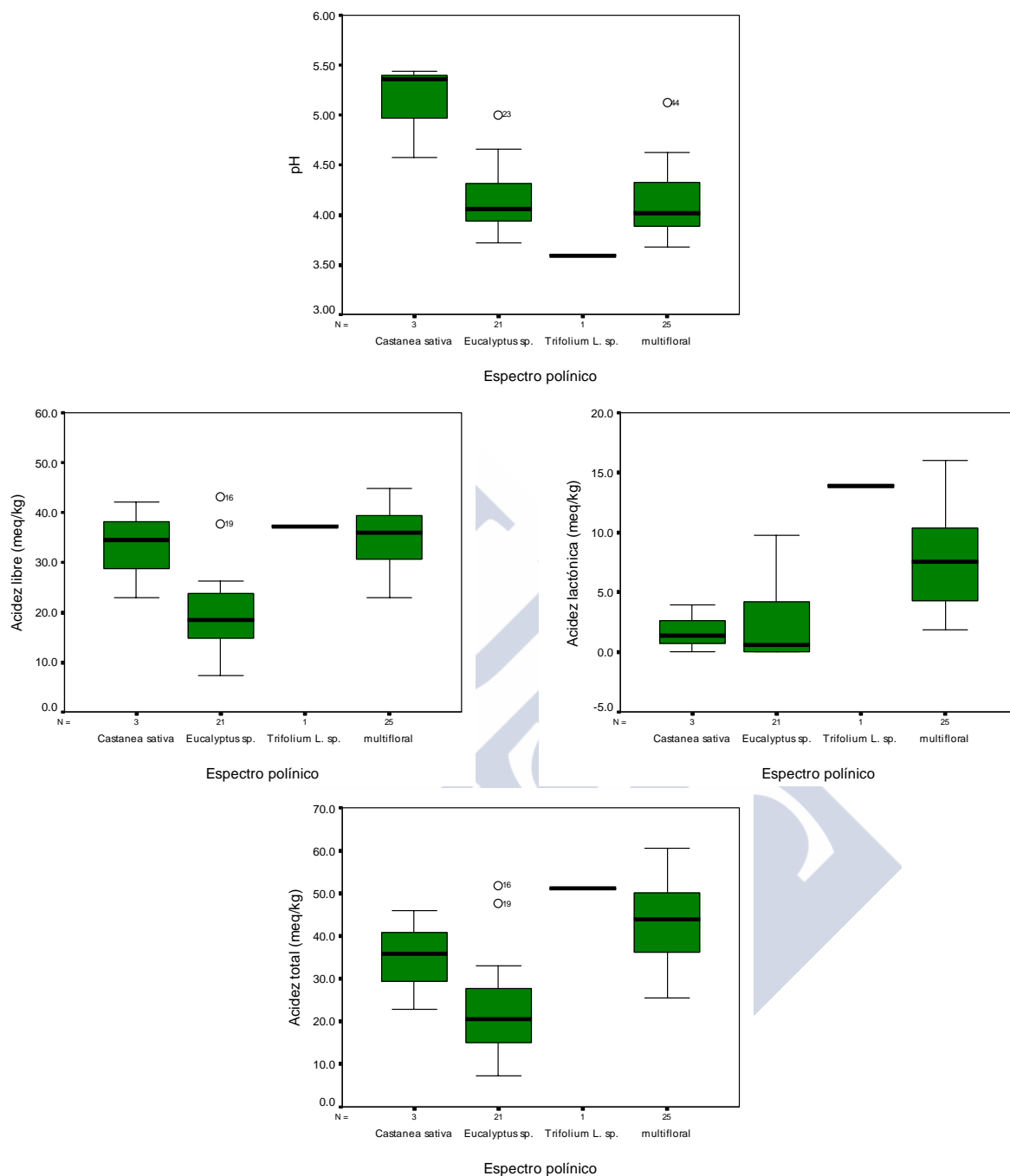


Figura 21. Distribuciones del pH y de los tipos de acidez (libre, láctica y total expresadas en meq/kg) en las mieles de Galicia con Denominación según el espectro polínico.

Si se comparan los resultados obtenidos en este trabajo (Tabla XVI) con los datos existentes en la bibliografía consultada, encontramos que el valor medio de **pH** de las mieles de *Castanea sativa* Miller analizadas, al igual que sucede con el valor medio de pH determinado por otros autores (*Accorti et al., 1986; Piazza et al., 1986; Persano Oddo et al., 1995*), es superior a 5.00. El valor máximo obtenido en este trabajo ha sido de 5.44, sin

embargo, *Piazza et al. (1986)* encontraron mieles de *Castanea sativa* Miller con valores de pH de 7.36, superiores incluso a los valores encontrados por estos mismos autores en las mieles de mielada, con valores máximos de 5.55. Hay que resaltar que la muestra 44, aún siendo multifloral presenta una alta proporción de pólenes de *Castanea sativa* Miller (87%), lo que provoca que su pH sea mucho más elevado que el de la media de las mieles multiflorales, como se puede comprobar en la Figura 21. En el caso a las mieles de *Eucalyptus* sp., el valor medio de pH encontrado es superior a los obtenidos por *Bosch y Mateo (1984)*, *Accorti et al. (1986)*, *Martínez-Gómez et al. (1993)*, *Persano Oddo et al. (1995)* y *Terrab et al. (2002)*, con valores comprendidos entre 3.65 y 4.06. Por el contrario, la miel de *Trifolium* L. sp. analizada presenta un valor de pH muy inferior al obtenido por *Singh y Bath (1997)*, concretamente menor en 0.5 unidades de pH.

En cuanto a la **acidez libre**, el valor medio obtenido en este estudio para las mieles de *Castanea sativa* Miller es superior a la acidez libre encontrada por *Cavia (2002)* en una muestra (27.3 meq/kg). En las mieles de *Eucalyptus* sp., el promedio obtenido es similar al de *Serra-Bonheví (1989)* y *Terrab et al. (2002)*, con valores de 20.96 y 19.5 meq/kg, respectivamente, pero inferior al de *Martínez-Gómez et al. (1993)* (25.34 meq/kg). Por último, la miel de *Trifolium* L. sp. presenta un valor muy superior de acidez libre a la analizada por *Singh y Bath (1997)* (26.5 meq/kg).

En lo que se refiere a la **acidez láctónica**, el valor medio encontrado en este trabajo para las mieles de *Castanea sativa* Miller es muy inferior a la acidez láctónica de la muestra analizada por *Cavia (2002)* (12.0 meq/kg). En las mieles de *Eucalyptus* sp. el promedio obtenido es similar al de *Martínez-Gómez et al. (1993)* (2.94 meq/kg) y muy inferior al de *Serra-Bonheví (1989)* y *Terrab et al. (2002)*, con valores de 7.35 y 9.26 meq/kg, respectivamente. La miel de *Trifolium* L. sp. analizada, por su parte, presenta un valor semejante al encontrado por *Singh y Bath (1997)* (15.0 meq/kg).

Por último, las mieles de *Castanea sativa* Miller analizadas en este trabajo presentan un valor medio de **acidez total** muy superior (más del doble) a las analizadas por *Accorti et al. (1986)*, *Persano Oddo et al. (1995)* y *Poiana et al. (1997)* con valores medios que oscilan entre 11.4 y 15.1 meq/kg e inferior a la acidez total de la muestra analizada por *Cavia (2002)* (39.3 meq/kg). Las mieles de *Eucalyptus* sp., por su parte, presentan unos valores medios para la acidez total inferiores a los obtenidos por *Accorti et al. (1986)*, *Serra-Bonheví (1989)*, *Martínez-Gómez et al. (1993)*, *Persano Oddo et al. (1995)* y *Terrab et al. (2002)* con valores medios comprendidos entre 24.1 y 28.7 meq/kg. La miel de *Trifolium* L. sp. analizada en este trabajo presenta un valor más elevado de acidez total que la determinada por *Singh y Bath (1997)* (41.5 meq/kg).

4.2.4.2. MIELES PROCEDENTES DE OTRAS ZONAS DE ESPAÑA

En la Tabla XVII y en la Figura 22 se encuentran recogidos los resultados de la determinación del pH y tipos de acidez (libre, láctónica y total expresadas en meq/kg) en las 25 mieles analizadas procedentes de otras zonas de España. Los promedios obtenidos para el pH, acidez libre, acidez láctónica y acidez total han sido de 4.13, 26.2 meq/kg, 5.0 meq/kg y 31.2 meq/kg, respectivamente, con unas desviaciones estándares de 0.32, 10.6 meq/kg, 2.1 meq/kg y 11.7 meq/kg, respectivamente.

Si se comparan estos valores con los obtenidos en las mieles de Galicia con Denominación (4.18, 28.9 meq/kg, 5.4 meq/kg y 34.3 meq/kg, respectivamente) hay que destacar que existe una gran semejanza entre ambas poblaciones. En todos los casos estos valores medios de pH y tipos de acidez (libre, láctónica y total expresadas en meq/kg) son *ligeramente mayores* en las mieles de Galicia con Denominación que en las procedentes de otras zonas de España, aunque esta diferencia es mínima.

Tabla XVII. pH y tipos de acidez (libre, láctónica y total expresadas en meq/kg) de las mieles procedentes de otras zonas de España ordenadas según su espectro polínico

Número de muestra	Comunidad Autónoma	Espectro polínico	pH	Acidez libre (meq/kg)	Acidez láctónica (meq/kg)	Acidez total (meq/kg)
1	Castilla y León	<i>Citrus sp.</i>	3.87	14.7	3.0	17.7
2	Comunidad Valenciana	<i>Citrus sp.</i>	3.76	14.7	2.8	17.5
3	Castilla y León	<i>Diplotaxis sp.</i>	3.93	17.9	3.8	21.7
4	Castilla La Mancha	<i>Echium sp.</i>	3.71	24.9	9.7	34.6
5	Castilla y León	<i>Erica sp.</i>	4.53	41.3	6.0	47.3
6	Comunidad Valenciana	<i>Eucalyptus sp.</i>	4.20	28.1	3.0	31.1
7	Comunidad Valenciana	<i>Eucalyptus sp.</i>	4.04	17.3	4.4	21.7
8	Castilla La Mancha	<i>Lavandula sp.</i>	4.54	23.0	5.7	28.7
9	Castilla La Mancha	<i>Lavandula sp.</i>	3.99	23.4	8.1	31.5
10	Castilla y León	<i>Lavandula sp.</i>	4.44	34.5	3.9	38.4
11	Castilla La Mancha	<i>Rosmarinus sp.</i>	4.49	18.6	5.3	23.9
12	Castilla La Mancha	<i>Rosmarinus sp.</i>	4.10	20.9	3.8	24.7
13	Castilla La Mancha	<i>Rosmarinus sp.</i>	3.88	16.4	4.1	20.5
14	Castilla y León	<i>Rosmarinus sp.</i>	3.78	16.7	2.3	19.0
15	Comunidad Valenciana	<i>Rosmarinus sp.</i>	3.90	16.2	3.6	19.8
16	Comunidad Valenciana	<i>Rosmarinus sp.</i>	3.71	15.9	4.3	20.2
17	Castilla La Mancha	<i>Rosmarinus sp.</i> y <i>Trifolium L. sp.</i>	4.42	33.7	5.4	39.1
18	Castilla y León	multifloral	3.99	20.7	5.0	25.7
19	Castilla y León	multifloral	4.28	41.8	7.6	49.4
20	Comunidad Valenciana	multifloral	4.68	35.4	5.0	40.4
21	Comunidad Valenciana	multifloral	3.99	17.0	4.4	21.4
22	Extremadura	multifloral	3.70	34.0	8.7	42.7
23	Extremadura	multifloral	4.28	49.8	8.8	58.6
24	Castilla y León	multifloral y de mielada	4.64	44.2	4.0	48.2
25	Comunidad Valenciana	multifloral y de mielada	4.48	33.7	2.8	36.5
MEDIA			4.13	26.2	5.0	31.2
SD			0.32	10.6	2.1	11.7
RSD%			7.8	40.6	41.1	37.5
V _{mín}			3.70	14.7	2.3	17.5
V _{máx}			4.68	49.8	9.7	58.6

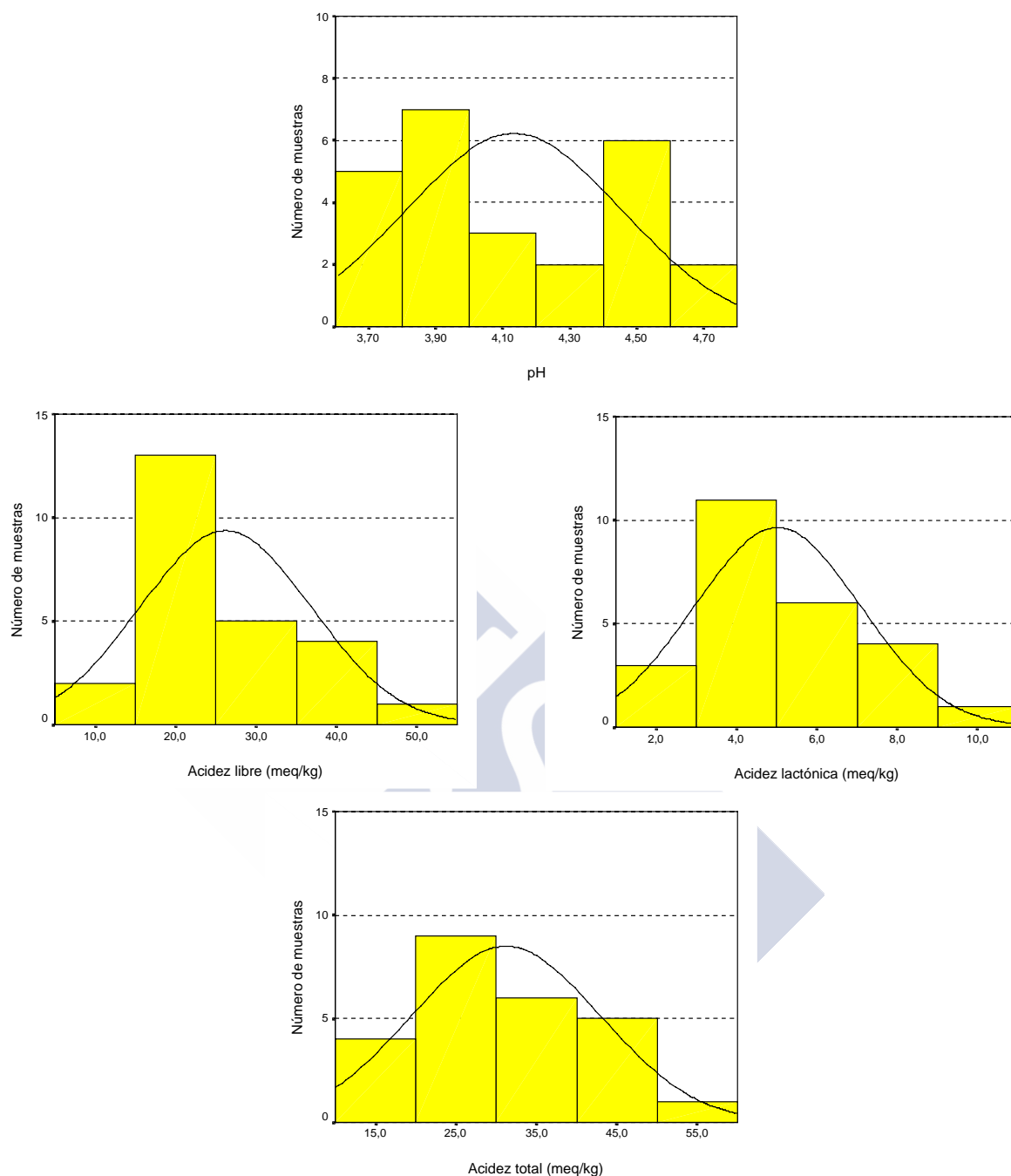


Figura 22. Distribuciones del pH y de los tipos de acidez (libre, láctica y total expresadas en meq/kg) en las mieles procedentes de otras zonas de España.

Al igual que sucedía con las muestras gallegas, existen muestras cuya acidez libre natural es superior a 40 meq/kg. En este caso son 4 muestras, lo que representa el 16% de las mieles analizadas. De nuevo, si se considera el límite legal de 50 meq/kg todas ellas cumplirían la legislación (DOCE, 2002; BOE, 2003).

En la Tabla XVIII se encuentran recogidos los resultados del pH y de los tipos de acidez (libre, láctica y total expresadas en meq/kg) agrupados según el espectro polínico.

Tabla XVIII. Estadísticos del pH y tipos de acidez (libre, láctica y total expresadas en meq/kg) en las mieles procedentes de otras zonas de España agrupados según el espectro polínico

Espectro polínico	N	pH [†]	Acidez libre (meq/kg)	Acidez láctica (meq/kg)	Acidez total (meq/kg)
<i>Citrus</i> sp.	2	3.82 ± 0.01 (3.76-3.87)	14.7 ± 0.0 (14.7-14.7)	2.9 ± 0.1 (2.8-3.0)	17.6 ± 0.1 (17.5-17.7)
<i>Diplotaxis</i> sp.	1	3.93	17.9	3.8	21.7
<i>Echium</i> sp.	1	3.71	24.9	9.7	34.6
<i>Erica</i> sp.	1	4.53	41.3	6.0	47.3
<i>Eucalyptus</i> sp.	2	4.12 ± 0.11 (4.04-4.20)	22.7 ± 7.6 (17.3-28.1)	3.7 ± 1.0 (3.0-4.4)	26.4 ± 6.6 (21.7-31.1)
<i>Lavandula</i> sp.	3	4.32 ± 0.29 (3.99-4.54)	27.0 ± 6.5 (23.0-34.5)	5.9 ± 2.1 (3.9-8.1)	32.9 ± 5.0 (28.7-38.4)
<i>Rosmarinus</i> sp.	6	3.98 ± 0.28 (3.71-4.49)	17.5 ± 1.9 (15.9-20.9)	3.9 ± 1.0 (2.3-5.3)	21.4 ± 2.4 (19.0-24.7)
<i>Rosmarinus</i> sp. y <i>Trifolium</i> L. sp.	1	4.42	33.7	5.4	39.1
multifloral	6	4.15 ± 0.34 (3.70-4.68)	33.1 ± 12.4 (17.0-49.8)	6.6 ± 2.0 (4.4-8.8)	39.7 ± 14.1 (21.4-58.6)
multifloral y de mielada	2	4.56 ± 0.11 (4.48-4.64)	39.0 ± 7.4 (33.7-44.2)	3.4 ± 0.8 (2.8-4.0)	42.4 ± 8.3 (36.5-48.2)

† MEDIA ± SD (V_{mín}-V_{máx})

En esta tabla se observa que las mieles de *Citrus* sp., *Diplotaxis* sp., *Echium* sp. y *Rosmarinus* sp. presentan unos valores medios de pH ≤ 4.00. Hay que destacar, que al igual que sucedía con la conductividad eléctrica, la presencia de gran cantidad de polen de *Trifolium* L. sp. en las muestras de *Rosmarinus* sp. provoca un aumento considerable en el pH medio. Las mieles de *Erica* sp. y las de bosque (mezcla de multifloral y de mielada) poseen valores medios de pH muy altos, pH ≥ 4.50. En el caso de las mieles de bosque, este elevado pH se debe a la presencia de elementos de mielada.

Las mieles con un valor medio de acidez libre menor son las de *Citrus* sp. y *Rosmarinus* sp., que al igual que la miel de *Diplotaxis* sp., no superan los 20.0 meq/kg de media. Estos tres tipos de mieles son también, y por este orden, los que presentan una acidez total media menor. De forma similar a lo que sucedía con el pH, la miel de *Erica* sp. y las de bosque (multifloral y de mielada) son las que presentan los mayores valores medios de acidez libre y total. En cuanto a la acidez láctica, el valor medio mínimo lo presentan las mieles de *Citrus* sp. y a continuación se encuentran las mieles de bosque (multifloral y de

mielada), mientras que la acidez láctica mayor ha sido encontrada en la miel de *Echium* sp.

Como se puede observar en la tabla anterior, tanto en el caso del pH como de los tipos de acidez (acidez libre, láctica y total expresada en mg/kg), son las mieles multiflorales las que presentan un rango más amplio de valores, como corresponde a un grupo más heterogéneo de mieles.

Al comparar los valores encontrados en este trabajo (Tabla XVIII) con los de la bibliografía consultada, se observa que el **pH** medio de las mieles de *Citrus* sp. obtenido en este trabajo se encuentra entre los obtenidos por Bosch y Mateo (1984), Accorti et al. (1986), Persano Oddo et al. (1995) y Terrab et al. (2002), con valores medios comprendidos entre 3.55 y 3.9. No se han encontrado, en la bibliografía consultada, valores de pH en mieles de *Diplotaxis* sp. El pH de la muestra de *Echium* sp. analizada es inferior al encontrado por Pérez-Arquillué et al. (1995) para una muestra (4.04). El pH de la miel de *Erica* sp. es superior a los valores medios de mieles de brezo de otros países (Italia, Portugal y Grecia) encontrados por Accorti et al. (1986), Andrade (1995), Persano Oddo et al. (1995), Thrasyvoulou y Manikis (1995) y Andrade et al. (1999) con valores comprendidos entre 4.0 y 4.2. Para las mieles de *Eucalyptus* sp. el valor medio de pH es, también, ligeramente superior al encontrado por Martínez-Gómez et al. (1993), Persano Oddo et al. (1995) y Terrab et al. (2002) con valores medios entre 3.65 y 3.9. En el caso de las mieles de *Lavandula* sp., el valor medio de pH es superior al encontrado por Bosch y Mateo (1984), Serra-Bonheví (1988) y Pérez-Arquillué et al. (1995), con valores medios que oscilan entre 3.54 y 3.96. Por último, en lo que se refiere a las mieles de *Rosmarinus* sp., el valor medio de pH es ligeramente superior a los encontrados por Bosch y Mateo (1984), Pérez et al. (1990) y Pérez-Arquillué et al. (1994), con valores medios comprendidos entre 3.7 y 3.89.

En el caso de la **acidez libre**, las muestras de *Citrus* sp analizadas poseen un valor medio inferior al encontrado por Terrab et al. (2002) (20.8 meq/kg). No se han encontrado valores en la bibliografía consultada de mieles de *Diplotaxis* sp. La acidez libre de la miel de *Echium* sp. obtenida en este trabajo es similar a la determinada, también en una muestra, por Pérez-Arquillué et al. (1995) (24.2 meq/kg). La acidez libre de la muestra de *Erica* sp. es superior al valor medio obtenido por Andrade et al. (1999) en mieles portuguesas (30.5 meq/kg). En lo que respecta a las mieles de *Eucalyptus* sp., el valor medio de acidez libre se encuentra entre los obtenidos por Serra-Bonheví (1989), Terrab et al. (2002) y Martínez-Gómez et al. (1993) con valores comprendidos entre 19.5 y 25.34 meq/kg. El valor medio de acidez libre de las mieles de *Lavandula* sp. obtenido en este estudio es similar al encontrado por Pérez-Arquillué et al. (1995) (26.2 meq/kg). Por último, en las muestras de *Rosmarinus*

sp., el valor medio de acidez libre es ligeramente superior a los obtenidos por *Pérez et al. (1990)* y *Pérez-Arquillué et al. (1994)*, con valores medios de acidez libre de 16.72 y 16.2 meq/kg, respectivamente.

En relación a la **acidez láctónica**, el valor medio encontrado en este estudio para las mieles de *Citrus* sp. es muy inferior al encontrado por *Terrab et al. (2002)*, con un valor de 9.31 meq/kg. En la bibliografía consultada no se han encontrado datos de mieles de *Diplotaxis* sp. La acidez láctónica de la miel de *Echium* sp. obtenida en este trabajo ha sido muy superior a la obtenida por *Pérez-Arquillué et al. (1995)* (2.8 meq/kg). La acidez láctónica en la muestra de *Erica* sp. es inferior al valor medio obtenido por *Andrade et al. (1999)* en mieles portuguesas (7.59 meq/kg). En lo que se refiere a las mieles de *Eucalyptus* sp., el valor medio de acidez láctónica es superior al obtenido *Martínez-Gómez et al. (1993)* (2.94 meq/kg) pero inferiores a los obtenidos por *Serra-Bonheví (1989)* y *Terrab et al. (2002)*, con valores de 7.35 y 9.26 meq/kg, respectivamente. Las mieles de *Lavandula* sp. presentan un valor medio de acidez láctónica superior al encontrado por *Pérez-Arquillué et al. (1995)* (3.9 meq/kg). Por último, el valor medio de la acidez láctónica de las muestras de *Rosmarinus* sp. es muy superior a los encontrados por *Pérez et al. (1990)* y *Pérez-Arquillué et al. (1994)*, con valores medios de acidez láctónica de 0.93 y 1.06 meq/kg, respectivamente.

En lo que se refiere a la **acidez total**, las muestras de *Citrus* sp. analizadas en este trabajo poseen un valor medio de acidez total que se encuentra entre los obtenidos por *Persano Oddo et al. (1995)*, *Accorti et al. (1986)*, *Abu-Tarboush et al. (1993)* y *Terrab et al. (2002)*, en mieles de diferentes orígenes geográficos, con valores que oscilan entre 13.75 y 30.1 meq/kg. En la bibliografía consultada no se han encontrado datos de acidez total en mieles de *Diplotaxis* sp. La acidez total de la miel de *Echium* sp. es superior a la obtenida por *Pérez-Arquillué et al. (1995)* (27.0 meq/kg). La acidez total de la muestra de *Erica* sp. analizada también es superior a la obtenida por *Accorti et al. (1986)*, *Persano Oddo et al. (1995)* y *Andrade et al. (1999)*, con valores medios que oscilan entre 38.1 y 42.1 meq/kg. En lo que respecta a las mieles de *Eucalyptus* sp., el valor medio de acidez total se encuentra entre los obtenidos por *Accorti et al. (1986)*, *Serra-Bonheví (1989)*, *Martínez-Gómez et al. (1993)*, *Persano Oddo et al. (1995)* y *Terrab et al. (2002)*, con valores medios comprendidos entre 24.1 y 28.7 meq/kg. El valor medio de acidez total de las mieles de *Lavandula* sp. obtenido en este estudio es superior al encontrado por *Pérez-Arquillué et al. (1995)* (30.1 meq/kg). Por último, el valor medio de la acidez total de las muestras de *Rosmarinus* sp. es superior a los encontrados por *Pérez et al. (1990)* y *Pérez-Arquillué et al. (1994)*, con valores medios de 17.65 y 17.2 meq/kg, respectivamente.

4.3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-TARBOUSH, H. M.; AL-KAHTANI, H. A., EL-SARRAGE, M. S. Floral-type identification and quality evaluation of some honey types. *Food Chem.* **1993**, 46, 13-17.
- ACCORTI, M.; PERSANO ODDO, L.; PIAZZA, M. G.; SABATINI, A. G. Schede di caratterizzazione delle principali qualità di miele italiano. *Apicoltura.* **1986**, 2, 1-35.
- ANDRADE, P. B. *Tipificação de méis de Erica sp. da região da Serra da Lousã*. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Coimbra. Portugal. **1995**.
- ANDRADE, P. B.; AMARAL, M. T.; ISABEL, P.; CARVALHO, J. C. M. F.; SEABRA, R. M. & PROENÇA DA CUNHA, A. Physicochemical attributes and pollen spectrum of Portuguese heather honeys. *Food Chem.* **1999**, 66 (4), 503-510.
- AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). *Official Methods of Analysis*. 16th ed., 5th rev.; Arlington: VA, USA, **1999**.
- BOE (BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO). Orden del 5 de agosto, por la que se aprueba la norma de calidad para la miel destinada al mercado interior. Madrid. España. **1983**.
- BOE (BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO). Orden del 12 de junio, por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis para la miel. Madrid. España. **1986**.
- BOE (BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO). Real Decreto 1049/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Norma de calidad relativa a la miel. Madrid. España. **2003**.
- BOGDANOV, S. Honey quality, methods of analysis and international regulatory standards: Review of the work of the International Honey Commission. *Mitt. Gebiete Lebensm.* **1999**, Hyg. 90, 108-125.
- BOGDANOV, S.; MARTIN, P.; LÜLLMANN, C. Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie.* **1997**, extra issue, 1-59.
- BOSCH, F.; MATEO, R. Estudio sobre la conductividad eléctrica y el pH de algunos tipos de mieles monoflorales españolas. *El Campo.* **1984**, 93, 97-100.
- CAVIA, M. M. *Estudio del envejecimiento de mieles de Burgos y Galicia: Influencia de la granulación inducida*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos. Área de Nutrición y Bromatología. Universidad de Burgos. España. **2002**.
- CODEX ALIMENTARIUS (FAO / WHO). Norma del Codex para la miel. CODEX STAN 12-1981. **1996** ver. 2.3 (Versión interna 2.04.03). GTI Publisher. Jouve S. A. París. Francia.
- COMISIÓN INTERNACIONAL DE LA MIEL. La calidad de la miel y las normas internacionales. *Vida apícola.* **2000**, 100 (3-4), 48-55.

- CRANE, E. The traditional hive products: honey and beeswax. En: *Bees and Beekeeping. Science, practice and world resources*. Ed. Heinemann Newnes, Oxford. UK. **1990**. pp. 388-451.
- DOCE (DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS). Directiva 2001/110/CE del Consejo de 20 de diciembre de 2001 relativa a la miel. Bruselas. Bélgica. **2002**.
- DOG (DIARIO OFICIAL DE GALICIA). Orden del 8 de febrero de 1989, por la que se aprueba el Reglamento de la denominación "Producto Galego de Calidade-Mel de Galicia". Santiago de Compostela (A Coruña). España. **1989**. Corrección de errores (DOG del 14 de abril de 1989).
- ESTI, M.; PANFILI, G.; MARCONI, E.; TRIVISONNO, M. C. Valorization of the honeys from the Molise region through physico-chemical, organoleptic and nutritional assessment. *Food Chem.* **1997**, 58 (1-2), 125-128.
- ESTUPIÑÁN, S.; SANJUÁN, E.; MILLÁN, R.; GONZÁLEZ-CORTÉS, M. A. Parámetros de calidad de la miel: I. Microbiología, caracteres físico químicos y de envejecimiento: Revisión. *Alimentaria*. **1998**, 296, 89-94.
- FRÍAS, I.; HARDISSON DE LA TORRE, A.; CORRALES, J. Parámetros físico químicos en mieles artesanales de Santa Cruz de Tenerife. *Anal. Bromatol.* **1991**, 53 (4), 339-356.
- HADORN, H.; ZÜRCHER, K. Formolzahl von Honig. Gleichzeitige Bestimmung von Formolzahl, pH, freier Säure und Lactongehalt in Honig. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. u. Hyg.* **1963**, 54 (1), 304-321.
- HUIDOBRO, J. F.; SIMAL, J. Miel de Galicia. *El Campo*. **1984a**, Enero- Marzo Nº 93, 86-96.
- HUIDOBRO, J. F.; SIMAL, J. Parámetros de calidad de la miel III: Acidez (pH, libre, lactónica y total) e índice de formol. *Offarm.* **1984b**, 3 (9), 523-531.
- HUIDOBRO, J. F.; SIMAL, J. Parámetros de calidad de la miel VIII: Comentario a los resultados encontrados en muestras comerciales. *Offarm.* **1985**, 4 (2), 69-73.
- KOHLICH, A.; KRENN, H. Ergebnisse von Untersuchungen über die Werte chemischer und physikalischer Merkmale von Honigen. *Mitt. Klosterneuburg.* **1985**, 35, 210-217.
- LORD, D. W.; SCOTTER, M. J.; WHITTAKER, A. D. ; WOOD, R. The determination of acidity, apparent reducing sugar and sucrose, hydroxymethylfurfural, mineral, moisture, water-insoluble solids contents in honey; Collaborative Trial. *J. Assoc. Publ. Analysts.* **1988**, 26, 51-76.
- MANUEL SUISSE DES DENRÉES ALIMENTAIRES. Office Central Fédéral des Imprimés et du Matériel. 23. Berna. La Suisse. **1974**.
- MARTÍNEZ-GÓMEZ, M. E.; GUERRA HERNÁNDEZ, E.; MONTILLA GÓMEZ, J. Y.; MOLINS MARIN, J. L. Physicochemical analysis of Spanish commercial Eucalyptus honeys. *J. Apic. Res.* **1993**, 32 (3), 121-126.

- 📖 MATEO, R.; BOSCH-REIG, F. Classification of Spanish unifloral honeys by discriminant analysis of electrical conductivity, color, water content, sugars and pH. *J. Agric.Food Chem.* **1998**, 46 (2), 393-400.
- 📖 MATEOS-NEVADO, M. D.; SÁENZ DE LA MAZA, J. A.; MATEOS-NEVADO, B. Mieles de la provincia de Sevilla. I. Estudio analítico de las mieles de la comarca "Sierra Norte". *Anal. Bromatol.* **1992a**, 44 (1), 93-99.
- 📖 MATEOS-NEVADO, M. D.; SÁENZ DE LA MAZA, J. A.; MATEOS-NEVADO, B. Mieles de la provincia de Sevilla. II. Caracterización química y físico química de las mieles de la comarca "La Campiña". *Anal. Bromatol.* **1992b**, 44 (2-3), 101-104.
- 📖 MATEOS-NEVADO, M. D.; SÁENZ DE LA MAZA, J. A.; MATEOS-NEVADO, B. Mieles de la provincia de Sevilla. III. Caracteres químicos de las mieles de la comarca de "La Vega". *Anal. Bromatol.* **1992c**, 44 (2-3), 105-107.
- 📖 MAURIZIO, A. Honigtau-Honigtau-honig. En: *Waldtracht und waldtrachthonig in der Imkerei.* (Kloft, W. J. y Kunkel, H.). **1985**. pp. 268-295.
- 📖 ORTÍZ, A.; FERNÁNDEZ, M. C.; SUBRÁ, E. *Principales características de la miel de La Alcarria.* Consejería de Agricultura y Medio Ambiente. Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha. Toledo. España. **1996**.
- 📖 PARDO, M. A. *Parámetros físico químicos de mieles "Producto Galego de Calidade-Mel de Galicia"*. Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Área de Nutrición y Bromatología. Universidad de Santiago de Compostela. España. **1991**.
- 📖 PÉREZ, C.; CONCHELLO, P.; ARIÑO, A.; UCAR, A.; HERRERA, A. Estudio de algunos parámetros físico químicos en mieles monoflorales de Zaragoza. *Alimentaria.* **1990**, 213, 59-61.
- 📖 PÉREZ-ARQUILLUÉ, C.; CONCHELLO, P.; ARIÑO, A. ; JUAN, T.; HERRERA, A. Quality evaluation of Spanish rosemary (*Rosmarinus officinalis*) honey. *Food Chem.* **1994**, 51, 207-210.
- 📖 PÉREZ-ARQUILLUÉ, C.; CONCHELLO, P.; ARIÑO, A.; JUAN, T.; HERRERA, A. Physicochemical attributes and pollen spectrum of some unifloral Spanish honeys. *Food Chem.* **1995**, 54 (2), 167-172.
- 📖 PERSANO ODDO, L.; BALDI, E.; PIAZZA, M. G. Acidità e pH nei principali mieli uniflorali italiani. *Apicoltura.* **1986**, 2, 145-154.
- 📖 PERSANO ODDO, L.; PIAZZA, M. G.; SABATINI, A. G.; ACCORTI, M. Characterization of unifloral honeys. *Apidologie.* **1995**, 26, 453-465.
- 📖 PIAZZA, M. G.; ACCORTI, M.; PERSANO ODDO, L. Indagine sulle caratteristiche chimico-fisiche dei mieli italiani di castagno e di melata. *Apicolt. Mod.* **1986**, 77, 47-51.
- 📖 POIANA, M.; MANZIU, E.; POSTORINO, S.; RECHICHI, F. & MINCIONE, B. Ricerche sui mieli commercializzati in Italia. Caratteristiche melissopalino-logiche, chimiche, chimico-fisiche ed

organolettiche. Rilievi effettuati sui mieli prodotti negli anni 1989-1994. *Riv. Sc. Alim.* **1997**, 26 (1), 13-42.

- 📖 RIOLOBOS, S. Estudio de la composición físico química (azúcares reductores; sacarosa aparente; humedad; acidez total; acidez libre; acidez lactónica; pH; índice de formol; actividad diastásica; HMF; conductividad eléctrica; cenizas; minerales) de las mieles extremeñas. V *Congreso Nacional de Apicultura*. (Don Benito. Badajoz. España). **1990**, 86-90.
- 📖 SANCHO, M. T. *Estudio de las mieles producidas en la Comunidad Autónoma del País Vasco*. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Área de Nutrición y Bromatología. Universidad de Santiago de Compostela. España. **1990**.
- 📖 SANCHO, M. T.; MUNIATEGUI, S.; HUIDOBRO, J. F.; SIMAL, J. Correlation between the electrical conductivity of honey in humid and in dry matter. *Apidologie*. **1991a**, 22, 221-227.
- 📖 SANCHO, M. T.; MUNIATEGUI, S.; HUIDOBRO, J. F.; SIMAL-LOZANO, J. Miel del País Vasco. I: pH y tipos de acidez. *Anal. Bromatol.* **1991b**, 53 (1), 77-86.
- 📖 SANJUÁN, E.; ESTUPIÑÁN, S.; MILLÁN, R.; CASTELO, M.; PENEDO, J. C.; CARDONA, A. Contribution to the quality evaluation and the water activity prediction of the La Palma island honey. *J. Food Quality*. **1997**, 20, 225-234.
- 📖 SANZ, B.; TRIGUERO, A. Composición química y espectro polínico de mieles españolas. *Anal. Bromatol.* **1970**, 22, 377-406.
- 📖 SANZ, S.; PÉREZ, C.; HERRERA, A.; SANZ, M.; JUAN, T. Composición de las mieles de la Rioja. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. **1994**, 34 (5), 540-552.
- 📖 SERRA-BONHEVÍ, J. Propriétés physico-chimiques, composition et spectre pollinique des miels de Lavandula Latifolia Med. produits en Espagne. *Sciences des aliments*. **1988**, 8 (2), 295-307.
- 📖 SERRA-BONHEVÍ, J. Características físico químicas. Composición de la miel de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) producida en España. *Anal. Bromatol.* **1989**, 41 (1), 41-56.
- 📖 SERRA-BONHEVÍ, J.; GÓMEZ PAJUELO, A.; GONELL GALINDO, J. Composición, propiedades físico químicas y espectro polínico de algunas mieles monoflorales de España. *Alimentaria*. **1987**, 9, 61-84.
- 📖 SERRA-BONHEVÍ, J.; GRANADOS-TARRÉS, E. Physicochemical properties, composition and pollen spectrum of ling heather (*Calluna vulgaris* (L) Hull) honey produced in Spain. *Apidologie*. **1993**, 24, 586-596.
- 📖 SINGH, N.; BATH, P. K. Quality evaluation of different types of Indian honey. *Food Chem.* **1997**, 58 (1-2), 129-133.
- 📖 STITZ, J.; SZIGVÁRT, B. Die elektrische Leitfähigkeit des Honigs. *Z. Unters. Lebensmittel*. **1931**, 63 (2), 211-214.

- 📖 TERRAB, A.; DÍEZ, M. J.; HEREDIA, F. J. Characterisation of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. *Food Chem.* **2002**, 79, 373-379.
- 📖 THRASYVOULOU, A.; MANIKIS, J. Some physicochemical and microscopic characteristics of Greek unifloral honeys. *Apidologie.* **1995**, 26, 441-452.
- 📖 VORWOHL, G. Die Beziehungen zwischen der elektrischen Leitfähigkeit der Honige und ihrer trachtmässigen Herkunft. *Annls. Abeille.* **1964**, 7 (4), 301-309.
- 📖 WHITE, J. W. Jr. Determination of acidity, nitrogen and ash in honey. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1962**, 45 (3), 548-551.
- 📖 WHITE, J. W. Jr. Honey. En: *Advances in Food Research*. Ed. Academic Press. New York. USA. **1978**. vol. 24 pp 287-364.
- 📖 WHITE, J. W. Jr. Composition of honey; Physical characteristics of honey. En: *Honey: A Comprehensive Survey*. (Crane, E.). Ed. Heinemann, London. UK. **1979a**. pp 157-239.
- 📖 WHITE, J. W. Jr. Composición y propiedades de la miel. En: *La Apicultura en los Estados Unidos*. (McGregor, S. E.). Ed. Limusa. México. **1979b**. pp 57-66.
- 📖 WHITE, J. W. Jr.; PETTY, J ; HAGER, R. B. The composition of honey. II. Lactone Content. *J. AOAC Int.* **1958**, 41 (1), 194-197.



ESTUDIO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS
NO AROMÁTICOS EN LA MIEL



CAPÍTULO 5

**DETERMINACIÓN DE LOS ÁCIDOS
ORGÁNICOS NO AROMÁTICOS**



5.1. INTRODUCCIÓN

5.1.1. IMPORTANCIA DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS EN LA MIEL

Como ya se ha comentado, los ácidos orgánicos son componentes minoritarios de la miel ya que se encuentran en una pequeña proporción (< 0.5%). A pesar de ello contribuyen a ciertas propiedades características de este alimento como, por ejemplo, las *propiedades organolépticas* (sabor, aroma y color) y algunas *propiedades físico químicas* (pH, acidez y conductividad eléctrica) (*White, 1979; Crane, 1990*).

Actualmente, al abrirse nuevas líneas de investigación, el interés por su estudio ha aumentado. En esta introducción se han considerado cinco grandes temas en los que se están investigando los ácidos orgánicos.

5.1.1.1. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

White et al. (1963) identificó lo que se denominaba “inhibina” como el peróxido de hidrógeno que se originaba en la reacción de formación del ácido glucónico. Esta sustancia era considerada por algunos autores como el principal componente de la actividad antibacteriana de la miel (*White et al., 1963; Dustmann, 1979; Morse, 1986*). Posteriormente, se observó que otras sustancias como los ácidos orgánicos podrían contribuir a la resistencia que presenta la miel al ataque de los microorganismos (*White, 1978*). En una completa revisión de la actividad antibacteriana de la miel, todos los factores diferentes al peróxido de hidrógeno se agruparon en lo que se denomina actividad antibacteriana no peróxido. Entre estos factores se encuentran el pH y la acidez, la osmolaridad (debida a la concentración de azúcares) y otros componentes con capacidad antibacteriana derivados de las plantas (*Molan, 1992a; 1992b*). En algunos trabajos esta actividad no peróxido se considera más importante, fundamentalmente, por los dos motivos que se citan a continuación. En primer lugar porque durante la maduración de la miel, la glucosa oxidasa se encuentra inactiva y la miel contiene una pequeña cantidad de peróxido de hidrógeno que no se considera suficiente para inhibir el crecimiento bacteriano (*Bogdanov, 1984; 1997*). En segundo lugar esta actividad, al contrario que el peróxido de hidrógeno, no es sensible al calentamiento ni a la luz y se mantiene intacta después del almacenamiento durante largos períodos (*Molan, 1992a; 1992b*).

En lo que se refiere a la acidez y a los ácidos orgánicos, las investigaciones se están centrando en la posible relación entre la acidez/pH y la capacidad antibacteriana de la miel (*Yatsunami y Echigo, 1984; Bogdanov, 1997*), así como en la identificación de ciertas

sustancias de carácter ácido que presentan una importante capacidad antibacteriana (Russell et al., 1988; Wahdan, 1998).

Bogdanov (1997) llegó a la conclusión de que la inhibición bacteriana se correlaciona significativamente con la acidez libre y total pero no con el pH, por lo que los ácidos de la miel tendrían un papel destacado en la actividad antibacteriana de la miel. En este mismo trabajo se sometieron varias mieles a un tratamiento que permitió recoger cuatro fracciones (ácida, básica, no polar/no volátil y volátil). Según este estudio la fracción ácida es la que mayor capacidad antibacteriana posee.

Las sustancias de carácter ácido identificadas hasta ahora como antibacterianas son fundamentalmente ácidos orgánicos aromáticos, como los ácidos cafeico y ferúlico (Wahdan, 1998) y varios derivados del ácido benzoico (Russell et al., 1988). Sin embargo no se han encontrado estudios de la posible participación de los ácidos orgánicos no aromáticos en esta capacidad antibacteriana.

5.1.1.2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La capacidad antioxidante de la miel es similar a la de algunas frutas y verduras frescas, variando en gran medida según el origen floral de la miel (Frankel et al., 1998; Gheldof y Engeseth, 2002; Gheldof et al., 2002). Los compuestos con mayor actividad antioxidante son los ácidos fenólicos y los flavonoides, aunque Gheldof et al. (2002) consideran que sus niveles en la miel son demasiado bajos para que sean los únicos compuestos responsables de la capacidad antioxidante de la miel. Por ello concluyen que esta capacidad es el resultado de la actividad conjunta y de las interacciones que existen entre diferentes componentes como los ácidos fenólicos y flavonoides, proteínas y aminoácidos, enzimas (glucosa-oxidasa, catalasa...), ácidos orgánicos, productos derivados de la reacción de Maillard y otros componentes minoritarios. Gheldof et al. (2002) estudiaron la posible relación entre la capacidad antioxidante de la miel y algunos de los compuestos antes mencionados, encontrándose dos relaciones significativas, una con los compuestos fenólicos y otra con el contenido en proteínas. Como representante de los ácidos orgánicos eligieron al **ácido glucónico** ya que es el mayoritario en la miel, utilizando el método desarrollado en nuestro equipo de investigación (Mato et al., 1997) para determinar su concentración. No se encontró una relación estadísticamente significativa entre este contenido en ácido glucónico y la actividad antioxidante de la miel.

5.1.1.3. INDICADORES DE FERMENTACIÓN

Una elevada acidez es considerada como un factor indicador de la fermentación de la miel en la mayor parte de las legislaciones, entre ellas la española (BOE, 2003). Como se ha comentado anteriormente, la fermentación es la degradación biológica más importante que sucede en la miel. La llevan a cabo una serie de levaduras que bajo unas determinadas condiciones de contenido en agua y temperatura provocan la formación de etanol a partir de los azúcares presentes y, si la reacción continúa, de **ácido acético** (Gonnet, 1982). Por tanto, y aunque el ácido acético se encuentra de forma natural en la mayor parte de las mieles, una excesiva concentración de dicho ácido, no precisada por el autor, indicaría que la miel ha sufrido un proceso de fermentación.

5.1.1.4. TRATAMIENTO CONTRA LA VARROASIS

Varroa jacobsoni es uno de los parásitos más importantes de las colonias de *Apis mellifera* y puede causar la muerte de las colmenas no tratadas en pocos años (Anderson y Trueman, 2000). Para combatir la varroasis, los apicultores han utilizado con éxito una gran cantidad de sustancias químicas de origen sintético como el amitraz, fluvalinato, cymazol, flumetrina, acrinatrina, cumaphos, etc. Sin embargo en los últimos años, y debido a la aplicación reiterada de un único pesticida, han surgido problemas de resistencias al tratamiento. Esto ha llevado a la necesidad de aumentar las dosis de estos productos con la consiguiente aparición de residuos en la miel. Por estas razones, se están investigando tratamientos alternativos contra la varroasis que utilizan sustancias naturales como los componentes de los aceites esenciales (timol, eucaliptol, mentol o alcanfor) y los **ácidos orgánicos** (Imdorf et al., 1996; Cossu y Alamanni, 1999; Gregorc y Planinc, 2001). Hasta el momento no se han detectado resistencias a estos nuevos acaricidas ni acumulación en las colmenas, aunque no se descarta su aparición en un futuro si su uso aumenta y los productos se aplican repetidamente (Milani, 2001).

Los ácidos orgánicos investigados, hasta el momento, para su uso como acaricidas son, fundamentalmente, los **ácidos fórmico, láctico y oxálico**. También se han estudiado, en menor medida, el **ácido cítrico** (Milani, 2001) y los **ácidos tánico y salicílico** (Eshbah y Ahmed, 1994).

5.1.1.4.1. ÁCIDO FÓRMICO

La eficacia del **ácido fórmico** contra la varroasis es similar a otras sustancias químicas ampliamente utilizadas como el fluvalinato (Calderone, 1999; Calderone, 2000; Hood y McCreadie, 2001). Actualmente, al ser este ácido muy volátil y nocivo por inhalación,

se han desarrollado diferentes sistemas de aplicación con el fin de mejorar su eficacia y reducir la toxicidad para el apicultor (*Fries, 1989; Daniels et al., 1999; Kochansky y Shimanuki, 1999*).

Stoya et al. (1986) han estudiado los residuos del ácido fórmico en la miel después de tratar las colmenas con este ácido para combatir la varroasis. El contenido de ácido fórmico en mieles procedentes de colmenas tratadas resultó ser, según la técnica de aplicación utilizada, de 54 a 82 veces mayor que el contenido natural de mieles procedentes de colmenas no tratadas. Este contenido desciende, tras el tratamiento, de forma asintótica con el tiempo hasta situarse en aproximadamente los niveles naturales después de transcurridos entre 5 y 8 meses. *Hansen y Guldborg (1988)* también investigaron los residuos de ácido fórmico en mieles de colmenas tratadas con este ácido. Las muestras de miel fueron extraídas y analizadas 8 o 9 meses después del tratamiento. Los autores llegan a la conclusión de que, después de transcurridos estos meses, parece que el contenido en ácido fórmico en las mieles de las colonias tratadas es aproximadamente equivalente a los niveles de ácido fórmico presente de forma natural en la miel. Por su parte, *Bogdanov et al. (2002)* encontraron un pequeño pero significativo aumento del contenido de ácido fórmico en la miel después del tratamiento de las colmenas con este ácido durante un período de 7 días. Según los autores, este aumento, similar en cosechas de diferentes años, no es problemático ya que no influye en la calidad de la miel.

5.1.1.4.2. ÁCIDO LÁCTICO

Eshbah y Ahmed (1994) sugieren que los tratamientos con **ácido láctico** son menos efectivos para combatir la varroasis que aquellos que utilizan el ácido oxálico. Sin embargo y bajo determinadas condiciones *Kraus y Berg (1994)* demuestran que este ácido posee una eficacia similar al tratamiento con cumaphos.

Stoya et al. (1987) estudiaron los residuos de los ácidos D-(-)-láctico y L-(+)-láctico en la miel al tratar las colmenas con una solución racémica de ácido láctico. Así, determinaron que sólo el contenido de ácido L-(+)-láctico se veía aumentado 10 veces con respecto a los niveles naturales, no existiendo prácticamente cambios en el contenido de ácido D-(-)-láctico con respecto a las mieles procedentes de colmenas no tratadas. Aproximadamente 7 u 8 semanas después de iniciado el tratamiento, el ácido L-(+)-láctico disminuye de forma prácticamente asintótica hasta su contenido natural.

5.1.1.4.3. ÁCIDO OXÁLICO

Numerosos trabajos demuestran la eficacia del **ácido oxálico** en el tratamiento de la varroasis. Según los resultados obtenidos por *Gregorc y Planinc (2001)* se concluye que el ácido oxálico tiene un efecto acaricida limitado en colmenas con crías pero una gran efectividad en el período sin crías. Se han investigado diferentes técnicas de aplicación, entre ellas la pulverización o fumigación (*Nanetti et al., 1995*) y el goteo o aplicación tópica (*Imdorf et al., 1997; Mutinelli et al., 1997*). Hay que destacar, que la eficacia de una solución de ácido oxálico por la técnica del goteo aumenta si se utiliza junto a la sacarosa (*Mutinelli et al., 1997; Milani, 2001; Prandin et al., 2001*).

Al igual que sucedía con los dos ácidos anteriores, existen algunos trabajos en los que se ha evaluado si el tratamiento de las colmenas contra la varroasis con ácido oxálico supone un aumento del contenido natural de este ácido en la miel. El resultado de estos trabajos coinciden en que el contenido natural no se ve influenciado por el tratamiento con ácido oxálico (*Mutinelli et al., 1997; Cossu y Alamanni, 1999; Alamanni et al., 2000; Del Nozal et al., 2000, Bogdanov et al., 2002*).

5.1.1.5. FACTORES DISCRIMINANTES DEL ORIGEN BOTÁNICO Y/O GEOGRÁFICO

Las limitaciones del análisis polínico, entre las que se encuentra el ser un análisis muy complejo, costoso y dependiente de expertos con amplios conocimientos, ha llevado al estudio de ciertos componentes minoritarios que podrían utilizarse como marcadores de algunos tipos de miel. Se busca, por tanto, una alternativa al espectro polínico que permita identificar el origen botánico de las mieles (*Molan, 1996*).

Anklam (1998) en una revisión bibliográfica de los métodos analíticos para la determinación del origen geográfico y botánico de la miel, considera, entre otros componentes, la investigación del perfil de los ácidos orgánicos no aromáticos para una posible caracterización de las mieles de diferentes orígenes botánicos.

Los trabajos que aportan datos sobre el contenido de estos ácidos orgánicos en los diferentes tipos de miel son escasos y este número, aún es menor, si se buscan estudios en los que se relacione su composición con el origen geográfico o botánico. Esto contrasta con el hecho de que los tipos de acidez son ampliamente utilizados en múltiples trabajos como parámetros discriminantes de la miel (*Stefanini, 1988; Sancho et al., 1991; Krauze y Zalewski, 1991; Peña y Herrero, 1993; Sanz et al., 1995; López et al., 1996; Ortiz et al.,*

1996; Gómez-Bárez et al., 2000; González-Paramás et al., 2000; Popek, 2002; Sousa et al., 2002; Terrab et al., 2002).

Talpay (1988) demostró, desde el punto de vista estadístico, que el contenido en **ácido cítrico** permite diferenciar los dos grupos de mieles clasificados según su origen botánico: miel de flores y de mielada. Asimismo estudió el contenido en ácido cítrico de las mieles procedentes de colmenas en las que se alimentaba artificialmente a las abejas con azúcar, observando que su contenido era menor que el de las mieles florales aunque no se pudieron establecer diferencias estadísticamente significativas.

Cherchi et al. (1994) desarrollaron un método de determinación simultánea de los contenidos de los **ácidos glucónico, pirúvico, málico, cítrico, succínico y fumárico** en la miel que podría ser utilizado junto con análisis físico químicos, organolépticos y polínicos, para verificar el origen de la miel.

Wilkins et al. (1995) identificaron dos diácidos alifáticos (**ácidos 2-metoxibutanodioico y 4-hidroxi-3-metil-trans-2-pentenodioico**) en las mieles de *Knigtea excelsa*. Después de analizar más de 200 mieles de Nueva Zelanda de diferentes orígenes, estos ácidos sólo se detectaron en muestras con una importante contribución de polen de *Knigtea excelsa* por lo que según los autores podrían ser considerados como marcadores de este tipo de mieles.

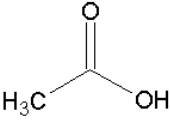
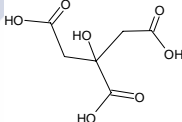
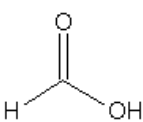
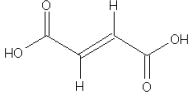
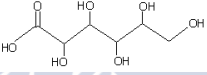
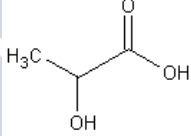
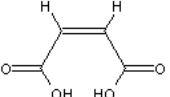
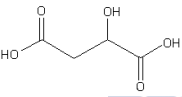
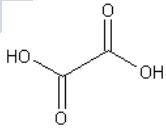
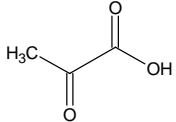
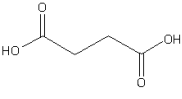
Ferreres et al. (1996) aislaron, identificaron y cuantificaron los **ácidos cis, trans-abscísico y trans, trans-abscísico** en miel de brezo (*Erica* sp.) de una zona de Portugal. Los autores no detectaron estos ácidos orgánicos en ningún otro tipo de miel monofloral analizada por lo que consideran que, después de analizar un mayor número de muestras de diferentes orígenes geográficos, ambos ácidos podrían ser útiles como marcadores de la miel de *Erica* sp. En un reciente trabajo, Gheldof et al. (2002) encontró mieles monoflorales de diferentes orígenes al brezo en las que existía **ácido cis, trans-abscísico** aunque las cantidades encontradas fueron 10 veces menores.

Del Nozal et al. (1998) también consideran que el contenido en ácidos orgánicos podría ser útil para caracterizar mieles de diferentes orígenes florales. Para estos autores los ácidos que parecen definir mejor el origen botánico, desde el punto de vista estadístico, son los **ácidos cítrico, pirúvico, glucónico, málico y quínico**. También observan que las mieles de *Erica* sp. contienen una elevada cantidad de **ácido quínico**, las de *Quercus* sp. poseen un bajo contenido en **ácido pirúvico** y un alto contenido en **ácidos málico y succínico**, las de *Thymus* sp. presentan una elevada cantidad de **ácido cítrico** y, por último, el **ácido galacturónico** sólo se ha encontrado en las mieles multiflorales.

5.1.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS DE LA MIEL DETERMINADOS EN ESTE TRABAJO

En la miel se han identificado con grados variables de certidumbre 19 ácidos orgánicos (Crane, 1990). De ellos, en este trabajo se han cuantificado, por los diferentes métodos puestos a punto, 11 ácidos orgánicos cuyas características se relacionan en la Tabla XIX.

Tabla XIX. Relación de las estructuras, números CAS, pesos moleculares y constantes de disociación de los ácidos orgánicos objeto de estudio en este trabajo
(The Merck Index, 2001; CRC Handbook of Chemistry and Physics, 2001)

 <p>CAS [64-19-7] PM = 60.05 g/mol pKa₁ = 4.76</p> <p>ÁCIDO ACÉTICO</p>	 <p>CAS [77-92-9] PM = 192.1 g/mol pKa₁ = 3.14 pKa₂ = 4.77 pKa₃ = 6.39</p> <p>ÁCIDO CÍTRICO</p>	 <p>CAS [64-18-6] PM = 46.03 g/mol pKa₁ = 3.75</p> <p>ÁCIDO FÓRMICO</p>
 <p>CAS [110-17-8] PM = 116.1 g/mol pKa₁ = 3.03 pKa₂ = 4.44</p> <p>ÁCIDO FUMÁRICO</p>	 <p>CAS [526-95-4] PM = 196.2 g/mol pKa₁ = 3.60</p> <p>ÁCIDO GLUCÓNICO</p>	 <p>CAS [79-33-4] PM = 90.08 g/mol pKa₁ = 3.79</p> <p>ÁCIDO LÁCTICO</p>
 <p>CAS [110-16-7] PM = 116.1 g/mol pKa₁ = 1.83 pKa₂ = 6.07</p> <p>ÁCIDO MALEICO</p>	 <p>CAS [97-67-6] PM = 134.1 g/mol pKa₁ = 3.40 pKa₂ = 5.11</p> <p>ÁCIDO MÁLICO</p>	 <p>CAS [144-62-7] PM = 90.1 g/mol pKa₁ = 1.23 pKa₂ = 4.19</p> <p>ÁCIDO OXÁLICO</p>
 <p>CAS [127-17-3] PM = 88.06 g/mol pKa₁ = 2.39</p> <p>ÁCIDO PIRÚVICO</p>	 <p>CAS [110-15-6] PM = 118.1 g/mol pKa₁ = 4.16 pKa₂ = 5.61</p> <p>ÁCIDO SUCCÍNICO</p>	<p>ÁCIDOS ORGÁNICOS DE LA MIEL DETERMINADOS EN ESTE TRABAJO</p>

5.2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

En relación a la identificación y cuantificación de los ácidos orgánicos en la miel, es de destacar, las escasas referencias bibliográficas que existen sobre este tema. Los métodos utilizados para su determinación son los que a continuación se relacionan.

5.2.1. MÉTODOS ENZIMÁTICOS

Tourn et al. (1980) aplicaron los tests enzimáticos UV de la firma *Boehringer-Mannheim*, sin previa clarificación, para la cuantificación de los **ácidos málico** y **cítrico** en 6 muestras (3 muestras de miel de mielada, 2 de miel de flores y 1 de jalea real). No se aporta ningún dato ni de precisión ni de recuperación del método propuesto. Según los autores el método enzimático presenta ventajas apreciables con respecto a otros métodos, no sólo en especificidad y sensibilidad, sino también en rapidez y sencillez de trabajo.

Stoya et al. (1986) determinaron el contenido en **ácido fórmico** por el método enzimático utilizando el test UV de la firma comercial *Boehringer-Mannheim* en mieles procedentes de colmenas no tratadas contra la varroasis (contenido natural del ácido en la miel) y en mieles procedentes de colmenas tratadas con este ácido (residuos del ácido en la miel). El porcentaje medio de recuperación fue de $96.0 \pm 6.5\%$.

Stoya et al. (1987) utilizaron el test UV de *Boehringer-Mannheim* para la determinación del contenido en **ácido D(-) y L(+)-láctico** por el método enzimático en mieles procedentes de colmenas no tratadas contra la varroasis (contenido natural de los ácidos en la miel) y en mieles procedentes de colmenas tratadas con el racemato de este ácido (residuos de los ácidos en la miel). Además se muestran los cocientes (o relaciones) existentes entre ambos isómeros (D(-) / L(+)), encontrándose que en la mayor parte de las muestras este cociente es menor de 3, aunque existen algunas muestras con relaciones mayores de 20. El porcentaje medio de recuperación para los ácidos D(-)-láctico y L(+)-láctico fue de $83 \pm 13\%$ y de $96 \pm 6\%$, respectivamente.

Hansen y Guldborg (1988) analizaron el contenido en **ácido fórmico** de mieles danesas. Unas muestras eran procedentes de colmenas no tratadas contra la varroasis y otras procedentes de colmenas que no tenían varroasis pero que fueron tratadas con este ácido y extraídas 8-9 meses después del tratamiento. En ambos casos se utilizó el test enzimático de la firma *Boehringer-Mannheim*. El límite de detección estimado fue de 5-10 mg de ácido fórmico/kg de miel.

Talpay (1988) cuantificó el contenido en **ácido cítrico** de 153 mieles florales, 97 de mielada y 18 procedentes de la alimentación artificial de las abejas con azúcar. Para ello

aplicó directamente el test enzimático UV de *Boehringer-Mannheim*, obteniendo una precisión con coeficientes de variación (RSD%) que oscilaron entre 1.61% y 1.72% y una recuperación de $92.0 \pm 6.3\%$.

Talpay (1989) analizó el contenido en **ácido fórmico** de 306 mieles de diferentes orígenes florales y geográficos. Para ello utilizó el test enzimático UV de *Boehringer-Mannheim*, obteniendo una precisión con un coeficiente de variación (RSD%) de 4.09% y una recuperación de $97.6 \pm 1.7\%$.

Sabatini et al. (1994) utilizaron los tests enzimáticos UV de *Boehringer-Mannheim* para determinar el contenido de **ácido fórmico**, **ácido D-láctico** y **L-láctico** en 42 mieles monoflorales de 7 especies diferentes. Los autores indican que previamente la solución de miel fue clarificada con carbón activo para reducir la influencia de la coloración de la miel y eliminar cierta inestabilidad en la lectura espectrofotométrica. En este trabajo no se ofrecen datos ni de precisión ni de recuperación del método.

Mato et al. (1997) pusieron a punto un micrométodo enzimático de determinación del contenido de **ácido D-glucónico total** en la miel empleando el test UV de *Boehringer-Mannheim*. Para asegurar la ruptura de la D-glucono- δ -lactona se ha llevado la solución de miel a pH 10.5 durante 10 minutos a la temperatura del laboratorio y una vez transcurrido este tiempo, se ha disminuido el pH a 7.8. Este método combina precisión (RSD% $\leq 0.30\%$), buena recuperación ($99.8 \pm 0.40\%$), especificidad, simplicidad y bajo coste.

Mutinelli et al. (1997) determinaron el contenido de **ácido oxálico** en la miel por el método enzimático usando un test UV de la firma comercial *Sigma*. El límite de detección estimado fue de 3 mg ácido oxálico/kg miel. No se ofrecen resultados de la puesta a punto del método propuesto en la miel, tales como datos de precisión y recuperación.

Mato et al. (1998a) desarrollaron un micrométodo enzimático de determinación específica del contenido de **ácido cítrico** en la miel utilizando el test UV de *Boehringer-Mannheim* con clarificación previa de la muestra con polivinilpolipirrolidona (PVPP). En este trabajo se hace una comparación de la precisión y exactitud del método directo, es decir, sin ningún tipo de clarificación y del método propuesto que introduce la clarificación previa de la muestra con polivinilpolipirrolidona (PVPP). De los ensayos realizados se concluye que los resultados de precisión y exactitud del método propuesto (precisión entre 0.26 y 1.60% y recuperación entre 98.0 y 100.9%) son mejores que los encontrados para el método directo (precisión entre 1.02 y 2.66% y recuperación entre 84.0 y 115.6%).

Mato et al. (1998b) aplicaron a la miel el micrométodo enzimático de determinación directa del contenido de **ácido L-málico** utilizando el test UV de *Boehringer-Mannheim*.

Para ello se llevaron a cabo estudios de precisión y exactitud, dando como resultado un $RSD\% \leq 3.5\%$ y una recuperación media de $100 \pm 3.5\%$. Asimismo, se han realizado ensayos de clarificación de la muestra utilizando diferentes clarificantes (polivinilpolipirrolidona [PVPP], Carrez, Carrez con NaOH, Carrez con KOH, Carrez con polivinilpolipirrolidona [PVPP] y carbón activo) pero no se obtuvo una mejora en los resultados de la precisión y recuperación.

Cossu y Alamanni (1999) adaptaron a la miel un método enzimático utilizado ampliamente para la cuantificación del ion oxalato en la orina, determinando el contenido de **ácido oxálico** en 40 muestras procedentes de Cerdeña (Italia). Para llevar a cabo este estudio se ha utilizado un test enzimático de Sigma clarificando previamente la muestra de miel con carbón activo. El porcentaje medio de recuperación obtenido fue de $90.8 \pm 1.0\%$.

Alamanni et al. (2000) analizaron el contenido en **ácido oxálico** de 49 muestras florales aplicando el método enzimático desarrollado por Cossu y Alamanni (1999). Los resultados encontrados fueron comparados con los obtenidos por un método propuesto de determinación simultánea de los ácidos oxálico, fórmico y láctico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con previa extracción en fase sólida (SPE) de los ácidos de la muestra. Los autores afirman que existe una buena correlación entre los resultados obtenidos por ambos métodos, cromatográfico y enzimático. Se especifica que no ha sido posible la cuantificación, por el método enzimático, del ácido oxálico en las mieles de madroño (*Arbutus unedo* L.) al existir una reacción paralela no controlable que impedía que la absorbancia se estabilizase.

Bogdanov et al. (2002) determinaron el contenido de los **ácidos fórmico y oxálico** en la miel empleando el test UV de la firma comercial *Boehringer-Mannheim* para el ácido oxálico, que permite cuantificar ambos ácidos en la misma muestra. Los coeficientes de variación (RSD%) obtenidos en los estudios de precisión del método fueron de 2.9 y 4.4% para el ácido fórmico y 13.4 y 18.4% para el ácido oxálico. La recuperación obtenida para el ácido fórmico fue de $93 \pm 4\%$, mientras que para el ácido oxálico fue de $84 \pm 24\%$. Los límites de detección de ambas determinaciones oscilaron entre 3 y 5 mg/kg.

5.2.2. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Stinson et al. (1960) separaron e identificaron algunos ácidos orgánicos de la miel (entre ellos los **ácidos acético, cítrico, fórmico, glucónico, láctico, málico y succínico**) utilizando métodos de cromatografía en papel, en columna y de intercambio iónico.

5.2.2.1. CROMATOGRAFÍA GASEOSA (GC)

Echigo y Takenaka (1974) emplearon un método de cromatografía gaseosa (GC) para la determinación, en aproximadamente 45 minutos, de diez ácidos orgánicos, entre los que se encontraban los **ácidos oxálico, succínico, fumárico, málico, cítrico y glucónico**. Al ser sustancias poco volátiles es necesario derivatizarlas previamente utilizando los trimetilsilil derivados.

Wilkins et al. (1995) identificaron en la miel 32 ácidos dicarboxílicos alifáticos como ésteres metílicos mediante un método de cromatografía gaseosa (GC) y detección por espectrometría de masas (MS). De ellos 18 fueron cuantificados, entre los que se encuentran los **ácidos málico y succínico**. La metodología y puesta a punto de los procesos de extracción, derivatización y análisis cromatográfico fueron descritos previamente por *Tan et al. (1988)* en la determinación de compuestos de diferente naturaleza: hidrocarburos (C₂₁ - C₃₃), ácidos aromáticos, diácidos y ácidos grasos de cadena lineal (C₈ - C₂₈).

Horvath y Molnár-Perl (1998) desarrollaron un procedimiento de cromatografía gaseosa (GC) y detección por espectrometría de masas (MS) para la determinación simultánea, como trimetilsilil derivados, de constituyentes mayoritarios (azúcares) y minoritarios (entre ellos, ácidos orgánicos) en la miel. Este método permite la cuantificación de 9 ácidos carboxílicos aromáticos y alifáticos entre los que se encuentran los **ácidos málico, cítrico, isocítrico, succínico y quínico**. Aplicando este método es posible la identificación y cuantificación del ácido cítrico e isocítrico, isómeros que se diferencian sólo en la posición de los grupos hidroxilos.

Verzera et al. (2001) pusieron a punto un método de cromatografía gaseosa (GC) con detección por espectrometría de masas (MS) con una previa microextracción en fase sólida (SPME) que permite la identificación de 113 compuestos volátiles en 15 muestras de diferentes orígenes florales de Sicilia (Italia). Entre estos compuestos volátiles analizados se encuentran ácidos orgánicos alifáticos como el **ácido acético** y aromáticos como el benzoico, respectivamente. En este trabajo no se aportan datos de la cuantificación de estos compuestos. Según los autores, el método SPME-GC-MS utilizado es simple, rápido y reproducible y proporciona información útil para la determinación del origen floral de la miel.

5.2.2.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA (HPLC, IC)

Pérez-Cerrada et al. (1989) desarrollaron un método de determinación de los aniones inorgánicos cloruros, fosfatos y sulfatos por cromatografía iónica (IC) con detector de

conductividad. Esta técnica ha sido aplicada a la determinación de estos aniones en muestras reales con alto contenido en azúcares como leche condensada, mosto, caramelo líquido, miel, etc. No existen interferencias de matriz y la reproducibilidad, según los autores, es aceptable. Este método permite, además, la determinación de los **ácidos málico, tartárico y oxálico**.

Cherchi et al. (1994) identificaron varios ácidos orgánicos en la miel y de ellos, cuantificaron los **ácidos glucónico, pirúvico, málico, cítrico, succínico y fumárico** en 48 mieles florales por un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección UV y con purificación previa de las muestras mediante extracción en fase sólida (SPE) con un cartucho de intercambio iónico. La separación cromatográfica fue llevada a cabo mediante la utilización de dos columnas C₁₈ de fase reversa conectadas en serie y con ácido sulfúrico (pH = 2.45) a un flujo de 0.7 mL/min como fase móvil en un tiempo de análisis de 60 minutos. Los porcentajes medios de recuperación oscilaron entre el 89 y el 104% según los ácidos orgánicos. En este trabajo no se presentan datos de precisión. Si se varía el pH de la fase móvil, algunos de los ácidos que salen solapados al pH del método se podrían separar. Según los autores parece ser que los ácidos policarboxílicos como el cítrico y el fumárico son los más sensibles a cualquier cambio en la fase móvil.

Cherchi et al. (1995) cuantificaron el contenido de los **ácidos glucónico, pirúvico, málico, cítrico, succínico y fumárico** en 37 mieles monoflorales de Cerdeña (Italia), mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con purificación previa de las muestras por extracción en fase sólida (SPE) siguiendo la metodología aplicada por *Cherchi et al. (1994)*. Además, y con el fin de caracterizar las muestras de esta región de Italia, se determinaron otros parámetros físico químicos, organolépticos, microbiológicos y palinológicos.

Defilippi et al. (1995) determinaron el **ácido fórmico** por cromatografía iónica (IC) con detector conductimétrico, utilizando como fase móvil tampón carbonato/bicarbonato a una concentración de 0.25:2.75 mM (pH = 10.1) y a un flujo de 1 mL/min. No es necesario ningún tipo de purificación ni extracción de la miel. El tiempo de análisis es menor de 5 minutos. Según los autores este método es simple, exacto y dotado de una gran sensibilidad en la miel, lo que permite su empleo en análisis rutinarios.

Del Nozal et al. (1998) cuantificaron los **ácidos cítrico, pirúvico, galacturónico, glucónico, málico, citramálico, quínico, succínico, fumárico y fórmico** en 57 muestras de miel de diferentes orígenes botánicos. Para ello los autores utilizaron dos sistemas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección UV y con purificación previa de la muestra mediante extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos de intercambio

aniónico. Uno de los métodos consiste en utilizar una columna de intercambio aniónico (específica para ácidos orgánicos) con ácido sulfúrico 5 mM a un flujo de 0.5 mL/min como fase móvil. El otro emplea dos columnas de fase reversa C₁₈ conectadas en serie, siendo la fase móvil amonio dihidrógenofosfato a pH = 2.2 y a un flujo de 0.7 mL/min. En ambos métodos el tiempo aproximado de análisis fue de 30 minutos. Hay que destacar que, en este trabajo, no se ofrecen datos de precisión ni de recuperación en muestras de miel, sino que estos datos se ofrecen sobre patrones de los ácidos o sobre jarabes que pretenden simular la composición de la miel.

Alamanni et al. (2000) analizaron el contenido de los **ácidos oxálico, láctico y fórmico** en 49 muestras monoflorales procedentes de Cerdeña (Italia). Para ello pusieron a punto un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección UV y con purificación previa de las muestras mediante extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos de intercambio aniónico. La separación cromatográfica tiene lugar en 20 minutos utilizando una columna específica para ácidos orgánicos y como fase móvil, ácido sulfúrico al 0.025 N a un flujo de 0.6 mL/min. Los coeficientes de variación de la repetibilidad del método para los ácidos oxálico, láctico y fórmico han sido de 2.8, 1.3 y 4.3%, respectivamente, mientras que los porcentajes de recuperación media han sido de 91.3, 94.5 y 93.7%, respectivamente. Como ya se ha comentado en el apartado 5.2.1. los resultados para el ácido oxálico fueron comparados con los obtenidos por el método enzimático.

Del Nozal et al. (2000) determinaron el **ácido oxálico** (como oxalato), junto a otros aniones inorgánicos como el sulfato y el nitrato, en 99 mieles florales y de mielada mediante un método de cromatografía iónica (IC) con detección conductimétrica. Para evitar las interferencias de matriz, como en los casos anteriores, se sometió la muestra a una extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos de intercambio iónico. La separación cromatográfica se llevó a cabo en aproximadamente 50 minutos, utilizando una columna de intercambio aniónico y como fase móvil una mezcla de borato-gluconato de litio (1.4%), n-butanol (2.0%), acetonitrilo (12.0%) y agua (84.6%) a un flujo de 2 mL/min. La repetibilidad del método para el ácido oxálico ha sido de 4.50%, mientras que el porcentaje de recuperación medio obtenido fue de $92.90 \pm 3.34\%$.

Casella y Gatta (2001) desarrollaron un método de cromatografía de intercambio aniónico utilizando detección amperométrica con potencial aplicado constante para la determinación de ácidos orgánicos como los ácidos gálico, ascórbico, glucónico, lactobiónico, galacturónico y glucurónico. La separación cromatográfica tiene lugar en menos de 20 minutos mediante una columna de intercambio aniónico con una fase móvil alcalina compuesta por NaOH 0.1 M y acetato de sodio 80 mM. El método propuesto ha sido

aplicado a muestras reales como té, vinagre o miel. En el caso de la miel sólo se ha cuantificado el **ácido glucónico**, siendo los coeficientes de variación del método de 9% para la precisión y de 98% para la recuperación. Según los autores el método permite la determinación de varios ácidos orgánicos en matrices reales sin complicados procesos de extracción o derivatización y con una buena sensibilidad, reproducibilidad y recuperación.

5.2.3. MÉTODOS ELECTROFORÉTICOS

Dentro de los métodos electroforéticos, la electroforesis capilar (CE) es una técnica de separación relativamente reciente que ha adquirido una gran importancia analítica en los últimos años. A pesar de ello, y si nos referimos a la miel, esta técnica está poco desarrollada lo que se refleja en la escasez de trabajos en los que se determine alguno de sus componentes. La electroforesis capilar en la **miel** se ha aplicado al análisis de:

- ✓ Azúcares (Noe et al. 1996).
- ✓ Componentes fenólicos (Andrade et al. 1997; Weston et al., 1999).
- ✓ Flavonoides (Delgado et al., 1994a; Delgado et al., 1994b).
- ✓ Residuos de antibióticos (Chen et al., 2001).

La separación y cuantificación de los ácidos orgánicos es una importante área de aplicación de la electroforesis capilar (Stover, 1997). Existe una gran cantidad de trabajos en los que los ácidos orgánicos se han cuantificado en alimentos como, por ejemplo:

- ✓ Agua de consumo humano (Chen et al., 1999)
- ✓ Bebidas refrescantes (Jimidar y Hamoir, 1993; Kaniansky et al., 1994; Wu et al., 1995; Soga y Ross, 1999).
- ✓ Café (Kelly y Nelson, 1993)
- ✓ Cerveza (DeVries, 1993; Heiger y Weinberger, 1994; Soga, 1996; Soga y Ross, 1997; Soga y Wakaura, 1997; Klampfl y Katzmayer, 1998; Klampfl, 1999).
- ✓ Leche y productos lácteos (Kuban y Karlberg, 1997; Izco et al., 2002a y 2002b).
- ✓ Licores (García-Moreno et al., 2001; Soga y Imaizumi, 2001; Moreno et al., 2003).
- ✓ Pan (Ackermans et al., 1992)
- ✓ Productos azucarados (Lalljie et al., 1993; Kaniansky et al., 1994; O'Flaherty et al., 2001).
- ✓ Salsas (Kenney, 1991; Soga y Ross, 1999).
- ✓ Té (Wu et al., 1995; Horie et al., 1998).

- ✓ Vegetales y frutas (*Jimidar et al., 1995; Trevaskis y Trenerry, 1996; Fukushi et al., 1997; Liao et al., 2001; Roselló et al., 2002*).
- ✓ Vinagre (*Castro et al., 2002; Moreno et al., 2003*).
- ✓ Vinos y mostos (*Huang et al., 1989; Kenney, 1991; Kelly y Nelson, 1993; Levi et al., 1993; Kaniansky et al., 1994; Stathakis y Cassidy, 1995; Soga, 1996; Arellano et al., 1997a; Arellano et al., 1997b; Klampfl et al., 1998; Kendl y Kupina, 1999; Mallet et al., 1999; Castiñeira et al., 2000; García-Moreno et al., 2001; O'Flaherty et al., 2001; Castiñeira et al., 2002; Moreno et al., 2003*).
- ✓ Zumos de frutas (*Kenney, 1991; López-Martínez y Rodríguez-Roldán, 1993; Kaniansky et al., 1994; Wu et al., 1995; Arellano et al., 1997a; Arellano et al., 1997b; Kuban y Karlberg, 1997; Xiong y Li, 1998; Soga y Ross, 1999; Saavedra et al., 2000; Saavedra et al., 2001; Vorarat et al., 2002*).

Sin embargo y hasta este momento, en la bibliografía consultada, sólo se ha encontrado una referencia en la que los ácidos orgánicos se han determinado en la **miel** (*Boden et al., 2000*). En este trabajo los autores aplican varios métodos de electroforesis capilar a la identificación, aunque no cuantificación, de algunos analitos en varias matrices alimentarias. Así identifican aniones orgánicos e inorgánicos en miel y ketchup; cationes y aminas en agua mineral, comida infantil, zumos de frutas y yema de huevo; carbohidratos en bebidas refrescantes, ketchup y miel. Concretamente, en lo que se refiere a la determinación de aniones orgánicos e inorgánicos en la miel, *Boden et al. (2000)* sólo identifican el **ácido cítrico** y los aniones inorgánicos cloruro y fosfato. La separación tiene lugar en 8 minutos a una temperatura de 22 °C, con detección UV y lectura indirecta a 232 nm, utilizando como electrolito ácido salicílico 7.5 mM, TRIS (tris[hidroxiometil]aminometano) 15 mM, Ca(OH)₂ 1 mM y DTAOH (hidróxido de dodeciltrimetilamonio) 0.35 mM.

En la Tabla XX se resumen todos los métodos de análisis anteriormente mencionados, desglosados para cada uno de los ácidos orgánicos de la miel objeto de estudio en este trabajo. Sólo se relacionan aquellos métodos en los que, además de identificar, se cuantifican estos ácidos orgánicos.

Tabla XX (continúa). Métodos de análisis en la miel utilizados para la cuantificación de los ácidos orgánicos objeto de estudio en este trabajo

Ácido orgánico	Método de análisis	Autor/es
ÁCIDO ACÉTICO	—	—
ÁCIDO CÍTRICO	GC ENZIMÁTICO ENZIMÁTICO HPLC HPLC HPLC GC - MS ENZIMÁTICO	<i>Echigo y Takenaka (1974)</i> <i>Tourn et al. (1980)</i> <i>Talpay (1988)</i> <i>Cherchi et al. (1994)</i> <i>Cherchi et al. (1995)</i> <i>Del Nozal et al. (1998)</i> <i>Horvath y Molnár-Perl (1998)</i> <i>Mato et al. (1998a)</i>
ÁCIDO FÓRMICO	ENZIMÁTICO ENZIMÁTICO ENZIMÁTICO ENZIMÁTICO IC HPLC HPLC ENZIMÁTICO	<i>Stoya et al. (1986)</i> <i>Hansen y Guldborg (1988)</i> <i>Talpay (1989)</i> <i>Sabatini et al. (1994)</i> <i>Defilippi et al. (1995)</i> <i>Del Nozal et al. (1998)</i> <i>Alamanni et al. (2000)</i> <i>Bogdanov et al. (2002)</i>
ÁCIDO FUMÁRICO	GC HPLC HPLC HPLC	<i>Echigo y Takenaka (1974)</i> <i>Cherchi et al. (1994)</i> <i>Cherchi et al. (1995)</i> <i>Del Nozal et al. (1998)</i>
ÁCIDO GLUCÓNICO	GC HPLC HPLC ENZIMÁTICO HPLC IC	<i>Echigo y Takenaka (1974)</i> <i>Cherchi et al. (1994)</i> <i>Cherchi et al. (1995)</i> <i>Mato et al. (1997)</i> <i>Del Nozal et al. (1998)</i> <i>Casella y Gatta (2001)</i>
ÁCIDO LÁCTICO	ENZIMÁTICO ENZIMÁTICO HPLC	<i>Stoya et al. (1987)</i> <i>Sabatini et al. (1994)</i> <i>Alamanni et al. (2000)</i>
ÁCIDO MALEICO	—	—
ÁCIDO MÁLICO	GC ENZIMÁTICO IC HPLC HPLC GC - MS HPLC GC - MS ENZIMÁTICO	<i>Echigo y Takenaka (1974)</i> <i>Tourn et al. (1980)</i> <i>Pérez-Cerrada et al. (1989)</i> <i>Cherchi et al. (1994)</i> <i>Cherchi et al. (1995)</i> <i>Wilkins et al. (1995)</i> <i>Del Nozal et al. (1998)</i> <i>Horvath y Molnár-Perl (1998)</i> <i>Mato et al. (1998b)</i>

Tabla XX (continuación). Métodos de análisis en la miel utilizados para la cuantificación de los ácidos orgánicos objeto de estudio en este trabajo

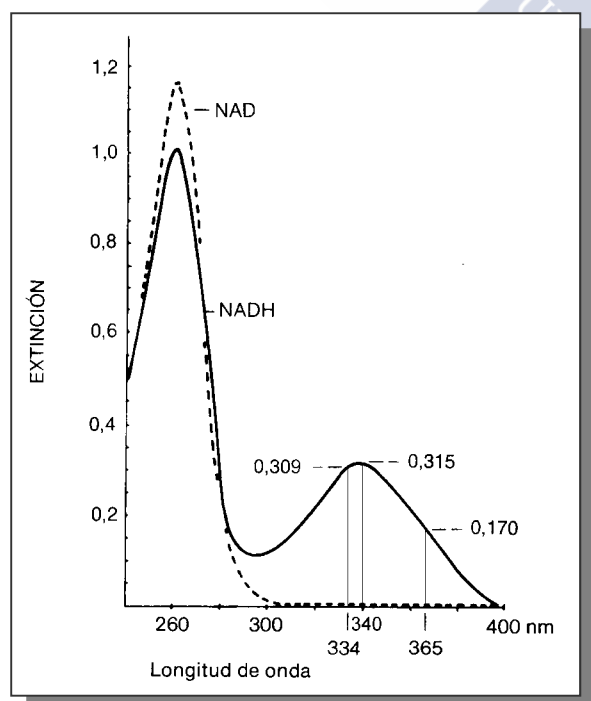
Ácido orgánico	Método de análisis	Autor/es
ÁCIDO OXÁLICO	GC IC ENZIMÁTICO ENZIMÁTICO HPLC / ENZIMÁTICO IC ENZIMÁTICO	<i>Echigo y Takenaka (1974)</i> <i>Pérez-Cerrada et al. (1989)</i> <i>Mutinelli et al. (1997)</i> <i>Cossu y Alamanni (1999)</i> <i>Alamanni et al. (2000)</i> <i>Del Nozal et al. (2000)</i> <i>Bogdanov et al. (2002)</i>
ÁCIDO PIRÚVICO	HPLC HPLC HPLC	<i>Cherchi et al. (1994)</i> <i>Cherchi et al. (1995)</i> <i>Del Nozal et al. (1998)</i>
ÁCIDO SUCCÍNICO	GC HPLC HPLC GC - MS HPLC GC - MS	<i>Echigo y Takenaka (1974)</i> <i>Cherchi et al. (1994)</i> <i>Cherchi et al. (1995)</i> <i>Wilkins et al. (1995)</i> <i>Del Nozal et al. (1998)</i> <i>Horvath y Molnár-Perl (1998)</i>



5.3. MÉTODOS ENZIMÁTICOS

Estos métodos se basan en la medida espectrofotométrica a una longitud de onda dada (334, 340 o 365 nm) del aumento o disminución de la absorbancia debida, respectivamente, a la reducción de los dinucleótidos de adenina y nicotinamida en su forma oxidada (NAD y NADP) o a la oxidación de los dinucleótidos de adenina y nicotinamida en su forma reducida (NADH y NADPH). Esto es posible porque las formas reducidas (NADH y NADPH) presentan un máximo de absorción entre 338.5 y 340.5 nm, mientras que las formas oxidadas (NAD y NADP) no muestran absorción entre 300 y 400 nm (*Boehringer-Mannheim, 1995; Mattenheimer, ?*).

La Figura 23 muestra los espectros de absorción de NADH y NAD obtenidos para una concentración de 0.05 mM. A las longitudes de onda de 334, 340 y 365 nm, con un paso de luz (d) de 1.0 cm, las absorbancias de la disolución NADH son de 0.309, 0.315 y 0.170, respectivamente. Conociendo la concentración (0.05 mM, en este caso), los coeficiente de extinción molar (ϵ) de NADH se pueden calcular según la ley de Lambert-Beer, presentando unos valores de 6.18, 6.30 y 3.40 L x mmol⁻¹ x cm⁻¹ para las longitudes de onda de 334, 340 y 365 nm, respectivamente (*Mattenheimer, ?*).



$$A = \epsilon \times c \times d \quad \epsilon = \frac{A}{c \times d}$$

$$\epsilon_{334} = \frac{0.309}{0.05 \times 1.0} = 6.18 \text{ L x mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{340} = \frac{0.315}{0.05 \times 1.0} = 6.30 \text{ L x mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{365} = \frac{0.170}{0.05 \times 1.0} = 3.40 \text{ L x mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

Figura 23. Espectros de absorción del NADH y del NAD.

5.3.1. PARTE EXPERIMENTAL

5.3.1.1. ÁCIDO D-GLUCÓNICO TOTAL

5.3.1.1.1. FUNDAMENTO

El ácido D-glucónico (D-gluconato) es fosforilado por la adenosina-5'-trifosfato (ATP) en presencia de la enzima gluconato quinasa (GntK) a D-gluconato-6-fosfato formándose simultáneamente adenosina-5'-difosfato (ADP) (Figura 24 - 1).

En la reacción, catalizada por la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGDH), el D-gluconato-6-fosfato, en presencia de dinucleótido de adenina y nicotinamida fosfato oxidado (NADP), sufre un proceso de descarboxilación oxidativa a ribulosa-5-fosfato con formación de dinucleótido de adenina y nicotinamida fosfato reducido (NADPH) (Figura 24 - 2).

La cantidad de NADPH formada durante la reacción es equivalente a la cantidad de ácido D-glucónico total presente en la muestra (*Möllering y Bergmeyer, 1989*).

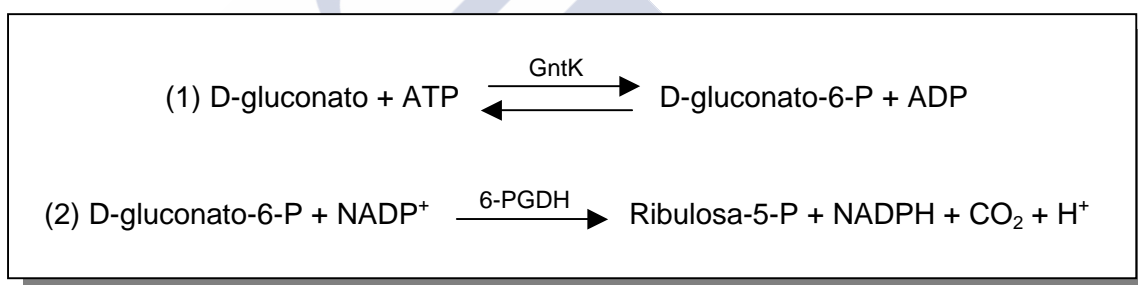


Figura 24. Reacciones de fosforilación (1) y descarboxilación oxidativa (2) en la determinación del ácido D-glucónico total.

5.3.1.1.2. MATERIAL Y APARATOS

- ✓ Espectrofotómetro Kontron Uvikon 922 UV-vis de doble haz.
- ✓ pHmetro Sentron 1001.
- ✓ Agitador magnético Metrohm 649.
- ✓ Microcubetas de cuarzo Hellma tipo N° 104-QS de 10.00 mm.
- ✓ Micropipeta Pipetman Gilson de 10 µL.
- ✓ Parafilm M.
- ✓ Cronómetro digital Van Allen.
- ✓ Material de vidrio de uso común en el laboratorio.

5.3.1.1.3. REACTIVOS

↪ Test enzimático para la determinación del ácido D-glucónico / D-glucono- δ -lactona de Boehringer-Mannheim GmbH (Cat. Nº 428 191).

- *Solución a1.*- 27 mL de solución compuesta por: tampón de trietanolamina (pH 7.8), 60 mg de dinucleótido de adenina y nicotinamida fosfato oxidado (NADP), 150 mg de adenosina-5'-trifosfato (ATP), sulfato de magnesio y estabilizadores.
- *Suspensión a2.*- 0.5 ml de suspensión de 110 U de 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGDH).
- *Suspensión a3.*- 0.5 ml de suspensión de 13 U de gluconato quinasa (GntK).

↪ Sal monosódica del ácido D-glucónico (99%) Sigma Art. G-9005.

↪ Hidróxido de potasio en lentejas p.a. ACS ISO Merck Art. 105021.

↪ Ácido clorhídrico fumante 37% p.a. ISO Merck Art. 100317.

↪ Agua Milli-Q Millipore.

5.3.1.1.4. PROCEDIMIENTO

5.3.1.1.4.1. PREPARACIÓN DE LA DISOLUCIÓN DE MIEL

Se ha utilizado el procedimiento aplicado a la miel desarrollado por nuestro equipo de investigación (*Mato et al., 1997*), que consiste en pesar exactamente 2.5 g de miel en un vaso de precipitados de 250 mL y disolverlos en 50 mL de agua Milli-Q. Se ajusta el pH de la disolución de miel a 10.50 con KOH 0.1 N, esperando 10 minutos en agitación y a temperatura de laboratorio para la total hidrólisis de la D-glucono- δ -lactona a ácido D-glucónico. Posteriormente la disolución se ajusta al pH del test (7.80) con HCl 0.1 N. Se enrasa en un matraz aforado a 100 mL y se lleva a cabo una dilución 1:10. Esta disolución es la que se va a utilizar para llevar a cabo la medida espectrofotométrica.

Con este procedimiento se va a determinar el ácido D-glucónico total como la suma del ácido D-glucónico libre y de la D-glucono- δ -lactona.

5.3.1.1.4.2. MEDIDA ESPECTROFOTOMÉTRICA

La determinación espectrofotométrica se realiza a 340 nm (Figura 25). En una microcubeta se pipetea 0.400 mL de la *solución a1*, 0.800 mL de la disolución de miel y 8 µL de la *suspensión a2*. Se tapa la cubeta con una pequeña porción de Parafilm y se mezcla su contenido agitando suavemente. La lectura de la absorbancia se realiza cuando sea estable, aproximadamente a los 5 minutos (M_1). La reacción comienza cuando se adicionan 8 µL de la *suspensión a3* y se mezcla. Al completarse la reacción, aproximadamente a los 10 minutos, se lee la absorbancia (M_2). Como las medidas se realizan en un espectrofotómetro de doble haz en la otra microcubeta, denominada de referencia, hay agua Milli-Q.

Para la realización del blanco el procedimiento es el descrito anteriormente añadiendo 0.800 mL de agua Milli-Q en lugar de la solución de miel. Las lecturas obtenidas serán respectivamente B_1 y B_2 .

En este caso se va a producir un aumento de absorbancia por formación de NADPH que se calcula de la siguiente forma:

$$\Delta A = \Delta M - \Delta B = [(M_2 - M_1) - (B_2 - B_1)]$$

5.3.1.1.5. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Los cálculos se realizaron siguiendo los protocolos de los métodos de *Boehringer-Mannheim (1995)* para alimentos, según la fórmula de cálculo general para la determinación de la concentración en g/L. En el caso de la miel, siguiendo nuestro procedimiento, el contenido de ácido D-glucónico total (ácido D-glucónico libre y D-glucono-δ-lactona) se expresa en g/kg y se calcula de la siguiente forma:

$$\text{g ácido D-glucónico total / kg miel} = \frac{47.34}{P} \times \Delta A$$

$$47.31 = \frac{1.216 \times 196.2}{6.30 \times 1.000 \times 0.800 \times 1000} \times \frac{100}{1000} \times \frac{100}{10} \times 1000$$

P = Peso (g) de la muestra de miel.
ΔA = [($M_2 - M_1$) - ($B_2 - B_1$)].
($M_2 - M_1$) = Absorbancia de la muestra.
($B_2 - B_1$) = Absorbancia del blanco.
1.216 = Volumen final del test (mL).
196.2 = Peso molecular del ácido D-glucónico (g/mol).
6.30 = Coeficiente de extinción (ϵ) del NADPH a 340 nm ($L \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).
1.000 = Espesor de la cubeta (cm).
0.800 = Volumen de la muestra (mL).
1000 = Factor mL/L.
(100/1000) = g de ácido D-glucónico total en 100 mL de solución final.
(100/10) = Factor de dilución.
1000 = Factor g/kg.

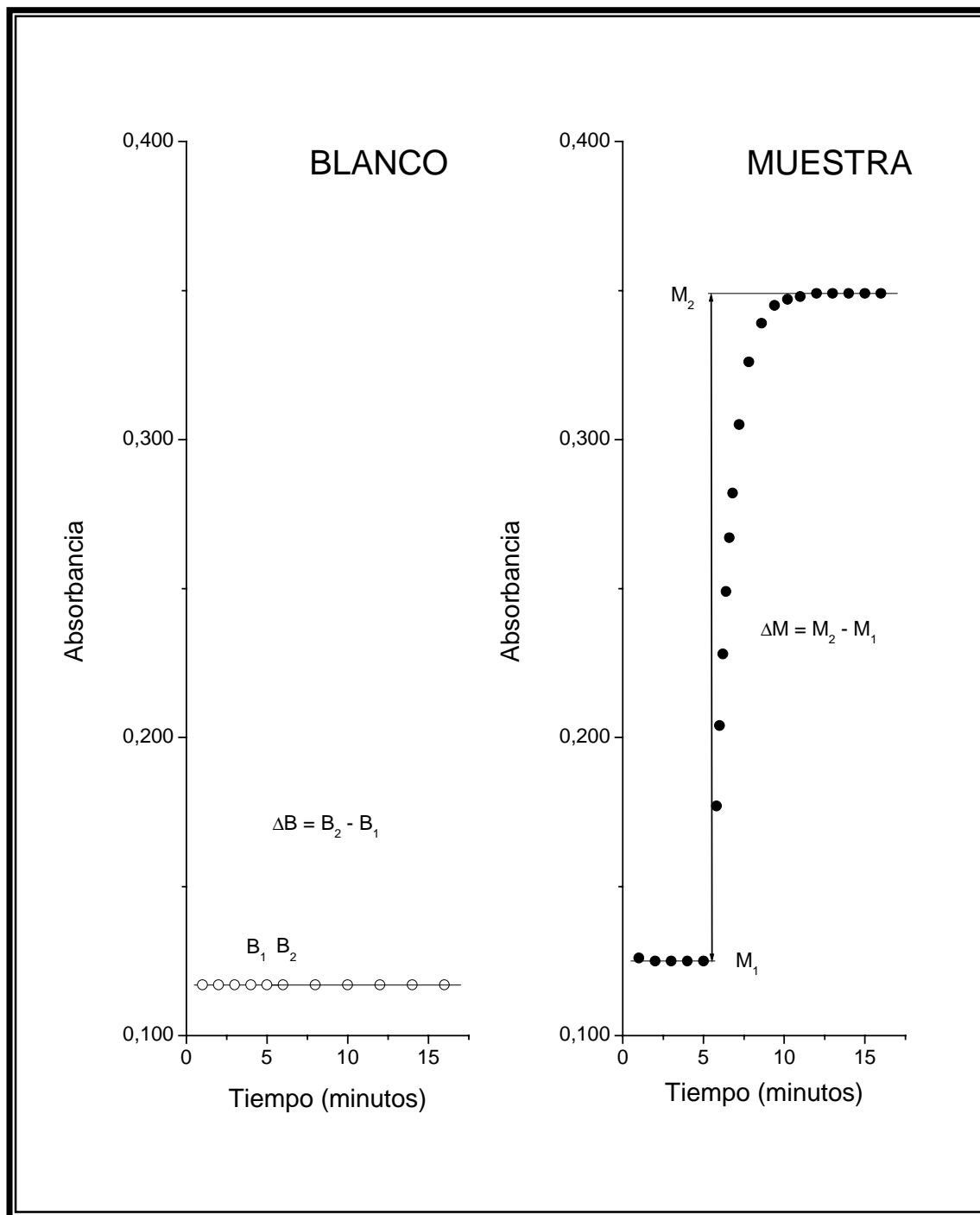


Figura 25. Absorbancias medidas a 340 nm en la determinación del ácido D-glucónico total en la miel por el método enzimático.

5.3.1.1.6. LÍMITE DE DETECCIÓN

El límite de detección del método se establece por un incremento de absorbancia (ΔA) de 0.010 a 340 nm (Möllering y Bergmeyer, 1989; Boehringer-Mannheim, 1995), lo que se corresponde con una concentración de ácido D-glucónico total de 0.19 g/kg.

5.3.1.1.7. PRECISIÓN

La precisión del método se estudió en 3 muestras de miel con contenido bajo, medio y alto de ácido D-glucónico total. Para ello se llevó a cabo la determinación de este ácido en 10 soluciones diferentes de cada una de las 3 muestras. Los coeficientes de variación (RSD%) obtenidos para cada miel fueron de 0.30, 0.22 y 0.07%, respectivamente (Mato et al., 1997).

5.3.1.1.8. RECUPERACIÓN

La confirmación de la exactitud del método se estudió en una muestra de bajo contenido en ácido D-glucónico total realizando sobrecargas con concentraciones crecientes conocidas de sal sódica del ácido D-glucónico a la mitad de muestra. El porcentaje de recuperación media obtenido fue de 99.8%, con un RSD% de 0.40%. Los valores para las diferentes sobrecargas oscilaron entre 99.2 y 100.5% (Mato et al., 1997).

5.3.1.1.9. ESPECIFICIDAD

Este método es específico para la determinación del ácido D-glucónico total, es decir de la D-glucono- δ -lactona conjuntamente con el ácido D-glucónico libre. Los demás ácidos derivados de azúcares no reaccionan (Möllering y Bergmeyer, 1989; Boehringer-Mannheim, 1995).

5.3.1.2. ÁCIDO CÍTRICO

5.3.1.2.1. FUNDAMENTO

El ácido cítrico (citrato) es convertido a oxalacetato y a acetato en una reacción catalizada por la enzima citrato liasa (CL) (Figura 26 - 1).

En presencia de las enzimas L-malato deshidrogenasa (L-MDH) y L-lactato deshidrogenasa (L-LDH), el oxalacetato y su producto de descarboxilación, piruvato, son reducidos a L-malato y L-lactato, respectivamente, por el dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido (NADH) (Figura 26 - 2 y Figura 26 - 3).

La cantidad de NADH oxidada durante las reacciones (2) y (3) equivale a la cantidad de ácido cítrico presente en la muestra (Möllering, 1989a).

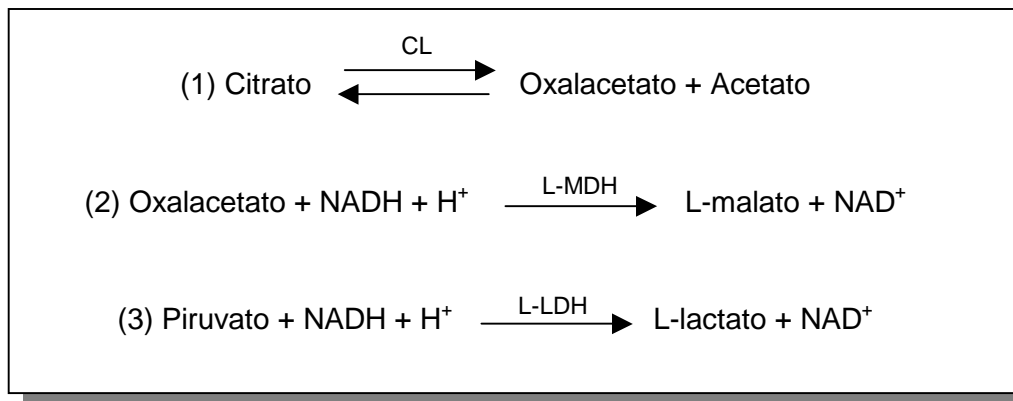


Figura 26. Reacciones de ruptura oxidativa (1) y reducción (2 y 3) en la determinación del ácido cítrico.

5.3.1.2.2. MATERIAL Y APARATOS

- ✓ Espectrofotómetro Kontron Uvikon 922 UV-vis de doble haz.
- ✓ Microcubetas de cuarzo Hellma tipo N° 104-QS de 10.00 mm.
- ✓ Micropipeta Pipetman Gilson de 10 µL.
- ✓ Papel de filtro Whatman N° 542 Cat. N° 1542 110.
- ✓ Parafilm M.
- ✓ Cronómetro digital Van Allen.
- ✓ Material de vidrio de uso común en el laboratorio.

5.3.1.2.3. REACTIVOS

- ↪ Test enzimático para la determinación del ácido cítrico de Boehringer-Mannheim GmbH (Cat. N° 139 076).
 - *Solución a1.*- 12 mL de solución compuesta por: tampón de glicilglicina (pH 7.8), 136 U de L-malato deshidrogenasa (L-MDH), 280 U de L-lactato deshidrogenasa (L-LDH), 5 mg de dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido (NADH) y estabilizadores.
 - *Solución a2.*- 0.3 ml de solución de 12 U de citrato liasa (CL).
 - Solución patrón de ácido cítrico.

↪ Polivinilpolipirrolidona (PVPP) Sigma Art. P-6755.

↪ Agua Milli-Q Millipore.

5.3.1.2.4. PROCEDIMIENTO

5.3.1.2.4.1. PREPARACIÓN DE LA DISOLUCIÓN DE MIEL

Se ha utilizado el procedimiento aplicado a la miel desarrollado por nuestro equipo de investigación (*Mato et al., 1998a*), que consiste en pesar exactamente 2 g de miel en un vaso de precipitados de 100 mL, disolverlos en 20 mL de agua Milli-Q y posteriormente enrasar en un matraz aforado a 100 mL. Se pipetea 10 mL de esta disolución en un tubo de vidrio con tapón del mismo material y se añaden 0.100 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP), agitando durante 1 minuto. El contenido de este tubo se va a filtrar a través de un papel Whatman Nº 542. Esta disolución filtrada es la que se va a utilizar para llevar a cabo la determinación espectrofotométrica.

5.3.1.2.4.2. MEDIDA ESPECTROFOTOMÉTRICA

La determinación espectrofotométrica se realiza a 340 nm (Figura 27). En una microcubeta se pipetea 0.300 mL de la *solución a1* y 0.600 mL de la solución de miel. Se tapa la cubeta con una pequeña porción de Parafilm y se mezcla su contenido agitando suavemente. La lectura de la absorbancia se realiza cuando sea estable, aproximadamente a los 5 minutos (M_1). La reacción comienza cuando se adicionan 6 μ L de la *solución a2* y se mezcla. Al completarse la reacción, aproximadamente a los 5 minutos, se lee la absorbancia (M_2). Como las medidas se realizan en un espectrofotómetro de doble haz en la otra microcubeta, denominada de referencia, hay agua Milli-Q.

Para la realización del blanco el procedimiento es el descrito anteriormente añadiendo 0.600 mL de agua Milli-Q en lugar de la solución de miel. Las lecturas obtenidas serán respectivamente B_1 y B_2 .

En este caso, al contrario que en la determinación del ácido D-glucónico total, se va a producir una disminución de absorbancia por transformación de NADH en NAD que se calcula de la siguiente forma:

$$\Delta A = \Delta M - \Delta B = [(M_1 - M_2) - (B_1 - B_2)]$$

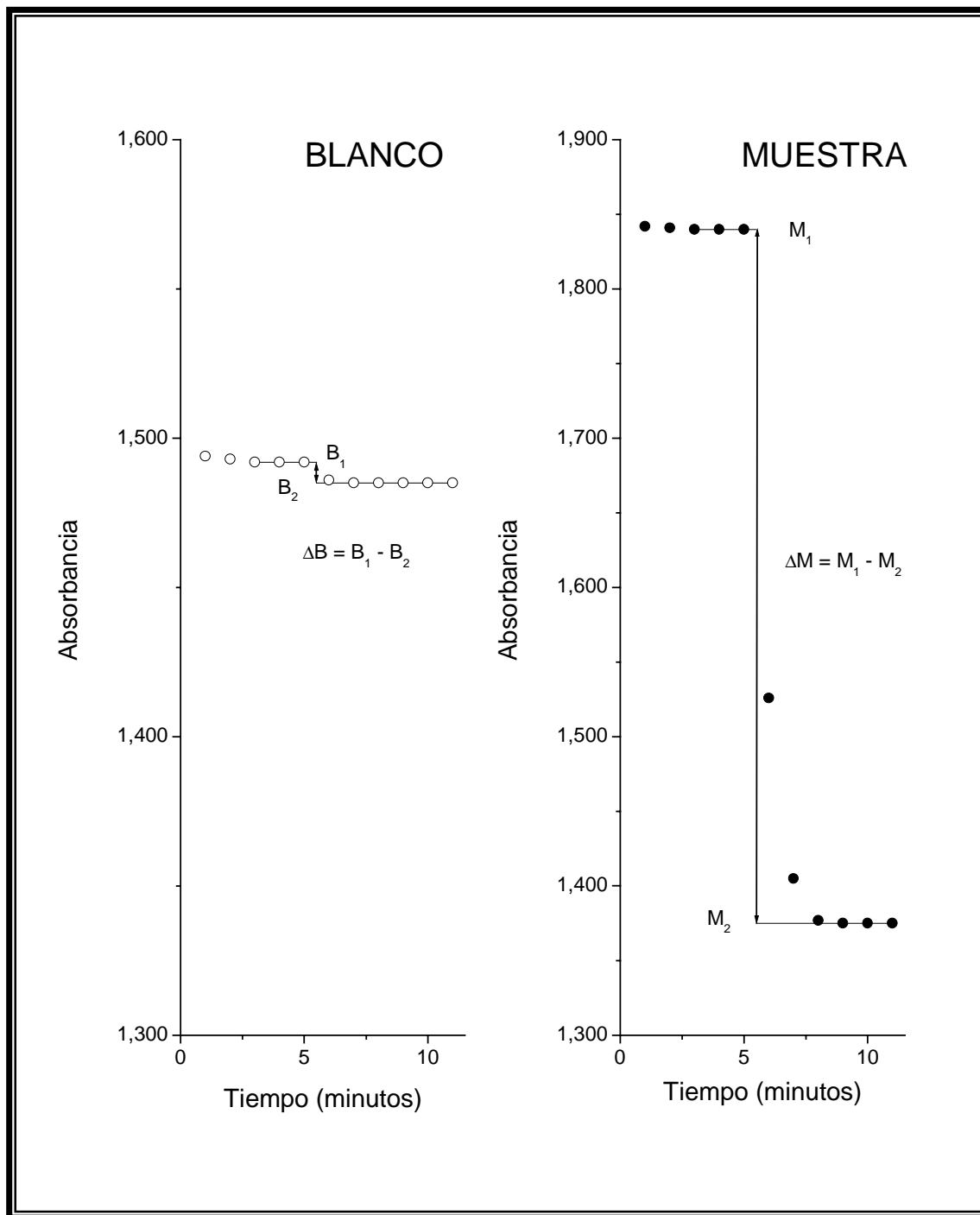


Figura 27. Absorbancias medidas a 340 nm en la determinación del ácido cítrico en la miel por el método enzimático clarificando con PVPP.

5.3.1.2.5. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Los cálculos se realizaron siguiendo los protocolos de los métodos de *Boehringer-Mannheim (1995)* para alimentos, según la fórmula de cálculo general para la determinación de la concentración en mg/L. En el caso de la miel, siguiendo nuestro procedimiento, el contenido de ácido cítrico se expresa en mg/kg y se calcula de la siguiente forma:

$$\text{mg ácido cítrico / kg miel} = \frac{4604}{P} \times \Delta A$$

$$4604 = \frac{0.906 \times 192.1}{6.30 \times 1.000 \times 0.600 \times 1000} \times \frac{100}{1000} \times 1000 \times 1000$$

P = Peso (g) de la muestra de miel.
ΔA = [(M₁ - M₂) - (B₁ - B₂)].
(M₁ - M₂) = Absorbancia de la muestra.
(B₁ - B₂) = Absorbancia del blanco.
0.906 = Volumen final del test (mL).
192.1 = Peso molecular del ácido cítrico (g/mol).
6.30 = Coeficiente de extinción (ε) del NADPH a 340 nm (L × mmol⁻¹ × cm⁻¹).
1.000 = Espesor de la cubeta (cm).
0.600 = Volumen de la muestra (mL).
1000 = Factor mL/L.
(100/1000) = g de ácido cítrico en 100 mL de solución final.
1000 = Factor mg/g.
1000 = Factor g/kg.

5.3.1.2.6. LÍMITE DE DETECCIÓN

El límite de detección del método se establece por un incremento de absorbancia (ΔA) de 0.010 a 340 nm (*Möllering, 1989a; Boehringer-Mannheim, 1995*), lo que se corresponde con una concentración de ácido cítrico de 23.0 mg/kg cuando la cantidad pesada de miel (P) es de 2 g. Si alguna muestra posee un contenido en ácido cítrico inferior al límite de detección se emplearía una cantidad de muestra suficiente para alcanzar este límite.

5.3.1.2.7. PRECISIÓN

La precisión del método se estudió en 4 muestras de miel con contenido bajo, medio, alto y muy alto de ácido cítrico. Para ello se llevó a cabo la determinación de este ácido en 10 soluciones diferentes de cada una de las 4 muestras. Los coeficientes de variación (RSD%) obtenidos para cada miel fueron de 1.60, 0.72, 0.51 y 0.26%, respectivamente (*Mato et al., 1998a*).

5.3.1.2.8. RECUPERACIÓN

La confirmación de la exactitud del método se estudió en 3 muestras de bajo contenido en ácido cítrico realizando sobrecargas con concentraciones crecientes conocidas de patrón de ácido cítrico a la mitad de muestra. Los porcentajes de recuperación media obtenidos en las 3 muestras fueron de 99.2, 99.5 y 100.5%, con unos RSD% de 1.14, 0.49 y 0.61%, respectivamente. Los valores para las diferentes sobrecargas oscilaron entre 98.0 y 100.9% (Mato et al., 1998a).

5.3.1.2.9. ESPECIFICIDAD

Este método es específico para la determinación del ácido cítrico. Los intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico y sus metabolitos no van a reaccionar (Möllering, 1989a; Boehringer-Mannheim, 1995).

5.3.1.3. ÁCIDO L-MÁLICO

5.3.1.3.1. FUNDAMENTO

El ácido L-málico (L-malato) es oxidado por el dinucleótido de adenina y nicotinamida oxidado (NAD), en presencia de la enzima L-malato deshidrogenasa (L-MDH), a oxalacetato (Figura 28 - 1).

El equilibrio de esta reacción tiende ampliamente hacia el lado del L-malato. Si se elimina el oxalacetato del sistema de reacción, se desplaza el equilibrio hacia la formación de oxalacetato. En la reacción catalizada por la enzima glutamato oxalacetato transaminasa (GOT), el oxalacetato, en presencia del L-glutamato, se convierte en L-aspartato con formación de 2-oxoglutarato (Figura 28 - 2).

La cantidad de NADH formada es equivalente a la concentración de ácido L-málico presente en la muestra (Möllering, 1989b).

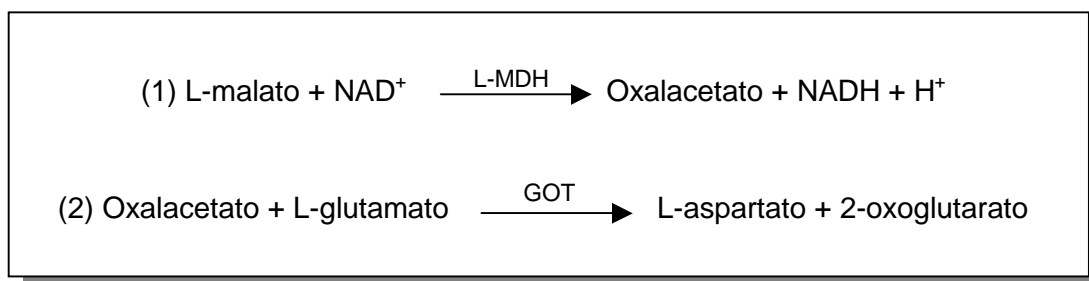


Figura 28. Reacciones de oxidación (1) y transaminación (2) en la determinación del ácido L-málico.

5.3.1.3.2. MATERIAL Y APARATOS

- ✓ Espectrofotómetro Kontron Uvikon 922 UV-vis de doble haz.
- ✓ Microcubetas de cuarzo Hellma tipo N° 104-QS de 10.00 mm.
- ✓ Micropipeta Pipetman Gilson de 10 y 100 μ L.
- ✓ Parafilm M.
- ✓ Cronómetro digital Van Allen.
- ✓ Material de vidrio de uso común en el laboratorio.

5.3.1.3.3. REACTIVOS

- ↪ Test enzimático para la determinación del ácido L-málico de Boehringer-Mannheim GmbH (Cat. N° 139 068).
 - *Solución a1.*- 30 mL de solución compuesta por: tampón de glicilglicina (pH 10.0), 440 mg de ácido L-glutámico y estabilizadores.
 - *Solución a2.*- 6 ml de solución de 210 mg de dinucleótido de adenina y nicotinamida oxidado (NAD).
 - *Suspensión a3.*- 0.4 mL de suspensión de 160 U de glutamato oxalacetato transaminasa (GOT).
 - *Solución a4.*- 0.4 mL de solución de 2400 U de L-malato deshidrogenasa (L-MDH).
- ↪ Sal monosódica del ácido L-málico (99%) Sigma Art. M-1125.
- ↪ Agua Milli-Q Millipore.

5.3.1.3.4. PROCEDIMIENTO

5.3.1.3.4.1. PREPARACIÓN DE LA DISOLUCIÓN DE MIEL

Se ha utilizado el procedimiento aplicado a la miel desarrollado por nuestro equipo de investigación (*Mato et al., 1998b*), que consiste en pesar exactamente 2.5 g de miel en un vaso de precipitados de 100 mL, disolverlos en 20 mL de agua Milli-Q y posteriormente enrasar en un matraz aforado a 100 mL. Esta disolución directamente es la que se va a utilizar para llevar a cabo la medida espectrofotométrica.

5.3.1.3.4.2. MEDIDA ESPECTROFOTOMÉTRICA

La determinación espectrofotométrica se realiza a 340 nm (Figura 29). En una microcubeta se pipetea 0.500 mL de la *solución a1*, 0.100 mL de la *solución a2*, 0.500 mL de la solución de miel y 5 μ L de la *suspensión a3*. Se tapa la cubeta con una pequeña porción de Parafilm y se mezcla su contenido agitando suavemente. La lectura de la absorbancia se realiza cuando su incremento sea constante, aproximadamente a los 5 minutos (M_1). La reacción comienza cuando se adicionan 5 μ L de la *solución a4*, se mezcla y se registran cada minuto los valores de absorbancia correspondientes a los 10 minutos siguientes a la adición.

En este caso, paralelamente a la reacción principal, se produce una reacción colateral más lenta. Ésta causa un desplazamiento de la reacción que puede ser eliminado extrapolando gráfica o matemáticamente. Para extrapolar matemáticamente el verdadero valor de la absorbancia de la muestra (M_2) se calcula la recta de regresión correspondiente a los datos registrados de los 5 últimos minutos y con esta recta se extrapola al tiempo de adición, es decir, al tiempo de inicio de la reacción. Igual que en el caso de los ácidos anteriormente determinados, al ser el espectrofotómetro de doble haz en la otra microcubeta, denominada de referencia, hay agua Milli-Q.

Para la realización del blanco el procedimiento es el descrito anteriormente añadiendo 0.500 mL de agua Milli-Q en lugar de la solución de miel. Las lecturas obtenidas serán respectivamente B_1 y B_2 .

En este caso se va a producir un aumento de absorbancia por formación de NADH por lo que la absorbancia total se calcula de la siguiente forma:

$$\Delta A = \Delta M - \Delta B = [(M_2 - M_1) - (B_2 - B_1)]$$

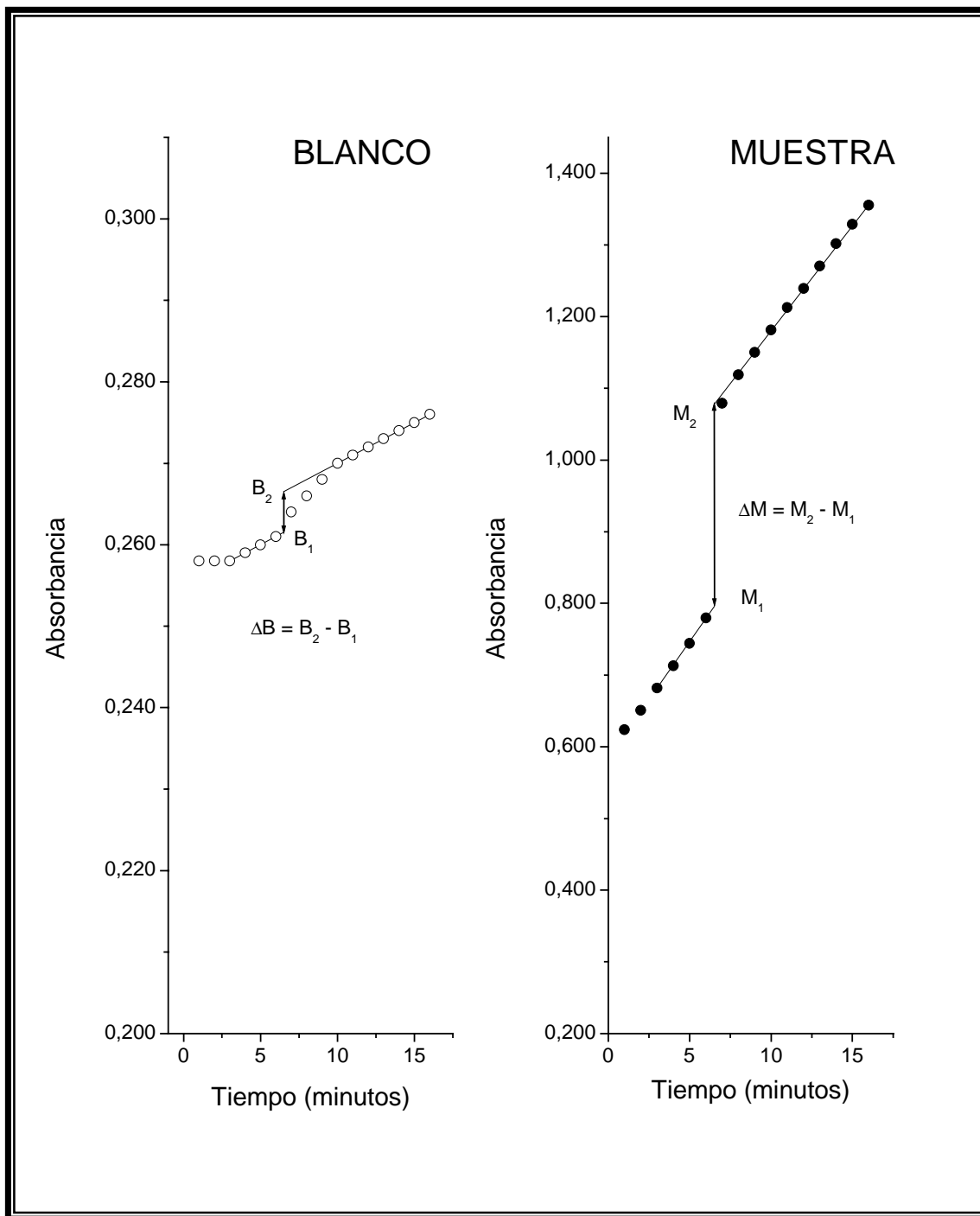


Figura 29. Absorbancias medidas a 340 nm en la determinación del ácido L-málico en la miel por el método enzimático.

5.3.1.3.5. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Los cálculos se realizaron siguiendo los protocolos de los métodos de *Boehringer-Mannheim (1995)* para alimentos, según la fórmula de cálculo general para la determinación de la concentración en mg/L. En el caso de la miel, siguiendo nuestro procedimiento, el contenido de ácido L-málico se expresa en mg/kg y se calcula de la siguiente forma:

$$\text{mg ácido L-málico / kg miel} = \frac{4725}{P} \times \Delta A$$

$$4725 = \frac{1.110 \times 134.1}{6.30 \times 1.000 \times 0.500 \times 1000} \times \frac{100}{1000} \times 1000 \times 1000$$

P = Peso (g) de la muestra de miel.
ΔA = [(M₂ - M₁) - (B₂ - B₁)].
(M₂ - M₁) = Absorbancia de la muestra.
(B₂ - B₁) = Absorbancia del blanco
1.110 = Volumen final del test (mL).
134.1 = Peso molecular del ácido L-málico (g/mol).
6.30 = Coeficiente de extinción (ε) del NADPH a 340 nm (L × mmol⁻¹ × cm⁻¹).
1.000 = Espesor de la cubeta (cm).
0.500 = Volumen de la muestra (mL).
1000 = Factor mL/L.
(100/1000) = g de ácido L-málico en 100 mL de solución final.
1000 = Factor mg/g.
1000 = Factor g/kg.

5.3.1.3.6. LÍMITE DE DETECCIÓN

El límite de detección del método se establece por un incremento de absorbancia (ΔA) de 0.010 a 340 nm (*Möllering, 1989b; Boehringer-Mannheim, 1995*), lo que se corresponde con una concentración de ácido L-málico de 19 mg/kg cuando la cantidad pesada de miel (P) es de 2.5 g. Si alguna muestra posee un contenido en ácido L-málico inferior al límite de detección se emplearía una cantidad de muestra suficiente para alcanzar este límite.

5.3.1.3.7. PRECISIÓN

La precisión del método se estudió en 4 muestras de miel con contenido bajo, medio, alto y muy alto de ácido L-málico. Para ello se llevó a cabo la determinación de este ácido en 10 soluciones diferentes de cada una de las 4 muestras. Los coeficientes de variación (RSD%) obtenidos para cada miel fueron de 3.5, 2.2, 1.1 y 0.8%, respectivamente (*Mato et al., 1998b*).

5.3.1.3.8. **RECUPERACIÓN**

La confirmación de la exactitud del método se estudió en una muestra de bajo contenido en ácido L-málico realizando sobrecargas con concentraciones crecientes conocidas de sal sódica del ácido L-málico a la mitad de muestra. El porcentaje de recuperación media fue de 100%, con un RSD% de 3.5%. Los valores para las diferentes sobrecargas oscilaron entre 96 y 104% (Mato et al., 1998b).

5.3.1.3.9. **ESPECIFICIDAD**

Este método es específico para la determinación del ácido L-málico. El D-isómero no reacciona. Además, tampoco reaccionan los ácidos L-láctico, D-láctico, L-aspartico y fumárico (Möllering, 1989b; Boehringer-Mannheim, 1995).

5.3.2. **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

5.3.2.1. **MIELES DE GALICIA CON DENOMINACIÓN**

En la Tabla XXI se encuentran recogidos los resultados de la determinación por el método enzimático de los ácidos D-glucónico total (g/kg), cítrico (mg/kg) y L-málico (mg/kg) en las 50 mieles de Galicia con Denominación analizadas.

El promedio obtenido para el ácido D-glucónico ha sido de 7.37 g/kg, con valores mínimo y máximo de 2.38 y 13.53 g/kg, respectivamente. En el caso del ácido cítrico, el valor medio obtenido ha sido de 116.3 mg/kg, con valores mínimo y máximo de 20.7 y 451.2 mg/kg, respectivamente. Por último para el ácido L-málico, el promedio obtenido ha sido de 91 mg/kg, con valores mínimo y máximo de 8 y 578 mg/kg, respectivamente.

Tabla XXI. Contenido de los ácidos orgánicos determinados por el método enzimático en las mieles de Galicia con Denominación ordenadas según su espectro polínico

Número de muestra	Provincia del envasador	Espectro polínico	Ácido D-glucónico total (g/kg)	Ácido cítrico (mg/kg)	Ácido L-málico (mg/kg)
1	Ourense	<i>Castanea sativa</i> Miller	7.13	451.2	512
2	Ourense	<i>Castanea sativa</i> Miller	12.17	437.4	578
3	Ourense	<i>Castanea sativa</i> Miller	12.72	211.8	212
4	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	3.63	39.1	32
5	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	5.89	43.7	19
6	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	5.01	41.4	26
7	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	4.58	34.5	25
8	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	5.64	32.2	21
9	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	5.47	46.0	25
10	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	4.50	62.2	21
11	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	4.24	36.8	21
12	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	4.58	43.7	23
13	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	3.67	59.9	26
14	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	6.32	29.9	28
15	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	5.56	20.7	19
16	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	8.42	25.3	23
17	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	6.06	34.5	19
18	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	6.53	36.8	25
19	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	7.42	32.2	32
20	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.	2.38	46.0	34
21	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.	4.92	71.4	26
22	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.	3.78	39.1	26
23	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.	2.54	32.2	17
24	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.	3.31	41.4	36
25	Lugo	<i>Trifolium</i> L. sp.	8.97	107.0	8
26	A Coruña	multifloral	4.77	179.6	163
27	A Coruña	multifloral	6.89	133.5	132
28	A Coruña	multifloral	6.83	138.1	134
29	A Coruña	multifloral	5.92	64.5	30
30	A Coruña	multifloral	7.29	73.7	55
31	Lugo	multifloral	10.98	73.7	40
32	Lugo	multifloral	8.84	292.4	291
33	Lugo	multifloral	8.53	117.4	74
34	Lugo	multifloral	12.17	80.6	43
35	Lugo	multifloral	8.67	39.1	25
36	Lugo	multifloral	5.34	105.9	26
37	Lugo	multifloral	11.73	96.7	21
38	Lugo	multifloral	10.05	96.7	38
39	Lugo	multifloral	9.44	138.1	55
40	Lugo	multifloral	10.77	149.6	98
41	Ourense	multifloral	11.34	94.4	42
42	Ourense	multifloral	8.74	435.1	518
43	Ourense	multifloral	5.54	382.1	231
44	Ourense	multifloral	13.53	181.9	197
45	Ourense	multifloral	7.47	393.6	234
46	Pontevedra	multifloral	10.43	71.4	23
47	Pontevedra	multifloral	11.32	99.0	43
48	Pontevedra	multifloral	6.76	147.3	112
49	Pontevedra	multifloral	8.76	101.3	36
50	Pontevedra	multifloral	11.05	74.8	30
MEDIA			7.37	116.3	91
SD			2.92	116.0	132
RSD%			39.61	99.7	146
V _{mín}			2.38	20.7	8
V _{máx}			13.53	451.2	578

Los resultados obtenidos para el ácido D-glucónico total en este trabajo son similares a los encontrados en el análisis de 20 muestras de Galicia con Denominación de la cosecha de 1994 con valores medio, mínimo y máximo de 7.37, 3.91 y 11.71 g/kg, respectivamente (Mato et al., 1997). En el caso del ácido cítrico, estos resultados son inferiores a los encontrados en las muestras de Galicia con Denominación de la cosecha de 1994 con valores medio, mínimo y máximo de 192.9, 44.2 y 827.0 mg/kg, respectivamente (Mato et al., 1998a). Por último, en lo que se refiere al ácido L-málico, los resultados obtenidos son también inferiores a los encontrados en las muestras de Galicia con Denominación de la cosecha de 1994 con valores medio, mínimo y máximo de 246, 94 y 596 mg/kg, respectivamente (Mato et al., 1998b).

En la Figura 30 se representan las distribuciones del contenido de los ácidos D-glucónico total, cítrico y L-málico de las mieles de Galicia con Denominación analizadas.

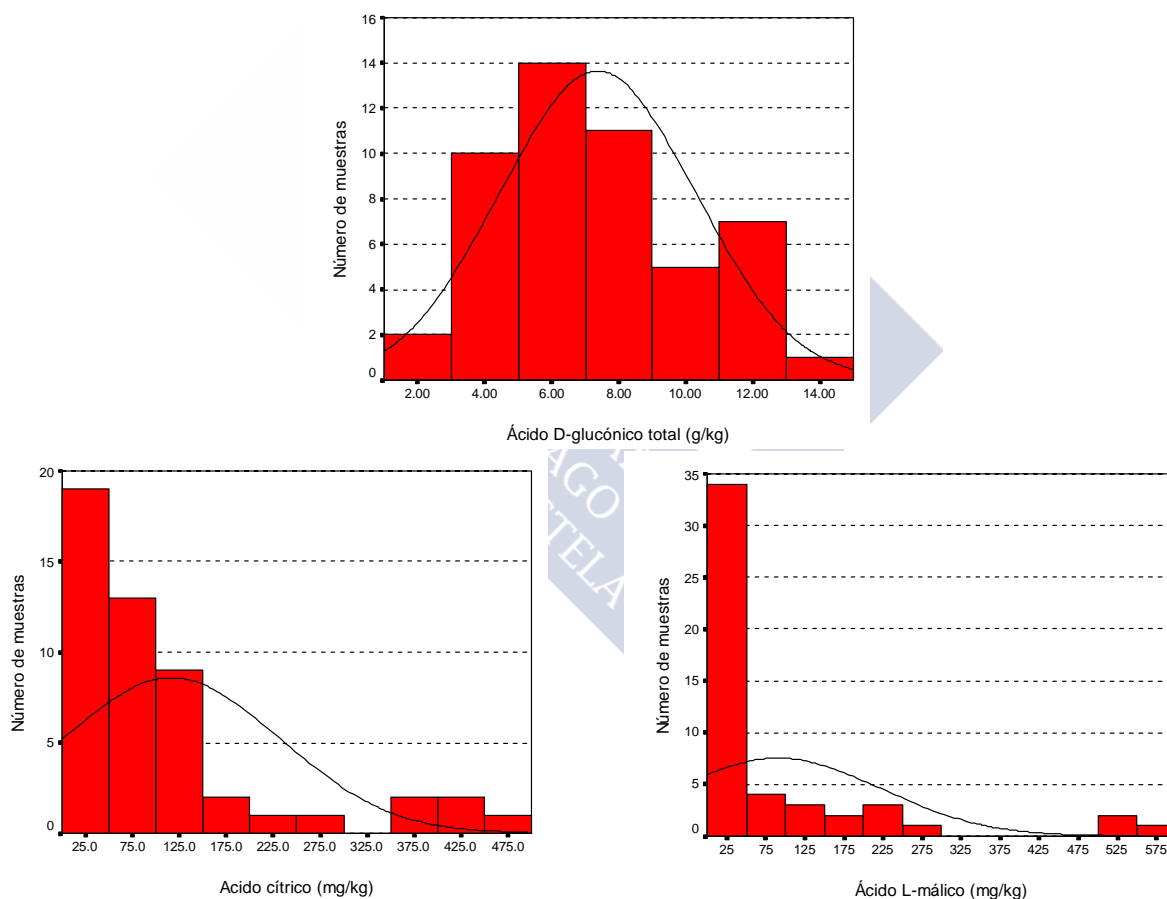


Figura 30. Distribuciones del contenido de los ácidos orgánicos determinados por el método enzimático en las mieles de Galicia con Denominación.

En esta figura se observa como el 70% de las muestras poseen un contenido de ácido D-glucónico total comprendido entre 3.00 y 9.00 g/kg. También se pone de manifiesto como el 64% de las muestras poseen un contenido en ácido cítrico, entre 20.0 y 100.0 mg/kg, elevándose este porcentaje a más de un 80% si se considera el contenido en ácido cítrico entre 20.0 y 150.0 mg/kg. Solamente cinco muestras superan los 350.0 mg/kg de ácido cítrico. Por último en el gráfico de distribución del ácido L-málico se observa como el 68% de las muestras poseen un contenido en ácido L-málico menor de 50.0 mg/kg. Solamente tres muestras superan los 300.0 mg/kg de ácido L-málico, con valores mayores de 500 mg/kg.

5.3.2.1.1. INFLUENCIA DE LA PROVINCIA DE PROCEDENCIA DEL ENVASADOR EN EL CONTENIDO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS DETERMINADOS POR EL MÉTODO ENZIMÁTICO

En la Tabla XXII aparecen los estadísticos del contenido de los ácidos D-glucónico total, cítrico y L-málico agrupados según la provincia de procedencia del envasador.

En esta tabla se observa como las provincias más occidentales (A Coruña y Pontevedra) poseen un contenido medio de ácido D-glucónico total más bajo que las provincias de Lugo y Ourense. Por su parte, tanto el contenido medio de ácido cítrico como el de ácido L-málico de la provincia de Ourense es mucho mayor que el del resto de las provincias, lo mismo sucede con los valores mínimo y máximo.

Tabla XXII. Estadísticos del contenido de los ácidos orgánicos determinados por el método enzimático en las mieles de Galicia con Denominación agrupados según la provincia de procedencia del envasador

Provincia procedencia envasador	N	Ácido D-glucónico total (g/kg) [*]	Ácido cítrico (mg/kg) [*]	Ácido málico (mg/kg) [*]
A Coruña	15	5.26 ± 1.14 (3.63-7.29)	68.6 ± 45.0 (32.2-179.6)	50 ± 49 (19-163)
Lugo	17	8.58 ± 2.14 (5.34-12.17)	86.9 ± 67.4 (20.7-292.4)	51 ± 66 (8-291)
Ourense	8	9.83 ± 2.98 (5.54-13.53)	323.4 ± 138.9 (94.4-451.2)	316 ± 193 (42-578)
Pontevedra	10	6.53 ± 3.61 (2.38-11.32)	72.4 ± 35.8 (32.2-147.3)	38 ± 27 (17-112)

^{*} MEDIA ± SD (V_{min}-V_{máx})

En la Figura 31 se representan las distribuciones del contenido de los tres ácidos orgánicos estudiados (ácido D-glucónico total, cítrico y L-málico) agrupados según la provincia de procedencia del envasador.

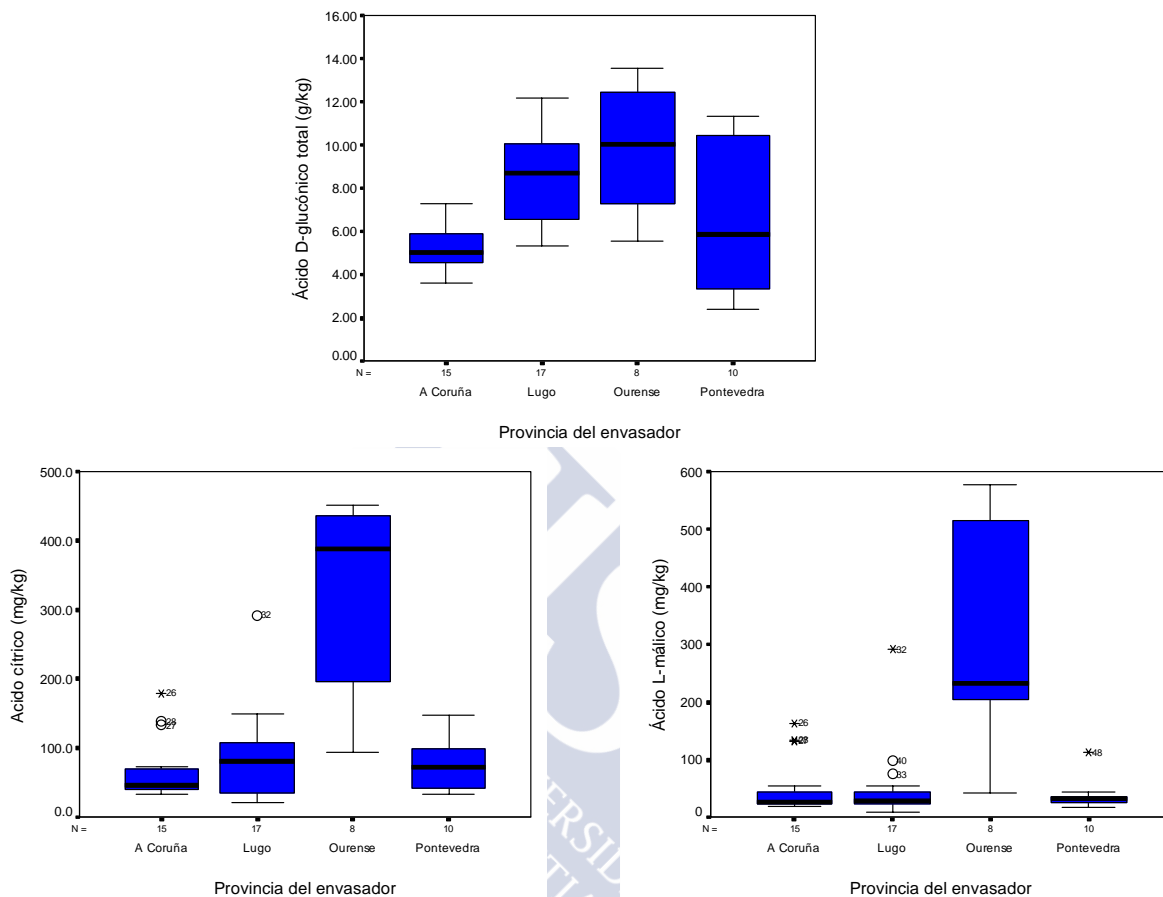


Figura 31. Distribuciones del contenido de los ácidos orgánicos determinados por el método enzimático en las mieles de Galicia con Denominación según la provincia de procedencia del envasador.

En cada uno de los gráficos de esta figura se observa lo siguiente:

Ácido D-glucónico total: existe una gran dispersión de datos en las provincias de Lugo, Ourense y Pontevedra. Esto coincide con lo que sucedía en el caso de la acidez libre y total, lo que deja entrever una posible relación entre estos parámetros y el contenido en ácido D-glucónico total que será estudiada posteriormente.

Ácido cítrico: el contenido en ácido cítrico de las muestras de la provincia de A Coruña, con excepción de tres muestras (Nº 26, 27 y 28), se encuentra por debajo de 100 mg/kg, siendo la única provincia en la que esto sucede. También

se puede observar la gran dispersión de datos que existe en la provincia Ourense.

Ácido L-málico: prácticamente todas las muestras de las provincias de A Coruña, Lugo y Pontevedra se encuentran por debajo de los 100 mg/kg, estando los datos muy agrupados. Por el contrario, la mayor parte de las mieles de la provincia de Ourense igualan o superan los 200 mg/kg, excepto las muestras N° 41 y 44 pero presentan, al igual que sucedía con el ácido cítrico, una gran dispersión de datos.

5.3.2.1.2. INFLUENCIA DEL ESPECTRO POLÍNICO EN EL CONTENIDO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS DETERMINADOS POR EL MÉTODO ENZIMÁTICO

En la Tabla XXIII aparecen recogidos los estadísticos del contenido de los ácidos D-glucónico total, cítrico y L-málico agrupados según el espectro polínico.

En esta tabla se observa que las mieles de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) presentan los valores medios más bajos de contenido en los ácidos D-glucónico total y cítrico, mientras que el menor contenido de ácido L-málico es el de la miel de *Trifolium* L. sp. Las mieles de castaño (*Castanea sativa* Miller) son las que poseen los valores medios más altos de contenido en los tres ácidos (D-glucónico total, cítrico y L-málico).

Tabla XXIII. Estadísticos del contenido de los ácidos orgánicos determinados por el método enzimático en las mieles de Galicia con Denominación agrupados según el espectro polínico

Espectro polínico	N	Ácido D-glucónico total (g/kg) [*]	Ácido cítrico (mg/kg) [*]	Ácido málico (mg/kg) [*]
<i>Castanea sativa</i> Miller	3	10.67 ± 3.08 (7.13-12.72)	366.8 ± 134.4 (211.8-451.2)	434 ± 195 (212-578)
<i>Eucalyptus</i> sp.	21	4.97 ± 1.53 (2.38-8.42)	40.4 ± 12.1 (20.7-71.4)	25 ± 5 (17-36)
<i>Trifolium</i> L. sp.	1	8.97	107.0	8
multifloral	25	8.93 ± 2.38 (4.77-13.53)	150.4 ± 108.4 (39.1-435.1)	108 ± 115 (21-518)

^{*} MEDIA ± SD (V_{mín}-V_{máx})

En la Figura 32 se representan las distribuciones del contenido de los ácidos D-glucónico total, cítrico y L-málico agrupados según su espectro polínico.

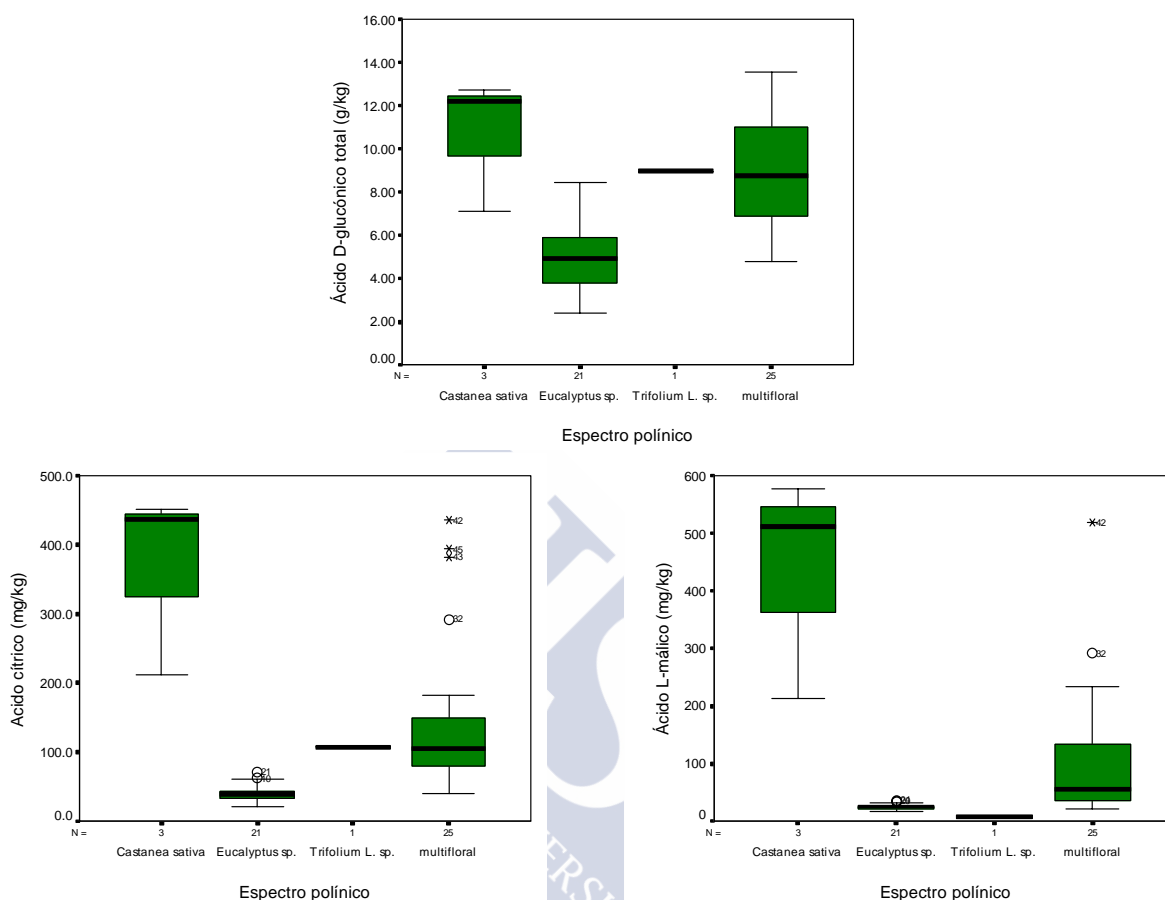


Figura 32. Distribuciones del contenido de los ácidos orgánicos determinados por el método enzimático en las mieles de Galicia con Denominación según el espectro polínico.

Particularmente en cada uno de los gráficos de esta figura se observa lo siguiente:

Ácido D-glucónico total: alrededor del 50% de las mieles de *Eucalyptus* sp. tienen un contenido de ácido D-glucónico total inferior a 5.00 g/kg, siendo el 75% de las mismas inferior a 6.00 g/kg. Aunque las muestras de *Castanea sativa* Miller son las que poseen el mayor promedio de ácido D-glucónico, el valor máximo de todas las muestras lo posee una miel multiflora (Nº 44). Esta miel presenta un porcentaje de pólenes de *Castanea sativa* Miller de aproximadamente un 87%. Sin embargo no se puede concluir que una elevada presencia de pólenes de *Castanea sativa* Miller provoque un aumento en el contenido del ácido D-glucónico total porque existen mieles multiflorales con un contenido mayor de 10.00 g/kg que no tienen una elevada presencia de pólenes de esta especie.

Ácido cítrico: existe una escasa dispersión de los resultados del contenido en ácido cítrico de las mieles de *Eucalyptus* sp. Por otra parte, el 84% de las muestras multiflorales presentan un contenido en ácido cítrico menor de 200.0 mg/kg. Del resto de las muestras multiflorales, las N° 32, 42 y 43, poseen un porcentaje de pólenes de *Castanea sativa* Miller superior al 60%, aunque este porcentaje es del 31% en el caso de la miel N° 45. Por ello, parece que en algunas muestras, aunque no en todas, el porcentaje de polen de *Castanea sativa* Miller hace aumentar el contenido en ácido cítrico de la miel.

Ácido L-málico: al igual que sucedía con el ácido cítrico se observa la escasa dispersión de las 21 muestras de *Eucalyptus* sp. El contenido en ácido L-málico de la mayor parte de las mieles multiflorales es menor de 200 mg/kg. Las muestras que aparecen como “outliers” en el diagrama de caja de las mieles multiflorales presentan un contenido de polen de *Castanea sativa* Miller mayor del 60%. Sin embargo, existen muestras con un contenido incluso mayor, como por ejemplo la muestra N° 44 (con un 87% de polen de *Castanea sativa* Miller) cuyo valor de ácido L-málico no supera los 200 mg/kg, por lo que tampoco se puede concluir que un elevado porcentaje de pólenes de *Castanea sativa* Miller provoca un aumento del contenido en ácido L-málico.

A continuación se van a comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los datos existentes en la bibliografía consultada, en la que los ácidos glucónico, cítrico y málico se han determinado en la miel utilizando métodos enzimáticos y cromatográficos (Tabla XX).

En cuanto al ácido D-glucónico total, el contenido medio obtenido en el presente estudio para las mieles de *Castanea sativa* Miller es superior al encontrado por *Mato et al. (1997)* para una muestra (9.53 g/kg). El valor medio observado en las mieles de *Eucalyptus* sp. es inferior, prácticamente en 2.00 g/kg, al obtenido por *Mato et al. (1997)* con un valor de 6.92 g/kg. No se han encontrado datos en la bibliografía consultada de ácido D-glucónico en mieles monoflorales de *Trifolium* L. sp. Por último, el promedio del contenido en ácido D-glucónico total de las mieles multiflorales obtenido en este trabajo es superior a los encontrados por *Cherchi et al. (1994)*, *Mato et al. (1997)* y *Del Nozal et al. (1998)* con valores medios que oscilan entre 2.68 y 7.73 g/kg.

En lo que se refiere al ácido cítrico, el contenido medio obtenido en este trabajo para las mieles de *Castanea sativa* Miller es superior al encontrado por *Tourn et al. (1980)* para una muestra (170.0 mg/kg), pero inferior a los encontrados por *Talpay (1988)* y *Mato et al. (1998a)*, con valores de 751.1 y 827.0 mg/kg, respectivamente. El valor medio observado en las mieles de *Eucalyptus* sp. es muy inferior a los obtenidos por *Talpay (1988)* y *Mato et al.*

(1998a), con valores medios de 199.8 y 62.4 mg/kg, respectivamente. El contenido en ácido cítrico de la miel de *Trifolium L. sp.* analizada es muy superior al obtenido, también, para una muestra por *Horvath y Molnár-Perl (1998)*, con un valor de 8.0 mg/kg. Por último, el promedio del contenido en ácido cítrico de las mieles multiflorales obtenido en este trabajo es similar al obtenido por *Cherchi et al. (1994)* (159.9 mg/kg), inferior a los encontrados por *Talpay (1988)* (245.9 mg/kg), *Mato et al. (1998a)* (227.0 mg/kg) y *Del Nozal et al. (1998)* (404.0 mg/kg) y superior al encontrado por *Horvath y Molnár-Perl (1998)* (45.8 mg/kg).

En el caso del ácido L-málico, el contenido medio obtenido en este trabajo para las mieles de *Castanea sativa* Miller es inferior a los encontrados, en ambos casos para una muestra, por *Tourn et al. (1980)* y *Mato et al. (1998b)*, con valores de 640 y 519 mg/kg, respectivamente. El valor medio observado en las mieles de *Eucalyptus sp.* es muy inferior al obtenido por *Mato et al. (1998b)*, con un valor medio de 136 mg/kg. El contenido en ácido L-málico de la miel de *Trifolium L. sp.* analizada es similar al valor obtenido para una muestra por *Horvath y Molnár-Perl (1998)* (11 mg/kg). Por último, el promedio del contenido de ácido L-málico de las mieles multiflorales obtenido en este trabajo es inferior a los obtenidos por *Cherchi et al. (1994)*, *Del Nozal et al. (1998)* y *Mato et al. (1998b)*, con valores que oscilan entre 135 y 321 mg/kg pero superior al encontrado por *Horvath y Molnár-Perl (1998)* (50 mg/kg).



5.3.2.2. MIELES PROCEDENTES DE OTRAS ZONAS DE ESPAÑA

En la Tabla XXIV se encuentran recogidos los resultados de la determinación por el método enzimático de los ácidos D-glucónico total (g/kg), cítrico (mg/kg) y L-málico (mg/kg) en las 25 mieles analizadas procedentes de otras zonas de España.

El promedio obtenido para el ácido D-glucónico total ha sido de 4.37 g/kg, con valores mínimo y máximo de 2.18 y 8.53 g/kg, respectivamente. En el caso del ácido cítrico, el valor medio obtenido ha sido de 263.6 mg/kg, con valores mínimo y máximo de 41.4 y 785.0 mg/kg, respectivamente. Por último para el ácido L-málico, el promedio obtenido ha sido de 206 mg/kg, con valores mínimo y máximo de 13 y 782 mg/kg, respectivamente.

Tabla XXIV. Contenido de los ácidos orgánicos determinados por el método enzimático en las mieles procedentes de otras zonas de España ordenadas según su espectro polínico

Número de muestra	Comunidad Autónoma	Espectro polínico	Ácido D-glucónico total (g/kg)	Ácido cítrico (mg/kg)	Ácido L-málico (mg/kg)
1	Castilla y León	<i>Citrus sp.</i>	2.50	128.9	40
2	Comunidad Valenciana	<i>Citrus sp.</i>	2.52	115.1	38
3	Castilla y León	<i>Diplotaxis sp.</i>	2.27	64.5	43
4	Castilla La Mancha	<i>Echium sp.</i>	4.56	142.7	15
5	Castilla y León	<i>Erica sp.</i>	7.10	400.5	748
6	Comunidad Valenciana	<i>Eucalyptus sp.</i>	4.24	257.8	274
7	Comunidad Valenciana	<i>Eucalyptus sp.</i>	5.03	66.8	91
8	Castilla La Mancha	<i>Lavandula sp.</i>	3.25	513.3	98
9	Castilla La Mancha	<i>Lavandula sp.</i>	4.18	82.9	38
10	Castilla y León	<i>Lavandula sp.</i>	4.37	494.9	503
11	Castilla La Mancha	<i>Rosmarinus sp.</i>	3.22	389.0	42
12	Castilla La Mancha	<i>Rosmarinus sp.</i>	3.37	92.1	144
13	Castilla La Mancha	<i>Rosmarinus sp.</i>	2.71	41.4	13
14	Castilla y León	<i>Rosmarinus sp.</i>	2.18	48.3	13
15	Comunidad Valenciana	<i>Rosmarinus sp.</i>	2.80	48.3	32
16	Comunidad Valenciana	<i>Rosmarinus sp.</i>	2.91	46.0	30
17	Castilla La Mancha	<i>Rosmarinus sp. y Trifolium L. sp.</i>	5.66	451.2	461
18	Castilla y León	multifloral	4.31	117.4	28
19	Castilla y León	multifloral	8.50	278.5	268
20	Comunidad Valenciana	multifloral	5.89	785.0	516
21	Comunidad Valenciana	multifloral	3.48	128.9	45
22	Extremadura	multifloral	5.28	124.3	127
23	Extremadura	multifloral	8.53	626.1	431
24	Castilla y León	multifloral y de mielada	5.58	550.2	782
25	Comunidad Valenciana	multifloral y de mielada	4.77	596.2	342
MEDIA			4.37	263.6	206
SD			1.79	226.0	238
RSD%			40.90	85.7	115
V _{mín}			2.18	41.4	13
V _{máx}			8.53	785.0	782

El valor medio del contenido de ácido D-glucónico total, al igual que los valores mínimo y máximo, son *menores* que los obtenidos en las mieles de Galicia con Denominación analizadas, con valores de 7.37, 2.38 y 13.53 g/kg, respectivamente (Tabla XXI). Por el contrario, los valores medio, mínimo y máximo del contenido de los ácidos

cítrico y L-málico son *mayores* que los obtenidos en las mieles de Galicia con Denominación analizadas, con valores de 116.3, 20.7 y 451.2 mg/kg para el ácido cítrico y de 91, 8 y 578 mg/kg para el ácido L-málico (Tabla XXI).

En la Figura 33 se representan las distribuciones del contenido de los ácidos D-glucónico total, cítrico y L-málico de las mieles analizadas procedentes de otras zonas de España. En esta figura se observa como prácticamente el 70% de las muestras poseen un contenido de ácido D-glucónico total entre 2.50 y 5.50 g/kg. También se pone de manifiesto como prácticamente el 60% de las muestras poseen un contenido en ácido cítrico menor de 200 mg/kg. Por último en la figura de distribución del ácido L-málico se observa como más de la mitad de las muestras poseen un contenido de ácido L-málico menor de 100 mg/kg.

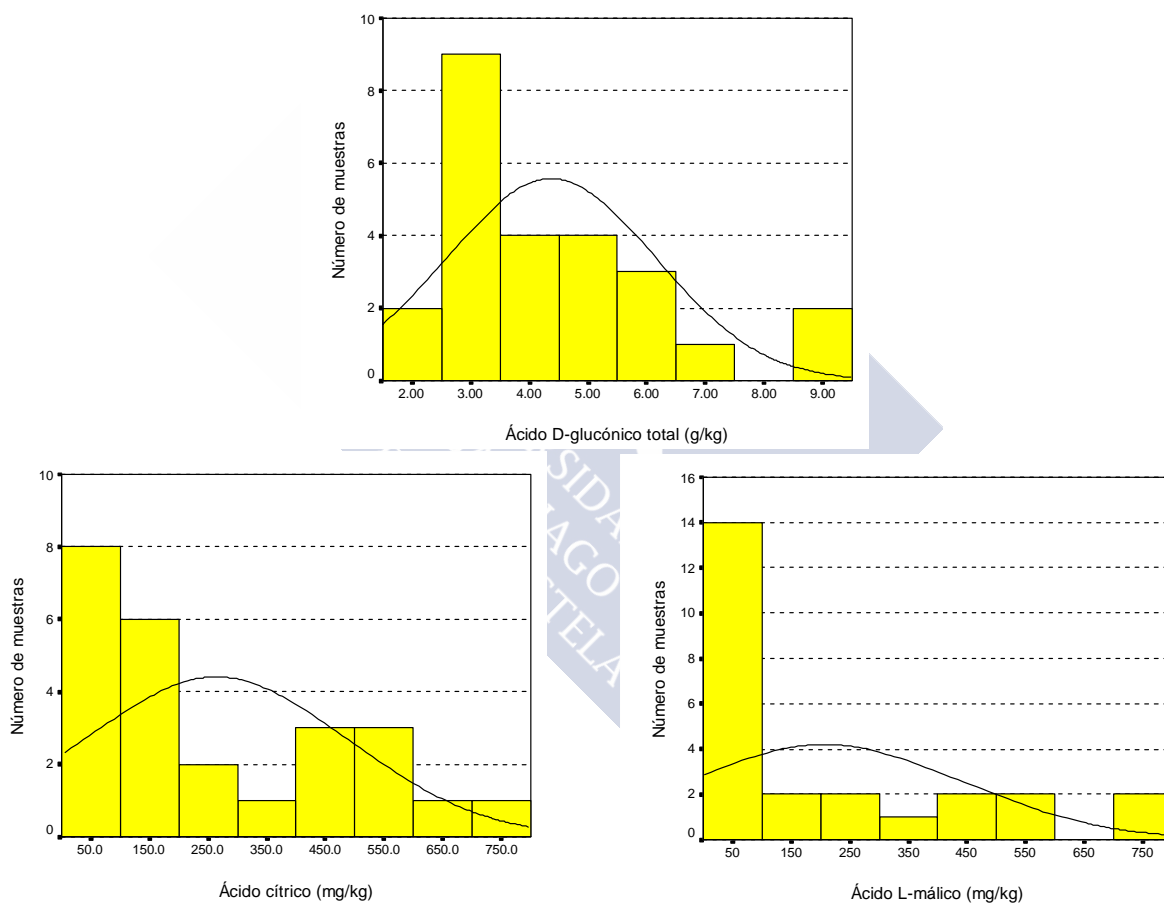


Figura 33. Distribuciones del contenido de los ácidos orgánicos determinados por el método enzimático en las mieles procedentes de otras zonas de España.

La Tabla XXV muestra los estadísticos del contenido de los ácidos D-glucónico total, cítrico y L-málico agrupados según el espectro polínico.

Tabla XXV. Estadísticos del contenido de los ácidos orgánicos determinados por el método enzimático en las mieles procedentes de otras zonas de España agrupados según el espectro polínico

Espectro polínico	N	Ácido D-glucónico total (g/kg)*	Ácido cítrico (mg/kg)*	Ácido málico (mg/kg)*
<i>Citrus</i> sp.	2	2.51 ± 0.01 (2.50-2.52)	122.0 ± 9.8 (115.1-128.9)	39 ± 1 (38-40)
<i>Diplotaxis</i> sp.	1	2.27	64.5	43
<i>Echium</i> sp.	1	4.56	142.7	15
<i>Erica</i> sp.	1	7.10	400.5	748
<i>Eucalyptus</i> sp.	2	4.64 ± 0.56 (4.24-5.03)	162.3 ± 135.1 (66.8-257.8)	183 ± 129 (91-274)
<i>Lavandula</i> sp.	3	3.93 ± 0.60 (3.25-4.37)	363.7 ± 243.4 (82.9-513.3)	213 ± 253 (38-503)
<i>Rosmarinus</i> sp.	6	2.87 ± 0.42 (2.18-3.37)	110.9 ± 137.5 (41.4-389.0)	46 ± 50 (13-144)
<i>Rosmarinus</i> sp. y <i>Trifolium</i> L. sp.	1	5.66	451.2	461
multifloral	6	6.00 ± 2.12 (3.48-8.53)	343.4 ± 291.3 (117.4-785.0)	236 ± 205 (28-516)
multifloral y de mielada	2	5.18 ± 0.57 (4.77-5.58)	573.2 ± 32.5 (550.2-596.2)	562 ± 311 (342-782)

* MEDIA ± SD (V_{mín}-V_{máx})

En esta tabla se observa como la miel doblemente monofloral de *Rosmarinus* sp. y *Trifolium* L. sp. tiene un contenido en los ácidos D-glucónico total, cítrico y L-málico mucho mayor que las muestras monoflorales de *Rosmarinus* sp. Esto mismo sucedía con los parámetros físico químicos analizados anteriormente (conductividad eléctrica, pH y tipos de acidez).

Si tenemos en cuenta cada ácido en particular, en la Tabla XXV se pone de manifiesto lo siguiente:

Ácido D-glucónico total: todas las mieles de *Citrus* sp., *Diplotaxis* sp. y *Rosmarinus* sp. poseen un contenido menor de 3.50 g/kg. Por el contrario, la miel de *Erica* sp. y las multiflorales son las muestras que presentan mayor valor medio de contenido de ácido D-glucónico total. El rango de valores encontrados en las mieles multiflorales es el más amplio, concretamente va desde 3.48 a 8.53 g/kg, como corresponde a un grupo más heterogéneo de mieles.

Ácido cítrico: todas las mieles de *Citrus sp.*, *Diplotaxis sp.* y *Echium sp.* analizadas poseen un contenido menor de 150.0 mg/kg. Las únicas muestras con un valor de ácido cítrico mayor de 600.0 mg/kg son multiflorales aunque las mieles de bosque (multifloral y de mielada) son las que presentan el mayor contenido medio en ácido cítrico. El rango de valores encontrados en las mieles multiflorales es el más amplio, concretamente va desde 117.4 a 785.0 mg/kg.

Ácido L-málico: todas las mieles de *Citrus sp.*, *Diplotaxis sp.* y *Echium sp.* analizadas poseen un contenido menor de 50 mg/kg. Las mieles con mayor contenido medio de ácido L-málico son las de bosque (multifloral y de mielada), aunque las 2 muestras analizadas presentan unos valores bastante diferentes. El rango de valores encontrados en las mieles multiflorales, al igual que en los casos anteriores, es el más amplio, concretamente va desde 28 a 516 mg/kg.

A continuación se van a comparar los resultados obtenidos para los ácidos D-glucónico total, cítrico y L-málico de las mieles procedentes de otras zonas de España analizadas con los datos encontrados en la bibliografía consultada:

Hay que destacar que no se han encontrado datos del contenido de los tres ácidos analizados ni en las mieles monoflorales de *Diplotaxis sp.* y *Echium sp.* ni en la miel doblemente monofloral de *Rosmarinus sp.* y *Trifolium L. sp.* ni en la miel de bosque (multifloral y de mielada).

En lo que se refiere al ácido D-glucónico total, Casella y Gatta (2001) analizaron una muestra de *Citrus sp.* obteniendo un valor similar (2.9 g/kg) al encontrado en este trabajo. Por su parte, Del Nozal et al. (1998) determinó el contenido de ácido D-glucónico en varios tipos de miel, entre las que se encontraban las mieles de *Erica sp.*, *Lavandula sp.* y *Rosmarinus sp.*, con valores medios de 4.93, 4.05 y 2.44 g/kg, respectivamente. De estos últimos datos destaca el contenido de ácido D-glucónico total de las mieles de *Erica sp.*, pues presentan un valor medio mucho menor que el obtenido en este trabajo. El contenido medio de este ácido en las mieles de *Eucalyptus sp.* obtenido por Mato et al. (1997) (6.92 g/kg) es superior al determinado en este trabajo para las mieles procedentes de otras zonas de España analizadas. Por último, el promedio de contenido de ácido D-glucónico total de las mieles multiflorales es superior al encontrado por Del Nozal et al. (1998) (2.68 g/kg) pero inferior al obtenido por Cherchi et al. (1994) y Mato et al. (1997), con valores medios de 6.9 y 7.73 g/kg, respectivamente.

En cuanto al ácido cítrico, el contenido medio de las mieles de *Citrus* sp. analizadas en este trabajo es superior al obtenido por *Horvath y Molnár-Perl (1998)* en una muestra, con un valor de 48.0 mg/kg. La miel de *Erica* sp. presenta un contenido en ácido cítrico superior al valor medio encontrado por *Del Nozal et al. (1998)* (131.0 mg/kg). *Mato et al. (1998a)* obtuvieron para las mieles de *Eucalyptus* un contenido medio de ácido cítrico de 62.4 mg/kg, prácticamente 100 mg/kg menor que el determinado para las mieles de este estudio. Los valores medios del contenido en ácido cítrico en las mieles de *Lavandula* sp. obtenidos por *Del Nozal et al. (1998)* (181.0 mg/kg) y *Horvath y Molnár-Perl (1998)* (203 mg/kg) fueron inferiores a los encontrados en este trabajo. *Del Nozal et al. (1998)* obtuvieron un valor medio de 49.0 mg/kg para las mieles de *Rosmarinus* sp., inferior al contenido medio de ácido cítrico de las mieles de este trabajo, aunque muy similar a los valores de 4 de las 6 muestras de *Rosmarinus* sp. analizadas. Por último, el promedio de contenido de ácido cítrico de las mieles multiflorales es inferior al encontrado por *Del Nozal et al. (1998)* (404.0 mg/kg) pero superior al obtenido por *Talpay (1988)*, *Cherchi et al. (1994)*, *Horvath y Molnár-Perl (1998)* y *Mato et al. (1998a)* con valores que oscilan entre 45.8 y 245.9 mg/kg.

En el caso del ácido L-málico, el valor medio de las mieles de *Citrus* sp. analizadas en este trabajo es superior al obtenido por *Horvath y Molnár-Perl (1998)* en una muestra, con un valor de 22 mg/kg. *Mato et al. (1998b)* encontraron un menor contenido medio de ácido L-málico para las mieles de *Eucalyptus*, con un valor de 136 mg/kg. *Del Nozal et al. (1998)* analizaron mieles de *Erica* sp., *Lavandula* sp. y *Rosmarinus* sp. pero no detectaron valores de ácido L-málico. Para las mieles de *Lavandula* sp., el valor medio del contenido en ácido L-málico obtenido por *Horvath y Molnár-Perl (1998)* (154 mg/kg) fue inferior al determinado en este trabajo. Por último, el promedio de contenido de ácido L-málico de las mieles multiflorales es inferior a los encontrados por *Del Nozal et al. (1998)* y *Mato et al. (1998b)*, con valores de 321 y 294 mg/kg, respectivamente, pero superiores a los obtenidos por *Cherchi et al. (1994)* y *Horvath y Molnár-Perl (1998)* con valores de 135.4 y 50 mg/kg, respectivamente.

5.4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Para la determinación de los ácidos orgánicos en la miel, se ha empleado un método de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC) con detección UV y con purificación previa de la muestra mediante extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos de intercambio aniónico. Este método propuesto permite la identificación y cuantificación de los **ácidos málico, maleico, cítrico, succínico y fumárico** en la miel. La puesta a punto del método de determinación de los ácidos orgánicos y del proceso de extracción han dado lugar, respectivamente, a la publicación de dos artículos (*Súarez-Luque et al., 2002a y 2002b*).

5.4.1. PARTE EXPERIMENTAL

5.4.1.1. MATERIAL Y APARATOS

- ✓ Equipo de cromatografía líquida Waters compuesto por:
 - Desgasificador de membrana Waters ILD.
 - Bomba de gradiente cuaternario Waters 600E.
 - Inyector automático Waters 717 plus.
 - Detector de fotodiodos (UV-visible) Waters 996.
 - Sistema de adquisición y tratamiento de datos cromatográficos Millennium 32[®] de Waters, versión 3.05.01 (1999) sobre Windows 98.
- ✓ Columna cromatográfica Spherisorb ODS-2 S5 (5 µm, 250 x 4.6 mm I.D.).
- ✓ pHmetro Crison micropH 2002.
- ✓ Agitador magnético Selecta Agimatic-S.
- ✓ Filtros de membrana de 0.45 µm Phenomenex AFO-0504.
- ✓ Filtros de membrana de acetato de celulosa de 0.45 µm Whatman Cat. N° 7000 0002.
- ✓ Cartuchos de intercambio iónico Waters Accell[™] Plus QMA Cat. N° WAT020545.
- ✓ Cronómetro digital Van Allen.
- ✓ Material de uso común en el laboratorio.

5.4.1.2. REACTIVOS

- ↪ Sales sódicas de los ácidos orgánicos Sigma: Ácido cítrico (Art. S-4641), ácido fumárico (Art. F-1506), ácido maleico (Art. M-5757), ácido málico (Art. M-1125) y ácido succínico (Art. S-2378).
- ↪ Ácido meta-fosfórico en trozos p.a. Merck Art. 100546.
- ↪ Hidróxido de sodio en lentejas p.a. ISO Merck Art. 106498.
- ↪ Ácido sulfúrico 95-97% p.a. ISO Merck Art. 100731.
- ↪ Agua Milli-Q Millipore.

5.4.1.3. PROCEDIMIENTO

5.4.1.3.1. PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES DE LOS PATRONES

Las disoluciones madre de los patrones de los ácidos málico, maleico, cítrico, succínico y fumárico de concentración 10 g/L se preparan en agua Milli-Q y se almacenan a 4 °C, permaneciendo estables durante un mes. Las disoluciones de trabajo de los patrones se preparan diariamente mediante dilución de las disoluciones madre en agua Milli-Q.

5.4.1.3.2. PREPARACIÓN DE LA DISOLUCIÓN DE MIEL

Se pesan exactamente 7.5 g de miel en un vaso de precipitados de 250 mL y se disuelven en 75 mL de agua Milli-Q. La disolución se lleva a pH 10.50 con NaOH 0.1 M, manteniéndose en agitación durante 15 minutos a la temperatura del laboratorio. Posteriormente, la disolución se ajusta a pH 5.00 con H₂SO₄ 0.1 M, se enrasa en un matraz aforado a 100 mL con agua Milli-Q y se agita. Con este procedimiento se pretenden evitar interferencias en la línea base. De la disolución anterior se pipetea 10 mL y se pasan a través de un filtro de acetato de celulosa de 0.45 µm. Este filtrado se somete a un proceso de extracción en fase sólida con un cartucho de intercambio iónico que consta de las siguientes etapas:

- Se activa el cartucho con 10 mL de NaOH 0.1 M a una velocidad de paso de 3.0 mL/min.
- Se pasan los 10 mL de la disolución de miel preparada anteriormente a través del cartucho (velocidad de percolación de 0.5 mL/min).
- El cartucho se lava con 10 mL de agua Milli-Q a una velocidad de 3.0 mL/min.

- Se eluyen los ácidos orgánicos con 4 mL de H₂SO₄ 0.1 M a una velocidad de 0.5 mL/min.

La disolución obtenida después de llevar a cabo esta extracción en fase sólida es la que se inyecta directamente en el cromatógrafo de líquidos.

5.4.1.3.3. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

El análisis se lleva a cabo en condiciones isocráticas utilizando como fase móvil agua Milli-Q acidificada con ácido meta-fosfórico 4.5% (p/v) a un pH de 2.20 y a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min. Esta fase móvil se prepara diariamente y se pasa a través de un filtro de membrana de 0.45 µm de tamaño de poro.

La columna se termostatiza a 25 °C. El volumen de inyección es de 20 µL. Todos los patrones y las muestras se inyectan por triplicado. La longitud de onda óptima para la detección conjunta de los ácidos orgánicos analizados es de 215 nm. El análisis cromatográfico se lleva a cabo en 15 minutos.

5.4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.4.2.1. PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO

5.4.2.1.1. RESULTADOS

Como ya se ha comentado, este método propuesto permite la identificación y cuantificación de los ácidos málico, maleico, cítrico, succínico y fumárico en la miel. Estos ácidos orgánicos se identifican mediante comparación de los tiempos de retención de los picos correspondientes con los obtenidos al analizar los patrones. La Tabla XXVI muestra los tiempos de retención medios de los ácidos orgánicos objeto de estudio.

Tabla XXVI. Tiempos de retención de los ácidos orgánicos determinados por el método propuesto de HPLC

ÁCIDO ORGÁNICO	TIEMPOS DE RETENCIÓN (min) ± SD	RSD (%)
Málico	5.81 ± 0.01	0.15
Maleico	9.07 ± 0.10	1.09
Cítrico	10.87 ± 0.09	0.78
Succínico	11.81 ± 0.10	0.87
Fumárico	13.61 ± 0.10	0.71

5.4.2.1.1.1. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

El límite de detección (LOD) de un método se define como la concentración más baja de un analito que produce una respuesta detectable superior al nivel de ruido del sistema mientras que el límite de cuantificación (LOQ) se define como la concentración más baja que puede ser determinada con precisión y exactitud (Green, 1996; Jenke, 1996). El límite de detección (LOD) se calcula como $s_b + 3s$ y el límite de cuantificación (LOQ) como $s_b + 10s$, donde s_b es la señal media de diez inyecciones de un blanco (ruido) y s la desviación estándar. La señal de cada una de las inyecciones del blanco es, en este caso, la mayor altura comprendida entre el tiempo de retención del ácido $\pm 10\%$. Una vez obtenida la señal para cada ácido orgánico, ésta se transforma en concentración (mg/kg) mediante la recta de calibrado correspondiente (ACS Committee on Environmental Improvement, 1980).

En la Tabla XXVII se muestran los límites de detección y cuantificación de los ácidos orgánicos analizados en la miel. Los límites de detección obtenidos se encuentran entre 0.0064 y 7.57 mg/kg para los ácidos fumárico y succínico, respectivamente. Los límites de cuantificación, por su parte, oscilan entre 0.025 y 10.93 mg/kg para los ácidos fumárico y succínico, respectivamente.

Cherchi et al. (1994) y Del Nozal et al. (1998), en la puesta a punto del método, determinan los límites de detección pero no los límites de cuantificación. Ambos autores obtienen unos límites de detección similares a los encontrados en este trabajo para los ácidos málico y cítrico. El ácido succínico presenta un límite de detección muy superior a los determinados por estos autores, con valores de 0.7 mg/kg y 2.0 mg/kg, respectivamente. Para el ácido fumárico, el límite de detección se encuentra entre el obtenido por Cherchi et al. (1994) (0.004 mg/kg) y Del Nozal et al. (1998) (0.066 mg/kg).

Tabla XXVII. Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) en mg/kg del método propuesto de HPLC para la determinación de los ácidos orgánicos en la miel

ÁCIDO ORGÁNICO	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
Málico	1.55	2.93
Maleico	0.059	0.075
Cítrico	1.44	2.72
Succínico	7.57	10.93
Fumárico	0.0064	0.025

5.4.2.1.1.2. RECTAS DE CALIBRADO

La cuantificación de los ácidos orgánicos se ha llevado a cabo mediante un método de calibración externa. Estas rectas de calibración se han construido con 7 concentraciones crecientes de una mezcla de patrones, inyectándose cada una por triplicado. La recta de calibrado para cada ácido se ha obtenido representando las alturas de los picos frente a las concentraciones y aplicando el método de mínimos cuadrados. Las rectas de calibrado se expresan como líneas de regresión del tipo ($y = ax + b$), donde y representa la altura del pico mientras que x representa la concentración del ácido orgánico en la miel (mg/kg). En la Tabla XXVIII se reflejan los parámetros (a y b) y los coeficientes de correlación (r) de las rectas obtenidas.

Cada recta de calibrado es lineal en un amplio intervalo, desde el límite de detección hasta al menos 900 mg/kg en el caso de los ácidos málico y cítrico, 1100 mg/kg para el ácido succínico, 5 mg/kg para el ácido maleico y 25 mg/kg para el ácido fumárico.

Tabla XXVIII. Parámetros y coeficientes de correlación (r) de las rectas de calibrado del método propuesto de HPLC para la determinación de los ácidos orgánicos en la miel

ÁCIDO ORGÁNICO	a	b	r
Málico	19.79	45.79	1.0000
Maleico	1272	41.66	1.0000
Cítrico	19.65	0.5058	0.9999
Succínico	6.984	46.70	0.9994
Fumárico	1481	38.05	0.9998

5.4.2.1.1.3. PRECISIÓN

La precisión es una medida del grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar un procedimiento analítico varias veces consecutivas (repetibilidad) o en diferentes intervalos de tiempo (reproducibilidad). Se determina mediante las desviaciones estándar relativas (RSD) que se expresan en tanto por ciento (*Miller y Miller, 2002*).

Ambos estudios se han llevado a cabo en tres mieles diferentes que contienen cantidades baja (muestra A), media (muestra B) y alta (muestra C) de ácidos orgánicos.

No es posible comparar estos resultados con los de otros autores (*Cherchi et al., 1994; Del Nozal et al., 1998*) porque no reflejan estudios de precisión en muestras de miel.

5.4.2.1.1.3.1. Repetibilidad

La repetibilidad se ha llevado a cabo inyectando cinco veces cada una de las mieles en un mismo día. En las tres muestras analizadas (A, B y C), el RSD% de los distintos ácidos ha sido $\leq 3.20\%$ (Tabla XXIX).

Tabla XXIX. Repetibilidad del método propuesto de HPLC para la determinación de los ácidos orgánicos en la miel

Ácido orgánico	Repetibilidad (n=5)					
	Muestra A		Muestra B		Muestra C	
	Media \pm SD (mg/kg)	RSD (%)	Media \pm SD (mg/kg)	RSD (%)	Media \pm SD (mg/kg)	RSD (%)
Málico	35.5 \pm 1.9	2.29	109.4 \pm 2.9	2.67	274.1 \pm 8.8	3.20
Maleico	0.213 \pm 0.011	0.93	0.257 \pm 0.008	3.11	0.143 \pm 0.003	1.93
Cítrico	70.9 \pm 1.6	0.90	120.8 \pm 0.8	0.70	390.3 \pm 10.5	2.68
Succínico	23.4 \pm 0.04	0.27	31.2 \pm 0.22	0.71	152.9 \pm 3.1	2.02
Fumárico	0.130 \pm 0.008	1.21	1.011 \pm 0.007	0.68	6.88 \pm 0.24	2.94

5.4.2.1.1.3.2. Reproducibilidad

La reproducibilidad se ha determinado analizando cada miel en tres días alternos. En las tres muestras analizadas (A, B y C), el RSD% de los distintos ácidos ha sido $\leq 4.86\%$ (Tabla XXX).

Tabla XXX. Reproducibilidad del método propuesto de HPLC para la determinación de los ácidos orgánicos en la miel

Ácido orgánico	Reproducibilidad (n=3)					
	Muestra A		Muestra B		Muestra C	
	Media \pm SD (mg/kg)	RSD (%)	Media \pm SD (mg/kg)	RSD (%)	Media \pm SD (mg/kg)	RSD (%)
Málico	34.6 \pm 1.0	2.95	113.1 \pm 3.4	3.03	268.0 \pm 10.4	3.90
Maleico	0.203 \pm 0.008	3.72	0.252 \pm 0.011	4.40	0.147 \pm 0.004	2.57
Cítrico	69.5 \pm 3.2	4.68	122.3 \pm 3.2	2.59	378.4 \pm 12.0	3.18
Succínico	23.10 \pm 1.12	4.86	30.69 \pm 0.92	2.99	149.4 \pm 3.4	3.07
Fumárico	0.128 \pm 0.005	4.15	0.987 \pm 0.045	4.59	7.08 \pm 0.09	3.23

5.4.2.1.1.4. RECUPERACIÓN

La exactitud de un método analítico hace referencia al grado de concordancia entre el valor verdadero o esperado para un analito en una muestra y el valor medio obtenido al repetir el procedimiento analítico un número determinado de veces. Su evaluación se puede llevar a cabo mediante las recuperaciones analíticas o el análisis de materiales de referencia certificados (*Miller y Miller, 2002*). En este caso se ha utilizado el método de las recuperaciones analíticas.

Para establecer la eficacia del procedimiento de extracción en fase sólida de los ácidos orgánicos, se aplicó todo el proceso analítico a una mezcla de patrones. Las recuperaciones medias obtenidas oscilan entre un 99.2 y un 103.4% para el ácido succínico y fumárico, respectivamente (Tabla XXXI).

Tabla XXXI. Recuperaciones medias obtenidas al someter una mezcla de patrones de los ácidos orgánicos estudiados a todo el proceso analítico

ÁCIDO ORGÁNICO	MEDIA (%) \pm SD	RSD (%)
Málico	101.8 \pm 0.18	0.18
Maleico	103.3 \pm 0.099	0.10
Cítrico	100.8 \pm 0.085	0.08
Succínico	99.2 \pm 0.34	0.34
Fumárico	103.4 \pm 1.43	1.38

Este procedimiento también se llevó a cabo en una miel sobrecargada con tres concentraciones (baja, media y alta) de una mezcla de patrones. La Tabla XXXII muestra las recuperaciones medias obtenidas para los ácidos orgánicos objeto de estudio.

Tabla XXXII. Recuperaciones medias obtenidas al someter a una muestra de miel sobrecargada con concentraciones crecientes de una mezcla de patrones de ácidos orgánicos a todo el proceso analítico

ÁCIDO ORGÁNICO	MEDIA (%) \pm SD	RSD (%)
Málico	62.9 \pm 4.4	7.0
Maleico	93.4 \pm 8.2	8.8
Cítrico	99.4 \pm 1.5	1.5
Succínico	75.0 \pm 5.0	6.7
Fumárico	94.4 \pm 4.6	4.9

No es posible comparar estos resultados con los de otros autores porque es la primera vez que estos estudios se llevan a cabo en muestras de miel. Los resultados de recuperación obtenidos por *Cherchi et al. (1994)* se realizan en soluciones de patrones y los obtenidos por *Del Nozal et al. (1998)* en jarabes que pretenden simular la composición de la miel.

Todos los resultados obtenidos anteriormente indican que el método propuesto puede ser usado para el análisis cuantitativo de los ácidos orgánicos en la miel.

5.4.2.1.2. DISCUSIÓN

En el desarrollo del método, el primer paso fue separar e identificar el mayor número de ácidos orgánicos posible, obteniéndose la separación de los patrones de los ácidos glucónico, tartárico, fórmico, málico, láctico, acético, maleico, cítrico, succínico y fumárico (Figura 34). En esta figura, la concentración de la mezcla de patrones del cromatograma fue de 1400 ppm para el ácido glucónico, 100 ppm para los ácidos tartárico, fórmico, málico, láctico, acético, cítrico y succínico, 40 ppm para el ácido fumárico y 2 ppm para el ácido maleico.

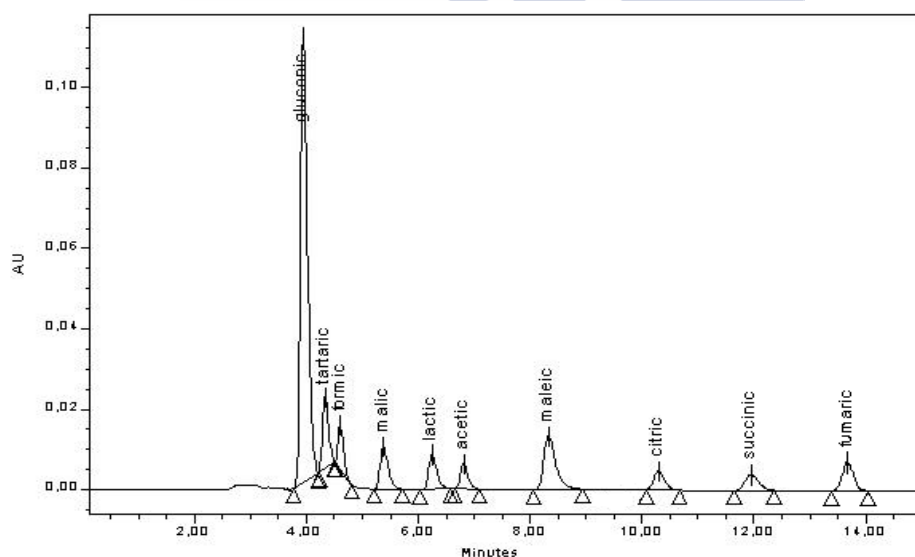


Figura 34. Cromatograma de una mezcla de patrones de los ácidos orgánicos separados por el método propuesto de HPLC.

Quando este método se aplicó a las muestras de miel surgieron numerosos problemas principalmente de interferencias. El ácido glucónico, mayoritario en la miel, no se logró cuantificar al obtenerse recuperaciones bajas y variables, probablemente debido a la saturación que sufre el cartucho de intercambio iónico. Los ácidos tartárico, fórmico, láctico y

acético tampoco mostraron porcentajes de recuperación aceptables. Por esta razón, en la miel sólo se cuantificaron los ácidos málico, maleico, cítrico, succínico y fumárico.

5.4.2.1.2.1. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

5.4.2.1.2.1.1. Influencia del tipo de columna

Se probaron tres columnas en fase reversa diferentes: una columna Nova-Pack C₁₈ (4 µm, 150 mm x 3.9 mm I.D.), una Nova-Pack C₁₈ (4 µm, 250 mm x 4.6 mm I.D.) y una columna Spherisorb ODS2 S5 (5 µm, 250 mm x 4.6 mm I.D.). Con la columna Nova-Pack C₁₈ (4 µm, 150 mm x 3.9 mm I.D.), una gran parte de los ácidos orgánicos estudiados se solapaban y la mayoría coelúan con la fase móvil. A continuación se ensayó la columna Nova-Pack C₁₈ (4 µm, 250 mm x 4.6 mm I.D.) de mayor longitud y diámetro interno que la anterior, pero se seguían produciendo solapamientos entre los ácidos. Los mejores resultados se obtuvieron con la columna Spherisorb ODS2 S5 (5 µm, 250 mm x 4.6 mm I.D.) por lo que se seleccionó para llevar a cabo el desarrollo del método propuesto de determinación de los ácidos orgánicos en la miel.

En los trabajos anteriores (*Cherchi et al., 1994; Del Nozal et al., 1998*) utilizaron dos columnas conectadas en serie para la separación y cuantificación de los diferentes ácidos orgánicos, por lo que el tiempo de análisis es mucho mayor (de 30 a 60 minutos) que en el método propuesto (15 minutos). Además de la disminución de tiempo, el emplear una única columna supone un ahorro económico considerable.

5.4.2.1.2.1.2. Influencia de la temperatura de la columna

Para conocer el efecto que ejercía la temperatura en la retención de los ácidos, se termostató la columna a diferentes temperaturas. Como era previsible los tiempos de retención disminuían a medida que la temperatura aumentaba, lo que implica una reducción del tiempo de análisis. Sin embargo si esta temperatura aumenta demasiado la resolución de los ácidos empeora. Los mejores resultados se obtuvieron con la columna a una temperatura de 25 °C.

5.4.2.1.2.1.3. Influencia de la fase móvil

En la bibliografía consultada, se utilizan principalmente dos fases móviles para la determinación por HPLC de los ácidos orgánicos en alimentos:

- Agua acidificada con ácido sulfúrico (*Randall et al., 1983; Picha, 1985; Gancedo y Luh, 1986; Romero-Rodríguez et al., 1992; Cherchi et al., 1994; Vázquez-Oderiz et al., 1994; Del Nozal et al., 1998; Shui y Leong, 2002*).

- Agua acidificada con ácido meta-fosfórico (*Coppola et al., 1978; Goiffon et al., 1985; Coppola y Starr, 1986; Hunter et al., 1991*).

El ácido sulfúrico es más estable y económico que el ácido meta-fosfórico. Sin embargo presenta una mayor absorción en la región ultravioleta (215 nm) lo que provoca un frente del disolvente mayor e interferencias con los ácidos orgánicos de tiempos de retención cortos. Por esta razón se eligió el ácido meta-fosfórico.

Para determinar la influencia del pH, se ensayaron diferentes valores de pH comprendidos entre 2.20 y 3.00 usando como fase móvil agua Milli-Q acidificada con ácido meta-fosfórico. Los mejores resultados se obtuvieron con un pH de 2.20. Hay que destacar la importancia de este control del pH ya que con una columna C₁₈ no es recomendable trabajar a pH inferior a 2.00 porque se deteriora su relleno al perderse cadenas C₁₈ unidas a la sílice. Por el contrario, a valores elevados de pH, disminuyen los tiempos de retención y, por tanto, la resolución, apareciendo solapamientos entre los diferentes ácidos.

Por último, otro factor que influye en la separación es la velocidad de flujo pues al aumentarla los tiempos de retención disminuyen. Se ensayaron velocidades de flujo de la fase móvil entre 0.2 y 1.0 mL/min, obteniéndose los mejores resultados a 0.7 mL/min.

5.4.2.1.2.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La cantidad de muestra elegida para realizar los análisis fue de 7.5 g de miel en 100 mL porque concentraciones mayores saturaban el cartucho usado para la extracción en fase sólida. Se centrifugó la muestra durante 10 minutos a 3800 rpm para eliminar el polen pero los resultados no mejoraron por lo que se desechó dicho procedimiento. Para hidrolizar las lactonas de los ácidos orgánicos y así evitar interferencias en la línea base, se llevó el pH de la disolución de miel a 10.50 con NaOH 0.1 M agitando durante 15 minutos a temperatura del laboratorio. Posteriormente esta disolución se ajustó a pH 5.00 con H₂SO₄ 0.1 M.

5.4.2.1.2.2.1. Procedimiento de extracción en fase sólida

Se ha estudiado la influencia de los parámetros que potencialmente pueden afectar al proceso de extracción para establecer las condiciones óptimas de recuperación de los ácidos orgánicos y para tener la mínima influencia de interferencias.

* TIPO DE CARTUCHO

Se ensayaron dos tipos de cartuchos de extracción en fase sólida:

- Cartucho C₁₈.
- Cartucho de intercambio aniónico.

Una mezcla de patrones de los ácidos orgánicos se disolvió, por una parte, en una solución ácida de pH 2.20 con ácido meta-fosfórico al 4.5% y por otra, en agua Milli-Q. Ambas disoluciones se sometieron al proceso de extracción con cada uno de los cartuchos.

Los ácidos orgánicos deben estar en su forma no iónica para ser retenidos en el cartucho C₁₈. Por tanto se esperaba que las mejores recuperaciones se obtuvieran al disolver la mezcla de ácidos orgánicos en una solución ácida. Sin embargo esto no fue así, ya que al disolverse en agua Milli-Q los porcentajes de recuperación, salvo para el ácido cítrico, aumentaron (Figura 35). No obstante, los resultados obtenidos con este cartucho C₁₈ no fueron satisfactorios en ningún caso.

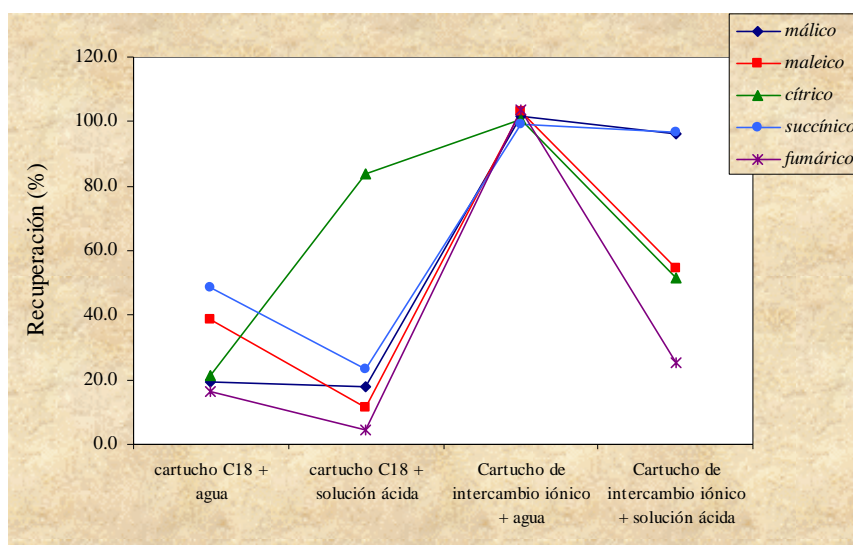


Figura 35. Recuperaciones obtenidas (%) al utilizar un cartucho C₁₈ y uno de intercambio aniónico en el proceso de extracción en fase sólida.

En el caso del cartucho de intercambio aniónico, los ácidos orgánicos deben estar en su forma iónica para ser retenidos en este tipo de cartucho. Por tanto los mejores resultados se obtuvieron cuando una mezcla de los patrones de los ácidos orgánicos estudiados se disolvieron en agua Milli-Q y se sometieron al proceso de extracción. Como se observa en la Figura 35 estas condiciones fueron las elegidas debido a que, para todos los ácidos orgánicos, se obtuvieron las mejores recuperaciones.

* ETAPA DE ACTIVACIÓN

Como soluciones de activación del cartucho se utilizaron metanol, dihidrogenofosfato de amonio 0.05 M, ácido acético a diferentes valores de pH e hidróxido de sodio a diferentes concentraciones. El metanol genera interferencias en la separación cuando el procedimiento

es aplicado a las muestras de miel. Cuando el procedimiento fue aplicado a la mezcla de patrones con la solución de dihidrogenofosfato de amonio 0.05 M (*Del Nozal et al., 1998*) se obtuvieron recuperaciones bastante bajas tanto para el ácido málico (85.4%) como, sobre todo, para el ácido fumárico (36.4%). Los resultados obtenidos al utilizar soluciones de ácido acético a diferentes pH (*Cherchi et al., 1994*) no fueron reproducibles. Las mejores recuperaciones se obtuvieron con soluciones de hidróxido de sodio. Cuando aumenta la concentración de hidróxido de sodio los resultados de recuperación decrecen, por lo que la concentración elegida como solución de activación fue de 0.1 M.

* **ETAPA DE LAVADO**

Después del paso de la solución de ácidos orgánicos a través del cartucho de intercambio aniónico, se ensayaron diferentes procedimientos de eliminación de interferencias. La Figura 36 muestra las recuperaciones obtenidas (%) al someter una mezcla de patrones de los ácidos orgánicos a diferentes procedimientos de lavado y/o secado. Los resultados de recuperación obtenidos cuando el cartucho ni se lava ni se seca no fueron mejorados al secar el cartucho con una corriente de nitrógeno (*Coppola et al., 1978*) o con aire (*Qiu, 1999; Cherchi et al., 1994*). Otro procedimiento utilizado fue lavar el cartucho de intercambio iónico con diferentes volúmenes de agua Milli-Q. Las mejores recuperaciones se obtienen con 10 mL de agua Milli-Q, ya que, como se pone de manifiesto en la Figura 36, volúmenes mayores de agua disminuyen los porcentajes de recuperación obtenidos.

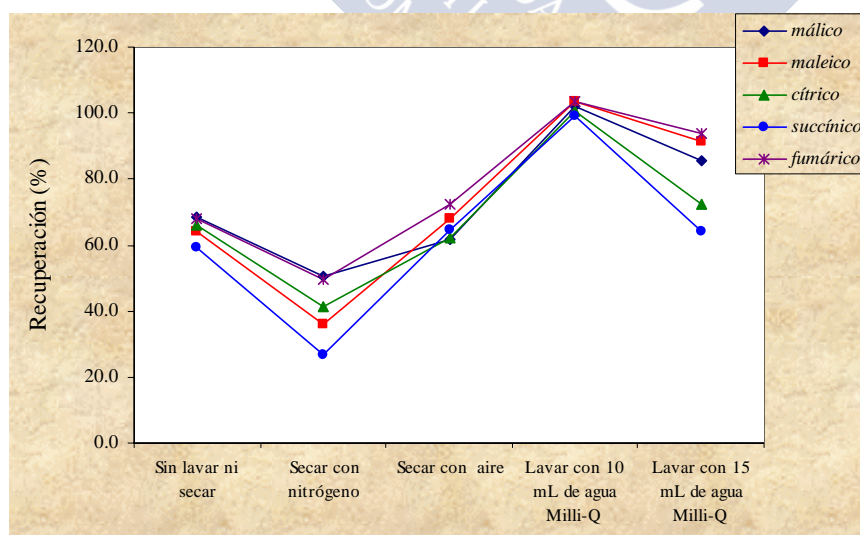


Figura 36. Recuperaciones obtenidas (%) al utilizar diferentes procedimientos de lavado y/o secado en el proceso de extracción en fase sólida.

* ETAPA DE ELUCIÓN

Se emplearon soluciones de ácido sulfúrico y meta-fosfórico para eluir los ácidos orgánicos retenidos en el cartucho. Los mejores resultados se obtuvieron con el ácido sulfúrico porque es un ácido más fuerte que el meta-fosfórico.

Una vez elegido el ácido sulfúrico como eluyente, se ensayaron diferentes volúmenes de este ácido con el fin de establecer las condiciones óptimas del proceso de elución. Como se muestra en la Figura 37, volúmenes inferiores a 4 mL parecen no ser suficientes para arrastrar completamente los ácidos orgánicos retenidos en el cartucho y así por ejemplo, la mayor recuperación obtenida con 2 mL de ácido sulfúrico es de un 44.9% para los ácidos maleico y succínico. Las mejores resultados se obtienen con un volumen de 4 mL, por lo que este volumen fue el elegido para llevar a cabo la etapa de elución.

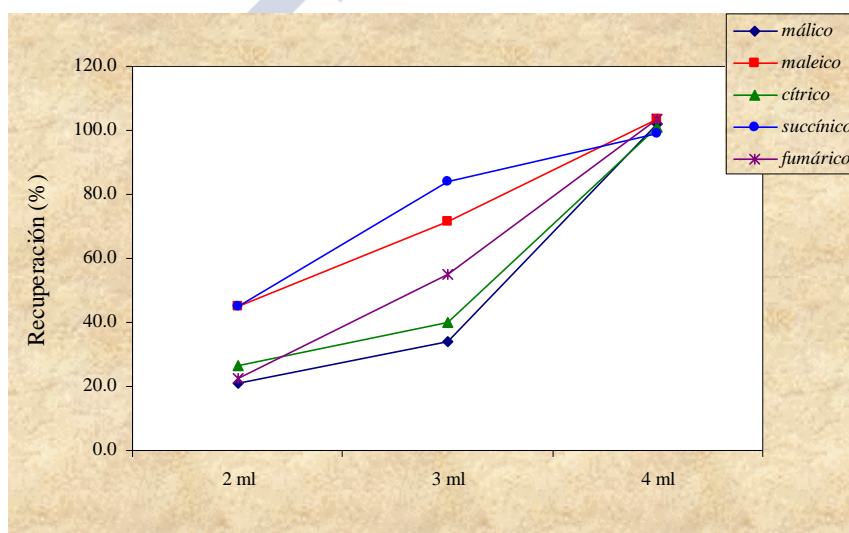


Figura 37. Recuperaciones obtenidas (%) al utilizar diferentes volúmenes de ácido sulfúrico en la etapa de elución del proceso de extracción en fase sólida.

* VELOCIDAD DE PERCOLACIÓN

En un principio los diferentes ensayos se llevaron a cabo sin ningún control de la velocidad de percolación pero los resultados obtenidos no fueron reproducibles. Se hizo necesario, por tanto, establecer las velocidades de paso en cada una de las etapas del proceso de extracción. Se observó que las velocidades de paso de la muestra y del ácido sulfúrico debían ser lentas porque cuando esta velocidad aumentaba las recuperaciones de los ácidos disminuían. Después de diferentes ensayos, se observó que las velocidades óptimas de percolación eran de 3.0 mL/min para las etapas de activación y lavado y de 0.5 mL/min para las etapas del paso de la muestra y elución de los ácidos.

5.4.2.2. MUESTRAS

5.4.2.2.1. MIELES DE GALICIA CON DENOMINACIÓN

En la Tabla XXXIII se encuentran recogidos los resultados de la determinación por el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de los ácidos málico, maleico, cítrico, succínico y fumárico, expresados en mg/kg, en las 50 mieles de Galicia con Denominación analizadas.

Las cantidades de los ácidos málico, maleico, succínico y fumárico fueron corregidas por los valores de recuperación obtenidos (Tabla XXXII) porque, para estos casos, el 100% de recuperación no se encuentra dentro del intervalo comprendido entre el valor medio de recuperación \pm intervalo de confianza.

El promedio obtenido para el ácido málico ha sido de 106 mg/kg, con valores mínimo y máximo de ND y 434 mg/kg, respectivamente. Para el ácido maleico se ha encontrado un valor medio de 0.48 mg/kg, con valores mínimo y máximo de ND y 4.67 mg/kg, respectivamente. Para el ácido cítrico los valores medio, mínimo y máximo han sido de 97, ND y 394 mg/kg, respectivamente. Para el ácido succínico, el promedio obtenido ha sido de 67 mg/kg, con valores mínimo y máximo de ND y 1012 mg/kg, respectivamente. Por último, para el ácido fumárico se ha obtenido un valor medio de 1.20 mg/kg, con valores mínimo y máximo de ND y 7.29 mg/kg, respectivamente.

Tabla XXXIII. Contenido de los ácidos orgánicos determinados por HPLC en las mieles de Galicia con Denominación ordenadas según su espectro polínico

Número de muestra	Provincia del envasador	Espectro polínico	Ácido málico (mg/kg)	Ácido maleico (mg/kg)	Ácido cítrico (mg/kg)	Ácido succínico (mg/kg)	Ácido fumárico (mg/kg)
1	Ourense	<i>Castanea sativa</i> Miller	345	0.21	334	71	7.29
2	Ourense	<i>Castanea sativa</i> Miller	434	0.15	394	1012	3.82
3	Ourense	<i>Castanea sativa</i> Miller	182	0.50	184	209	4.34
4	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	123	ND	38	37	0.64
5	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	83	0.26	44	41	0.44
6	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	108	0.18	40	36	0.44
7	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	102	0.30	39	49	0.70
8	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	33	0.52	39	44	0.40
9	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	88	0.37	59	78	0.26
10	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	66	0.37	50	ND	0.33
11	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	42	0.20	34	90	0.37
12	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	ND	0.12	ND	ND	0.06
13	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	105	ND	49	12	0.50
14	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	101	0.28	33	49	0.30
15	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	94	0.28	26	28	0.47
16	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	85	0.12	33	ND	0.25
17	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	103	0.29	36	100	0.37
18	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	109	0.32	39	101	0.36
19	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	35	ND	20	ND	0.04
20	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.	20	ND	36	20	0.35
21	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.	31	0.44	60	27	0.43
22	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.	21	0.29	25	17	0.66
23	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.	13	0.12	26	ND	0.35
24	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.	46	0.44	35	ND	0.55
25	Lugo	<i>Trifolium</i> L. sp.	ND	0.14	78	ND	0.07
26	A Coruña	multifloral	236	0.48	137	53	2.50
27	A Coruña	multifloral	217	0.21	120	64	1.78
28	A Coruña	multifloral	225	0.34	130	84	2.14
29	A Coruña	multifloral	123	0.56	65	60	0.58
30	A Coruña	multifloral	134	0.46	77	23	0.40
31	Lugo	multifloral	93	0.42	70	20	0.55
32	Lugo	multifloral	185	0.56	246	102	4.10
33	Lugo	multifloral	179	0.55	109	ND	0.83
34	Lugo	multifloral	81	0.36	74	31	0.23
35	Lugo	multifloral	22	0.52	47	33	0.17
36	Lugo	multifloral	27	ND	89	ND	0.19
37	Lugo	multifloral	17	4.11	46	34	1.39
38	Lugo	multifloral	39	0.59	76	ND	0.36
39	Lugo	multifloral	57	0.28	100	ND	0.64
40	Lugo	multifloral	71	0.41	123	27	1.24
41	Ourense	multifloral	38	0.27	71	45	0.14
42	Ourense	multifloral	364	0.51	348	106	7.26
43	Ourense	multifloral	192	0.42	320	40	3.71
44	Ourense	multifloral	180	0.48	146	358	2.31
45	Ourense	multifloral	218	0.17	322	52	3.77
46	Pontevedra	multifloral	25	0.50	45	ND	ND
47	Pontevedra	multifloral	30	0.75	77	57	0.20
48	Pontevedra	multifloral	95	ND	126	67	1.01
49	Pontevedra	multifloral	49	4.67	72	37	0.58
50	Pontevedra	multifloral	37	0.39	58	31	0.21
MEDIA			106	0.48	97	67	1.20
SD			95	0.83	95	149	1.70
RSD%			90	173	98	223	142
V _{min}			ND	ND	ND	ND	ND
V _{máx}			434	4.67	394	1012	7.29

En la Figura 38 se representan las distribuciones del contenido los ácidos málico, maleico, cítrico, succínico y fumárico de las mieles de Galicia con Denominación analizadas por el método de HPLC.

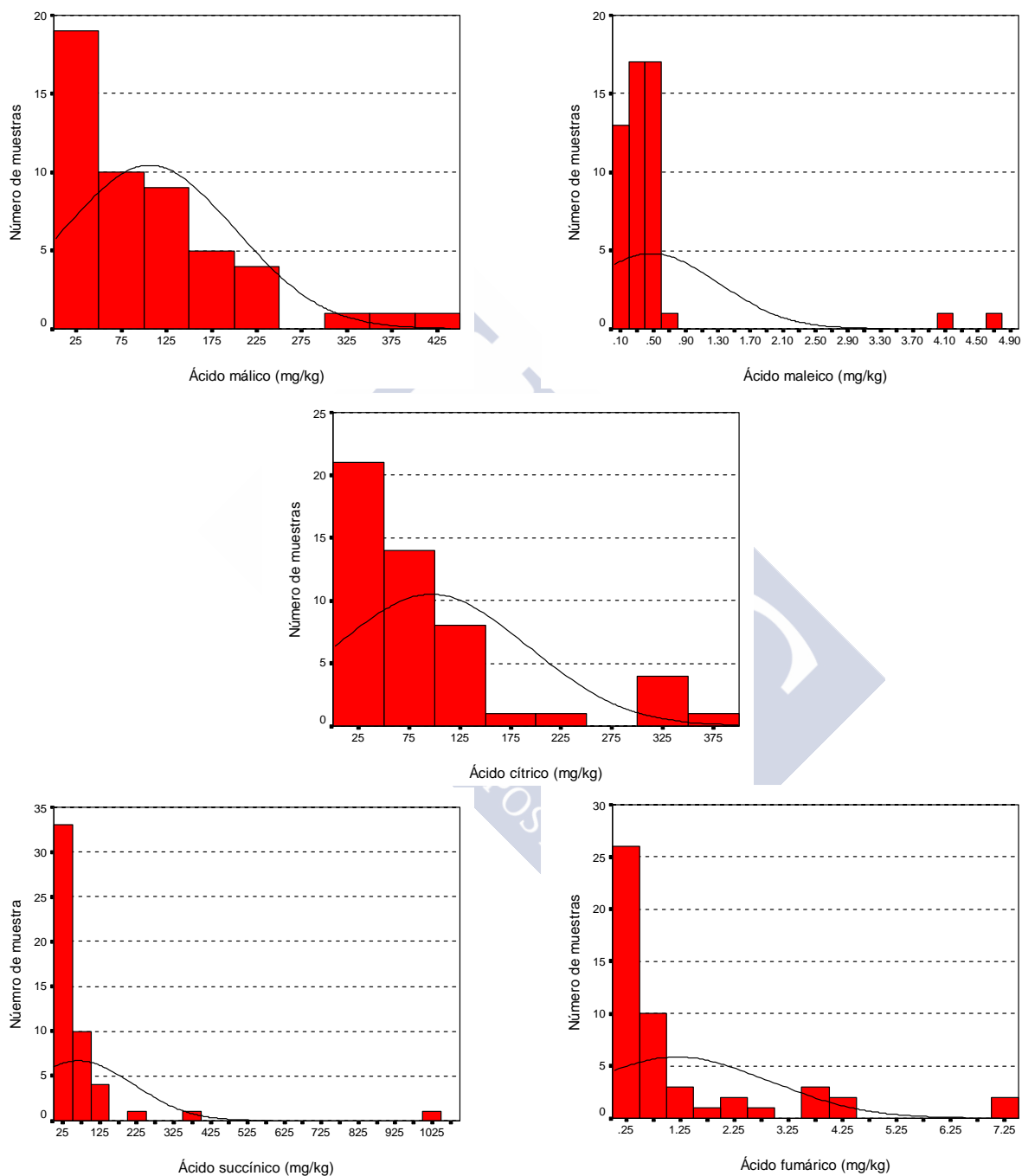


Figura 38. Distribuciones del contenido de los ácidos orgánicos determinados por HPLC en las mieles de Galicia con Denominación.

En todos los gráficos de esta figura se puede observar como la mayor parte de las muestras se encuentran bastante agrupadas y poseen un contenido bajo de ácidos orgánicos. Sin embargo existen mieles con unos valores muy extremos, lo que demuestra la gran variabilidad en la composición de ácidos orgánicos de las mieles estudiadas. Esta variabilidad es particularmente importante en el caso de los ácidos maleico y succínico.

5.4.2.2.1.1. INFLUENCIA DE LA PROVINCIA DE PROCEDENCIA DEL ENVASADOR EN EL CONTENIDO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS DETERMINADOS POR HPLC

En la Tabla XXXIV aparecen los estadísticos del contenido de los ácidos málico, maleico, cítrico, succínico y fumárico agrupados según la provincia de procedencia del envasador.

En esta tabla se observa una tendencia común en el contenido de todos los ácidos orgánicos analizados por HPLC, con excepción del ácido maleico. Así la provincia de Ourense presenta el mayor promedio de las cuatro provincias para estos ácidos mientras que el menor promedio lo presenta la provincia de Pontevedra. En el caso del contenido en ácido maleico, está situación es diferente ya que es la provincia de Pontevedra la que presenta el mayor valor medio mientras que el valor medio más bajo lo presenta la provincia de A Coruña.

Tabla XXXIV. Estadísticos del contenido de los ácidos orgánicos determinados por HPLC en las mieles de Galicia con Denominación agrupados según la provincia de procedencia del envasador

Provincia procedencia envasador	N	Ácido málico (mg/kg) [*]	Ácido maleico (mg/kg) [*]	Ácido cítrico (mg/kg) [*]	Ácido succínico (mg/kg) [*]	Ácido fumárico (mg/kg) [*]
A Coruña	15	112 ± 69 (ND-236)	0.29 ± 0.18 (ND-0.56)	61 ± 39 (ND-137)	45 ± 28 (ND-90)	0.77 ± 0.74 (0.06-2.50)
Lugo	17	76 ± 52 (ND-185)	0.54 ± 0.94 (ND-4.11)	73 ± 54 (20-246)	31 ± 37 (ND-102)	0.68 ± 0.96 (0.04-4.10)
Ourense	8	244 ± 128 (38-434)	0.34 ± 0.15 (0.15-0.51)	265 ± 115 (71-394)	237 ± 332 (40-1012)	4.08 ± 2.37 (0.14-7.29)
Pontevedra	10	37 ± 23 (13-95)	0.76 ± 1.39 (ND-4.67)	56 ± 31 (25-126)	26 ± 23 (ND-67)	0.43 ± 0.28 (ND-1.01)

^{*} MEDIA ± SD (V_{mín}-V_{máx})

En la Figura 39 se representan las distribuciones del contenido de los ácidos málico, maleico, cítrico, succínico y fumárico agrupados según la provincia de procedencia del envasador.

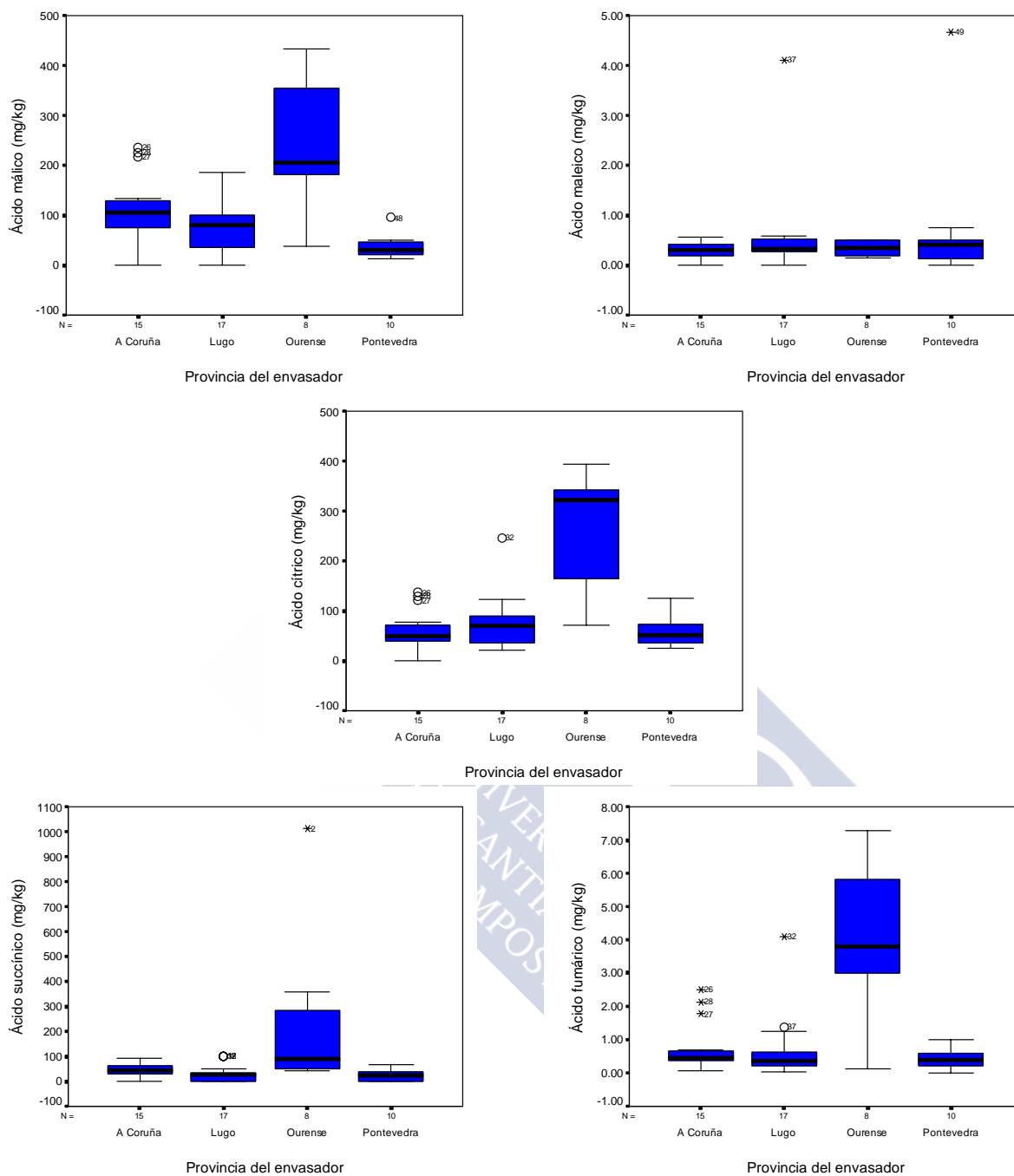


Figura 39. Distribuciones del contenido de los ácidos orgánicos determinados por HPLC en las mieles de Galicia con Denominación según la provincia de procedencia del envasador.

En todos los gráficos de esta figura, exceptuando el del ácido maleico, se observa la gran dispersión de los contenidos de estos ácidos en la provincia de Ourense.

Particularmente en cada gráfico de distribución se observa lo siguiente:

Ácido málico: los datos del contenido de las mieles de la provincia de Pontevedra se encuentran muy agrupados y todos ellos son inferiores a 100 mg/kg.

Ácido maleico: la distribución de los resultados es similar en las cuatro provincias encontrándose muy agrupados. En todas las provincias el contenido en ácido maleico es inferior a 1.00 mg/kg salvo en dos muestras multiflorales, una de la provincia de Lugo (Nº 37) y otra de Pontevedra (Nº 49), que presentan valores muy extremos.

Ácido cítrico: la mayor parte de las mieles de la provincia de A Coruña, con excepción de las muestras Nº 26, 27 y 28, poseen un contenido de ácido cítrico inferior a 100 mg/kg.

Ácido succínico: se observa como prácticamente todas las muestras de la provincia de A Coruña, Lugo y Pontevedra poseen un contenido inferior a 100 mg/kg. En estas tres provincias, al contrario de lo que sucede en la provincia de Ourense, los resultados se encuentran muy agrupados.

Ácido fumárico: la única provincia que presenta sus datos agrupados y no posee "outliers" es la provincia de Pontevedra. En todas las demás o bien los resultados se encuentran muy dispersos (provincia de Ourense) o bien hay valores extremos (provincias de Lugo y A Coruña).

Hay que destacar que existe cierta similitud entre los gráficos de distribución por provincias del contenido de los ácidos málico, cítrico y fumárico, lo que podría indicar la posible relación entre el contenido de estos ácidos que será comprobada estadísticamente más adelante en este trabajo.

5.4.2.2.1.2. INFLUENCIA DEL ESPECTRO POLÍNICO EN EL CONTENIDO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS DETERMINADOS POR HPLC

En la Tabla XXXV aparecen recogidos los estadísticos del contenido de los ácidos málico, maleico, cítrico, succínico y fumárico, agrupados según el espectro polínico.

En esta tabla se observa la gran variabilidad en el contenido de los ácidos orgánicos incluso entre las mieles del mismo origen botánico. Las mieles de *Castanea sativa* Miller son las que poseen los promedios más altos de contenido de los ácidos málico, cítrico, succínico y fumárico. Por el contrario las mieles de *Eucalyptus* sp. son las que presentan los promedios más bajos de contenido de los ácidos málico, cítrico y succínico. Los ácidos málico y succínico no fueron detectados en la única miel *Trifolium* L sp. analizada. Las mieles multiflorales se destacan del resto en su alto contenido medio en ácido maleico.

Tabla XXXV. Estadísticos del contenido de los ácidos orgánicos determinados por HPLC en las mieles de Galicia con Denominación agrupados según el espectro polínico

Espectro polínico	N	Ácido málico (mg/kg)*	Ácido maleico (mg/kg)*	Ácido cítrico (mg/kg)*	Ácido succínico (mg/kg)*	Ácido fumárico (mg/kg)*
<i>Castanea sativa</i> Miller	3	320 ± 128 (182-434)	0.29 ± 0.19 (0.15-0.50)	304 ± 108 (184-394)	431 ± 508 (71-1012)	5.15 ± 1.87 (3.82-7.29)
<i>Eucalyptus</i> sp.	21	67 ± 39 (ND-123)	0.23 ± 0.16 (ND-0.52)	36 ± 13 (ND-60)	35 ± 34 (ND-101)	0.39 ± 0.17 (0.04-0.70)
<i>Trifolium</i> L. sp.	1	ND	0.14	78	ND	0.07
multifloral	25	117 ± 91 (17-364)	0.72 ± 1.12 (ND-4.67)	124 ± 89 (45-348)	53 ± 70 (ND-358)	1.45 ± 1.72 (ND-7.26)

* MEDIA ± SD (V_{mín}-V_{máx})

En la Figura 40 se representan las distribuciones del contenido de los ácidos málico, maleico, cítrico, succínico y fumárico agrupados según su espectro polínico.

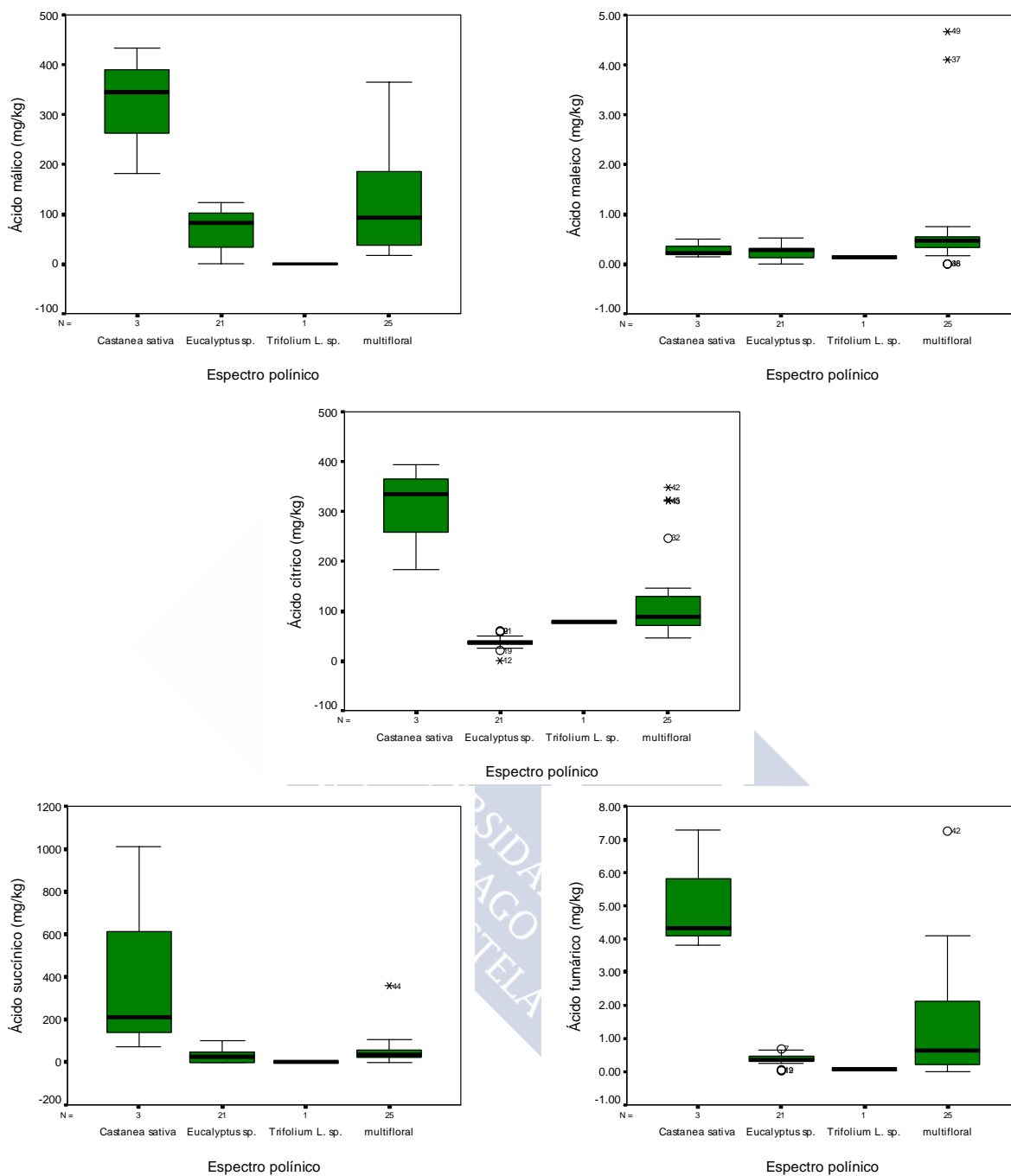


Figura 40. Distribuciones del contenido de los ácidos orgánicos determinados por HPLC en las mieles de Galicia con Denominación según el espectro polínico.

En todos los gráficos de esta figura, exceptuando el del ácido málico, se observa la escasa dispersión de los contenidos de estos ácidos en las mieles de *Eucalyptus* sp.

Particularmente en cada gráfico de distribución se observa lo siguiente:

Ácido málico: existe una gran dispersión de resultados en el contenido de las mieles multiflorales. Además todas las muestras de *Eucalyptus* sp. poseen un contenido en ácido málico menor de 125 mg/kg.

Ácido maleico: los datos del contenido en ácido maleico de todas las especies botánicas analizadas se encuentran muy agrupados. Todas las muestras, salvo dos multiflorales (Nº 37 y 49), presentan un contenido en este ácido menor de 1.00 mg/kg.

Ácido cítrico: todas las muestras analizadas de *Eucalyptus* sp. y de *Trifolium* sp. L. poseen un contenido en ácido cítrico inferior a 100 mg/kg. En el caso de las muestras multiflorales, la mayor parte tienen un contenido en ácido cítrico inferior a 150 mg/kg salvo cuatro muestras (Nº 32, 42, 43 y 45) que presentan unos valores similares a los de las muestras de *Castanea sativa* Miller. Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente (apartado 5.3.2.1.1.2.), esto no indica que esas muestras tengan siempre un elevado porcentaje de pólenes de *Castanea sativa* Miller.

Ácido succínico: las muestras de *Castanea sativa* Miller analizadas presentan una elevada dispersión en el contenido de ácido succínico. Por el contrario tanto las mieles de *Eucalyptus* sp. como las multiflorales presentan unos valores mucho más agrupados.

Ácido fumárico: el contenido de ácido fumárico en las muestras de *Castanea sativa* Miller analizadas se diferencia claramente del de las otras especies botánicas. Por otra parte, todas las muestras analizadas de *Eucalyptus* sp. y de *Trifolium* sp. L. poseen un contenido en ácido fumárico inferior a 1.00 mg/kg.

La Figura 41 consta de tres cromatogramas en los que se observan los perfiles de los ácidos orgánicos de una miel de *Castanea sativa* Miller (Nº 1), de una de *Eucalyptus* sp. (Nº 20) y de una multiflora (Nº 40), todas ellas mieles características procedentes de Galicia con Denominación.

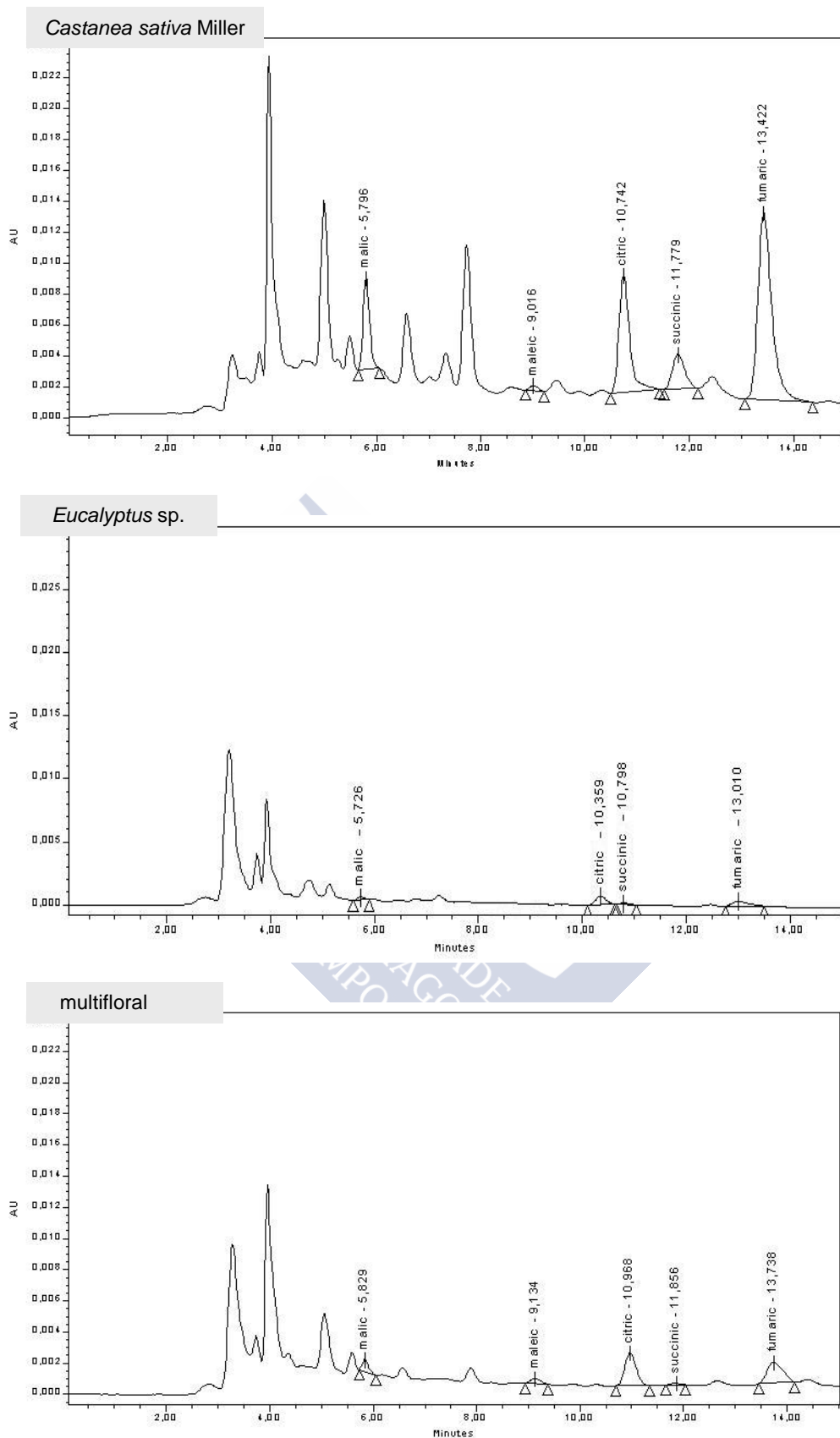


Figura 41. Cromatogramas de los ácidos orgánicos determinados por HPLC en las mieles de Galicia con Denominación de diferentes orígenes botánicos.

A continuación se van a comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los datos existentes en la bibliografía consultada, en la que los ácidos málico, cítrico, succínico y fumárico se han determinado en la miel utilizando métodos enzimáticos y cromatográficos (Tabla XX).

Hay que destacar, por una parte, que no se han encontrado referencias del ácido maleico ya que es la primera vez que se cuantifica.

La bibliografía consultada para los ácidos málico y cítrico es la misma que la utilizada cuando estos ácidos han sido determinados por el método enzimático. Por esta razón, todo lo comentado en el apartado 5.3.2.1.1.2. se puede aplicar íntegramente cuando los ácidos se determinan por el método de HPLC. La única diferencia es que, utilizando el método de HPLC propuesto, no se ha detectado ácido málico en la miel de *Trifolium L. sp.*

No se han encontrado datos, en la bibliografía consultada, del contenido de ácido succínico en las mieles de *Castanea sativa* Miller ni de *Eucalyptus sp.* En lo que se refiere a la miel de *Trifolium L. sp.*, en este trabajo no se ha detectado ácido succínico aunque *Horvath y Molnár-Perl (1998)* si lo han detectado, obteniendo un valor de 4 mg/kg en una muestra. El promedio del contenido de ácido succínico de las mieles multiflorales analizadas es muy inferior al obtenido por *Del Nozal et al. (1998)* con un valor de 1078 mg/kg pero superior al encontrado por *Cherchi et al. (1994)* y *Horvath y Molnár-Perl (1998)*, con valores de 33.4 y 23 mg/kg, respectivamente.

Por último, en cuanto al ácido fumárico, sólo se han encontrado datos en mieles multiflorales pero no en ninguna de las monoflorales analizadas en este trabajo (*Castanea sativa* Miller, *Eucalyptus sp.*, *Trifolium L. sp.*). El promedio del contenido de ácido fumárico obtenido en las mieles multiflorales es inferior a los encontrados por *Cherchi et al. (1994)* y *Del Nozal et al. (1998)*, con valores de 2.6 y 2 mg/kg, respectivamente.

5.4.2.2. MIELES PROCEDENTES DE OTRAS ZONAS DE ESPAÑA

En la Tabla XXXVI se encuentran recogidos los resultados de la determinación por el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de los ácidos málico, maleico, cítrico, succínico y fumárico, expresados en mg/kg, en las 25 mieles analizadas procedentes de otras zonas de España.

Al igual que para las mieles de Galicia con Denominación, las cantidades de los ácidos málico, maleico, succínico y fumárico fueron corregidas por los valores de recuperación obtenidos (Tabla XXXII) porque, para estos casos, el 100% de recuperación no se encuentra dentro del intervalo comprendido entre el valor medio de recuperación \pm intervalo de confianza.

Tabla XXXVI. Contenido de los ácidos orgánicos determinados por HPLC en las mieles procedentes de otras zonas de España ordenadas según su espectro polínico

Número de muestra	Comunidad Autónoma	Espectro polínico	Ácido málico (mg/kg)	Ácido maleico (mg/kg)	Ácido cítrico (mg/kg)	Ácido succínico (mg/kg)	Ácido fumárico (mg/kg)
1	Castilla y León	<i>Citrus sp.</i>	87	4.58	143	317	8.75
2	Comunidad Valenciana	<i>Citrus sp.</i>	72	ND	122	252	8.41
3	Castilla y León	<i>Diplotaxis sp.</i>	66	0.16	90	68	9.23
4	Castilla La Mancha	<i>Echium sp.</i>	25	0.37	175	71	8.62
5	Castilla y León	<i>Erica sp.</i>	789	1.13	426	137	19.32
6	Comunidad Valenciana	<i>Eucalyptus sp.</i>	368	0.14	237	148	12.57
7	Comunidad Valenciana	<i>Eucalyptus sp.</i>	142	0.24	68	53	9.82
8	Castilla La Mancha	<i>Lavandula sp.</i>	138	1.22	546	79	9.40
9	Castilla La Mancha	<i>Lavandula sp.</i>	65	0.60	88	69	8.81
10	Castilla y León	<i>Lavandula sp.</i>	610	0.46	537	118	14.96
11	Castilla La Mancha	<i>Rosmarinus sp.</i>	69	0.61	434	44	8.66
12	Castilla La Mancha	<i>Rosmarinus sp.</i>	220	0.46	92	169	9.61
13	Castilla La Mancha	<i>Rosmarinus sp.</i>	17	0.14	44	55	8.59
14	Castilla y León	<i>Rosmarinus sp.</i>	39	0.61	49	ND	8.90
15	Comunidad Valenciana	<i>Rosmarinus sp.</i>	82	0.64	51	106	9.08
16	Comunidad Valenciana	<i>Rosmarinus sp.</i>	60	ND	50	158	8.83
17	Castilla La Mancha	<i>Rosmarinus sp. y Trifolium L. sp.</i>	534	0.58	455	150	20.39
18	Castilla y León	multifloral	45	1.90	127	ND	8.87
19	Castilla y León	multifloral	269	0.67	300	ND	12.14
20	Comunidad Valenciana	multifloral	518	0.74	832	395	15.03
21	Comunidad Valenciana	multifloral	46	0.13	144	78	8.75
22	Extremadura	multifloral	210	0.13	115	95	9.08
23	Extremadura	multifloral	521	1.03	614	254	19.97
24	Castilla y León	multifloral y de mielada	568	0.91	545	198	24.11
25	Comunidad Valenciana	multifloral y de mielada	376	0.56	609	842	13.63
MEDIA			237	0.72	276	154	11.82
SD			229	0.92	233	174	4.58
RSD%			96	127	84	113	39
V _{min}			17	ND	44	ND	8.41
V _{máx}			789	4.58	832	842	24.11

El promedio obtenido para el ácido málico ha sido de 237 mg/kg, con valores mínimo y máximo de 17 y 789 mg/kg, respectivamente. Para el ácido maleico se ha encontrado un valor medio de 0.72 mg/kg, con valores mínimo y máximo de ND y 4.58 mg/kg, respectivamente. Para el ácido cítrico los valores medio, mínimo y máximo han sido de 276, 44 y 832 mg/kg, respectivamente. Para el ácido succínico, el promedio obtenido ha sido de 154 mg/kg, con valores mínimo y máximo de ND y 842 mg/kg, respectivamente. Por último, para el ácido fumárico se ha obtenido un valor medio de 11.82 mg/kg, con valores mínimo y máximo de 8.41 y 24.11 mg/kg, respectivamente.

Los valores medios del contenido de todos los ácidos analizados por HPLC (ácidos málico, maleico, cítrico, succínico y fumárico) de las mieles procedentes de otras zonas de España son *mayores* que los obtenidos en las mieles de Galicia con Denominación analizadas, con valores de 106, 0.48, 97, 67 y 1.20 mg/kg, respectivamente (Tabla XXXIII). Hay que destacar la gran diferencia que existe en el caso del ácido fumárico donde el valor máximo encontrado para las mieles de Galicia con Denominación (7.29 mg/kg) es menor que el valor mínimo obtenido para las mieles procedentes de otras zonas de España (8.41 mg/kg).

En la Figura 42 se representan las distribuciones del contenido de los ácidos málico, maleico, cítrico, succínico y fumárico de las mieles analizadas procedentes de otras zonas de España.

En esta figura se observa como el 48% de las muestras poseen un contenido de ácido málico menor de 100 mg/kg. El resto de las muestras se reparten entre 100 y 800 mg/kg. Al igual que sucedía con las mieles de Galicia con Denominación, en el gráfico de los ácidos maleico y succínico la mayor parte de las muestras se encuentran bastante agrupadas, excepto una miel cuyo contenido en estos ácidos presenta un valor muy extremo. En el gráfico del ácido cítrico se pone de manifiesto como el 56% de las muestras poseen un contenido en este ácido menor de 200 mg/kg. Por último, el 64% de las muestras presentan un contenido de ácido fumárico entre 7 y 11 mg/kg.

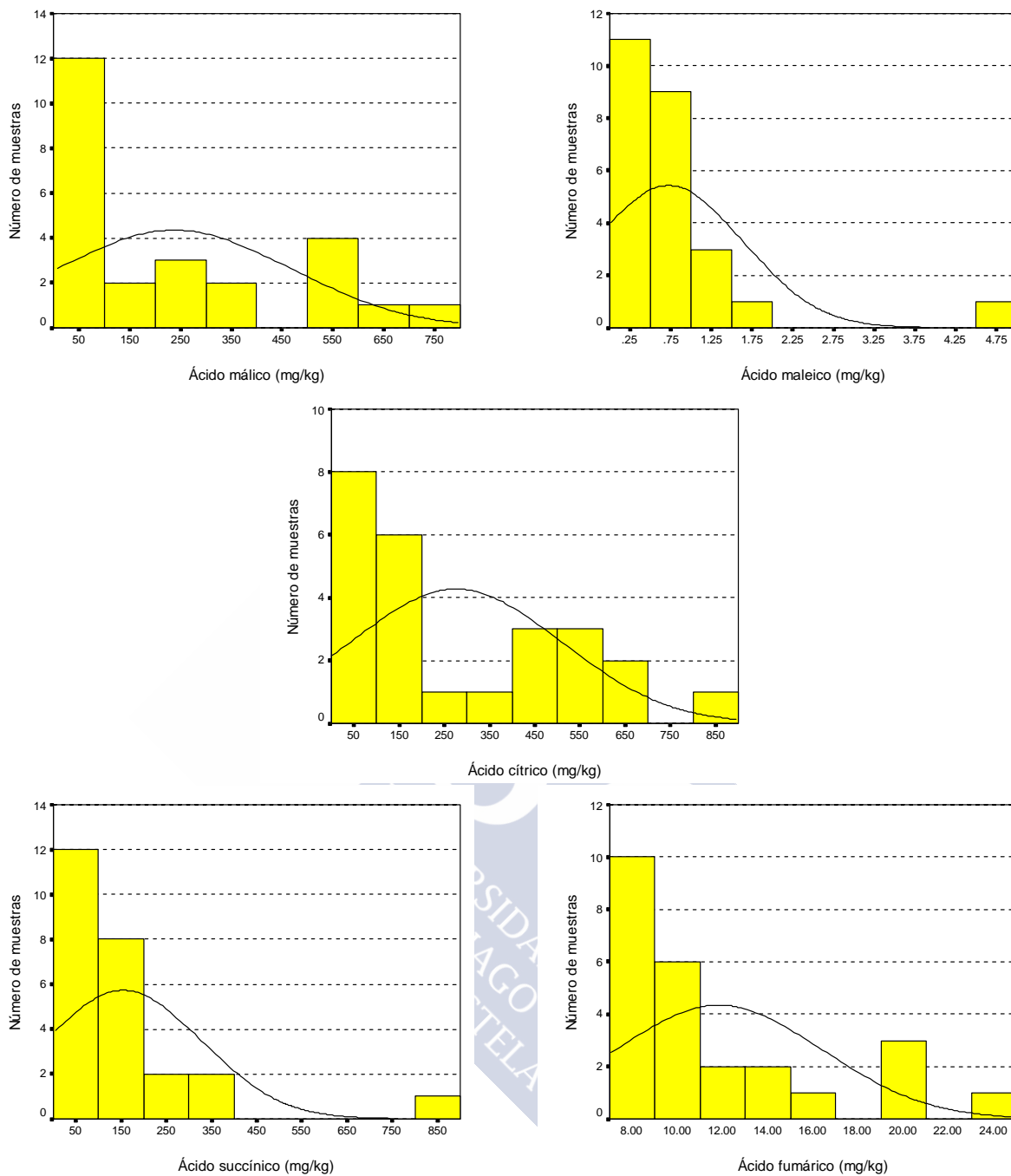


Figura 42. Distribuciones del contenido de los ácidos orgánicos determinados por HPLC en las mieles procedentes de otras zonas de España.

La Tabla XXXVII muestra los estadísticos del contenido de los ácidos málico, maleico, cítrico, succínico y fumárico agrupados según el espectro polínico.

Tabla XXXVII. Estadísticos del contenido de los ácidos orgánicos determinados por HPLC en las mieles procedentes de otras zonas de España agrupados según el espectro polínico

Espectro polínico	N	Ácido málico (mg/kg)*	Ácido maleico (mg/kg)*	Ácido cítrico (mg/kg)*	Ácido succínico (mg/kg)*	Ácido fumárico (mg/kg)*
<i>Citrus</i> sp.	2	80 ± 11 (72-87)	2.29 ± 3.24 (ND-4.58)	133 ± 15 (122-143)	285 ± 46 (252-317)	8.58 ± 0.24 (8.41-8.75)
<i>Diplotaxis</i> sp.	1	66	0.16	90	68	8.41
<i>Echium</i> sp.	1	25	0.37	175	71	9.23
<i>Erica</i> sp.	1	789	1.13	426	137	8.62
<i>Eucalyptus</i> sp.	2	255 ± 160 (142-368)	0.19 ± 0.07 (0.14-0.24)	153 ± 120 (68-237)	101 ± 67 (53-148)	11.20 ± 1.94 (9.82-12.57)
<i>Lavandula</i> sp.	3	271 ± 296 (65-610)	0.76 ± 0.40 (0.46-1.22)	390 ± 262 (88-546)	89 ± 26 (69-118)	11.06 ± 3.39 (8.81-14.96)
<i>Rosmarinus</i> sp.	6	81 ± 72 (17-220)	0.41 ± 0.27 (ND-0.64)	120 ± 155 (44-434)	89 ± 67 (ND-169)	8.95 ± 0.37 (8.59-9.61)
<i>Rosmarinus</i> sp. y <i>Trifolium</i> L. sp.	1	534	0.58	455	150	20.39
multifloral	6	268 ± 214 (45-521)	0.77 ± 0.66 (0.13-1.90)	355 ± 301 (115-832)	137 ± 157 (ND-395)	12.31 ± 4.50 (8.75-19.97)
multifloral y de mielada	2	472 ± 136 (376-568)	0.74 ± 0.25 (0.56-0.91)	577 ± 45 (545-609)	520 ± 455 (198-842)	18.87 ± 7.41 (13.63-24.11)

* MEDIA ± SD (V_{mín}-V_{máx})

En esta tabla, al igual que sucedía con las mieles de Galicia con Denominación (Tabla XXXV), se observa la gran variabilidad que existe en el contenido de ácidos orgánicos incluso dentro de cada una de las especies botánicas.

Por otra parte, una característica común a todos los ácidos orgánicos analizados es que la miel doblemente monofloral de *Rosmarinus* sp. y *Trifolium* L. sp. presenta un contenido de todos ellos mucho mayor que las muestras monoflorales de *Rosmarinus* sp. Este mismo comportamiento ya se ha comentado al estudiar los parámetros físico químicos (conductividad eléctrica, pH y tipos de acidez) y los ácidos orgánicos determinados por el método enzimático.

Si tenemos en cuenta cada ácido en particular, en la Tabla XXXVII se pone de manifiesto lo siguiente:

Ácido málico: todas las mieles de *Citrus* sp., *Diplotaxis* sp. y *Echium* sp. analizadas poseen un contenido inferior a 100 mg/kg. La miel de *Erica* sp. es la

muestra que presenta el mayor valor de contenido de ácido málico. El rango de valores encontrados en las mieles de *Lavandula* sp. es el más amplio, concretamente va desde 65 a 610 mg/kg.

Ácido maleico: la mayor variabilidad en el contenido se produce en las mieles de *Citrus* sp., ya que en una muestra este ácido no es detectable y la otra posee el valor máximo del contenido en ácido málico. Las muestras de *Diplotaxis* sp. y *Eucalyptus* sp. presentan valores inferiores a 0.25 mg/kg. Sin tener en cuenta las mieles de *Citrus* sp., las mieles con un mayor contenido en ácido maleico son las multiflorales y la de *Erica* sp.

Ácido cítrico: sólo la miel de *Diplotaxis* sp. posee un contenido inferior a 100 mg/kg. Por el contrario las muestras con un mayor contenido medio de ácido cítrico son las mieles de bosque (multifloral y de mielada). El rango de valores encontrados en las mieles multiflorales es el más amplio, concretamente va desde 115 a 832 mg/kg.

Ácido succínico: todas las mieles de las especies botánicas analizadas excepto las de *Citrus* sp., *Rosmarinus* sp., multiflorales y de bosque presentan un contenido igual o inferior a 150 mg/kg. El mayor valor medio de contenido en ácido succínico lo encontramos en las mieles de bosque (multifloral y de mielada).

Ácido fumárico: todas las mieles de *Citrus* sp., *Diplotaxis* sp., *Echium* sp., *Erica* sp. y *Rosmarinus* sp. poseen un contenido en ácido fumárico inferior a 10.00 mg/kg. Las muestras con un mayor contenido medio de este ácido son las de bosque (multifloral y de mielada) y la doblemente monofloral de *Rosmarinus* sp. y *Trifolium* L. sp.

La Figura 43 consta de tres cromatogramas en los que se observan los perfiles de los ácidos orgánicos de una miel de *Citrus* sp. (Nº 2), de una de *Lavandula* sp. (Nº 8) y de una de *Rosmarinus* sp. (Nº 11), todas ellas mieles características procedentes de otras zonas de España.

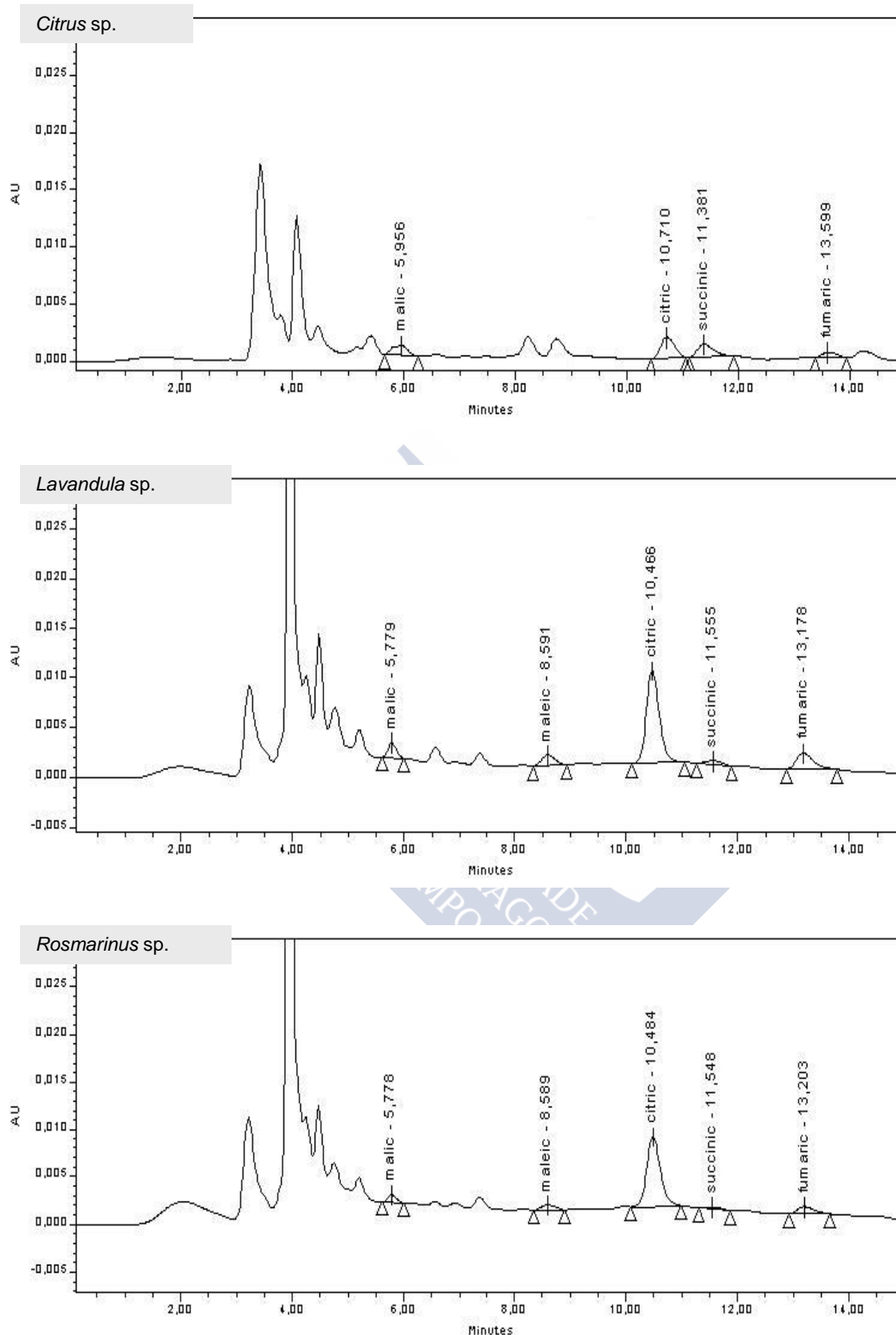


Figura 43. Cromatogramas de los ácidos orgánicos determinados por HPLC en las mieles procedentes de otras zonas de España de diferentes orígenes botánicos.

A continuación se van a comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los datos existentes en la bibliografía consultada, en la que los ácidos málico, cítrico, succínico y fumárico se han determinado en la miel utilizando métodos enzimáticos y cromatográficos (Tabla XX).

Hay que destacar que no se han encontrado datos, en la bibliografía manejada, del contenido de ninguno de estos ácidos orgánicos en las mieles monoflorales de *Diplotaxis* sp. y *Echium* sp., en la miel doblemente monofloral de *Rosmarinus* sp. y *Trifolium* L. sp. ni en la miel de bosque (multifloral y de mielada). Como ya se ha comentado en el caso de las mieles de Galicia con Denominación, tampoco se han encontrado referencias del ácido maleico ya que es la primera vez que se cuantifica.

La bibliografía consultada para los ácidos málico y cítrico es la misma que la utilizada cuando estos ácidos han sido determinados por el método enzimático. Por esta razón, todo lo comentado en el apartado 5.3.2.1.2. se puede aplicar íntegramente cuando los ácidos se determinan por el método de HPLC.

No se han encontrado datos, en la bibliografía consultada, del contenido de ácido succínico en las mieles de *Eucalyptus* sp. En lo que se refiere a la miel de *Citrus* sp., el valor obtenido en este trabajo es muy superior al detectado por Horvath y Molnár-Perl (1998) en una muestra (16 mg/kg). Del Nozal et al. (1998) encontraron en las mieles de *Erica* sp. un valor de 1146 mg/kg, casi 8 veces superior al determinado en este trabajo. En cuanto a las mieles de *Lavandula* sp., éstas poseen un valor medio que se encuentra entre el obtenido por Horvath y Molnár-Perl (1998) (48 mg/kg) y Del Nozal et al. (1998) (451 mg/kg). El valor medio encontrado en este trabajo para las mieles de *Rosmarinus* sp. es similar al valor medio obtenido por Del Nozal et al. (1998) (95 mg/kg). Por último, el promedio del contenido de ácido succínico de las mieles multiflorales analizadas es muy inferior al obtenido por Del Nozal et al. (1998) con un valor de 1078 mg/kg pero superior al encontrado por Cherchi et al. (1994) y Horvath y Molnár-Perl (1998), con valores de 33.4 y 23 mg/kg, respectivamente.

Por último, en cuanto al ácido fumárico, no se han encontrado datos en mieles de *Citrus* sp. ni de *Eucalyptus* sp. Del Nozal et al. (1998) analizó mieles de *Erica* sp., *Lavandula* sp. y *Rosmarinus* sp. obteniendo valores medios de 2, 3 y 2 mg/kg, respectivamente. Todos estos valores son muy inferiores a los encontrados en este trabajo. El promedio del contenido de ácido fumárico obtenido en las mieles multiflorales es muy superior a los encontrados por Cherchi et al. (1994) y Del Nozal et al. (1998), con valores de 2.6 y 2 mg/kg, respectivamente.

5.5. ELECTROFORESIS CAPILAR (CE)

La base de la separación de la electroforesis capilar (CE) es la misma que la de las otras técnicas de electroforesis, es decir, moléculas cargadas migran en presencia de un campo eléctrico al electrodo con carga opuesta (Zeece, 1992). Concretamente, en la electroforesis capilar los componentes de una muestra se separan por su diferente movilidad cuando se someten a una campo eléctrico en el interior de un capilar (Cruces, 1998).

Una de las principales ventajas de la electroforesis capilar frente a otras técnicas es que necesita una instrumentación sencilla. Básicamente consiste en una fuente de alimentación de alto voltaje, dos reservorios de electrolito, un capilar, un detector y un sistema de adquisición de datos. Este esquema puede ser completado con muchos más elementos como inyector automático de muestras, control de la temperatura del capilar y de la muestra, fuente de alimentación programable, diferentes detectores, colector de fracciones y un sistema de adquisición de datos computerizado (Li, 1992). Un diagrama esquemático de la instrumentación básica se muestra en la Figura 44.

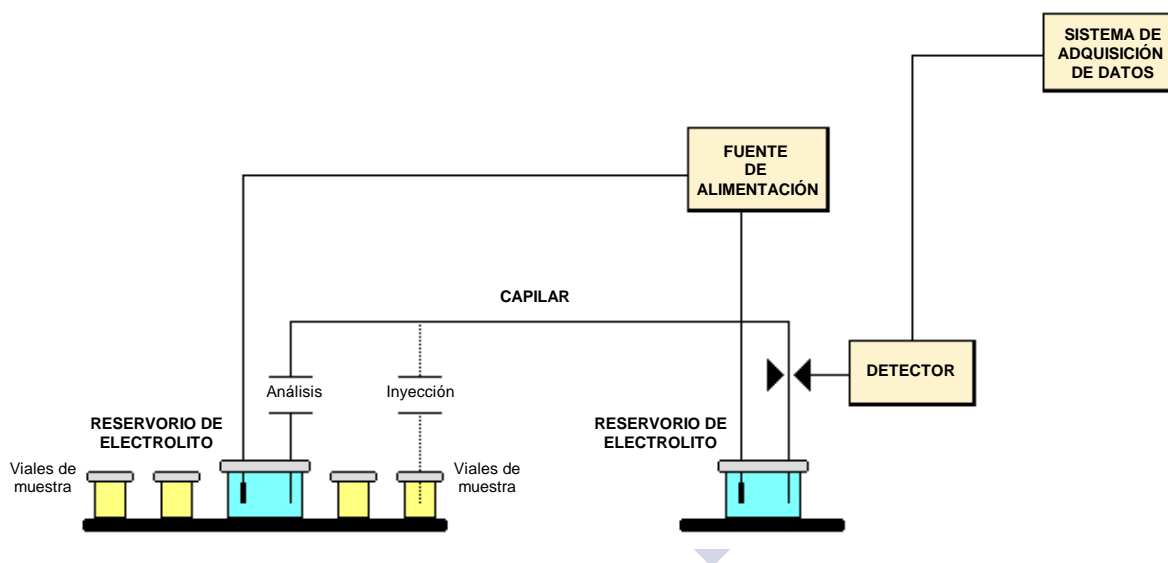


Figura 44. Representación esquemática de la instrumentación básica de electroforesis capilar (Basada en la de Thibault y Dovichi, 1998).

Se han desarrollado diferentes modos de separación de la electroforesis capilar para resolver los distintos problemas analíticos que se pueden presentar (Cruces, 1998). El origen de estos modos de separación se puede atribuir al hecho de que la electroforesis capilar se ha desarrollado como una combinación de técnicas electroforéticas y cromatográficas (Li, 1992). Estos modos de separación se pueden clasificar en (Heiger, 1992; Li, 1992; Cruces, 1998):

- *Electroforesis capilar en zona (CZE)*. La separación se basa en la diferente movilidad electroforética que presentan las sustancias iónicas (aniones y cationes) en el electrolito que se encuentra relleno el interior del capilar. Es el modo más empleado de electroforesis capilar debido a su simplicidad y versatilidad. Por ello, los estudios utilizando esta técnica representan más del 60% de las publicaciones de electroforesis capilar (*Camilleri, 1998*). Este modo de electroforesis capilar presenta la limitación de que no permite la separación de sustancias neutras.
- *Cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC o MECC)*. El mecanismo de separación se basa en el reparto de los solutos entre la fase micelar y la fase acuosa. Es un híbrido entre la cromatografía y la electroforesis. En esta técnica se van a añadir sustancias tensioactivas al electrolito que forman micelas a una determinada concentración. Es el único modo de electroforesis capilar que permite la separación tanto de especies cargadas como neutras.
- *Electroforesis capilar en gel (CGE)*. La separación tiene lugar al desplazarse los solutos a través de los poros de un polímero que rellena el capilar y que actúa como un tamiz molecular. Se utiliza fundamentalmente para la separación de macromoléculas como proteínas o ácidos nucleicos. En este tipo de electroforesis capilar tampoco es posible separar las sustancias neutras.
- *Electrocromatografía capilar (CEC)*. La separación se basa en procesos electroforéticos e interacciones con la fase estacionaria. El capilar está relleno con un material habitual en columnas cromatográficas como es la sílica gel. Actualmente, esta técnica se encuentra en fase de desarrollo.
- *Isoelectroenfoque capilar (CIEF)*. La separación se basa en la migración electroforética de sustancias anfóteras en un gradiente de pH creado por un anfíbolito. Estas sustancias se van a separar en función de sus diferentes puntos isoeléctricos y no por sus diferentes movilidades electroforéticas. Se utiliza fundamentalmente para la separación de péptidos y proteínas.
- *Isotacoforesis capilar (CITP)*. Se basa en que las bandas de muestra se desplazan a la misma velocidad en el interior del capilar entre dos soluciones tampón con diferente conductividad eléctrica, denominadas electrolito frontal y terminal. Es una forma de operar muy diferente a las anteriores porque utiliza un sistema de tampón discontinuo. Se separan sustancias iónicas aunque en un mismo análisis no es posible separar aniones y cationes.

Para la determinación de los ácidos orgánicos en la miel se ha empleado un método de electroforesis capilar en zona (CZE) con detección UV sin ningún tratamiento previo de purificación de la muestra. Este método propuesto permite la identificación y cuantificación de los **ácidos oxálico, fórmico, málico, succínico, pirúvico, acético, láctico, cítrico y glucónico** en la miel. Tanto la puesta a punto del método de determinación de los ácidos orgánicos como su aplicación a la miel han dado lugar, respectivamente, a la publicación de dos artículos que en estos momentos están en prensa (*Mato et al. 2003a y b*).

5.5.1. PARTE EXPERIMENTAL

5.5.1.1. FUNDAMENTO

Como se ha comentado anteriormente, el fundamento de la electroforesis capilar en zona consiste en la separación de las sustancias iónicas (aniones y cationes) por su diferente movilidad electroforética al aplicar un campo eléctrico en el interior de un capilar de sílice fundida relleno de electrolito (*Gordon et al., 1988; Brunet, 1992; Heiger, 1992; Li, 1992; Cruces, 1998; Kuhr, 1998*).

Esta diferente migración de las especies en el interior de un capilar se rige por dos fenómenos que tienen lugar simultáneamente:

1. ELECTROMIGRACIÓN

La velocidad a la que se mueve una sustancia a través de una disolución tampón bajo la influencia de un campo eléctrico y en ausencia del fenómeno de electroósmosis se denomina *velocidad electroforética* (v_e) y viene definida por la expresión (1). La *movilidad electroforética* (μ_e) de una sustancia iónica viene dada por la expresión (2) y se puede observar que depende de su relación carga/tamaño (q/r) de forma que, para unas mismas condiciones operacionales, cuanto mayor sea esta relación mayor será la movilidad electroforética de una sustancia (*Heiger, 1992; Li, 1992; Cruces, 1998; Kuhr, 1998*).

$$(1) \quad v_e = \mu_e E = \mu_e \frac{V}{L_T}$$

$$(2) \quad \mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

E = campo eléctrico aplicado.
 V = voltaje aplicado.
 L_T = longitud total del capilar.
 q = carga del ión.
 η = viscosidad del electrolito.
 r = radio del ión.

2. ELECTROÓSMOSIS

Este fenómeno se define como el movimiento relativo de un líquido con respecto a una superficie cargada bajo la acción de un campo eléctrico. En condiciones normales de trabajo este flujo denominado, *flujo electroosmótico* (EOF), se desplaza hacia el cátodo independientemente de la polaridad de la fuente de alimentación (Figura 45).

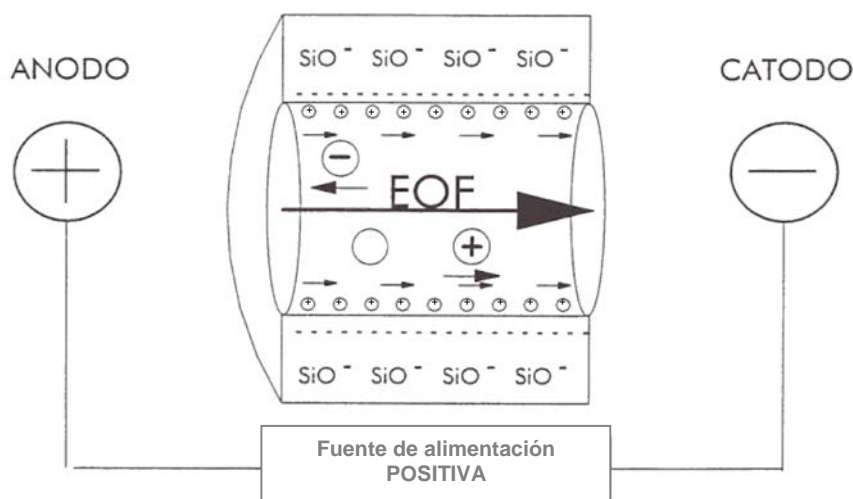


Figura 45. Movimiento del flujo electroosmótico (EOF) y movilidad de aniones y cationes en el interior de un capilar de sílice fundida con una fuente de alimentación positiva (Waters, 1995).

Los capilares de sílice fundida presentan en su superficie grupos silanoles (Si-OH) que se van a ionizar dependiendo del pH de la disolución del electrolito. Se ha comprobado que la ionización es prácticamente nula a pH 2.5, sin embargo a $\text{pH} > 3.0$ los grupos silanoles libres de la superficie de la sílice se ionizan (Si-O^-) dejando la pared del capilar cargada negativamente. Estas cargas negativas atraen a los cationes de la disolución tampón formándose una capa inerte de cargas positivas en la pared del capilar que se denomina *capa fija*. Como estos cationes no tienen la suficiente densidad para compensar todas las cargas negativas de la pared, se coloca otra capa de cationes que se encuentra más débilmente unida y que constituye la llamada *capa móvil*. Ambas capas forman la *doble capa difusa* de cationes entre las que se crea una diferencia de potencial denominada potencial zeta (ζ). Cuando se aplica un campo eléctrico, la capa móvil de cationes migra hacia el cátodo y arrastra todo el fluido del interior del capilar dando lugar al flujo electroosmótico (Heiger, 1992; Waters, 1995; Kitagishi, 1997; Cruces, 1998; Kuhr, 1998).

En la mayoría de las aplicaciones se trabaja con una fuente de alimentación positiva de modo que el cátodo esté en el extremo de detección. En este caso los cationes migran

hacia el cátodo por movilidad propia mientras que las sustancias neutras y los aniones lentos son arrastrados por el flujo electroosmótico. Sin embargo los aniones con una movilidad superior a la del flujo electroosmótico migrarán hacia el ánodo y no serán detectados (Figura 45).

Por tanto para llevar a cabo el análisis de aniones es necesario, por una parte, utilizar una fuente de alimentación negativa (ánodo en el extremo de detección) y, por otra, invertir la dirección del flujo electroosmótico de forma que se desplace hacia el ánodo. Esta inversión del flujo electroosmótico se produce añadiendo al electrolito un tensioactivo catiónico en una determinada concentración para formar hemimicelas. Éstas se sitúan alrededor de la pared del capilar cargada negativamente y, como su movilidad es extremadamente baja, se puede considerar el conjunto pared/hemimicela prácticamente estático. Al añadir el tensioactivo catiónico, la carga neta del conjunto es positiva compensándose con los aniones del electrolito. Al aplicar un campo eléctrico las cargas negativas que, en este caso, forman la capa móvil van a migrar hacia el ánodo, produciéndose una inversión del flujo electroosmótico (Figura 46).

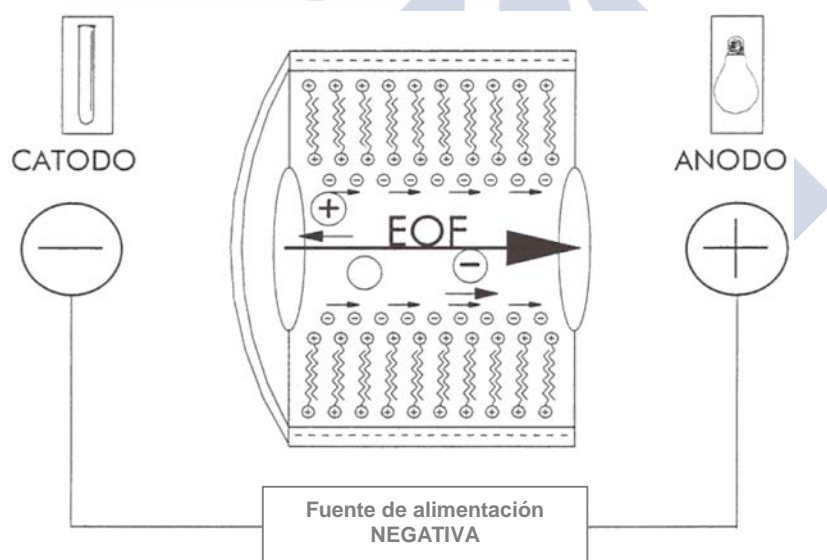


Figura 46. Inversión del flujo electroosmótico (EOF) y movilidad de aniones y cationes en el interior de un capilar de sílice fundida con una fuente de alimentación negativa (*Waters, 1995*).

Al igual que se definía la velocidad electroforética también se puede definir una *velocidad de flujo electroosmótico* (v_{EOF}) que se calcula por la expresión (3). Esta velocidad es proporcional a la movilidad debida al flujo electroosmótico (μ_{EOF}) que viene dada por la expresión (4).

$$(3) \quad v_{\text{EOF}} = \mu_{\text{EOF}} E = \mu_{\text{EOF}} \frac{V}{L_T}$$

$$(4) \quad \mu_{\text{EOF}} = \frac{\zeta \varepsilon}{4\pi\eta}$$

E = campo eléctrico aplicado.

V = voltaje aplicado.

L_T = longitud total del capilar.

ζ = potencial zeta.

ε = constante dieléctrica del electrolito.

η = viscosidad del electrolito.

Los fenómenos de electromigración y electroósmosis se dan simultáneamente en el interior del capilar. La velocidad de una especie en una muestra va a depender de ambos fenómenos por lo que la *velocidad electroforética efectiva o real* (v_r) de un componente vendrá dada por la expresión (5).

$$(5) \quad v_r = v_e + v_{\text{EOF}} = (\mu_e + \mu_{\text{EOF}}) \frac{V}{L_T}$$

El *tiempo de migración efectivo o real* (t_m) es el tiempo que tarda el soluto en moverse desde el principio del capilar hasta la ventana del detector y vendrá dado por la ecuación (6).

$$(6) \quad t_m = \frac{L_T}{v_r} = \frac{L_T^2}{(\mu_e + \mu_{\text{EOF}}) V}$$

5.5.1.2. MATERIAL Y APARATOS

- ✓ Capillary Ion Analyzer (CIA System) Waters versión 1.3 equipado con una fuente de alimentación negativa y un detector UV-visible de longitud de onda fija con lámpara de mercurio y filtro de 185 nm.
- ✓ Módulo Waters bus SAT/IN.
- ✓ Sistema de adquisición y tratamiento de datos Millennium 2010 v. 2.15 con opción CIA específica para electroforesis capilar.
- ✓ Capilar de sílice fundida Accusep Capillaries Waters de 60 cm x 75 μm I.D., con la ventana de detección a 7.5 cm del final del capilar.
- ✓ Viales de electrolito de polietileno en el carrusel de inyección y de cristal en el de detección. La capacidad de ambos tipos de viales es de 20 mL.
- ✓ Viales de muestra Eppendorf de 600 μL .

- ✓ pHmetro Sentron 1001.
- ✓ Agitador magnético Metrohm 649.
- ✓ Filtro de membrana de PTFE de 0.5 µm MFS.
- ✓ Filtros de membrana de 0.45 µm Phenomenex AFO-0504.
- ✓ Cronómetro digital Van Allen.
- ✓ Material de uso común en el laboratorio.

5.5.1.3. REACTIVOS

- ↪ Sales sódicas de los ácidos orgánicos Sigma: Ácido oxálico (Art. S-9265), ácido fórmico (Art. S-2140), ácido málico (Art. M-1125), ácido succínico (Art. S-2378), ácido pirúvico (Art. P-2256), ácido láctico (Art. L-7022), ácido cítrico (Art. S-4641) y ácido glucónico (Art. G-9005).
- ↪ Sal potásica del ácido acético Sigma Art. P-3542.
- ↪ Ácido glutárico Merck Art. 800295.
- ↪ Dihidrógeno fosfato de sodio monohidrato p.a. ACS Merck Art. 106346.
- ↪ Hidrógeno fosfato de disodio anhidro p.a. Merck Art. 106559.
- ↪ Cloruro de calcio dihidrato p.a. ACS Merck Art. 102382.
- ↪ Hidróxido de sodio en lentejas p.a. ISO Merck Art. 106498.
- ↪ Ácido clorhídrico fumante 37% p.a. ISO Merck Art. 100317.
- ↪ OFM-OH (Hidróxido de tetradeciltrimetilamonio, TTAOH) 100 mM CIA Pak Waters Art. JWE036992.
- ↪ Agua Milli-Q Millipore.

5.5.1.4. PROCEDIMIENTO

5.5.1.4.1. PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES DE LOS PATRONES

Las disoluciones madre de los patrones de los ácidos oxálico, fórmico, málico, succínico, glutárico, pirúvico, acético, láctico, cítrico y glucónico de concentración 10 g/L se preparan en agua Milli-Q y se almacenan a 4 °C permaneciendo estables durante un mes. Las disoluciones de trabajo de los patrones se preparan diariamente mediante dilución de las disoluciones madre en agua Milli-Q.

5.5.1.4.2. PREPARACIÓN DE LA DISOLUCIÓN DE MIEL

Se pesan exactamente 2.5 g de miel en un vaso de precipitados de 250 mL y se disuelven en 75 mL de agua Milli-Q. La disolución se lleva a pH 10.50 aproximadamente con NaOH 0.1 M manteniéndose en agitación durante 10 minutos a la temperatura del laboratorio. Posteriormente, la disolución se ajusta a pH 8.00 con HCl 0.1 M, se enrasa en un matraz aforado a 100 mL con agua Milli-Q y se agita. Con este procedimiento se suaviza el ruido de fondo y se mejora tanto la respuesta de los ácidos como la reproducibilidad de los tiempos de migración. La disolución se pasa a través de un filtro de membrana de 0.5 μm antes de su inyección en el equipo de electroforesis capilar.

Se ha comprobado que en algunas ocasiones y debido a la gran variabilidad en el contenido de ácidos orgánicos, la cantidad de 2.5 g/100 mL era excesiva ya que los picos salían muy deformados. Para estas muestras con un alto contenido en ácidos orgánicos, la cantidad adecuada de muestra es de 1 g/100 mL, por lo que sería necesario realizar una dilución 1:2.5 de la disolución inicialmente preparada.

En general, las mieles más oscuras son las que presentan un mayor contenido en ácidos orgánicos por lo que parece existir una cierta relación entre el contenido de ácidos orgánicos y el color de la miel. De una forma aproximada se podría determinar la cantidad de muestra necesaria utilizando para ello la escala de color del método oficial de la AOAC (1999) de manera que, en las mieles que presentan un color clasificado como *light amber* o *amber*, sería necesario hacer esta dilución o pesar directamente 1 g/100 mL.

5.5.1.4.3. CONDICIONES ELECTROFORÉTICAS

5.5.1.4.3.1. PREPARACIÓN DEL ELECTROLITO

En un vaso de precipitados de 250 mL se pipetea las cantidades que se indican de los reactivos siguientes:

- 7.5 mL de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (100 mM)
- 2.5 mL de Na_2HPO_4 (100mM)
- 2.5 mL de OFM-OH (100 mM)
- 2.4 mL de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10mM)

Se añaden aproximadamente 75 mL de agua Milli-Q. Esta disolución, cuyo pH se encuentra entre 6.60 y 6.70, se lleva a pH 6.40 con HCl 1 M (aproximadamente 100 μL). Se enrasa en un matraz aforado a 100 mL y se filtra a vacío utilizando un filtro de membrana de 0.45 μm , dejando desgasificar la disolución durante unos minutos.

5.5.1.4.3.2. ACONDICIONAMIENTO DEL CAPILAR

Cuando se utiliza por primera vez un capilar, se realiza el siguiente acondicionamiento del mismo:

1. Purga con agua durante 10 minutos.
2. Purga con NaOH 1 M durante 10 minutos.
3. Purga con NaOH 10 mM durante 10 minutos.
4. Purga con agua durante 30 minutos.
5. Purga con electrolito durante 90 minutos.

Asimismo, diariamente es necesario llevar a cabo un acondicionamiento del interior del capilar para obtener unos resultados reproducibles ya que el fosfato es un electrolito que se adsorbe sobre la superficie del capilar y necesita mayor tiempo de equilibrado (*Heiger, 1992*). Este acondicionamiento consiste en realizar los pasos 3, 4 y 5 del procedimiento anterior.

Entre inyecciones se va a purgar con electrolito durante 2 minutos para facilitar la eliminación de los restos de la inyección anterior. En esta rutina de lavado es muy importante no utilizar NaOH porque se elimina el recubrimiento de tensioactivo y se desestabiliza el interior del capilar obteniéndose tiempos de migración muy diferentes.

Una vez finalizadas las inyecciones es necesario limpiar el interior del capilar para eliminar el electrolito así como para evitar, fundamentalmente cuando se trabaje con muestras, la adsorción de ciertas sustancias orgánicas en las paredes del capilar. En este caso se realiza el siguiente procedimiento de lavado:

1. Purga con NaOH 10 mM durante 10 minutos.
2. Purga con agua durante 30 minutos.

Cuando no se utilice el capilar durante algún tiempo es conveniente limpiarlo con agua/metanol y secarlo realizando una purga con el extremo de inyección del capilar libre.

5.5.1.4.3.3. CONDICIONES DE SEPARACIÓN

El sistema de inyección utilizado es el modo hidrostático durante 30 segundos y a una altura de 10 cm por encima del carrusel del detector donde se encuentra el otro extremo del capilar sumergido en el electrolito. En estas condiciones la cantidad de muestra inyectada es de aproximadamente 37.2 nL. Todos los patrones y muestras se inyectaron por triplicado.

La separación electroforética tiene lugar a una temperatura controlada de 25 °C, con un voltaje aplicado de -25 kV (polaridad de la fuente de alimentación negativa) y una corriente de 25 μ A. Otro de los parámetros programados ha sido la isomigración durante 120 segundos para estabilizar los tiempos de migración de muestras con diferentes conductividades.

Para la detección de los ácidos orgánicos se utiliza un detector UV-visible de longitud de onda fija a 185 nm. Al utilizar fosfato como electrolito el modo de detección es directo. La velocidad de adquisición de datos es de 20 puntos/segundo.

El análisis electroforético se desarrolla en un tiempo total inferior a 4.5 minutos saliendo todos los ácidos orgánicos en un intervalo de menos de 2.0 minutos.

5.5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.5.2.1. PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO

5.5.2.1.1. RESULTADOS

Este método permite la identificación y cuantificación de los ácidos oxálico, fórmico, málico, succínico, pirúvico, acético, láctico, cítrico y glucónico en la miel. Uno de los mayores problemas de reproducibilidad que presenta la electroforesis capilar es la fluctuación en los tiempos de migración absolutos (Yang *et al.*, 1996). Por ello, para la identificación de los ácidos orgánicos algunos autores (Kenney, 1991; Heiger, 1992; Jones, 1993; Wu *et al.*, 1995) utilizan los tiempos de migración relativos con respecto a un compuesto de referencia. En el caso del desarrollo del método en la miel se eligió el ácido glutárico ya que no está presente de forma natural en la miel y ha sido empleado como patrón interno en HPLC (Del Nozal *et al.*, 1998).

En la Tabla XXXVIII se encuentran recogidos los tiempos de migración absolutos y relativos de los ácidos orgánicos en una mezcla de patrones.

En esta tabla se puede comprobar como los coeficientes de variación (RSD%) descienden para todos los ácidos al utilizar los tiempos de migración relativos.

Tabla XXXVIII. Tiempos de migración absolutos y relativos de los ácidos orgánicos determinados por el método propuesto de electroforesis capilar (CE) en una mezcla de patrones

ÁCIDO ORGÁNICO	TIEMPOS DE MIGRACIÓN ABSOLUTOS (min) ± SD	RSD (%)	TIEMPOS DE MIGRACIÓN RELATIVOS ± SD	RSD (%)
Oxálico	2.05 ± 0.023	1.12	0.863 ± 0.00084	0.10
Fórmico	2.19 ± 0.026	1.19	0.922 ± 0.00024	0.03
Málico	2.28 ± 0.027	1.18	0.957 ± 0.00028	0.03
Succínico	2.30 ± 0.027	1.17	0.968 ± 0.00050	0.05
Glutárico	2.38 ± 0.029	1.22	1.000 ± 0.00000	0.00
Pirúvico	2.58 ± 0.034	1.32	1.086 ± 0.00148	0.14
Acético	2.62 ± 0.035	1.34	1.104 ± 0.00147	0.13
Láctico	2.79 ± 0.039	1.40	1.172 ± 0.00252	0.22
Cítrico	2.87 ± 0.041	1.43	1.207 ± 0.00274	0.23
Glucónico	3.24 ± 0.050	1.54	1.362 ± 0.00469	0.34

En la Tabla XXXIX aparecen recogidos los tiempos de migración absolutos y relativos de los ácidos orgánicos en las mieles analizadas. Comparando ambas tablas, se puede observar como los tiempos de migración absolutos de los ácidos orgánicos objeto de estudio son muy diferentes en las muestras y en los patrones. Sin embargo, si se trabaja con tiempos de migración relativos, las variaciones debidas a la diferente conductividad de las muestras, a la concentración de los analitos o a pequeños cambios en el flujo electroosmótico (fluctuaciones en el voltaje, temperatura, composición o pH del electrolito) se minimizan como se verá más adelante en la discusión del método.

Tabla XXXIX. Tiempos de migración absolutos y relativos de los ácidos orgánicos determinados por el método propuesto de electroforesis capilar (CE) en la miel

ÁCIDO ORGÁNICO	TIEMPOS DE MIGRACIÓN ABSOLUTOS (min) ± SD	RSD (%)	TIEMPOS DE MIGRACIÓN RELATIVOS ± SD	RSD (%)
Oxálico	2.31 ± 0.041	1.77	0.846 ± 0.0039	0.46
Fórmico	2.49 ± 0.048	1.93	0.913 ± 0.0020	0.22
Málico	2.59 ± 0.051	1.97	0.949 ± 0.0015	0.16
Succínico	2.62 ± 0.049	1.87	0.961 ± 0.0018	0.19
Glutárico	2.72 ± 0.056	2.06	1.000 ± 0.0000	0.00
Pirúvico	3.01 ± 0.072	2.39	1.100 ± 0.0044	0.40
Acético	3.04 ± 0.073	2.40	1.115 ± 0.0046	0.41
Láctico	3.26 ± 0.085	2.61	1.198 ± 0.0071	0.59
Cítrico	3.39 ± 0.088	2.60	1.244 ± 0.0082	0.66
Glucónico	3.88 ± 0.121	3.12	1.423 ± 0.0161	1.13

5.5.2.1.1.1. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de un método de electroforesis capilar se definen de la misma forma que en el caso de un método de cromatografía líquida de alta resolución (apartado 5.4.2.1.1.1.). El límite de detección se calcula como $s_b + 3s$ y el de cuantificación como $s_b + 10s$, donde s_b es la señal media de diez inyecciones de un blanco (ruido) y s la desviación estándar. La señal de cada una de las inyecciones del blanco es el área en valor absoluto comprendida entre el tiempo de migración absoluto $\pm 2\%$. Una vez obtenida la señal para cada ácido orgánico, ésta se transforma en concentración mediante la recta de calibrado correspondiente (*ACS Committee on Environmental Improvement, 1980*).

En la Tabla XL se muestran los límites de detección y cuantificación de los ácidos orgánicos analizados en la miel. Los límites de detección obtenidos se encuentran entre 0.4 y 38 mg/kg para los ácidos oxálico y glucónico, respectivamente. Mientras que en lo que se refiere a los límites de cuantificación, éstos oscilan entre 12 y 78 mg/kg para los ácidos oxálico y glucónico, respectivamente.

Tabla XL. Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) en mg/kg del método propuesto de electroforesis capilar (CE) para la determinación de los ácidos orgánicos en la miel

ÁCIDO ORGÁNICO	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
Oxálico	0.4	12
Fórmico	2.1	23
Málico	2.0	21
Succínico	2.0	12
Pirúvico	7.0	39
Acético	11	34
Láctico	4.2	26
Cítrico	9.2	28
Glucónico	38	78

Se puede aumentar la sensibilidad del método realizando electrónicamente un suavizado del ruido de la línea base (*smoothing*) con un software de integración adecuado (*Altria, 1999*). En este caso se ha llevado a cabo este filtrado del ruido de la línea base (*smoothing 25*) con una opción del software de tratamiento de datos Millennium 2010.

5.5.2.1.1.2. RECTAS DE CALIBRADO

La cuantificación de los ácidos orgánicos se ha realizado mediante un método de calibración externa. Estas rectas de calibración se han construido con 7 concentraciones crecientes de una mezcla de patrones. Cada punto se ha inyectado por triplicado. La recta de calibrado para cada ácido se ha obtenido representando las áreas de los picos frente a las concentraciones y aplicando el método de mínimos cuadrados. Las rectas de calibrado se expresan como líneas de regresión del tipo ($y = ax + b$), donde y representa el área del pico mientras que x representa la concentración del ácido orgánico en la miel (mg/kg). En la Tabla XLI se reflejan los parámetros a y b y los coeficientes de correlación (r) de las rectas obtenidas. Como se puede observar en dicha tabla los coeficientes de correlación lineal para las rectas de calibrado de todos los ácidos orgánicos son ≥ 0.9996 .

Cada una de las rectas de calibrado es lineal en un amplio intervalo desde el límite de cuantificación hasta 2400 mg/kg en el caso de los ácidos oxálico y fórmico, 1600 mg/kg para los ácidos málico y succínico, 800 mg/kg para el ácido pirúvico, 4000 mg/kg para los ácidos acético, láctico y cítrico y 7200 mg/kg cuando se trata del ácido glucónico. Como ya se ha comentado en el apartado 5.5.1.4.2., si las muestras poseen un elevado contenido en ácidos orgánicos se les aplica una dilución, por lo que las cantidades máximas anteriores se multiplicarán por el factor de dilución de 2.5.

Tabla XLI. Parámetros y coeficientes de correlación (r) de las rectas de calibrado del método propuesto de electroforesis capilar (CE) para la determinación de los ácidos orgánicos en la miel

ÁCIDO ORGÁNICO	a	b	r
Oxálico	26.7	502	0.9999
Fórmico	10.7	212	0.9996
Málico	10.8	201	0.9997
Succínico	13.4	294	0.9998
Pirúvico	9.8	335	0.9996
Acético	17.9	233	0.9999
Láctico	9.6	204	0.9999
Cítrico	12.8	-533	0.9996
Glucónico	5.3	56	0.9999

Para evitar posibles variaciones en la cuantificación de los ácidos orgánicos en las muestras a lo largo del tiempo se han realizado diariamente las rectas de calibrado, aumentando, de esta forma, la precisión del método.

5.5.2.1.1.3. PRECISIÓN

Al igual que en el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se han llevado a cabo estudios de *repetibilidad* y *reproducibilidad* para evaluar la precisión del método propuesto de electroforesis capilar (CE). Ambos estudios se han realizado en tres mieles de Galicia con Denominación que contienen concentraciones baja (muestra N° 4), media (muestra N° 28) y alta (muestra N° 2) de ácidos orgánicos.

5.5.2.1.1.3.1. Repetibilidad

La repetibilidad se ha llevado a cabo inyectando en un mismo día 5 veces cada una de las mieles. En la Tabla XLII se muestran los resultados obtenidos en el estudio de repetibilidad. En esta tabla se observa que los ácidos oxálico, fórmico, acético, cítrico y glucónico fueron detectados en las tres muestras mientras que el ácido pirúvico no fue detectado en ninguna de las tres mieles. En las tres muestras analizadas (N° 4, 28 y 2), el RSD% de los distintos ácidos oscila entre 0.2 y 4.6%.

Tabla XLII. Repetibilidad del método propuesto de electroforesis capilar (CE) para la determinación de los ácidos orgánicos en la miel

Ácido orgánico	Repetibilidad (n=5)					
	Muestra N° 4		Muestra N° 28		Muestra N° 2	
	Media ± SD [*]	RSD (%)	Media ± SD [*]	RSD (%)	Media ± SD [*]	RSD (%)
Oxálico	14 ± 0.6	4.3	42 ± 1.1	2.6	114 ± 2.1	1.8
Fórmico	63 ± 2.9	4.6	120 ± 3.2	2.7	908 ± 9.9	1.1
Málico	NC	—	105 ± 2.8	2.7	539 ± 6.4	1.2
Succínico	ND	—	37 ± 1.7	4.6	60 ± 2.2	3.7
Pirúvico	ND	—	ND	—	ND	—
Acético	62 ± 1.7	2.7	87 ± 1.0	1.1	323 ± 3.1	1.0
Láctico	NC	—	180 ± 3.3	1.8	303 ± 0.6	0.2
Cítrico	49 ± 1.2	2.4	109 ± 0.9	0.8	329 ± 0.9	0.3
Glucónico	3.7 ± 0.03	0.8	8.3 ± 0.04	0.5	12.9 ± 0.04	0.3

^{*}Concentraciones de todos los ácidos en mg/kg, salvo el ácido glucónico que viene expresado en g/kg

5.5.2.1.1.3.2. Reproducibilidad

La reproducibilidad se ha determinado analizando cada miel en tres días alternos. En la Tabla XLIII se muestran los resultados obtenidos en el estudio de reproducibilidad. En las tres muestras analizadas (N° 4, 28 y 2), el RSD% de los distintos ácidos oscila entre 0.5 y 10.0%.

Tabla XLIII. Reproducibilidad del método propuesto de electroforesis capilar (CE) para la determinación de los ácidos orgánicos en la miel

Ácido orgánico	Reproducibilidad (n=3)					
	Muestra Nº 4		Muestra Nº 28		Muestra Nº 2	
	Media \pm SD [*]	RSD (%)	Media \pm SD [*]	RSD (%)	Media \pm SD [*]	RSD (%)
Oxálico	16 \pm 1.6	10.0	40 \pm 2.4	6.0	116 \pm 3.8	3.3
Fórmico	59 \pm 3.5	5.9	124 \pm 5.3	4.3	905 \pm 27.3	3.0
Málico	NC	—	108 \pm 1.0	0.9	553 \pm 14.0	2.5
Succínico	ND	—	36 \pm 2.5	6.9	62 \pm 1.9	3.1
Pirúvico	ND	—	ND	—	ND	—
Acético	65 \pm 3.8	5.8	89 \pm 2.5	2.8	324 \pm 1.5	0.5
Láctico	NC	—	179 \pm 8.1	4.5	314 \pm 12.5	4.0
Cítrico	46 \pm 3.8	8.3	107 \pm 2.6	2.4	352 \pm 24.4	6.9
Glucónico	3.6 \pm 0.04	1.1	8.2 \pm 0.13	1.6	12.8 \pm 0.19	1.5

* Concentraciones de todos los ácidos en mg/kg, salvo el ácido glucónico que viene expresado en g/kg

5.5.2.1.1.4. RECUPERACIÓN

Al igual que en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la exactitud del método de electroforesis capilar (CE) se ha evaluado mediante el método de las recuperaciones analíticas. Para ello se han utilizado dos muestras de Galicia con Denominación con bajo contenido en ácidos orgánicos (Nº 7 y 28). Se ha pesado la mitad de muestra y se han realizado tres sobrecargas de concentración creciente (baja, media y alta) de una mezcla de patrones de ácidos orgánicos.

La Tabla XLIV recoge, por una parte, las recuperaciones medias de las tres sobrecargas realizadas en cada una de las mieles y, por otra, las recuperaciones medias de ambas muestras. En esta tabla se observa como las recuperaciones medias de ambas muestras obtenidas para cada uno de los ácidos orgánicos oscilan entre 95 y 103%.

Según todos los resultados anteriormente expuestos, el método propuesto de electroforesis capilar de zona puede ser utilizado para el análisis cuantitativo de los ácidos orgánicos en la miel. Como se ha comentado, en la bibliografía manejada, no hay ningún método de electroforesis capilar que cuantifique los ácidos orgánicos en la miel, por lo que no existen estudios de precisión y recuperación con los que comparar los realizados en este trabajo.

Tabla XLIV. Recuperaciones medias obtenidas al someter a dos muestras de miel sobrecargadas con concentraciones crecientes de una mezcla de patrones de ácidos orgánicos a todo el proceso analítico

Ácido orgánico	Recuperaciones					
	Muestra N° 7		Muestra N° 28		Media de ambas muestras	
	Media ± SD	RSD (%)	Media ± SD	RSD (%)	Media ± SD	RSD (%)
Oxálico	98 ± 0.5	0.5	100 ± 2.1	2.1	99 ± 1.6	1.6
Fórmico	103 ± 3.2	3.1	103 ± 0.5	0.5	103 ± 2.1	2.0
Málico	99 ± 5.4	5.5	101 ± 1.5	1.5	100 ± 3.6	3.6
Succínico	97 ± 4.5	4.6	101 ± 3.1	3.1	99 ± 3.0	3.0
Pirúvico	98 ± 6.8	6.9	96 ± 5.8	6.0	97 ± 5.7	5.9
Acético	105 ± 4.8	4.6	100 ± 5.1	5.1	102 ± 5.1	5.0
Láctico	97 ± 2.6	2.7	101 ± 2.8	2.8	99 ± 3.2	3.2
Cítrico	101 ± 5.1	5.0	89 ± 10.1	11.3	95 ± 9.4	9.9
Glucónico	100 ± 1.2	1.2	101 ± 2.8	2.8	101 ± 1.9	1.9

5.5.2.1.2. DISCUSIÓN

El primer paso, en el desarrollo del método, fue separar e identificar el mayor número de ácidos orgánicos posible, obteniéndose la separación de los patrones de los ácidos oxálico, fórmico, tartárico, málico, succínico, maleico, glutárico, pirúvico, acético, láctico, cítrico, butírico, benzoico, sórbico, ascórbico y glucónico (Figura 47).

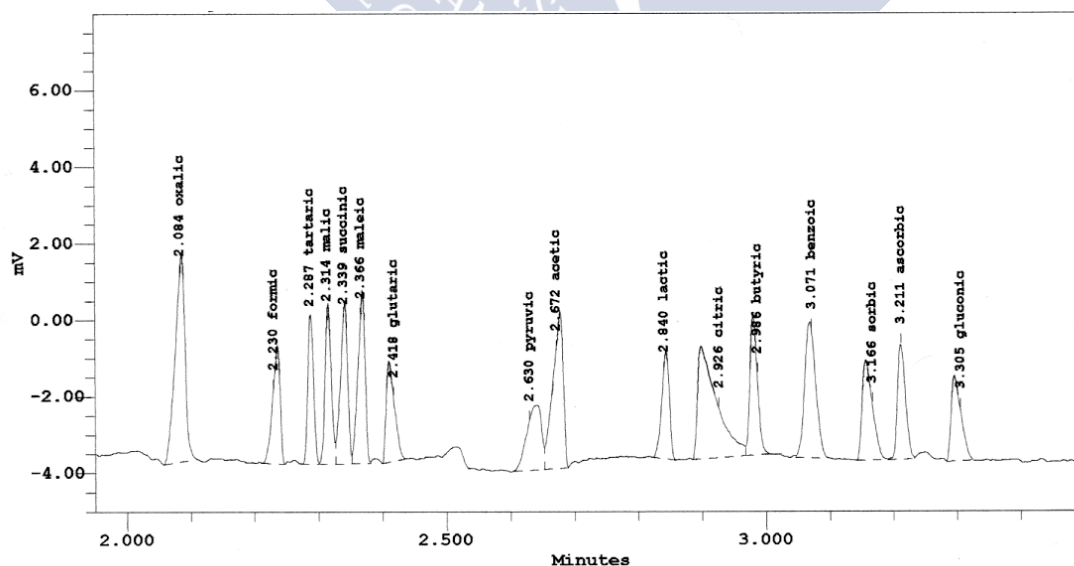


Figura 47. Electroferograma de una mezcla de patrones de los ácidos orgánicos separados mediante el método propuesto de electroforesis capilar (CE).

En esta figura, la concentración de la mezcla de patrones del electroferograma fue de 5 ppm para los ácidos oxálico, fórmico, tartárico, málico, succínico, maleico, glutárico, pirúvico, acético, láctico, butírico y sórbico, 12.5 ppm para el ácido cítrico, 1 ppm para el ácido benzoico y 10 ppm para los ácidos ascórbico y glucónico. Se ha observado que el ácido ascórbico en las condiciones de trabajo se degrada a lo largo del tiempo, por lo que se podría utilizar para realizar un análisis cualitativo pero no cuantitativo.

Como ya se ha comentado, de estos 16 ácidos se han identificado y cuantificado en la miel los ácidos oxálico, fórmico, málico, succínico, pirúvico, acético, láctico, cítrico y glucónico. El ácido glutárico, según algunos autores (*Del Nozal et al., 1998*), no se encuentra de forma natural en la miel por lo que se ha añadido a las muestras como ácido de referencia para realizar el cálculo de los tiempos de migración relativos.

Los ácidos tartárico y maleico no se han detectado por este método en ninguna de las muestras analizadas tanto de Galicia con Denominación como de otras zonas de España. Sin embargo si ambos ácidos se encuentran en concentraciones mayores en alguna miel podrían ser identificados y cuantificados por este método. En la Tabla XLV se recogen los tiempos de migración absolutos y relativos, los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) y las rectas de calibrado de estos ácidos orgánicos.

Tabla XLV. Tiempos de migración absolutos y relativos, límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) y rectas de calibrado del método propuesto de electroforesis capilar (CE) para la determinación de los ácidos tartárico y maleico en la miel

ÁCIDO ORGÁNICO	TIEMPOS DE MIGRACIÓN ABSOLUTOS (min) ± SD	TIEMPOS DE MIGRACIÓN RELATIVOS ± SD	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	RECTA DE CALIBRADO (y=ax+b)
Tartárico	2.25 ± 0.027	0.946 ± 0.00023	15	53	y= 9.7 x + 177 (r = 0.9998)
Maleico	2.33 ± 0.026	0.980 ± 0.00090	2.4	6.8	y= 15.2 x + 234 (r = 0.9998)

Por último, no fue posible identificar los ácidos butírico, benzoico, sórbico y ascórbico en la miel ya que se encuentran en una zona en la que hay múltiples interferencias, produciéndose solapamientos con otros compuestos con tiempos de migración similares.

5.5.2.1.2.1. CONDICIONES ELECTROFORÉTICAS

5.5.2.1.2.1.1. Elección del electrolito

La elección del electrolito es fundamental en la electroforesis capilar de zona para obtener una buena separación. Se debe elegir un electrolito cuya movilidad sea similar a la de los analitos con el fin de evitar distorsiones en la forma de los picos (Heiger, 1992).

En la Tabla XLVI se recogen los diferentes electrolitos utilizados por otros autores en la determinación de los ácidos orgánicos en alimentos por electroforesis capilar.

Tabla XLVI. Electrolitos empleados por algunos autores en la determinación de los ácidos orgánicos en diferentes alimentos por electroforesis capilar (CE)

ELECTROLITO	MODO DE DETECCIÓN UV	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
Ácido 2,6-piridinodicarboxílico (PDC)	Indirecto	Soga, 1996; Soga y Ross, 1997; Soga y Wakaura, 1997; Kandl y Kupina, 1999; Soga y Ross, 1999; Soga y Imaizumi, 2001; Izco et al., 2002b; Roselló et al., 2002
Ácido benzoico	Indirecto	Ackermans et al., 1992; Mallet et al., 1999
Ácido p-amino benzoico (PAB)	Indirecto	Klampfl y Katzmayer, 1998; Klampfl et al., 1998; Klampfl, 1999
Ácido piromelítico (PMA)	Indirecto	Arellano et al., 1997a; Arellano et al., 1997b
Ácido salicílico	Indirecto	Boden et al., 2000
Ácido trimelítico (TMA)	Indirecto	Wu et al., 1995
Cromato	Indirecto	Jimidar et al., 1995; Stathakis y Cassidy, 1995; Trevaskis y Trenerry, 1996; Kuban y Karlberg, 1997; Horie et al., 1998; O'Flaherty et al., 2001
Fosfato	Directo	Jimidar y Hamoir, 1993; Castiñeira et al., 2000; Saavedra et al., 2000; Saavedra et al., 2001; Castiñeira et al., 2002; Vorarat et al., 2002
Ftalato	Indirecto	Kenney, 1991; DeVries, 1993; Kelly y Nelson, 1993; Lalljie et al., 1993; Levi et al., 1993; López-Martínez y Rodríguez-Roldán, 1993; Heiger y Weinberger, 1994; Chen et al., 1999; Izco et al., 2002a
Tetraborato	Directo	García-Moreno et al., 2001; Castro et al., 2002; Moreno et al., 2003

Como se observa en esta tabla, la mayoría de los electrolitos utilizados pertenecen al modo indirecto de detección UV, es decir, el electrolito presenta una mayor absorción en la región del UV que los analitos (en este caso los ácidos orgánicos), por lo que en el momento

en que el analito pasa por el detector se produce un descenso de absorbancia en forma de pico negativo. Esta señal es posteriormente transformada mediante una inversión de la polaridad a la salida del detector por lo que los picos del electroferograma aparecen como positivos (*Heiger, 1992; Waters, 1995; Cruces, 1998*).

De los electrolitos de detección indirecta más ampliamente utilizados, el cromato presenta una movilidad elevada por lo que se emplea fundamentalmente para la determinación específica de aniones inorgánicos o conjunta de aniones inorgánicos y orgánicos. El ftalato posee una movilidad moderada, similar a la de los ácidos orgánicos, por lo que se prefiere al cromato para la determinación de estos aniones. Para determinar la efectividad del ftalato como electrolito en la separación de los ácidos orgánicos de la miel, se ensayó una disolución compuesta por hidrógeno ftalato de potasio (5 mM) y tensoactivo catiónico OFM-OH (0.5 mM) que actúa como modificador del flujo electroosmótico. El pH de la disolución se ajustó a 5.60 con NaOH 0.1 M (*DeVries, 1993; Lalljie et al., 1993; Levi et al., 1993; Waters, 1995*). El resto de las condiciones electroforéticas son las especificadas en el método general desarrollado por *Waters (1995)*. El resultado fue que al aplicar este método a la miel, la sensibilidad y la resolución de los diferentes ácidos no fueron adecuadas (*Cendón, 1997*).

Al no obtener resultados satisfactorios con electrolitos de detección indirecta, se pensó en utilizar un electrolito de detección directa, es decir un electrolito con menor absorción en la región del UV que los ácidos orgánicos por lo que en el momento en que el analito pasa a través del detector se produce un aumento de absorbancia. El electrolito seleccionado fue el fosfato porque su movilidad es similar a la de los ácidos orgánicos y, además, ha sido ampliamente utilizado en la determinación de estos compuestos tanto en alimentos (Tabla XLVI) como en muestras medioambientales (*Turcat et al., 1994; Waters, 1995; Buchberger et al., 1997; Barbas et al., 1999; Galli et al., 2000; Naidu y Chen, 2001; Xu et al., 2001; Galli et al., 2002*).

La disolución del electrolito fosfato utilizada está compuesta por $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (7.5 mM) y Na_2HPO_4 (2.5 mM), a la que se le ha añadido un tensoactivo catiónico (hidróxido de tetradeciltrimetilamonio [TTAOH], comercialmente denominado OFM-OH) como modificador del flujo electroosmótico e iones calcio para modificar la selectividad del método (*Cendón, 1997*).

Una vez seleccionado el electrolito y su composición, se pasó a optimizar el método estudiando la influencia de los diferentes factores que afectan tanto al flujo electroosmótico como a la selectividad.

5.5.2.1.2.1.2. Influencia del pH del electrolito

La influencia del pH del electrolito en la migración de los ácidos orgánicos es uno de los primeros mecanismos utilizados para ajustar la selectividad. Modificaciones en el pH van a provocar cambios en el flujo electroosmótico y en la movilidad de los aniones por lo que se producen variaciones en los tiempos de migración de los analitos (Ross, 1997).

Con el fin de estudiar el efecto que tiene el pH del electrolito sobre los tiempos de migración absolutos y relativos, se ha sometido una mezcla de patrones de los 16 ácidos orgánicos a separar por este método a distintos valores del pH desde 6.00 hasta 7.60, en intervalos de 0.40 unidades de pH (Figura 48). En todos los ensayos, el electrolito era fosfato, [OFM-OH] = 2.5 mM y no se añadió Ca²⁺.

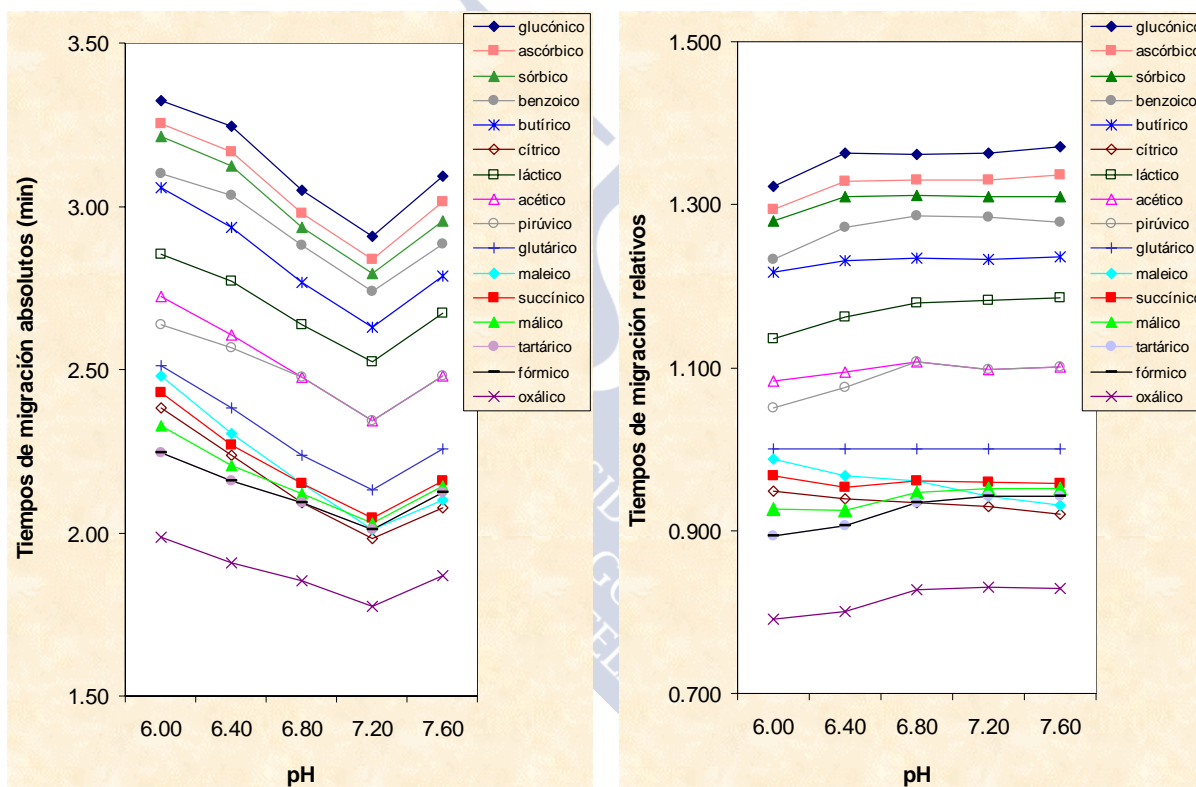


Figura 48. Variación de los tiempos de migración absolutos y relativos de una mezcla de patrones de los ácidos orgánicos con el pH del electrolito (fosfato; [OFM-OH]=2.5 mM; [Ca²⁺]=0 mM).

En la Figura 48 se observa que a medida que aumenta el pH, el tiempo de análisis va disminuyendo hasta llegar al pH 7.20, a partir del cual vuelve a aumentar. Los ácidos maleico, succínico, glutárico y cítrico son los que varían en mayor medida su movilidad al modificar el pH.

El pH directo del electrolito es de aproximadamente 6.80, con lo que tendría la ventaja de no ser necesario llevar el electrolito a pH. Sin embargo, además del solapamiento

entre los ácidos tartárico y fórmico (que como se observa en la Figura 48, se produce a cualquier pH), existe solapamiento entre los ácidos succínico y maleico y entre los ácidos pirúvico y acético.

A pH > 6.80 los ácidos pirúvico y acético coeluyen. La resolución de los ácidos orgánicos comprendidos entre el oxálico y el glutárico disminuye aunque a partir del ácido butírico esta resolución aumenta. A pH 7.60 el ácido láctico sale muy mal resuelto.

A pH < 6.80 se resuelve el solapamiento entre los ácidos pirúvico y acético. El pH 6.00 no se considera adecuado porque el ácido maleico se solapa con el ácido glutárico. A pH 6.40 los ácidos en los que existe un solapamiento son, por una parte, los ácidos fórmico y tartárico y, por otra, el ácido cítrico con el succínico. Estos solapamientos se producen a cualquier pH y, según la bibliografía consultada, se podrían resolver si se añade al electrolito algún aditivo (Lalljie *et al.*, 1993). Por ello el pH de 6.40 fue seleccionado para llevar a cabo la separación electroforética.

5.5.2.1.2.1.3. Influencia de la concentración del modificador del flujo electroosmótico

Como ya se ha comentado, en el análisis de aniones son necesarias dos condiciones: invertir la polaridad de la fuente de alimentación (polaridad negativa) para que el cátodo esté en el lugar de detección y añadir al electrolito un tensioactivo catiónico (generalmente una sal de alquilamonio) que modifique el flujo electroosmótico. En la determinación de los ácidos orgánicos en alimentos se han utilizado diferentes modificadores del flujo electroosmótico (Tabla XLVII). En este trabajo se ha elegido el hidróxido de tetradeciltrimetilamonio (TTAOH), comercialmente denominado OFM-OH, por ser uno de los más utilizados en la bibliografía manejada.

En la Figura 49 se muestra la variación de los tiempos de migración absolutos y relativos de una mezcla de patrones de los 16 ácidos orgánicos separados por este método con diferentes concentraciones de OFM-OH. En todos los ensayos el electrolito fue fosfato, el pH fue de 6.40 y no se añadió Ca^{2+} .

Tabla XLVII. Modificadores del flujo electroosmótico empleados por algunos autores en la determinación de los ácidos orgánicos en diferentes alimentos por electroforesis capilar (CE)

MODIFICADOR DEL FLUJO ELECTROSMÓTICO	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
Bromuro de miristiltrimetilamonio (MTAB)	<i>Chen et al., 1999; Castiñeira et al., 2000; Castiñeira et al., 2002</i>
Bromuro e hidróxido de cetiltrimetilamonio (CTAB, CTAOH)	<i>Heiger y Weinberger, 1994; Jimidar et al., 1995; Soga, 1996; Kuban y Karlberg, 1997; Soga y Ross, 1997; Soga y Wakaura, 1997; Kandl y Kupina, 1999; Soga y Ross, 1999; O'Flaherty et al., 2001; Soga y Imaizumi, 2001; Izco et al., 2002a y 2002b; Vorarat et al., 2002</i>
Bromuro e hidróxido de tetradeciltrimetilamonio (TTAB, TTAOH)	<i>Kenney, 1991; DeVries, 1993; Kelly y Nelson, 1993; Lalljie et al., 1993; Levi et al., 1993; López-Martínez y Rodríguez-Roldán, 1993; Wu et al., 1995; Trevaskis y Trenerry, 1996; Horie et al., 1998; Klampfl y Katzmayer, 1998; Klampfl et al., 1998; Klampfl, 1999; Mallet et al., 1999; García-Moreno et al., 2001; Castro et al., 2002; Moreno et al., 2003</i>

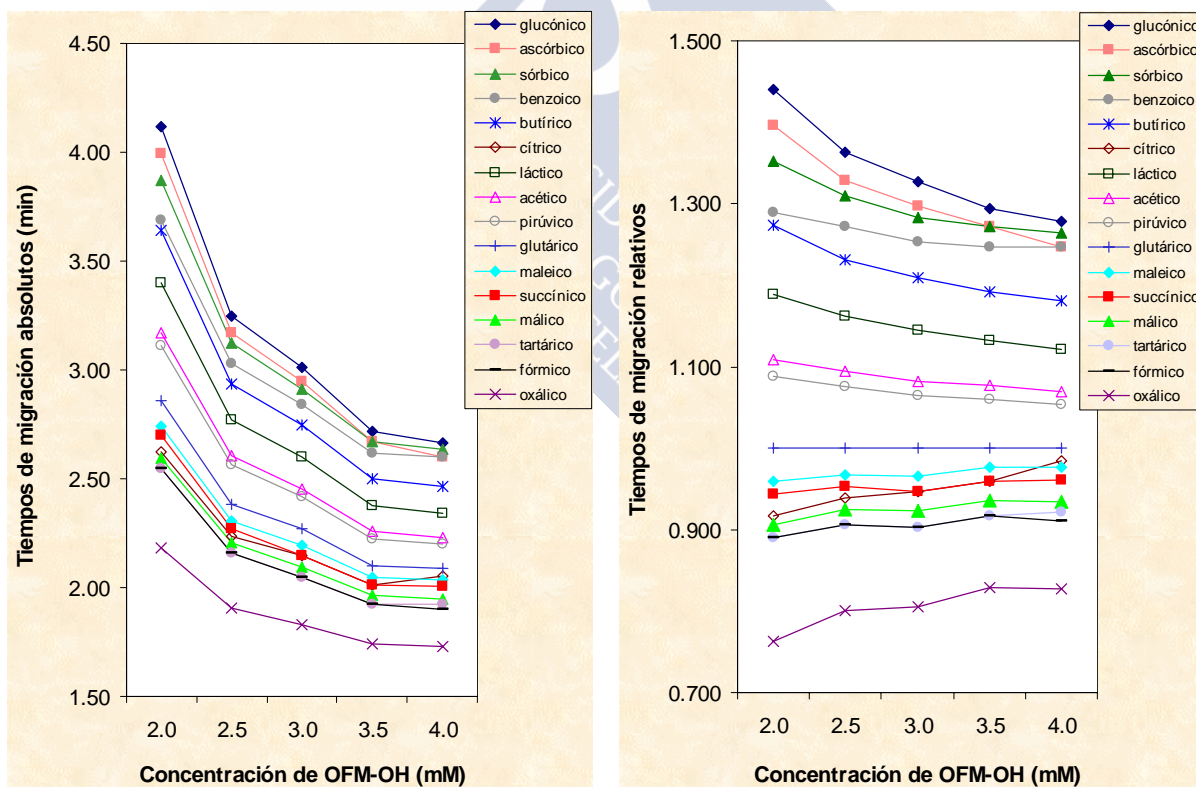


Figura 49. Variación de los tiempos de migración absolutos y relativos de una mezcla de patrones de los ácidos orgánicos con la concentración de OFM-OH (mM) (fosfato; pH=6.40; $[Ca^{2+}] = 0$ mM).

En esta figura se observa que, a medida que aumenta la concentración de OFM-OH, el tiempo de análisis va disminuyendo aunque a partir de 2.5 mM este descenso es menos pronunciado. Los ácidos sórbico, ascórbico y glucónico son los que varían su movilidad en mayor medida al modificar la concentración de OFM-OH.

Al igual que sucedía al modificar el pH, tampoco se ha podido resolver la comigración de los ácidos fórmico y tartárico con la variación en la concentración de OFM-OH. Los resultados obtenidos muestran que la variación en el rango estudiado de la concentración de OFM-OH tiene un pequeño, aunque significativo, efecto sobre la selectividad de los ácidos orgánicos.

A una concentración de OFM-OH > 2.5 mM se producen solapamientos entre los ácidos benzoico, sórbico, ascórbico y glucónico. A una concentración de OFM-OH < 2.5 mM existe un pico negativo entre los ácidos maleico y glutárico además de producirse una mala resolución entre el ácido butírico y el benzoico. Por estas razones, la concentración de OFM-OH seleccionada para llevar a acabo la separación electroforética ha sido de 2.5 mM.

5.5.2.1.2.1.4. Influencia de la concentración de iones Ca^{2+}

Como se ha comprobado, la modificación del pH y de la concentración de OFM-OH en el electrolito no han sido suficientes para resolver la comigración de los ácidos fórmico y tartárico ni el solapamiento que se produce entre los ácidos cítrico y succínico.

La adicción de ciertos compuestos al electrolito, como disolventes orgánicos o sales complejantes es otra de las estrategias utilizadas para mejorar la resolución y/o aumentar la selectividad de la separación de los ácidos orgánicos (*Heiger, 1992; Volgger et al., 1997; Cruces, 1998*).

Los disolventes orgánicos van a disminuir, en general, el flujo electroosmótico debido a que producen un aumento en la viscosidad del electrolito (*Cruces, 1998*). Para aumentar la selectividad de la separación de los ácidos orgánicos, en la bibliografía consultada, se ha utilizado acetonitrilo (*Jimidar et al., 1995; Kuban y Kalberg, 1997; Horie et al., 1998; Naidu y Chen, 2001; O'Flaherty et al., 2001; Xu et al., 2001*), metanol (*López-Martínez y Rodríguez-Roldán, 1993; Trevanskis y Trenerry, 1996; Chen et al., 1999; Vorarat et al., 2002*) o polietilenglicol (*Kaniansky et al., 1994*).

La movilidad relativa de los ácidos orgánicos también puede verse modificada por cambios en su estado de carga a través de una complejación catiónica selectiva con sales complejantes (*Lalljie et al., 1993; Devêvre et al., 1994; Cruces, 1998*). Se han utilizado sales de calcio (*Lalljie et al., 1993; Devêvre et al., 1994; Boden et al., 2000; Dahlén et al., 2000*), de cobre (*Wiley, 1995; Chiari et al., 1996*), de magnesio (*Chiari et al., 1996*), de níquel (*Chiari et*

al., 1996) y una mezcla de sales de calcio y magnesio (García-Moreno et al., 2001; Castro et al., 2002; Moreno et al., 2003).

Lalljie et al. (1993) encontró que la adición de cationes alcalino-térreos al electrolito era efectiva para producir la separación de los ácidos fórmico y tartárico. Además con los iones Ca^{2+} el ácido cítrico, que sale solapado con el ácido succínico, es el que más va a modificar su movilidad relativa. Por estas razones se ha elegido añadir al electrolito sales de calcio pues se solucionan los problemas de selectividad que se presentaban en un principio.

En la Figura 50 se muestra la variación de los tiempos de migración absolutos y relativos de una mezcla de patrones de los 16 ácidos orgánicos separados por este método con diferentes concentraciones de iones Ca^{2+} . En todos los ensayos realizados el electrolito fue fosfato, el pH fue de 6.40 y $[\text{OFM-OH}] = 2.5 \text{ mM}$.

En esta figura se observa como a medida que la $[\text{Ca}^{2+}]$ aumenta los tiempos de migración absolutos y, por tanto, el tiempo de análisis, también aumenta. Los ácidos oxálico, tartárico, málico y, sobre todo, cítrico son los que presentan mayores variaciones en su movilidad relativa. Esto es debido a que son ácidos di y tricarbónicos que por sus constantes de disociación se ven más afectados que los monocarbónicos por la concentración de iones Ca^{2+} añadida al electrolito (Dahlén et al., 2000). Además los ácidos oxálico, tartárico y cítrico son buenos agentes complejantes (Soga y Ross, 1997).

Hay que destacar que cuando se utilizan concentraciones elevadas de Ca^{2+} , además de aumentar el tiempo de análisis, la resolución de los ácidos pirúvico y acético disminuye y se producen solapamientos entre diferentes ácidos orgánicos. Esta situación se hace extrema con la $[\text{Ca}^{2+}] = 1 \text{ mM}$, en la que la resolución de la mayor parte de los ácidos es bastante mala.

Como se ha comprobado, el control que la concentración de iones Ca^{2+} ejerce sobre la selectividad es mucho mayor que las variaciones en el pH o en la concentración del modificador del flujo electroosmótico (OFM-OH).

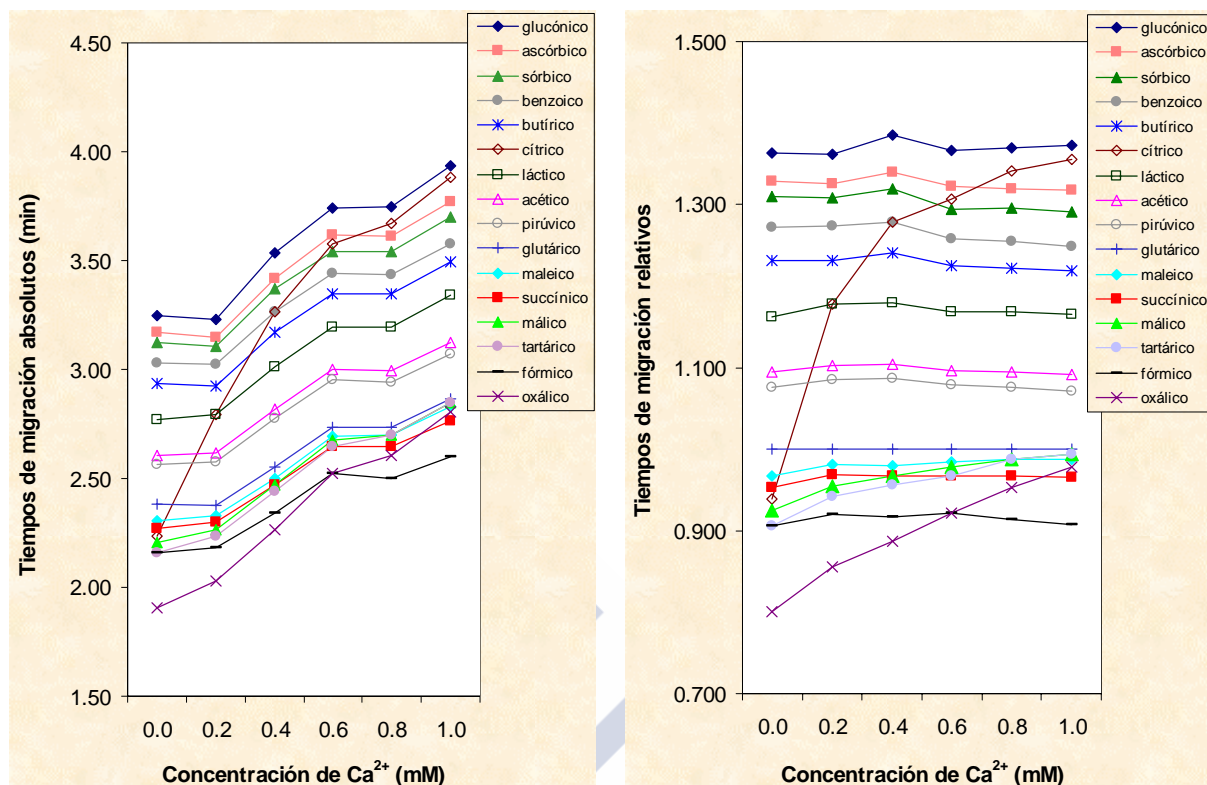


Figura 50. Variación de los tiempos de migración absolutos y relativos de una mezcla de patrones de los ácidos orgánicos con la concentración de Ca²⁺ (mM) (fosfato; pH=6.40; [OFM-OH]=2.5 mM).

Las mejores condiciones se han observado cuando la [Ca²⁺] = 0.2 mM aunque se produce un solapamiento entre los ácidos láctico y cítrico. Si se aumenta la concentración a 0.4 mM, los ácidos málico y succínico coeluyen y el ácido cítrico se solapa, en este caso, con el benzoico. Por esta razón se han ensayado concentraciones de [Ca²⁺] ligeramente superiores a 0.2 mM, obteniéndose los mejores resultados con una [Ca²⁺] = 0.24 mM.

5.5.2.1.2.1.5. Influencia de la temperatura

El control de la temperatura, de forma que se mantenga estable durante la separación, es imprescindible para lograr una buena reproducibilidad de los tiempos de migración de los analitos (Heiger, 1992; Ross, 1997). Este control es, además, importante para evitar el efecto Joule (Cruces, 1998).

Al aumentar la temperatura se va a disminuir el tiempo de análisis ya que disminuye la viscosidad de la disolución tampón y, por tanto, aumentan el flujo electroosmótico y la movilidad electroforética. Sin embargo si esta temperatura es demasiado elevada se pueden producir cambios en la composición y pH del electrolito lo que provoca ensanchamientos de banda y una disminución en la resolución de la separación. Por el contrario cuanto menor

sea la temperatura de un capilar, mayor podrá ser el voltaje aplicado aumentando la eficacia de la separación (Cruces, 1998).

En la Figura 51 se muestra la variación de los tiempos de migración absolutos y relativos de una mezcla de patrones de los 16 ácidos orgánicos al realizar la separación termostatzada a diferentes temperaturas. En todos los ensayos el electrolito fue fosfato, el pH fue de 6.40, [OFM-OH] = 2.5 mM y [Ca²⁺] = 0.24 mM.

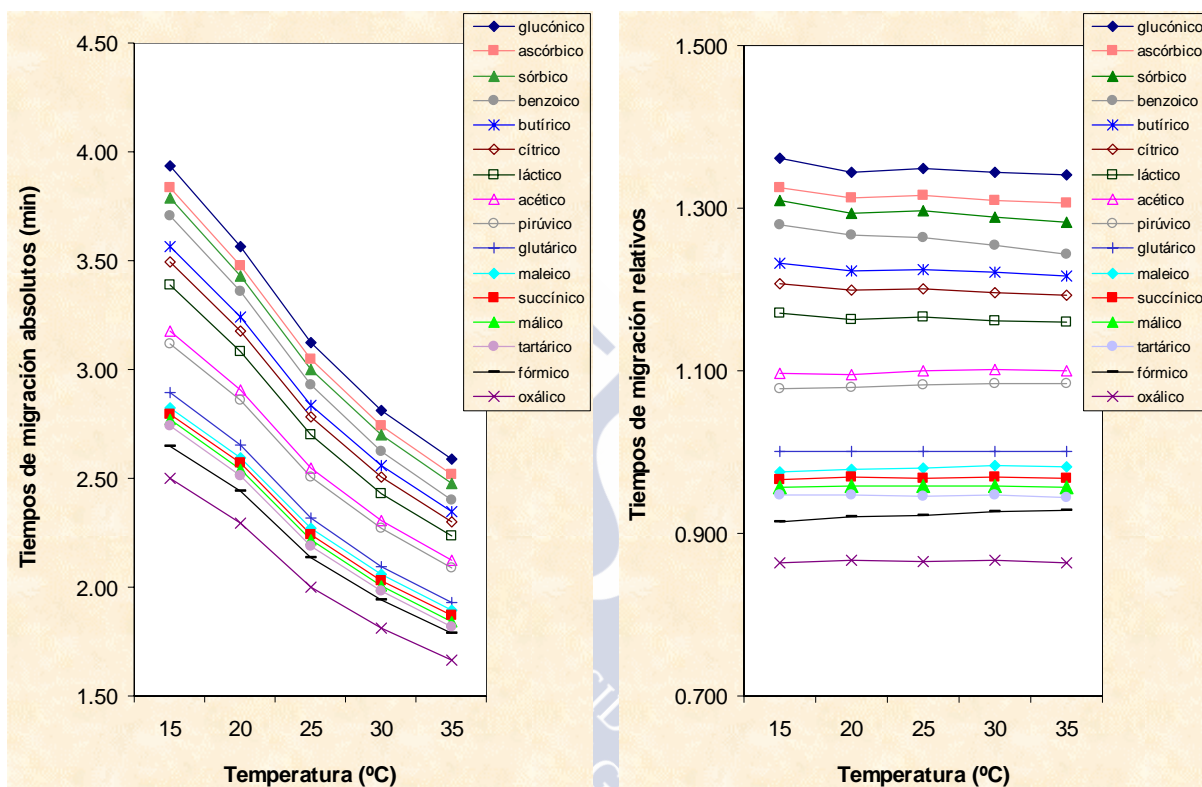


Figura 51. Variación de los tiempos de migración absolutos y relativos de una mezcla de patrones de los ácidos orgánicos con la temperatura (°C) (fosfato, pH=6.40; [OFM-OH]=2.5 mM; [Ca²⁺]=0.24 mM).

En esta figura se pone de manifiesto que al aumentar la temperatura los tiempos de migración absolutos de los ácidos orgánicos objeto de estudio disminuyen de forma prácticamente lineal, con coeficientes de correlación que oscilan entre 0.993 y 0.994. Se ha elegido llevar a cabo el análisis a 25 °C ya que lo ideal es utilizar temperaturas cercanas a la temperatura ambiente y, además, no se ha observado ninguna mejoría en la resolución de los ácidos orgánicos al utilizar otras temperaturas.

5.5.2.1.2.1.6. Influencia del voltaje

En general, voltajes altos dan lugar a separaciones más rápidas con mayores eficacias. Sin embargo, cuanto mayor es el voltaje aplicado a un capilar, mayor es el efecto Joule y el ensanchamiento de los picos por lo que la resolución disminuye (Cruces, 1998).

En la Figura 52 se muestra la variación de los tiempos de migración absolutos y relativos de una mezcla de patrones de los 16 ácidos orgánicos separados por este método al aplicar diferentes voltajes. En todos los ensayos el electrolito fue fosfato, el pH fue de 6.40, [OFM-OH] = 2.5 mM, [Ca²⁺] = 0.24 mM y temperatura 25 °C.

De forma similar a lo que sucedía con la temperatura, al aumentar el voltaje disminuyen los tiempos de migración absoluta de los ácidos orgánicos aunque en este caso de forma no lineal. Se ha elegido llevar a cabo la separación a un voltaje de -25 kV porque a partir de este voltaje no se observa ninguna mejoría en la resolución de los ácidos orgánicos.

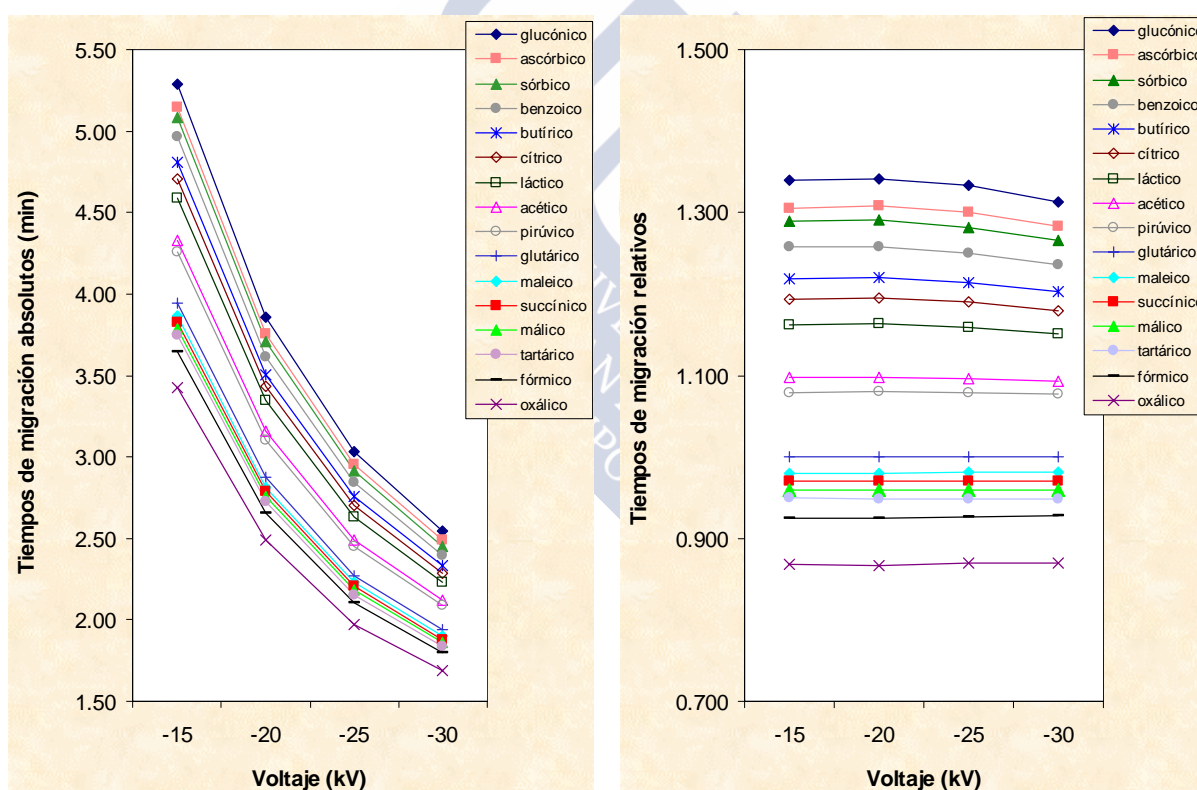


Figura 52. Variación de los tiempos de migración absolutos y relativos de los ácidos orgánicos con el voltaje aplicado (kV) (fosfato, pH=6.40; [OFM-OH]=2.5 mM; [Ca²⁺]=0.24 mM; T^a 25 °C).

En todos los gráficos anteriores se pone de manifiesto que las variaciones en las condiciones electroforéticas (pH, [OFM-OH], [Ca²⁺], temperatura o voltaje) producen cambios más importantes en los tiempos de migración absolutos que en los tiempos de migración relativos. Esto confirma el empleo de los tiempos de migración relativos para llevar a cabo la identificación de los ácidos orgánicos pues aumenta la robustez del método.

5.5.2.1.2.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

En primer lugar, se ha determinado la cantidad de muestra necesaria ensayando diferentes cantidades de miel (1, 2.5 y 5 g en 100 mL). La cantidad elegida para llevar a cabo la separación fue de 2.5 g de miel en 100 mL porque concentraciones mayores producían una distorsión de los picos de los ácidos orgánicos del electroferograma por ser la concentración de los mismos excesiva. En las muestras con un alto contenido en ácidos orgánicos va a ser necesario hacer una dilución de la muestra 1:2.5 o bien pesar 1 g de miel en 100 mL. Como ya se ha comentado, se podría determinar la cantidad de muestra necesaria utilizando la escala de color del método oficial de la AOAC, ya que existe una cierta relación entre el contenido de ácidos orgánicos y el color de la miel. Así, en las mieles que presentan un color incluido en las categorías de *light amber* o *amber* sería necesario hacer esta dilución o pesar directamente 1 g/100 mL.

En segundo lugar, se han llevado las muestras de miel a pH = 10-11 agitando durante 10 minutos para garantizar la ruptura de la gluconolactona, procedimiento descrito en la determinación del ácido D-gluconico total por el método enzimático (*Mato et al., 1997*). El pH al que se vuelve en esta determinación enzimática es aproximadamente 7.8 (que es el pH del tampón del test enzimático). En este caso se han ensayado diferentes pHs (4.0, 8.0 y 10.0), comprobándose que el pH final óptimo es 8.0. Para aumentar el pH se ha utilizado NaOH y KOH (0.1 M) y no se han encontrado diferencias entre utilizar una u otra base. Se ha elegido NaOH 0.1 M. Para disminuir el pH se ha empleado HCl y H₂SO₄ (0.1 M) obteniéndose resultados similares. Se ha decidido utilizar HCl 0.1 M porque el pico debido a los Cl⁻ (al principio del electroferograma) es menor que el de los SO₄²⁻, lo que hace que los tiempos de migración de los ácidos orgánicos en las muestras se desplacen en menor medida, siendo más similares a los de los patrones.

Hay que destacar que existen diferencias entre llevar las mieles a pH y no hacerlo. Así al llevar a pH se suaviza el ruido de fondo y aumenta tanto la reproducibilidad del método como la respuesta de algunos ácidos. El mayor aumento en la respuesta se produce en los ácidos fórmico, cítrico y gluconico, probablemente debido a la ruptura de los ésteres del ácido fórmico y de las lactonas del ácido gluconico. En el caso del ácido cítrico

probablemente el aumento se deba a que a pH 8.0 este ácido se encuentra totalmente disociado ($pK_{a3} = 6.39$) sin embargo si no se lleva la muestra a pH, no se produce esta disociación completa y el pico del ácido cítrico presenta una cola mucho mayor.

5.5.2.2. MUESTRAS

5.5.2.2.1. MIELES DE GALICIA CON DENOMINACIÓN

En la Tabla XLVIII se recogen los resultados de la determinación por el método de electroforesis capilar (CE) de los ácidos oxálico, fórmico, málico, succínico, acético, láctico, cítrico y glucónico en las 50 mieles de Galicia con Denominación analizadas. El ácido pirúvico no se refleja en la tabla porque sólo se encontró en la muestra N° 16 (39 mg/kg), en el resto de las muestras la concentración de este ácido es inferior al límite de detección (LOD) o de cuantificación (LOQ). En esta tabla, también aparece la suma de todos los ácidos analizados en g/kg y la suma de los ácidos minoritarios, es decir, de todos los ácidos excepto el ácido glucónico, expresada también en g/kg.

Las cantidades de ácido fórmico fueron corregidas por el valor de recuperación obtenido (Tabla XLIV) porque el 100% de recuperación no se encuentra dentro del intervalo comprendido entre el valor medio de recuperación \pm intervalo de confianza.

Los promedios obtenidos para los ácidos oxálico, fórmico, málico, succínico, acético, láctico, cítrico y glucónico son 37 mg/kg, 152 mg/kg, 70 mg/kg, 19 mg/kg, 122 mg/kg, 136 mg/kg, 92 mg/kg y 8.3 g/kg, respectivamente (Tabla XLVIII). Según estos datos, aparte del ácido glucónico, los ácidos fórmico, acético y láctico son los que se encuentran en mayor proporción en las mieles analizadas.

En la Tabla XLVIII, también se puede comprobar como en 10 de las 50 mieles de Galicia con Denominación (N° 1, 2, 3, 26, 29, 42, 43, 44, 45 y 48) la contribución del contenido de todos los ácidos orgánicos excepto el glucónico (ácidos minoritarios) es $\geq 10\%$ aunque en ningún caso supera el 30%. Por tanto, en la mayoría de las muestras el ácido glucónico representa más del 90% del contenido de los ácidos orgánicos analizados. Hay que destacar que en las mieles con un contenido en ácidos minoritarios $\geq 10\%$ se incluyen todas las muestras de la provincia de Ourense menos una (N° 41) y todas las de *Castanea sativa* Miller.

Tabla XLVIII. Contenido de los ácidos orgánicos determinados por electroforesis capilar (CE) en las mieles de Galicia con Denominación ordenadas según su espectro polínico

Número de muestra	Ácido oxálico (mg/kg)	Ácido fórmico (mg/kg)	Ácido málico (mg/kg)	Ácido succínico (mg/kg)	Ácido acético (mg/kg)	Ácido láctico (mg/kg)	Ácido cítrico (mg/kg)	Ácido glucónico (g/kg)	Suma todos ácidos sin glucónico (mg/kg)	Suma todos ácidos (g/kg)
1	109	278	486	187	130	579	351	8.0	2119	10.1
2	114	908	539	60	323	303	329	12.9	2577	15.5
3	82	889	206	29	336	154	158	14.4	1855	16.3
4	14	63	NC	ND	62	NC	49	3.7	188	3.9
5	NC	61	ND	ND	NC	78	48	6.7	187	6.9
6	NC	66	ND	ND	57	48	51	6.0	222	6.2
7	15	40	NC	ND	NC	NC	38	4.8	93	4.9
8	12	36	NC	NC	53	68	46	6.6	216	6.8
9	NC	45	NC	ND	NC	48	41	5.7	133	5.8
10	14	63	NC	ND	44	53	49	5.4	222	5.7
11	NC	56	NC	ND	49	53	NC	4.9	158	5.1
12	NC	48	NC	NC	41	39	29	5.3	157	5.4
13	NC	70	NC	ND	46	27	36	3.7	178	3.9
14	15	72	NC	NC	144	27	41	6.9	299	7.2
15	20	73	NC	NC	178	46	33	5.9	350	6.3
16	NC	64	ND	ND	325	29	ND	8.4	457	8.8
17	NC	53	NC	NC	97	65	NC	6.2	215	6.4
18	29	94	NC	NC	161	76	NC	7.0	360	7.4
19	23	110	NC	ND	400	NC	30	7.7	562	8.3
20	NC	65	21	ND	59	NC	49	3.5	195	3.6
21	19	66	NC	ND	57	30	76	5.2	248	5.5
22	13	60	NC	ND	44	51	ND	4.5	167	4.7
23	13	49	NC	ND	42	49	ND	3.9	153	4.1
24	NC	70	28	ND	61	35	32	4.7	226	4.9
25	NC	NC	ND	ND	80	200	65	9.7	345	10.0
26	45	131	127	26	97	166	140	5.0	732	5.8
27	26	152	103	NC	97	179	123	9.1	679	9.8
28	42	120	105	37	87	180	109	8.3	680	9.0
29	283	185	NC	ND	282	NC	47	7.1	797	7.9
30	23	123	45	ND	89	162	51	8.1	494	8.5
31	NC	35	30	ND	NC	171	72	12.1	308	12.4
32	69	169	256	90	60	291	276	11.4	1212	12.6
33	155	227	67	17	143	144	109	10.4	863	11.2
34	32	143	38	ND	93	55	50	14.0	411	14.4
35	NC	89	NC	ND	223	33	ND	8.8	345	9.1
36	22	94	NC	NC	213	117	78	6.2	524	6.7
37	14	134	ND	ND	45	121	60	13.3	374	13.7
38	NC	41	29	ND	44	255	54	11.5	423	11.9
39	16	81	40	ND	51	298	124	10.9	610	11.5
40	18	131	75	17	39	115	133	11.8	528	12.3
41	22	67	32	ND	121	38	63	12.3	343	12.6
42	119	311	485	197	133	495	331	11.0	2072	13.1
43	111	321	212	90	310	241	315	6.6	1599	8.2
44	83	863	187	15	294	123	138	13.8	1701	15.5
45	72	221	209	142	120	620	292	10.7	1675	12.4
46	NC	46	ND	ND	46	34	71	11.9	197	12.1
47	23	93	21	ND	98	632	91	12.3	958	13.3
48	112	279	95	34	282	163	123	7.7	1089	8.8
49	46	136	37	ND	208	39	125	8.6	591	9.2
50	23	28	29	NC	155	58	65	12.6	359	12.9
MEDIA	37	152	70	19	122	136	92	8.3	629	9.0
SD	53	202	129	45	102	157	93	3.2	603	3.5
RSD%	143	132	184	241	84	115	102	38	96	39
Vmin	NC	NC	ND	ND	NC	NC	ND	3.5	93	3.6
Vmáx	283	908	539	197	400	632	351	14.4	2577	16.3

En la Figura 53 se presentan los porcentajes de las muestras en las que cada uno de los ácidos orgánicos determinados por el método propuesto de CE aparece como no detectable (ND), no cuantificable (NC) y presente. Se observa que el ácido glucónico se encuentra en todas las muestras mientras que, después del ácido pirúvico, el ácido succínico es el que se encuentra en un menor número de muestras.

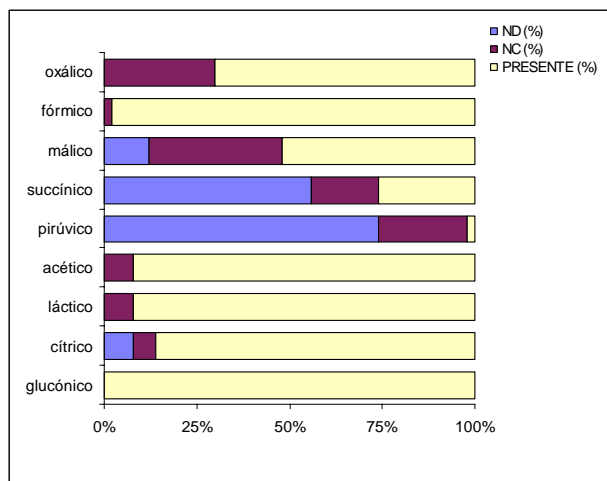


Figura 53. Porcentaje de muestras de Galicia con Denominación en las que cada uno de los ácidos orgánicos determinados por el método de electroforesis capilar (CE) aparece como no detectable (ND), no cuantificable (NC) y presente.

En la Figura 54 se representan las distribuciones de los ácidos oxálico, fórmico, málico, succínico, acético, láctico, cítrico y glucónico de las mieles de Galicia con Denominación analizadas por el método propuesto de electroforesis capilar.

En esta figura se observa como, excepto para el contenido del ácido glucónico cuya distribución es normal, las distribuciones del contenido de los ácidos orgánicos en las muestras de Galicia con Denominación están muy desplazadas hacia la izquierda. Esto es particularmente importante en el caso de los ácidos oxálico (el 78% de las muestras con un contenido entre 0 y 50 mg/kg), málico (el 72% de las muestras con un contenido entre 0 y 50 mg/kg) y succínico (el 84% de las muestras con un contenido entre 0 y 30 mg/kg). Por tanto el contenido en ácidos orgánicos de la mayor parte de las mieles analizadas es bajo aunque también se observan muestras con valores muy extremos, lo que demuestra la gran variabilidad en la composición de ácidos orgánicos de las mieles estudiadas.

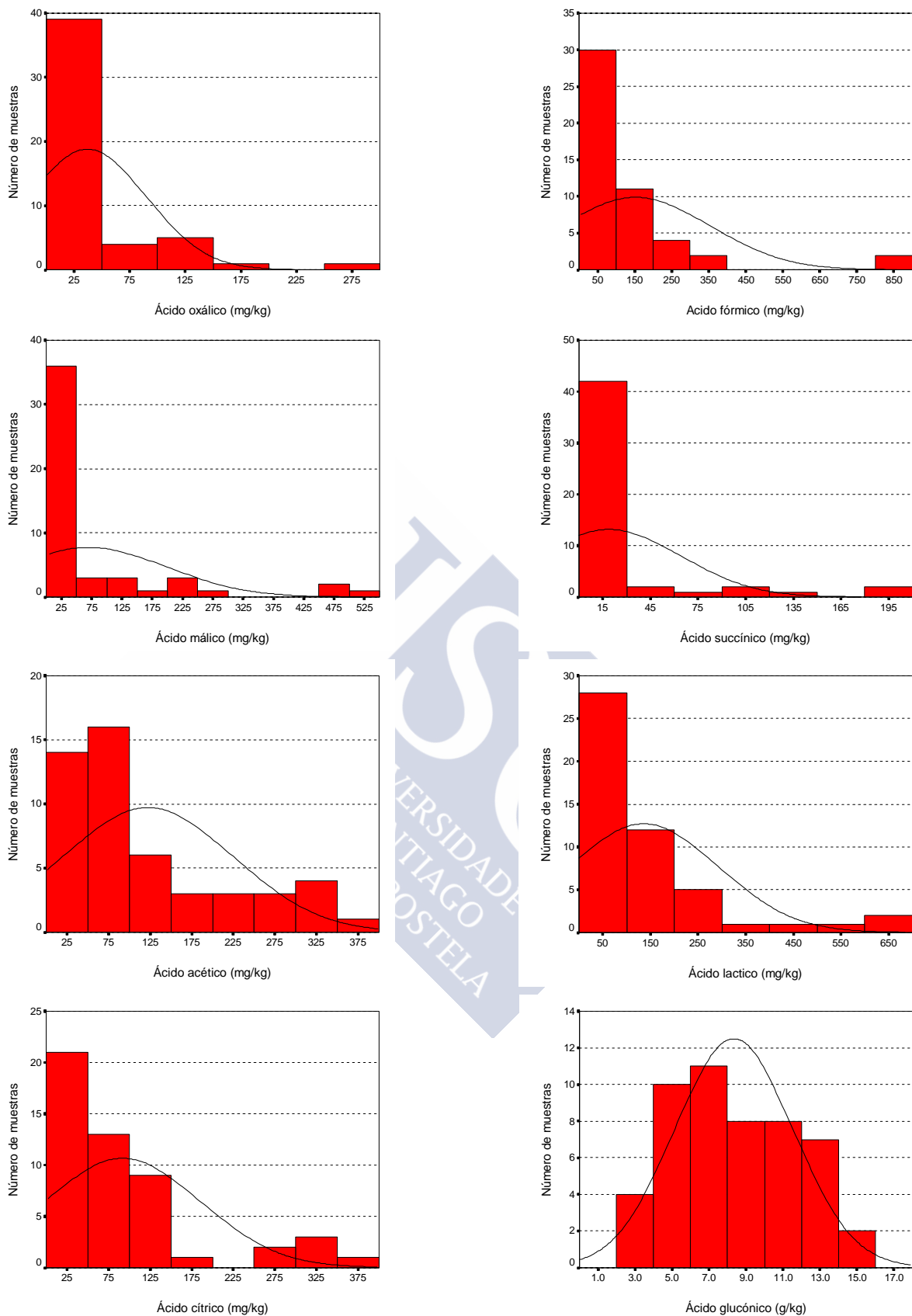


Figura 54. Distribuciones del contenido de los ácidos orgánicos determinados por electroforesis capilar (CE) en las mieles de Galicia con Denominación.

5.5.2.2.1.1. INFLUENCIA DE LA PROVINCIA DE PROCEDENCIA DEL ENVASADOR EN EL CONTENIDO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS DETERMINADOS POR ELECTROFORESIS CAPILAR (CE)

En la Tabla XLIX aparecen los estadísticos del contenido de los ácidos oxálico, fórmico, málico, succínico, acético, láctico, cítrico y glucónico agrupados según la provincia de procedencia del envasador.

En esta tabla se observa como la provincia de Ourense presenta el mayor promedio de las cuatro provincias para todos los ácidos orgánicos analizados por electroforesis capilar. El contenido del ácido succínico en las muestras de las provincias de A Coruña, Lugo y Pontevedra es muy bajo porque en muchas de estas mieles este ácido se encuentra por debajo del límite de detección o de cuantificación. La única muestra con contenido en ácido pirúvico pertenece a la provincia de Lugo (muestra N^o 16).

Tabla XLIX. Estadísticos del contenido de los ácidos orgánicos determinados por electroforesis capilar (CE) en las mieles de Galicia con Denominación agrupados según la provincia de procedencia del envasador

Provincia procedencia envasador	N	Ácido oxálico (mg/kg)	Ácido fórmico (mg/kg)	Ácido málico (mg/kg)	Ácido succínico (mg/kg)	Ácido acético (mg/kg)	Ácido láctico (mg/kg)	Ácido cítrico (mg/kg)	Ácido glucónico (g/kg)
A Coruña	15	32 ± 71 (NC-283)	84 ± 46 (36-185)	25 ± 46 (ND-127)	4 ± 11 (ND-37)	67 ± 68 (NC-282)	73 ± 66 (NC-180)	57 ± 37 (NC-140)	6.0 ± 1.6 (3.7-9.1)
Lugo	17	24 ± 38 (NC-155)	95 ± 55 (NC-227)	31 ± 63 (ND-256)	7 ± 22 (ND-90)	135 ± 108 (NC-400)	120 ± 94 (NC-298)	66 ± 68 (ND-276)	9.5 ± 2.6 (5.9-14.0)
Ourense	8	89 ± 32 (22-119)	482 ± 344 (67-908)	295 ± 183 (32-539)	90 ± 77 (ND-197)	221 ± 102 (120-336)	319 ± 220 (38-620)	247 ± 110 (63-351)	11.2 ± 2.7 (6.6-14.4)
Pontevedra	10	25 ± 34 (NC-112)	89 ± 73 (28-279)	23 ± 29 (ND-95)	3 ± 11 (ND-34)	105 ± 83 (42-282)	109 ± 189 (NC-632)	63 ± 44 (ND-125)	7.5 ± 3.7 (3.5-12.6)

* MEDIA ± SD, (V_{mín}-V_{máx})

En la Figura 55 se representan las distribuciones del contenido de los ácidos oxálico, fórmico, málico, succínico, acético, láctico, cítrico y glucónico agrupados según la provincia de procedencia del envasador.

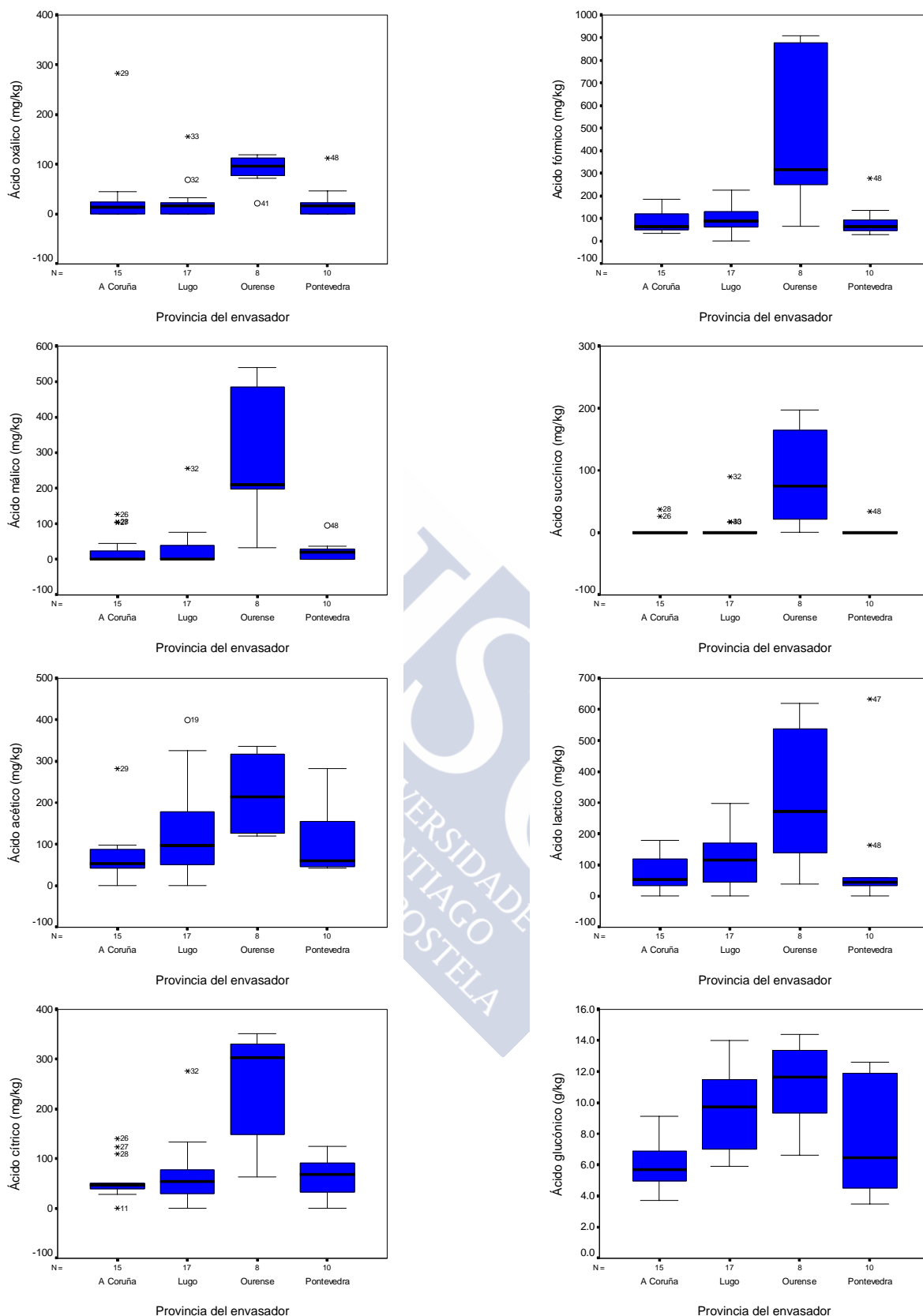


Figura 55. Distribuciones del contenido de los ácidos orgánicos determinados por electroforesis capilar (CE) en las mieles de Galicia con Denominación según la provincia de procedencia del envasador.

En los gráficos de distribución de esta figura se observa lo siguiente:

Ácido oxálico: existe poca dispersión en los datos de contenido de este ácido en las mieles de todas las provincias. Todas ellas se encuentran bastante agrupadas salvo algunos valores, concretamente 5 muestras, con un contenido mucho mayor en el caso de las provincias de A Coruña, Lugo y Pontevedra y menor en el caso de la de Ourense.

Ácido fórmico: existe una gran dispersión de resultados en el contenido del ácido fórmico de la provincia de Ourense. En el resto de las provincias, el contenido en este ácido se encuentra mucho más agrupado y es inferior a 300 mg/kg.

Ácido málico: las muestras de Ourense presentan una gran dispersión de resultados en el contenido de ácido málico. Por el contrario, la mayor parte de las muestras del resto de las provincias poseen un contenido en este ácido mucho más agrupado e inferior a 100 mg/kg.

Ácido succínico: en las provincias de A Coruña, Lugo y Pontevedra sólo 6 muestras (Nº 26, 28, 32, 33, 40 y 48) poseen un contenido en ácido succínico superior al límite de detección y cuantificación.

Ácido acético: todas las mieles de la provincia de A Coruña, excepto la muestra 29, presentan un contenido menor de 100 mg/kg siendo la única provincia en la que esto sucede.

Ácido láctico: las muestras de Pontevedra poseen un contenido en ácido láctico similar, excepto dos muestras con un contenido muy superior a las demás (Nº 47 y 48). Al igual que en algunos ácidos anteriores, existe una gran dispersión de los datos de las muestras de Ourense.

Ácido cítrico: las muestras de A Coruña poseen un contenido en ácido cítrico muy similar e inferior a 100 mg/kg, salvo tres muestras (Nº 26, 27 y 28) que poseen un contenido mayor. Las muestras de la provincia de Ourense presentan un contenido en este ácido muy superior a las del resto de las provincias.

Ácido glucónico: la mayor dispersión de datos se produce en las muestras de Pontevedra mientras que los resultados más agrupados se encuentran en la provincia de A Coruña. Hay que destacar que es el único gráfico de la figura que no presenta ningún valor extremo u "outlier" del contenido de ácido glucónico en ninguna de las provincias estudiadas.

5.5.2.2.1.2. INFLUENCIA DEL ESPECTRO POLÍNICO EN EL CONTENIDO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS DETERMINADOS POR ELECTROFORESIS CAPILAR (CE)

En la Tabla L aparecen recogidos los estadísticos del contenido de los ácidos oxálico, fórmico, málico, succínico, acético, láctico, cítrico y glucónico, agrupados según el espectro polínico.

En esta tabla se observa la gran variabilidad en el contenido de los ácidos orgánicos incluso entre las mieles del mismo origen botánico. Las mieles de *Castanea sativa* Miller son las que poseen los promedios más altos de contenido en todos los ácidos orgánicos analizados por este método de CE siendo cuantificables en todas las muestras. En ninguna de las mieles de *Eucalyptus* sp. se ha detectado o cuantificado el ácido succínico. Los ácidos oxálico y málico en las mieles de *Eucalyptus* sp. presentan unos valores medios muy bajos debido a que el contenido de algunas de estas muestras es inferior al límite de detección o de cuantificación. La única miel que presenta ácido pirúvico es de *Eucalyptus* sp. (muestra Nº 16). En lo que se refiere a la miel de *Trifolium* L. sp., los ácidos oxálico, fórmico, málico y succínico presentan unos valores inferiores al límite de detección o de cuantificación. Por último, el rango de valores encontrados en las mieles multiflorales es el más amplio para todos los ácidos analizados, como corresponde a un grupo heterogéneo de mieles.

Tabla L. Estadísticos del contenido de los ácidos orgánicos determinados por electroforesis capilar (CE) en las mieles de Galicia con Denominación agrupados según el espectro polínico

Espectro polínico	N	Ácido oxálico (mg/kg)	Ácido fórmico (mg/kg)	Ácido málico (mg/kg)	Ácido succínico (mg/kg)	Ácido acético (mg/kg)	Ácido láctico (mg/kg)	Ácido cítrico (mg/kg)	Ácido glucónico (g/kg)
<i>Castanea sativa</i> Miller	3	102 ± 17 (82-114)	692 ± 358 (278-908)	410 ± 179 (206-539)	92 ± 84 (29-187)	263 ± 115 (130-336)	345 ± 216 (154-579)	279 ± 106 (158-351)	11.8 ± 3.3 (8.0-14.4)
<i>Eucalyptus</i> sp.	21	9 ± 9 (NC-29)	63 ± 17 (36-110)	2 ± 7 (ND-28)	ND	91 ± 102 (NC-400)	39 ± 24 (NC-78)	31 ± 22 (ND-76)	5.6 ± 1.4 (3.5-8.4)
<i>Trifolium</i> L. sp.	1	NC	NC	ND	ND	80	200	65	9.7
multifloral	25	54 ± 64 (NC-283)	169 ± 166 (28-863)	89 ± 111 (ND-485)	27 ± 51 (ND-197)	133 ± 90 (NC-310)	189 ± 170 (NC-632)	122 ± 89 (ND-331)	10.2 ± 2.5 (5.0-14.0)

* MEDIA ± SD, (V_{mín}-V_{máx})

En la Figura 56 se representan las distribuciones del contenido de los ácidos oxálico, fórmico, málico, succínico, acético, láctico, cítrico y glucónico agrupados según su espectro polínico.

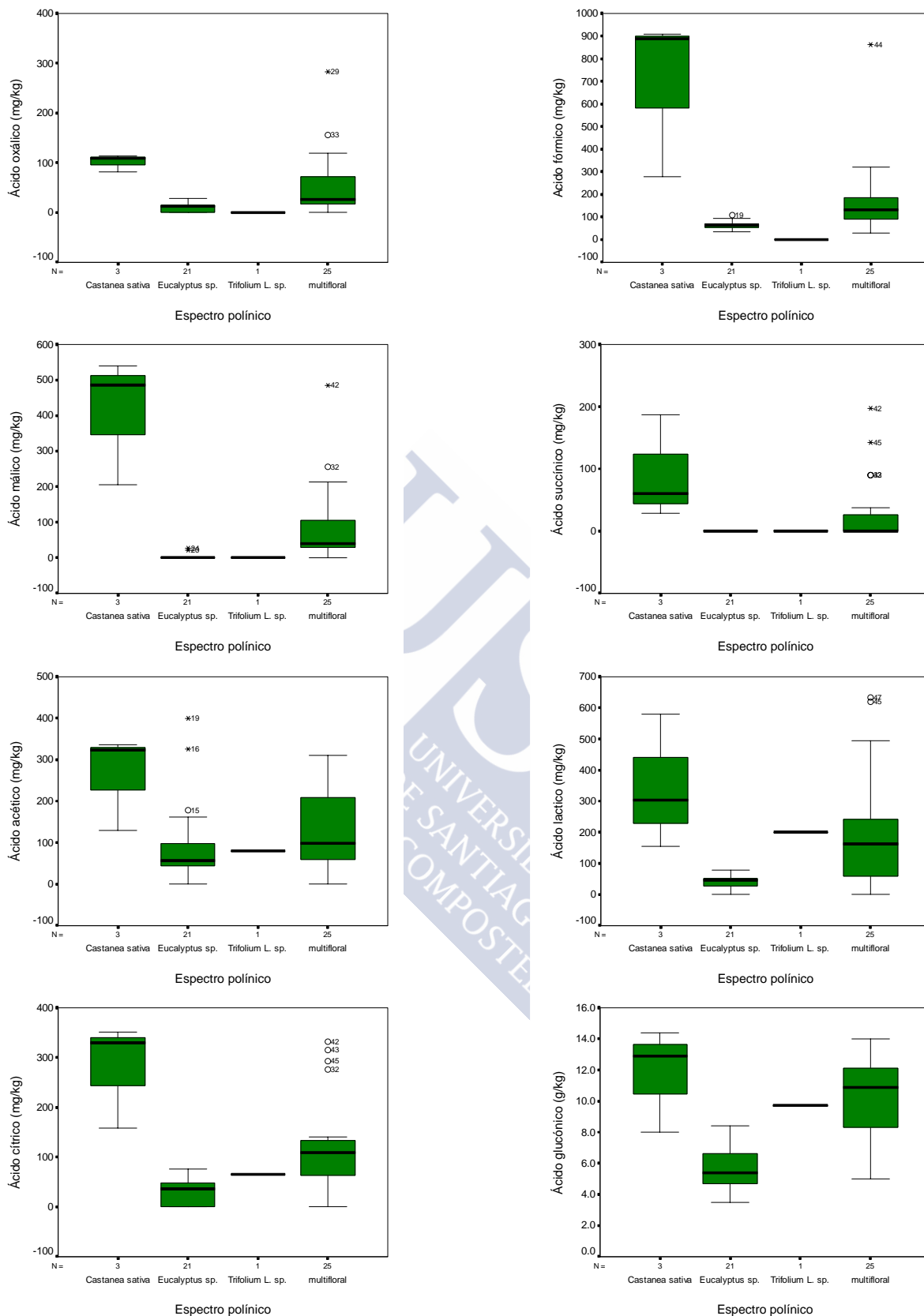


Figura 56. Distribuciones del contenido de los ácidos orgánicos determinados por electroforesis capilar (CE) en las mieles de Galicia con Denominación según el espectro polínico.

En cada gráfico de distribución de la figura anterior se observa lo siguiente:

Ácido oxálico: los resultados obtenidos para el ácido oxálico tanto en las mieles de *Castanea sativa* Miller como en las de *Eucalyptus* sp. se encuentran muy agrupados. Las muestras multiflorales tienen una mayor dispersión en los datos.

Ácido fórmico: La mayor dispersión en el contenido en ácido fórmico se produce en las mieles de *Castanea sativa* Miller y la menor en las de *Eucalyptus* sp. Este ácido no ha sido cuantificado en la única miel de *Trifolium* L. sp. analizada. Todas las mieles multiflorales poseen un contenido en este ácido inferior a 350 mg/kg salvo una muestra (Nº 44) que supera los 800 mg/kg. Esta miel presenta un porcentaje de pólenes de *Castanea sativa* Miller de aproximadamente un 87%.

Ácido málico: este ácido sólo se ha cuantificado en dos de las 21 mieles de *Eucalyptus* sp. analizadas y no se ha detectado en la miel de *Trifolium* L. sp. Las mieles multiflorales poseen un contenido en ácido málico inferior a 250 mg/kg salvo dos muestras (Nº 32 y 42) cuyo porcentaje en pólenes de *Castanea sativa* Miller es mayor del 60%. Sin embargo, como ya se comentó en el apartado 5.3.2.1.1.2., esto no indica que las muestras con elevado contenido en ácido málico tengan siempre un elevado porcentaje de pólenes de *Castanea sativa* Miller.

Ácido succínico: este ácido no se ha detectado o cuantificado en ninguna miel de *Eucalyptus* sp. ni de *Trifolium* L. sp. En el caso de las multiflorales este contenido es inferior a 50 mg/kg salvo cuatro muestras (Nº 32, 42, 43 y 45) que presentan unos valores similares a los de las muestras de *Castanea sativa* Miller. Las muestras Nº 32, 42 y 43 poseen un contenido en pólenes de *Castanea sativa* Miller mayor del 60% pero este porcentaje es del 31% en la muestra Nº 45. Por lo tanto, al igual que sucedía con el ácido málico, no es posible establecer una relación entre el contenido de este ácido y el porcentaje de pólenes de *Castanea sativa* Miller. Todas las mieles analizadas poseen un contenido en ácido succínico inferior a 200 mg/kg.

Ácido acético: el contenido de este ácido en todas las muestras de *Castanea sativa* Miller es superior a 100 mg/kg. Las muestras de *Eucalyptus* sp. poseen un contenido en ácido acético inferior a 200 mg/kg, salvo dos muestras (Nº 16 y 19) con un valor en este ácido muy superior. Las muestras multiflorales, por su parte, presentan la mayor dispersión de resultados.

Ácido láctico: existe una gran dispersión de los resultados obtenidos en las mieles de *Castanea sativa* Miller y multiflorales. Las muestras de *Eucalyptus* sp. se encuentran muy agrupadas y presentan un bajo contenido en ácido láctico.

Ácido cítrico: todas las muestras de *Eucalyptus* sp. y de *Trifolium* L. sp. presentan un contenido en ácido cítrico inferior a 100 mg/kg. Dentro de las muestras multiflorales, existen cuatro muestras (Nº 32, 42, 43 y 45) que presentan unos valores similares a los de las muestras de *Castanea sativa* Miller. Al igual que sucedía con el ácido succínico y como ya se ha comentado en los apartados 5.3.2.1.1.2. y 5.4.2.2.1.2. no es posible establecer una relación entre el contenido en este ácido y el porcentaje de pólenes de *Castanea sativa* Miller.

Ácido glucónico: la mayor parte de las muestras de *Eucalyptus* sp. poseen un contenido en ácido glucónico inferior a 8.0 g/kg. Por el contrario en la mayoría de las muestras del resto de los orígenes botánicos estudiados, el contenido es superior a 8.0 g/kg.

La Figura 57 consta de tres electroferogramas en los que se observan los perfiles de los ácidos orgánicos de una miel de *Castanea sativa* Miller (Nº 2), de una de *Eucalyptus* sp. (Nº 4) y de una multiflora (Nº 36), todas ellas mieles características procedentes de Galicia con Denominación.

La bibliografía consultada para los ácidos málico, succínico, cítrico y glucónico ya ha sido comentada en los apartados 5.3.2.1.1.2. (método enzimático) y 5.4.2.2.1.2. (método cromatográfico) por lo que, en este caso, se van a comparar los resultados obtenidos en este trabajo para los ácidos oxálico, fórmico, pirúvico y láctico con los existentes en la bibliografía manejada. Hay que destacar que no se han encontrado datos de la cuantificación del ácido acético en la miel.

En lo que se refiere al ácido oxálico, no se han encontrado datos en la bibliografía manejada de su contenido en las mieles de *Castanea sativa* Miller ni de *Trifolium* L. sp. El valor medio observado en las mieles de *Eucalyptus* sp. es inferior a los obtenidos por *Cossu y Alamanni (1999)* y *Alamanni et al. (2000)*, con valores medios de 44.79 y 11.53 mg/kg, respectivamente. Por el contrario, el promedio del contenido en ácido oxálico de las mieles multiflorales obtenido en este trabajo es superior a los obtenidos por *Cossu y Alamanni (1999)*, *Alamanni et al. (2000)* y *Del Nozal et al. (2000)* con valores que oscilan entre 13.58 y 48.36 mg/kg.

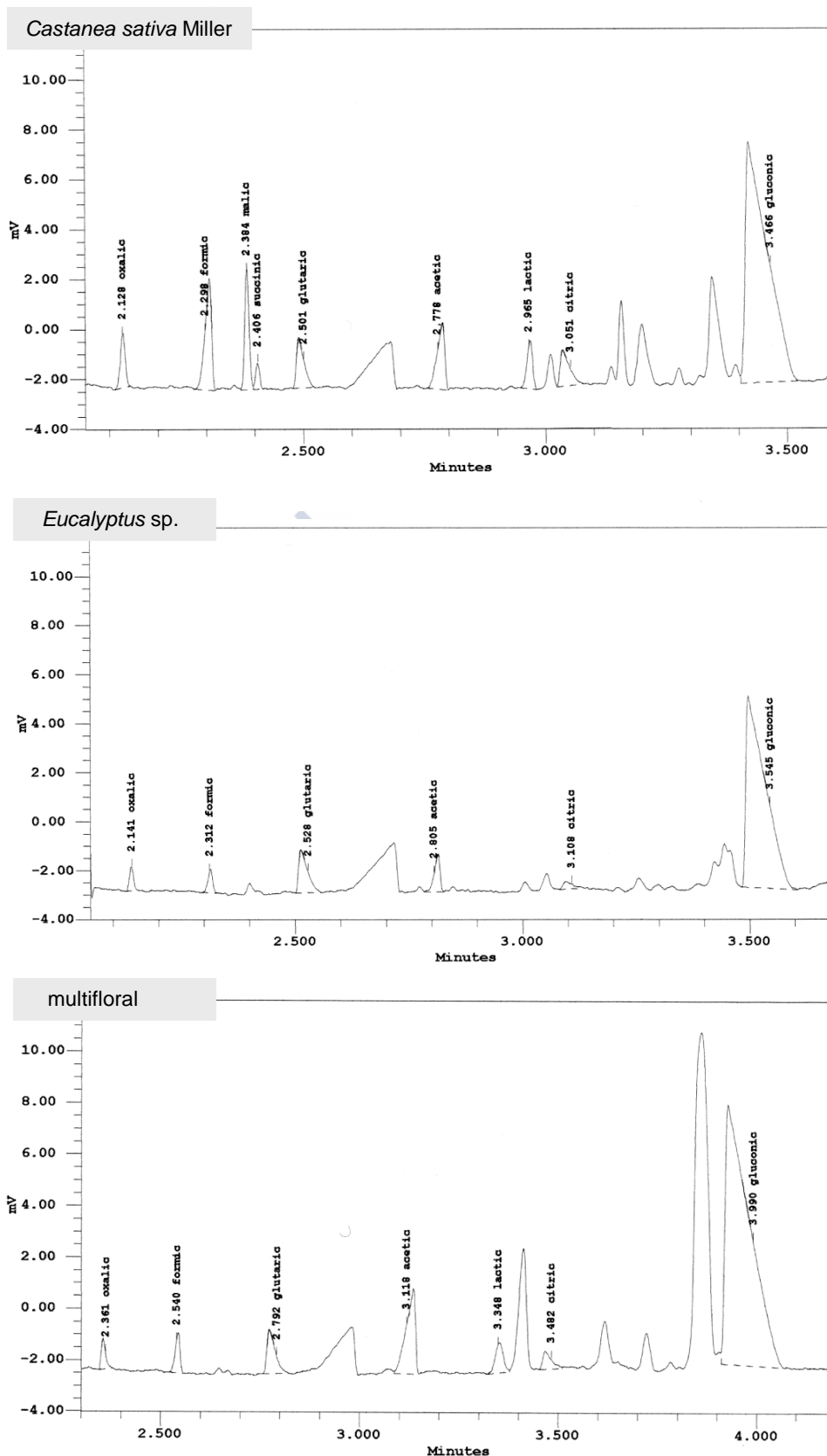


Figura 57. Electroferogramas de los ácidos orgánicos determinados por electroforesis capilar (CE) en las mieles de Galicia con Denominación de diferentes orígenes botánicos (el ácido glutárico se ha añadido a las muestras para realizar el cálculo de los tiempos de migración relativos).

En la bibliografía consultada, al igual que sucede en este trabajo, las mieles de *Castanea sativa* Miller poseen un contenido en ácido fórmico mucho mayor que las mieles florales de otras especies botánicas, con valores que oscilan entre 273 mg/kg y 679 mg/kg (Stoya et al., 1986; Talpay, 1989; Sabatini et al. (1994); Defilippi et al., 1995). El valor medio observado en las mieles de *Eucalyptus* sp. es superior a los obtenidos por Talpay (1989), Sabatini et al. (1994) y Alamanni et al. (2000), con valores medios comprendidos entre 14 y 20.7 mg/kg. En la miel analizada de *Trifolium* L. sp. no se ha cuantificado el ácido fórmico, aunque Talpay (1989) obtuvo una media de 18.9 mg/kg. Por último, el promedio del contenido de ácido fórmico de las mieles multiflorales obtenido en este trabajo es similar al encontrado por Defilippi et al. (1995), con un valor de 176 mg/kg y superior a los obtenidos por Talpay (1989) y Del Nozal et al. (1998), con valores de 31.8 y 94 mg/kg, respectivamente.

El ácido pirúvico se ha cuantificado, en este trabajo, en una única muestra de *Eucalyptus* sp. Sin embargo no es posible comparar este resultado con los obtenidos por otros autores porque no se han encontrado datos en la bibliografía manejada. Este ácido si se ha determinado en mieles multiflorales por Cherchi et al. (1994) y Del Nozal et al. (1998), con valores medios de 55.2 mg/kg y 19 mg/kg, respectivamente.

Por último, en cuanto al ácido láctico, el promedio encontrado en este trabajo para las mieles de *Castanea sativa* Miller es superior al obtenido por Sabatini et al. (1994) (235 mg/kg). El valor medio observado en las mieles de *Eucalyptus* sp. es muy inferior al obtenido por Sabatini et al. (1994) y Alamanni et al. (2000), con valores de 162 mg/kg y 127.13 mg/kg, respectivamente. No se han encontrado datos de su contenido en mieles de *Trifolium* L. sp. ni en las multiflorales.

5.5.2.2. MIELES PROCEDENTES DE OTRAS ZONAS DE ESPAÑA

En la Tabla LI se encuentran recogidos los resultados de la determinación por el método de electroforesis capilar (CE) de los ácidos oxálico, fórmico, málico, succínico, acético, láctico, cítrico y glucónico en las 25 mieles analizadas procedentes de otras zonas de España. El ácido pirúvico no se refleja en la tabla porque sólo aparece en las muestras Nº 17 (39 mg/kg) y Nº 23 (63 mg/kg), en el resto de las mieles, su contenido es inferior al límite de detección (LOD) o de cuantificación (LOQ). En esta tabla, también aparece la suma de todos los ácidos analizados en g/kg y la suma de los ácidos minoritarios, es decir, de todos los ácidos excepto el ácido glucónico, expresada también en g/kg.

Al igual que en las mieles de Galicia con Denominación, las cantidades de ácido fórmico fueron corregidas por el valor de recuperación obtenido (Tabla XLIV) porque el 100% de recuperación no se encuentra dentro del intervalo comprendido entre el valor medio de recuperación \pm intervalo de confianza.

Tabla LI. Contenido de los ácidos orgánicos determinados por electroforesis capilar (CE) en las mieles procedentes de otras zonas de España ordenadas según su espectro polínico

Número de muestra	Ácido oxálico (mg/kg)	Ácido fórmico (mg/kg)	Ácido málico (mg/kg)	Ácido succínico (mg/kg)	Ácido acético (mg/kg)	Ácido láctico (mg/kg)	Ácido cítrico (mg/kg)	Ácido glucónico (g/kg)	Suma todos ácidos sin glucónico (mg/kg)	Suma todos ácidos (g/kg)
1	NC	23	37	NC	ND	NC	129	2.3	188	2.5
2	NC	26	35	ND	NC	NC	114	2.6	175	2.8
3	66	47	36	NC	39	47	57	1.9	292	2.2
4	NC	28	NC	NC	NC	127	138	4.3	292	4.6
5	242	254	777	216	166	245	379	7.6	2278	9.9
6	120	90	275	158	40	47	255	4.6	984	5.6
7	23	114	80	NC	65	89	74	5.2	445	5.6
8	296	123	87	13	39	38	590	3.2	1186	4.4
9	129	78	26	24	NC	62	85	4.3	405	4.7
10	74	103	508	164	78	336	460	4.8	1723	6.5
11	346	93	37	ND	34	ND	395	2.8	905	3.7
12	36	44	147	129	NC	49	86	3.0	491	3.5
13	68	30	NC	NC	NC	NC	37	2.3	134	2.4
14	NC	NC	NC	16	NC	54	59	1.9	129	2.0
15	16	24	30	13	NC	30	54	2.6	166	2.8
16	19	24	21	NC	NC	32	45	3.1	141	3.2
17	83	88	474	151	79	183	454	6.1	1549	7.6
18	13	41	22	NC	NC	27	118	4.2	221	4.4
19	77	201	250	96	119	230	249	8.4	1223	9.6
20	107	238	535	117	109	172	723	5.7	2000	7.7
21	NC	30	46	NC	NC	30	107	3.5	214	3.7
22	64	77	113	54	55	238	141	5.6	742	6.3
23	100	239	437	298	148	681	622	8.6	2588	11.2
24	139	169	787	227	94	377	528	6.0	2321	8.3
25	69	72	330	366	49	288	593	4.5	1766	6.3
MEDIA	83	90	204	82	45	135	260	4.4	902	5.3
SD	92	75	246	107	51	161	221	1.9	808	2.6
RSD%	110	83	121	131	115	119	85	44	90	4.9
Vmín	NC	NC	NC	ND	ND	ND	37	1.9	129	2.0
Vmáx	346	254	787	366	166	681	723	8.6	2588	11.2

Los promedios obtenidos para los ácidos oxálico, fórmico, málico, succínico, acético, láctico, cítrico y glucónico son 83 mg/kg, 90 mg/kg, 204 mg/kg, 82 mg/kg, 45 mg/kg, 135 mg/kg, 260 mg/kg y 4.4 g/kg, respectivamente (Tabla LI). Según estos datos, aparte del ácido glucónico, los ácidos málico, láctico y cítrico son los que se encuentran en una mayor proporción en las mieles procedentes de otras zonas de España.

En la Tabla LI, también se puede comprobar como en 14 de las 25 mieles procedentes de otras zonas de España (Nº 3, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 17, 19, 20, 22, 23, 24 y 25), la contribución del contenido de todos los ácidos orgánicos excepto el glucónico (ácidos minoritarios) es $\geq 10\%$ aunque en ningún caso supera el 30%. En el resto de las muestras el ácido glucónico representa más del 90% del contenido de los ácidos orgánicos totales.

Los valores medios del contenido de los ácidos oxálico, málico, succínico y cítrico de las mieles procedentes de otras zonas de España analizadas por el método propuesto de electroforesis capilar son *mayores* que los obtenidos en las mieles de Galicia con Denominación analizadas, con valores de 37, 70, 19 y 92 mg/kg, respectivamente (Tabla XLVIII). Por el contrario, los valores medios del contenido de los ácidos fórmico, acético y glucónico de las mieles procedentes de otras zonas de España son *menores* que los obtenidos en las mieles de Galicia con Denominación analizadas, con valores de 152 mg/kg, 122 mg/kg y 8.3 g/kg, respectivamente (Tabla XLVIII). El ácido láctico es similar en ambos grupos de muestras.

En la Figura 58 se presentan los porcentajes de las muestras en las que cada uno de los ácidos orgánicos determinados por el método propuesto de electroforesis capilar aparece como no detectable (ND), no cuantificable (NC) y presente. Se observa que los ácidos glucónico y cítrico se encuentran en todas las muestras mientras que el ácido pirúvico es el que se encuentra en un menor número de muestras.

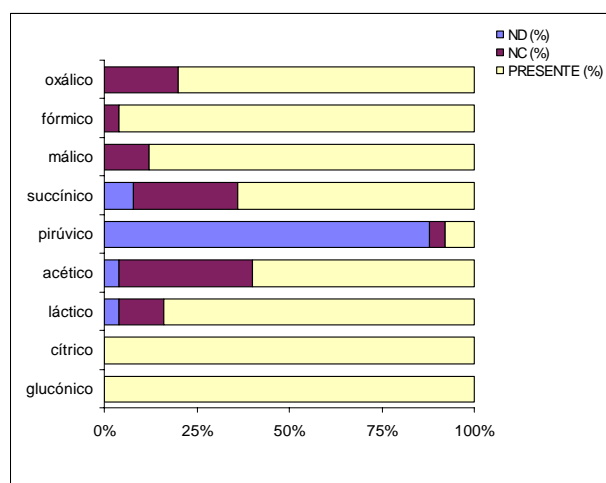


Figura 58. Porcentaje de muestras procedentes de otras zonas de España en las que cada uno de los ácidos orgánicos determinados por el método de electroforesis capilar (CE) aparece como no detectable (ND), no cuantificable (NC) y presente.

En la Figura 59 se representan las distribuciones del contenido de los ácidos oxálico, fórmico, málico, succínico, acético, láctico, cítrico y glucónico de las mieles analizadas procedentes de otras zonas de España.

Al igual que sucedía con las muestras de Galicia con Denominación, las distribuciones del contenido de los ácidos orgánicos en las mieles procedentes de otras zonas de España están muy desplazadas hacia la izquierda, es decir presentan valores bastante bajos de ácidos orgánicos. En este caso esto es particularmente importante en los ácidos málico (el 56% de las muestras con un contenido entre 0 y 100 mg/kg), succínico (el 56% de las muestras con un contenido entre 0 y 50 mg/kg) y láctico (el 60% de las muestras con un contenido entre 0 y 100 mg/kg).



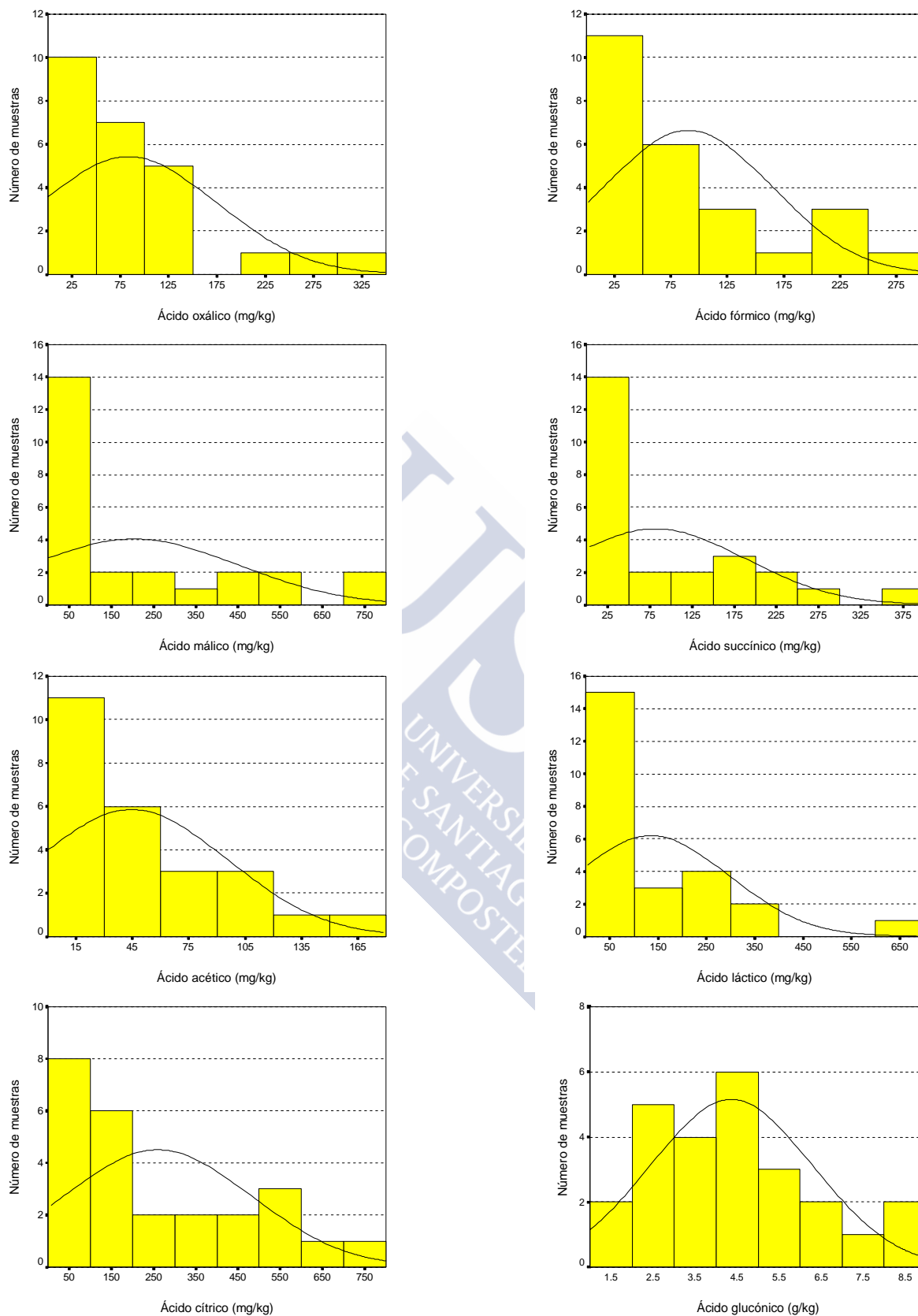


Figura 59. Distribuciones del contenido de los ácidos orgánicos determinados por electroforesis capilar (CE) en las mieles procedentes de otras zonas de España.

La Tabla LII muestra los estadísticos del contenido de los ácidos oxálico, fórmico, málico, succínico, acético, láctico, cítrico y glucónico agrupados según el espectro polínico. Como ya se ha comentado, las dos mieles con ácido pirúvico son las N° 17 y 23, cuyos espectros polínicos son doblemente monofloral de *Rosmarinus* sp. y *Trifolium* L. sp. (39 mg/kg) y multifloral (63 mg/kg), respectivamente.

Tabla LII. Estadísticos del contenido de los ácidos orgánicos determinados por electroforesis capilar (CE) en las mieles procedentes de otras zonas de España agrupados según el espectro polínico

Espectro polínico	N	Ácido oxálico (mg/kg)	Ácido fórmico (mg/kg)	Ácido málico (mg/kg)	Ácido succínico (mg/kg)	Ácido acético (mg/kg)	Ácido láctico (mg/kg)	Ácido cítrico (mg/kg)	Ácido glucónico (g/kg)
<i>Citrus</i> sp.	2	NC	25 ± 2 (23-26)	36 ± 1 (35-37)	ND	ND	NC	122 ± 11 (114-129)	2.5 ± 0.2 (2.3-2.6)
<i>Diplotaxis</i> sp.	1	66	47	36	NC	39	47	57	1.9
<i>Echium</i> sp.	1	NC	28	NC	NC	NC	127	138	4.3
<i>Erica</i> sp.	1	242	254	777	216	166	245	379	7.6
<i>Eucalyptus</i> sp.	2	72 ± 69 (23-120)	102 ± 17 (90-114)	178 ± 138 (80-275)	79 ± 112 (NC-158)	53 ± 18 (40-65)	68 ± 30 (47-89)	165 ± 128 (74-255)	4.9 ± 0.4 (4.6-5.2)
<i>Lavandula</i> sp.	3	166 ± 116 (74-296)	101 ± 23 (78-123)	207 ± 262 (26-508)	67 ± 84 (13-164)	39 ± 39 (NC-78)	145 ± 166 (38-336)	378 ± 262 (85-590)	4.1 ± 0.8 (3.2-4.8)
<i>Rosmarinus</i> sp.	6	81 ± 132 (NC-346)	36 ± 31 (NC-93)	39 ± 55 (NC-147)	26 ± 51 (ND-129)	6 ± 14 (NC-34)	28 ± 23 (ND-54)	113 ± 139 (37-395)	2.6 ± 0.5 (1.9-3.1)
<i>Rosmarinus</i> sp. y <i>Trifolium</i> L. sp.	1	83	88	474	151	79	183	454	6.1
multifloral	6	60 ± 45 (NC-107)	138 ± 99 (30-239)	234 ± 213 (22-535)	94 ± 111 (NC-298)	72 ± 63 (NC-148)	230 ± 240 (27-681)	327 ± 274 (107-723)	6.0 ± 2.1 (3.5-8.6)
multifloral y de mielada	2	104 ± 50 (69-139)	121 ± 69 (72-169)	559 ± 323 (330-787)	297 ± 98 (227-366)	72 ± 32 (49-94)	333 ± 63 (288-377)	561 ± 46 (528-593)	5.3 ± 1.1 (4.5-6.0)

* MEDIA ± SD, (Vmin-Vmáx)

En la tabla anterior, se pone de manifiesto la gran variabilidad que existe en el contenido de ácidos orgánicos en las muestras analizadas, incluso dentro de cada una de las especies botánicas.

Una característica común es que la miel doblemente monofloral de *Rosmarinus* sp. y *Trifolium* L. sp. presenta un contenido en todos los ácidos analizados, salvo el ácido oxálico, mucho mayor que las muestras monoflorales de *Rosmarinus* sp. Este mismo comportamiento ya se ha comentado al estudiar los parámetros físico químicos (conductividad eléctrica, pH y tipos de acidez) y los ácidos orgánicos determinados por el método enzimático y HPLC.

Al observar los resultados de cada ácido individualmente en la tabla anterior se pone de manifiesto lo siguiente:

Ácido oxálico: las mieles de *Citrus* sp. y *Echium* sp. analizadas poseen un contenido en este ácido inferior al límite de cuantificación. El mayor promedio de contenido en ácido oxálico lo presentan las mieles de *Lavandula* sp.

Ácido fórmico: todas las muestras de *Citrus* sp., *Diplotaxis* sp., *Echium* sp., *Rosmarinus* sp. y la doblemente monofloral de *Rosmarinus* sp. y *Trifolium* L. sp. presentan un contenido inferior a 100 mg/kg. Por el contrario la miel de *Erica* sp. y algunas multiflorales sobrepasan los 200 mg/kg de ácido fórmico.

Ácido málico: las muestras de *Citrus* sp., *Diplotaxis* sp. y *Rosmarinus* sp. presentan un promedio bajo y muy similar de contenido en ácido málico. Este ácido no se ha cuantificado en la miel de *Echium* sp. Las mieles con mayor contenido en ácido málico son la miel de *Erica* sp. y una de las mieles de bosque (multifloral y de mielada) con unos contenidos superiores a los 750 mg/kg.

Ácido succínico: las mieles de *Citrus* sp., *Diplotaxis* sp. y *Echium* sp. presentan un contenido inferior al límite de detección o de cuantificación. Las mieles con mayor variabilidad en el contenido de este ácido son las mieles multiflorales.

Ácido acético: no es detectable en las mieles de *Citrus* sp. ni cuantificable en la de *Echium* sp. Todas las demás muestras, salvo la miel de *Erica* sp. y alguna multifloral, poseen un contenido en ácido acético inferior a 100 mg/kg.

Ácido láctico: las mieles de *Citrus* sp. tienen un contenido en este ácido inferior al límite de cuantificación del método. El mayor valor medio se observa en las mieles de bosque (multifloral y de mielada).

Ácido cítrico: hay que destacar que este ácido ha sido cuantificado en todas las muestras analizadas. Las muestras multiflorales son las que presentan una mayor variabilidad en el contenido en ácido cítrico presentando una de ellas el mayor contenido de todas las muestras analizadas. Las mieles de bosque poseen el mayor valor medio de este ácido.

Ácido glucónico: todas las muestras de *Citrus* sp., *Diplotaxis* sp. y *Rosmarinus* sp. poseen un contenido inferior a 3.5 g/kg. La mayor variabilidad en el contenido de este ácido se produce, de nuevo, en las mieles multiflorales.

La Figura 60 consta de tres electroferogramas en los que se observan los perfiles de los ácidos orgánicos de una miel de *Citrus* sp. (Nº 1), de una de *Lavandula* sp. (Nº 10) y de una de *Rosmarinus* sp. (Nº 12), todas ellas mieles características procedentes de otras zonas de España.

La bibliografía consultada para los ácidos málico, succínico, cítrico y glucónico ya ha sido comentada en los apartados 5.3.2.1.2. (método enzimático) y 5.4.2.2.2. (método HPLC) por lo que, al igual que sucedía con las mieles de Galicia con Denominación, se van a comparar los resultados obtenidos en este trabajo para los ácidos oxálico, fórmico, pirúvico y láctico con los existentes en la bibliografía manejada. Hay que destacar que no se han encontrado datos de la cuantificación del ácido acético en la miel.

No se han encontrado datos en la bibliografía consultada del contenido de ninguno de los ácidos orgánicos analizados en las mieles monoflorales de *Diplotaxis* sp. y *Echium* sp., en la miel doblemente monofloral de *Rosmarinus* sp. y *Trifolium* L. sp. ni en la miel de bosque (multifloral y de mielada).

En este trabajo, el ácido oxálico no se ha cuantificado en las mieles de *Citrus* sp. mientras que en otros estudios se han encontrado valores de 28.95 mg/kg (Cossu y Alamanni, 1999) y 9.21 mg/kg (Alamanni et al., 2000). La miel de *Erica* sp. analizada presenta un contenido en este ácido muy superior al obtenido por Del Nozal et al. (2000) (71 mg/kg). Los valores medios obtenidos en este trabajo para las mieles de *Eucalyptus* sp., *Lavandula* sp., *Rosmarinus* sp. y multiflorales son superiores a los obtenidos por otros autores (Cossu y Alamanni, 1999; Alamanni et al., 2000; Del Nozal et al., 2000).

En lo que se refiere al ácido fórmico, el valor medio de las mieles de *Citrus* sp. analizadas en este trabajo es superior al encontrado por Sabatini et al. (1994), con un valor de 14 mg/kg. La miel de *Erica* sp. analizada presenta un contenido de ácido fórmico similar a los obtenidos por Talpay (1989) y Del Nozal et al. (1998), con valores de 253.6 y 236 mg/kg, respectivamente. El valor medio encontrado para las mieles de *Eucalyptus* sp. es muy superior a los obtenidos por Talpay (1989), Sabatini et al. (1994) y Alamanni et al. (2000), con valores que oscilan entre 14 y 20.7 mg/kg, respectivamente. El promedio de las mieles de *Lavandula* sp. analizadas se encuentra entre los obtenidos por Alamanni et al. (2000) (21.60 mg/kg) y Del Nozal et al. (1998) (168 mg/kg). En las mieles de *Rosmarinus* sp. el valor medio obtenido en este trabajo es inferior al encontrado por Del Nozal et al. (1998) (75 mg/kg). Por último, en las mieles multiflorales, el contenido en ácido fórmico obtenido es inferior al encontrado por Defilippi et al. (1995) (176 mg/kg) pero superior a los observados por Talpay (1989) (31.8 mg/kg) y Del Nozal et al. (1998) (94 mg/kg).

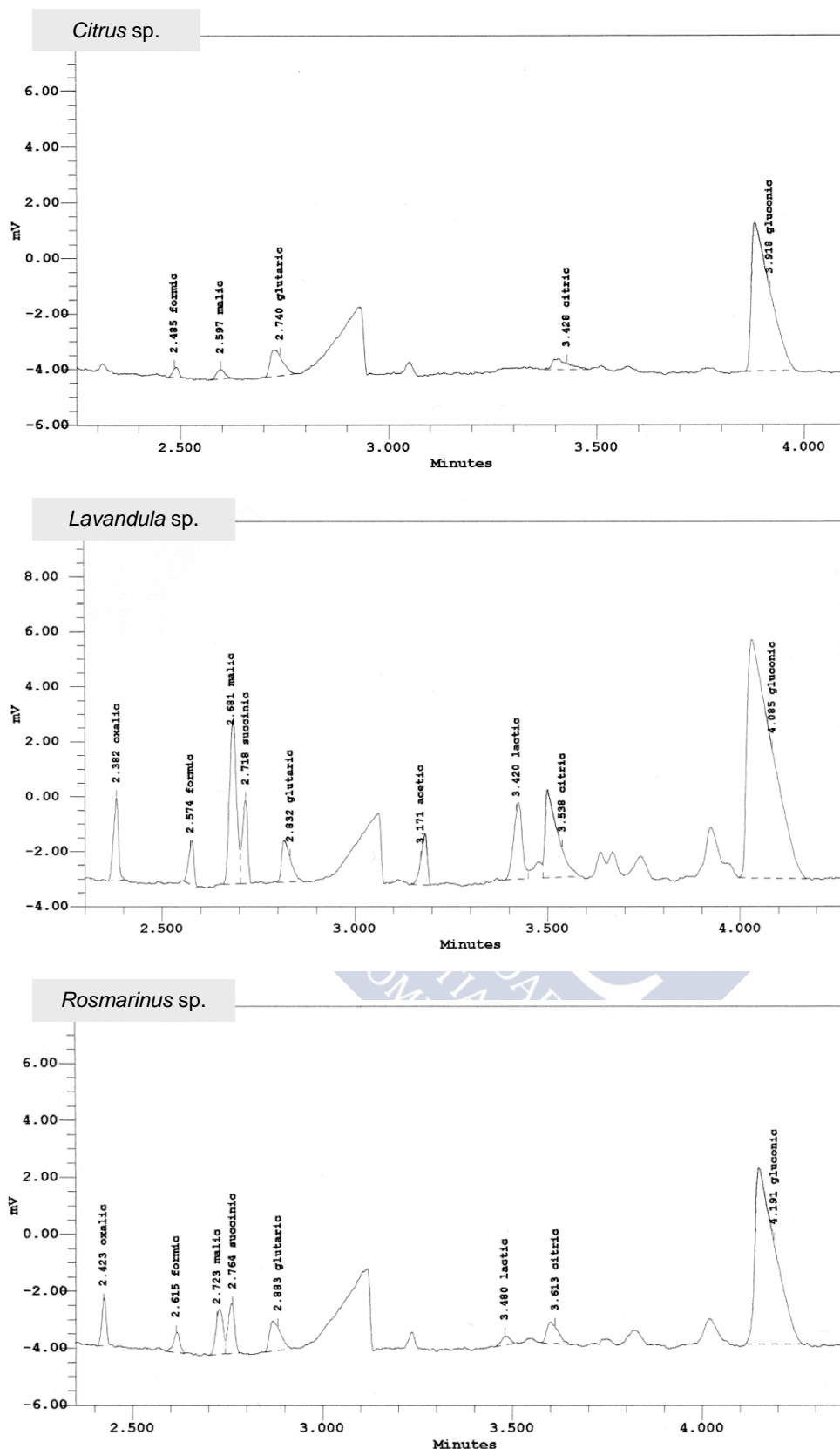
















Figura 60. Electroferogramas de los ácidos orgánicos determinados por electroforesis capilar (CE) en las mieles procedentes de otras zonas de España de diferentes orígenes botánicos (el ácido glutárico se ha añadido a las muestras para realizar el cálculo de los tiempos de migración relativos).

Como ya se ha comentado, el ácido pirúvico se ha cuantificado en dos muestras, una doblemente monofloral de *Rosmarinus* sp. y *Trifolium* L. sp. (39 mg/kg) y otra multifloral (63 mg/kg). *Cherchi et al. (1994)* y *Del Nozal et al. (1998)* obtuvieron para las mieles multiflorales valores de 55.2 mg/kg y 19 mg/kg, respectivamente.

Por último, en cuanto al ácido láctico, no se han encontrado datos de su contenido en las mieles de *Erica* sp., *Rosmarinus* sp. ni en las multiflorales. El contenido de ácido láctico en las mieles de *Citrus* sp. analizadas en este trabajo se encuentra por debajo del límite de cuantificación, aunque *Sabatini et al. (1994)* lo determinó obteniendo un valor de 201 mg/kg. El valor medio observado en las mieles de *Eucalyptus* sp. es muy inferior al obtenido por *Sabatini et al. (1994)* y *Alamanni et al. (2000)*, con valores de 162 mg/kg y 127.13 mg/kg, respectivamente. El promedio del contenido en ácido láctico de las mieles de *Lavandula* sp. es, también, inferior al encontrado por *Alamanni et al. (2000)* (186.84 mg/kg).



5.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-  <http://www.waters.com>
-  ACKERMANS, M. T.; ACKERMANS-LOONEN, J. C. J. M.; BECKERS, J. L. Determination of propionate in bread using capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr.* **1992**, 627, 273-279.
-  ACS COMMITTEE ON ENVIRONMENTAL IMPROVEMENT. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Anal. Chem.* **1980**, 52, 2242-2249.
-  ALAMANNI, M. C.; COSSU, M.; SANNA, F. Un metodo HPLC per il dosaggio degli acidi ossalico, lattico e formico quali acaricidi e componenti naturali nel miele. *La Rivista di Scienza dell'Alimentazione.* **2000**, 29 (2), 139-147.
-  ALTRIA, K. D. Optimization of sensitivity in capillary electrophoresis. *LC GC-Mag. Sep. Sci.* **1999**, 17 (1), 28, 30, 32, 34-35.
-  ANDERSON, D. L.; TRUEMAN, J. W. H. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Exp. Appl. Acarol.* **2000**, 24, 165-189.
-  ANDRADE, P.; FERRERES, F.; GIL, M. I.; TOMAS-BARBERAN, F. A. Determination of phenolic compounds in honeys with different floral origin by capillary zone electrophoresis. *Food Chem.* **1997**, 60 (1), 79-84.
-  ANKLAM, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem.* **1998**, 63 (4), 549-562.
-  AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). *Official Methods of Analysis.* 16th ed., 5th rev.; Arlington: VA, USA, **1999**.
-  ARELLANO, M.; ANDRIANARY, J.; DEDIEU, F.; COUDERC, F.; PUIG, P. H. Method development and validation for the simultaneous determination of organic and inorganic acids by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* **1997a**, 765, 321-328.
-  ARELLANO, M.; COUDERC, F.; PUIG, P. H. Simultaneous separation of organic and inorganic acids by capillary zone electrophoresis. Application to wines and fruit juices. *Am. J. Enol. Viticult.* **1997b**, 48 (4), 408-412.
-  BARBAS, C.; LUCAS-GARCÍA, J. A.; GUTIÉRREZ-MAÑERO, F. J. Separation and identification of organic acids in root exudates of *Lupinus luteus* by capillary zone electrophoresis. *Phytochemical analysis.* **1999**, 10, 55-59.
-  BODEN, J.; HAUMANN, I.; MAINKA, A. Anwendung der Kapillarelektrophorese in der Lebensmittelanalytik. *GIT Labor-Fachzeitschrift.* **2000**, 44 (8), 924-927.
-  BOE (BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO). Real Decreto 1049/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Norma de calidad relativa a la miel. Madrid. España. **2003**.

- BOEHRINGER-MANNHEIM GmbH. *Methods of Enzymatic BioAnalysis and Food Analysis using Test-Combinations*. D-Gluconic acid / D-Glucono- δ -lactone Cat. N° 428 191; Citric acid Cat. N° 139 076; L-Malic acid Cat. N° 139 068. PO Box 310120 Mannheim, Germany. **1995**, pp. 2-5; 42-44; 22-25; 98-100.
- BOGDANOV, S. Characterisation of antibacterial substances in honey. *Lebensm.-Wis. u.-Technol.* **1984**, 17, 74-76.
- BOGDANOV, S. Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *Lebensm.-Wis. u.-Technol.* **1997**, 30, 748-753.
- BOGDANOV, S.; CHARRIÈRE, J.-D.; IMDORF, A.; KILCHENMANN, V.; FLURI, P. Determination of residues in honey after treatments with formic and oxalic acid under field conditions. *Apidologie*. **2002**, 33, 399-409.
- BRUNET, R. M. Principios y aplicaciones de la electroforesis capilar al análisis de iones. *Técnicas de laboratorio*. **1992**, 14(169), 114-119.
- BUCHBERGER, W.; KLAMPFL, C. W.; EIBENSTEINER, F.; BUCHGRABER, K. Determination of fermenting acids in silage by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*. **1997**, 766, 197-203.
- CALDERONE, N. W. Evaluation of formic acid and a thymol-based blend of natural products for the fall control of *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) in colonies of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* **1999**, 92 (2), 253-260.
- CALDERONE, N. W. Effective fall treatment of *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) with a new formulation of formic acid in colonies of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in the Northeastern United States. *J. Econ. Entomol.* **2000**, 93 (4), 1065-1075.
- CAMILLERI, P. History and development of capillary electrophoresis. En: *Capillary Electrophoresis. Theory and practice*. 2nd edition. (Camilleri, P.). Ed. CRC Press LLC. Boca Raton. Florida. USA. **1998**. pp. 1-22.
- CASELLA, I. G.; GATTA, M. Determination of electroactive organic acids by anion-exchange chromatography using a copper modified electrode. *J. Chromatogr. A*. **2001**, 912, 223-233.
- CASTIÑEIRA, A.; PEÑA, R. M.; HERRERO, C.; GARCÍA-MARTÍN, S. Simultaneous determination of organic acids in wine samples by capillary electrophoresis and UV detection: optimization with five different background electrolytes. *HRC-J. High Res. Chrom.* **2000**, 23 (11), 647-652.
- CASTIÑEIRA, A.; PEÑA, R. M.; HERRERO, C.; GARCÍA-MARTÍN, S. Analysis of organic acids in wine by capillary electrophoresis with direct UV detection. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2002**, 15 (3), 319-331.
- CASTRO, R.; MORENO, M. V. G.; NATERA, R.; GARCÍA-ROWE, F.; HERNÁNDEZ, M. J.; BARROSO, C. G. Comparative analysis of the organic acid content of vinegar by capillary electrophoresis and ion-exclusion chromatography with conductimetric detection. *Chromatographia*. **2002**, 56 (1/2), 57-61.

- 📖 CENDÓN, V. *Determinación de los ácidos orgánicos en la miel por electroforesis capilar*. Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Área de Nutrición y Bromatología. Universidad de Santiago de Compostela. España. **1997**.
- 📖 CHEN, Z.; TANG, C.; YU, J. C. Simultaneous determination of inorganic anions and organic acids in environmental samples by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection. *HRC-J. High Res. Chrom.* **1999**, 22 (7), 379-385.
- 📖 CHEN, T. B.; DENG, W. H.; LU, W. H.; CHEN, R. M.; RAO, P. F. Detection of residual antibiotics in honey by capillary electrophoresis. *Sepu.* **2001**, 19 (1), 91-93.
- 📖 CHERCHI, A.; SPANEDDA, L.; TUBEROSO, C.; CABRAS, P. Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of organic acids in honey. *J. Chromatogr. A.* **1994**, 669 (1-2), 59-64.
- 📖 CHERCHI, A.; PORCU, M.; SPANEDDA, L.; TUBEROSO, C. I. G.; COSENTINO S.; PALMAS F. Individuazione di parametri utili per la caratterizzazione e la valorizzazione di mieli tipici della Sardegna: asfodelo, cardo e corbezzolo. *La Rivista di Scienza dell'Alimentazione.* **1995**, 24 (4), 523-534.
- 📖 CHIARI, M.; DELL'ORTO, N.; CASELLA, L. Separation of organic acids by capillary zone electrophoresis in buffers containing divalent metal cations. *J. Chromatogr. A.* **1996**, 745, 93-101.
- 📖 COPPOLA, E. D.; CONRAD, E. C.; COTTER, R. High Pressure Liquid Chromatographic determination of major organic acids in cranberry juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1978**, 61 (6), 1490-1492.
- 📖 COPPOLA, E. D.; STARR, M. S. Liquid chromatographic determination of major organic acids in apple juice and cranberry juice cocktail: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1986**, 69 (4), 594-597.
- 📖 COSSU, M.; ALAMANNI, M. C. Possibilità di impiego di una metodica enzimatica per la determinazione dell'acido ossalico in campioni di miele della Sardegna. *La Rivista di Scienza dell'Alimentazione.* **1999**, 28 (3), 315-319.
- 📖 CRANE, E. The traditional hive products: honey and beeswax. En: *Bees and Beekeeping. Science, practice and world resources*. Ed. Heinemann Newnes, Oxford. UK. **1990**. pp. 388-451.
- 📖 CRC HANDBOOK OF CHEMISTRY AND PHYSICS. A ready-reference book of chemical and physical data. 82nd edition. (Lide, D. R.). Ed. CRC Press. Boca Raton. Florida. USA. **2001**.
- 📖 CRUCES, C. *Electroforesis capilar*. Monografías. Ciencias Nº 4. Ed. Servicio de Publicaciones. Universidad de Almería. Almería. España. **1998**.

- DAHLÉN, J.; HAGBERG, J.; KARLSSON, S. Analysis of low molecular weight organic acids in water with capillary zone electrophoresis employing indirect photometric detection. *Fresen J. Anal. Chem.* **2000**, 366 (5), 488-493.
- DANIELS, R. S.; HAMID, A.; ROGERS, R. E. L.; MACKENZIE, K. Membrane-barrier delivery of formic acid, a chemical used for mite control on honey bees (*Apis mellifera*). *J. Apic. Res.* **1999**, 38 (1-2), 63-69.
- DEFILIPPI, A.; PIANCONE, G.; PRANDTATTER, A.; TIBALDI, G. P. Honey quality: determination of formic acid by ion chromatography. *Ind. Aliment.-Italy.* **1995**, 34 (33), 495-497.
- DEL NOZAL, M. J.; BERNAL, J. L.; MARINERO, P.; DIEGO, J. C.; FRECHILLA, J. I.; HIGES, M.; LLORENTE, J. High performance liquid chromatographic determination of organic acids in honey from different botanical origin. *J. Liq. Chromatogr. & Relat. Techn.* **1998**, 21 (20), 3197-3214.
- DEL NOZAL, M. J.; BERNAL, J. L.; DIEGO, J. C.; GÓMEZ, L. A.; RUIZ, J. M.; HIGES, M. Determination of oxalate, sulfate and nitrate in honey and honeydew by ion-chromatography. *J. Chromatogr. A.* **2000**, 881, 629-638.
- DELGADO, C.; TOMAS-BARBERÁN, F. A.; TALOU, T.; GASET, A. Capillary electrophoresis as an alternative to HPLC for determination of honey flavonoids. *Chromatographia.* **1994a**, 38 (1-2), 71-78.
- DELGADO, C.; TALOU, T.; GASET, A. Capillary electrophoresis: Application and development in the domain of the food science and agrosresource industry. *Spectra Anal.* **1994b**, 23 (181), 42-46.
- DEVÊVRE, O.; PUTRA, D. P.; BOTTON, B.; GARBAYE, J. Sensitive and selective method for the separation of organic acids by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* **1994**, 679, 349-357.
- DEVRIES, K. J. Determination of organic acids in beer by capillary electrophoresis. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **1993**, 51, 155-157.
- DUSTMANN, J. H. Antibacterial effect of honey. *Apiacta.* **1979**, 14, 7-11.
- ECHIGO, T.; TAKENAKA, T. Production of organic acids in honey by honeybees. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi.* **1974**, 48 (4), 225-230.
- ESHBAH, H. M.; AHMED, F. F. Screening certain natural products and organic acids for controlling Varroa mite (*Varroa jacobsoni* Oudemans). *Shashpa.* **1994**, 1 (1), 53-62.
- FERRERES, F.; ANDRADE, P.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Natural occurrence of abscisic acid in heather honey and floral nectar. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 2053-2056.
- FRANKEL, S.; ROBINSON, G. E.; BERENBAUM, M. R. Antioxidant content and correlated characteristics of 14 monofloral honeys. *J. Apic. Res.* **1998**, 37, 27-31.

- 📖 FRIES, I. Short-interval treatments with formic acid for control of *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies in cold climates. *Swed. J. Agric. Res.* **1989**, 19 (4), 213-216.
- 📖 FUKUSHI, K.; TAKEDA, S.; WAKIDA, S-I; YAMANE, M.; HIGASHI, K.; HIRO, K. Determination of ascorbic acid in vegetables by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* **1997**, 772, 313-320.
- 📖 GALLI, V.; OLMO, N.; BARBAS, C. Development and validation of a capillary electrophoresis method for the measurement of short-chain organic acids in natural rubber latex. *J. Chromatogr. A.* **2000**, 894, 135-144.
- 📖 GALLI, V.; OLMO N.; BARBAS, C. Capillary electrophoresis for the determination of new markers of natural latex quality. *J. Chromatogr. A.* **2002**, 949, 367-372.
- 📖 GANCEDO, M. C.; LUH, B. S. HPLC analysis of organic acids and sugars in tomato juice. *J. Food Sci.* **1986**, 51 (3), 571- 573.
- 📖 GARCÍA-MORENO, M. V.; JURADO-CAMPOY, C. J.; GARCÍA-BARROSO, C. Method devised for determining low molecular weight organic acids in vinic samples by capillary electrophoresis: validation of the method with real samples. *Eur. Food Res. Technol.* **2001**, 213, 381-385.
- 📖 GHELDOF, N.; ENGESETH, N. J. 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. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 3050-3055.
- 📖 GHELDOF, N.; WANG, X.-H.; ENGESETH, N. J. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 5870-5877.
- 📖 GOIFFON, J. P.; BLACHERE, A.; REMINIAC, C. Dosage des acides organiques du vin par chromatographie en phase liquide. *Analisis.* **1985**, 13 (5), 218-225.
- 📖 GÓMEZ-BÁREZ, J. A.; GARCÍA-VILLANOVA, R. J.; ELVIRA-GARCÍA, S.; RIVAS-PALÁ, T.; GONZÁLEZ-PARAMÁS, A. M.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, J. Geographical discrimination of honeys through the employment of sugar patterns and common chemical quality parameters. *Eur. Food Res. Technol.* **2000**, 210, 437-444.
- 📖 GONNET, M. *Le miel. Composition, propriétés et conservation.* 2^{ème} edition. Ed. Opida, I.N.R.A. Station expérimentale d'apiculture. Montfavet. La France. **1982**. pp. 1-30.
- 📖 GONZÁLEZ-PARAMÁS, A. M.; GÓMEZ-BÁREZ, J. A.; GARCÍA-VILLANOVA, R. J.; RIVAS-PALÁ, T.; ARDANUY-ALBÁJAR, R.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, J. Geographical discrimination of honeys by using mineral composition and common chemical quality parameters. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80, 157-165.
- 📖 GORDON, M. J.; HUANG, X.; PENTONEY, S. L. Jr.; ZARE, R. N. Capillary electrophoresis. *Science.* **1988**, 242, 224-228.
- 📖 GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 305A-309A.

- 📖 GREGORC, A.; PLANINC, I. Acaricidal effect of oxalic acid in honeybee (*Apis mellifera*) colonies. *Apidologie*. **2001**, 32, 333-340.
- 📖 HANSEN, H.; GULDBORG, M. Residues in honey and wax after treatment of bee colonies with formic acid. *Tidsskr. Planteavl.* **1988**, 92 (1), 1-10.
- 📖 HEIGER, D. N. *High Performance Capillary Electrophoresis – An Introduction*. 2nd edition. Ed. Hewlett Packard Company, France. **1992**.
- 📖 HEIGER, D.; WEINBERGER, R. Determination of small ions by capillary zone electrophoresis with indirect photometric detection. *Hewlett Packard Application Note 12-5963-1138E*. **1994**.
- 📖 HOOD, W. M.; McCREADIE, J. W. Field tests of the Varroa Treatment Device using formic acid to control *Varroa destructor* and *Acarapis woodi*. *J. Agric. Urban Entomol.* **2001**, 18 (2), 87-96.
- 📖 HORIE, H.; YAMAUCHI, Y.; KOHATA, K. Analysis of organic anions in tea infusions using capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*. **1998**, 817 (1-2), 139-144.
- 📖 HORVATH, K.; MOLNÁR-PERL, I. Simultaneous GC-MS quantitation of o-phosphoric, aliphatic and aromatic carboxylic acids, proline, hydroxymethylfurfural and sugars as their TMS derivatives: in honeys. *Chromatographia*. **1998**, 48 (1-2), 120-126.
- 📖 HUANG, X.; LUCKEY, J. A.; GORDON, M. J.; ZARE, R. N. Quantitative analysis of low molecular weight carboxylic acids by capillary zone electrophoresis/conductivity detection. *Anal. Chem.* **1989**, 61, 766-770.
- 📖 HUNTER, J. J.; VISSER, J. H.; DE VILLIERS, O. T. Preparation of grapes and extraction of sugars and organic acids for determination by High Performance Liquid Chromatography. *Am. J. Enol. Vitic.* **1991**, 42 (3), 237-244.
- 📖 IMDORF, A.; CHARRIERE, J. D.; MAQUELIN, C.; KILCHENMANN, V.; BACHOFEN, B. Alternative varroa control. *Am. Bee J.* **1996**, 136, 189-193.
- 📖 IMDORF, A.; CHARRIERE, J. D.; BACHOFEN, B. Efficiency checking of the *Varroa jacobsoni* control methods by means of oxalic acid. *Apiacta*. **1997**, 32, 89-91.
- 📖 IZCO, J. M.; TORMO, M.; JIMÉNEZ-FLORES, R. Development of a CE method to analyze organic acids in dairy products: Application to study the metabolism of heat-shocked spores. *J. Agric. Food Chem.* **2002a**, 50, 1765-1773.
- 📖 IZCO, J. M.; TORMO, M.; JIMÉNEZ-FLORES, R. Rapid simultaneous determination of organic acids, free amino acids, and lactose in cheese by capillary electrophoresis. *J. Dairy Sci.* **2002b**, 85 (9), 2122-2129.
- 📖 JENKE, D. R. Chromatographic method validation: A review of current practices and procedures. II. Guidelines for primary validation parameters. *J. Liq. Chromatogr. and Relat. Techn.* **1996**, 19 (5), 737-757.

- 📖 JIMIDAR, M.; HAMOIR, T. P. Comparison of capillary zone electrophoresis with high-performance liquid chromatography for the determination of additives in foodstuffs. *J. Chromatogr. A.* **1993**, 636, 179-186.
- 📖 JIMIDAR, M.; HARTMANN, C.; COUSEMENT, N.; MASSART, D. L. Determination of nitrate and nitrite in vegetables by capillary electrophoresis with indirect detection. *J. Chromatogr. A.* **1995**, 706 (1+2), 479-492.
- 📖 JONES, W. R. Method development approaches for capillary ion electrophoresis. *J. Chromatogr.* **1993**, 640, 387-395.
- 📖 KANDL, T.; KUPINA, S. An improved capillary electrophoresis procedure for the determination of organic acids in grape juice and wine. *Am. J. Enol. Viticult.* **1999**, 50 (2), 155-161.
- 📖 KANIANSKY, D.; MASÁR, M.; MADAJOVÁ, J.; MARÁK, J. Determination of sorbic acid in food products by capillary zone electrophoresis in a hydrodynamically closed separation compartment. *J. Chromatogr. A.* **1994**, 677, 179-185.
- 📖 KELLY, L.; NELSON, R. J. Capillary zone electrophoresis of organic acids and anions. *J. Liq. Chromatogr. & Relat. Techn.* **1993**, 16 (9-10), 2103-2112.
- 📖 KENNEY, B. F. Determination of organic acids in food samples by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.* **1991**, 546, 423-430.
- 📖 KITAGISHI, K. Introduction. En: *Handbook of capillary electrophoresis applications*. (Shintani, H. y Polonský, J.). Ed. Chapman & Hall. London. UK. **1997**. pp. 1-14.
- 📖 KLAMPFL, C. W. Analysis of organic acids and inorganic anions in different types of beer using capillary zone electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47 (3), 987-990.
- 📖 KLAMPFL, C. W.; KATZMAYR, M. U. Determination of low-molecular-mass anionic compounds in beverage samples using capillary zone electrophoresis with simultaneous indirect ultraviolet and conductivity detection. *J. Chromatogr. A.* **1998**, 822, 117-123.
- 📖 KLAMPFL, C. W.; KATZMAYR, M. U.; BUCHBERGER, W. Separation of inorganic and organic anions by capillary zone electrophoresis with simultaneous indirect UV and conductivity detection. *Electrophoresis.* **1998**, 19, 2459-2464.
- 📖 KOCHANSKY, J.; SHIMANUKI, H. Development of a Gel Formulation of Formic Acid for Control of Parasitic Mites of Honey Bees. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47 (9), 3850-3853.
- 📖 KRAUS, B.; BERG, S. Effect of a lactic acid treatment during winter in temperate climate upon *Varroa jacobsoni* Oud. and the bee (*Apis mellifera* L.) colony. *Exp. Appl. Acarol.* **1994**, 18 (8), 459-468.
- 📖 KRAUZE, A.; ZALEWSKI, R. I. Classification of honeys by principal component analysis on the basis of chemical and physical parameters. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1991**, 192, 19-23.
- 📖 KUBAN, P.; KARLBERG, B. On-line dialysis coupled to a capillary electrophoresis system for determination of small anions. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 1169-1173.

- 📖 KUHR, W. G. Separation of small organic molecules. En: *Capillary Electrophoresis. Theory and practice*. 2nd edition. (Camilleri, P.). Ed. CRC Press LLC. Boca Raton. Florida. USA. **1998**. pp. 91-133.
- 📖 LALLJIE, S. P. D.; VINDEVOGEL, J.; SANDRA, P. Quantitation of organic acids in sugar refinery juices with capillary zone electrophoresis and indirect UV detection. *J. Chromatogr. A*. **1993**, 652, 563-569.
- 📖 LEVI, V.; WEHR, T.; TALMADGE, K.; ZHU, M. Analysis of organic acids in wines by capillary electrophoresis and HPLC. *Am. Lab.* **1993**, 25, 29-32.
- 📖 LI, S. F. Y. *Capillary electrophoresis: principle, practice and applications*. Journal of Chromatography Library, vol. 52. Ed. Elsevier Science Publishers B. V. Ámsterdam. The Netherlands. **1992**.
- 📖 LIAO, T.; JIANG, C. M.; WU, M. C.; HWANG, J. Y.; CHANG, H. M. Quantification of L-ascorbic acid and total ascorbic acid in fruits and spinach by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*. **2001**, 22 (8), 1484-1488.
- 📖 LÓPEZ, B.; LATORRE, M. J.; FERNÁNDEZ, M. I.; GARCÍA, M. A.; GARCÍA, S.; HERRERO, C. Chemometric classification of honeys according to their type based on quality control data. *Food Chem.* **1996**, 55 (3), 281-287.
- 📖 LÓPEZ-MARTÍNEZ, N.; RODRÍGUES-ROLDÁN, A. Aplicación de la electroforesis capilar micelar al análisis cuantitativo de ácidos carboxílicos. *Alimentaria*. **1993**, 243, 71-74.
- 📖 MALLET, S.; ARELLANO, M.; BOULET, J. B.; COUDERC, F. Determination of tartaric acid in solid wine residues by capillary electrophoresis and indirect UV detection. *J. Chromatogr. A*. **1999**, 853, 181-184.
- 📖 MATO, I.; HUIDOBRO, J. F.; SÁNCHEZ, M. P.; MUNIATEGUI, S.; FERNÁNDEZ-MUIÑO, M. A.; SANCHO, M. T. Enzymatic determination of total D-gluconic acid in honey. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45 (9), 3550-3553.
- 📖 MATO, I.; HUIDOBRO, J. F.; CENDÓN, V.; MUNIATEGUI, S.; FERNÁNDEZ-MUIÑO, M. A.; SANCHO, M. T. Enzymatic determination of citric acid in honey by using polyvinylpyrrolidone clarification. *J. Agric. Food Chem.* **1998a**, 46 (1), 141-144.
- 📖 MATO, I.; HUIDOBRO, J. F.; SÁNCHEZ, M. P.; MUNIATEGUI, S.; FERNÁNDEZ-MUIÑO, M. A.; SANCHO, M. T. Enzymatic determination of L-malic acid in honey. *Food Chem.* **1998b**, 62 (4), 503-508.
- 📖 MATO, I.; HUIDOBRO, J. F.; SIMAL-LOZANO, J.; SANCHO, M. T. Optimization of a capillary zone electrophoresis method with direct UV detection for the determination of organic acids. *J. Chromatogr. A*. **2003a**, en prensa.
- 📖 MATO, I.; HUIDOBRO, J. F.; SIMAL-LOZANO, J.; SANCHO, M. T. Application of capillary zone electrophoresis with direct UV detection to the determination of nonaromatic organic acids in honey. *J. Chromatogr. A*. **2003b**, en prensa.


- 📖 MATTENHEIMER, H. *La teoría del test enzimático*. Ed. Boehringer Mannheim GmbH. Diagnostica, Mannheim, Germany. ?.
- 📖 MILANI, N. Activity of oxalic and citric acids on the mite *Varroa destructor* in laboratory assays. *Apidologie*. **2001**, 32, 127-138.
- 📖 MILLER, J. N.; MILLER, J. C. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. 4ª ed. Ed. Pearson Education, S. A. Madrid. España. **2002**.
- 📖 MOLAN, P. C. The antibacterial activity of honey 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World*. **1992a**, 73 (1), 5-28.
- 📖 MOLAN, P. C. The antibacterial activity of honey 2. Variation in the potency of the antibacterial activity. *Bee World*. **1992b**, 73 (2), 59-76.
- 📖 MOLAN, P. C. Authenticity of Honey. En: *Food Authentication*. (Ashurst, P. R. y Dennis, M. J.). Ed. Blackie Academic and Professional. London. UK. **1996**. pp. 259-303.
- 📖 MÖLLERING, H. Citrate. En: *Methods of enzymatic analysis*. 3rd ed. (Bergmeyer, H. U.). Ed. Verlag Chemie, Weinheim, Germany. **1989a**, vol VII, pp. 2-12.
- 📖 MÖLLERING, H. L(-)-Malate. En: *Methods of enzymatic analysis*. 3rd ed. (Bergmeyer, H. U.). Ed. Verlag Chemie, Weinheim, Germany. **1989b**, vol VII, pp. 39-47.
- 📖 MÖLLERING, H.; BERGMAYER, H. U. D-Gluconate (D-Glucono- δ -lactone) and D-Gluconate 6-Phosphate. En: *Methods of enzymatic analysis*. 3rd ed. (Bergmeyer, H. U.). Ed. Verlag Chemie, Weinheim, Germany. **1989**, vol VI, pp. 220-227.
- 📖 MORENO, M. V. G.; JURADO, C. J.; BARROSO, C. G. Determination of organic acids by capillary electrophoresis with simultaneous addition of Ca and Mg as complexing agents. *Chromatographia*. **2003**, 57 (3-4), 185-189.
- 📖 MORSE, R. A. The antibiotic properties of honey. *Pan-Pacific Entomologist*. **1986**, 62, 370-371.
- 📖 MUTINELLI, F.; BAGGIO, A.; CAPOLONGO, F.; PIRO, R.; PRANDIN, L.; BIASION, L. A scientific note on oxalic acid by topical application for the control of varroosis. *Apidologie*. **1997**, 28, 461-462.
- 📖 NAIDU, R.; CHEN, Z. L. Application of co-electroosmotic capillary electrophoresis for the determination of inorganic anions and carboxylic acids in soil and plant extract with direct UV detection. *Chromatographia*. **2001**, 54, 495-500.
- 📖 NANETTI, A.; MASSI, A.; MUTINELLI, F.; CREMASCO, S. L'acido ossalico nel controllo della varroasi: note preliminari. *Apitalia*. **1995**, 22, 29-32.
- 📖 NOE, C. R.; FREISSMUTH, J.; ROTHLEY, D.; LACHMANN, B.; RICHTER, P. Capillary zone electrophoresis of carbohydrate mixtures. *Pharmazie*. **1996**, 51 (11), 868-873.
- 📖 O'FLAHERTY, B.; YANG, W. P.; SENGUPTA, S.; CHOLLI, A. L. Fast detection of anionic components in sugar and wine samples using a novel device based on capillary zone electrophoresis. *Food Chem*. **2001**, 74(1), 111-118.

- ORTÍZ, A.; FERNÁNDEZ, M. C.; SUBRÁ, E. *Principales características de la miel de La Alcarria*. Consejería de Agricultura y Medio Ambiente. Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha. Toledo. España. **1996**.
- PEÑA, R.; HERRERO, C. Pattern recognition analysis applied to classification of honeys from two geographic origin. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, 41, 560-564.
- PÉREZ-CERRADA, M.; HERRERO-VILLEN, M. A.; MAQUIEIRA, A. Sugar-rich food: Determination of inorganic anions by ionic chromatography. *Food Chem.* **1989**, 34, 285-294.
- PICHA, D. H. Organic acid determination in sweet potatoes by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* **1985**, 33, 743-745.
- POPEK, S. A procedure to identify a honey type. *Food Chem.* **2002**, 79, 401-406.
- PRANDIN, L.; DAINESE, N.; GIRARDI, B.; DAMOLIN, O.; PIRO, R.; MUTINELLI, F. A scientific note on long-term stability of a home-made oxalic acid water sugar solution for controlling varroosis. *Apidologie.* **2001**, 32, 451-452.
- QIU, J. Statistics aided optimization for high-performance liquid chromatographic analysis of organic acids in tobacco. *J. Chromatogr. A.* **1999**, 859, 153-158.
- RANDALL, H. E.; VAN SOESTBERGEN, A. W.; RISTOW, K. A. Evaluation of apple juice authenticity by organic acid analysis. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1983**, 66 (6), 1517-1520.
- ROMERO-RODRÍGUEZ, M. A.; VÁZQUEZ-ODERIZ, M. L.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J.; SIMAL-LOZANO, J. Determination of vitamin C and organic acids in various fruits by HPLC. *J. Chromatogr. Sci.* **1992**, 30, 433-437.
- ROSELLÓ, S.; GALIANA-BALAGUER, L.; HERRERO-MARTINEZ, J. M.; MAQUIEIRA, A.; NUEZ, F. Simultaneous quantification of the main organic acids and carbohydrates involved in tomato flavour using capillary zone electrophoresis. *J. Sci. Food Agric.* **2002**, 82 (10), 1101-1106.
- ROSS, G. A. Precision and quantitation in capillary electrophoresis. En: *Handbook of capillary electrophoresis applications*. (Shintani, H. y Polonský, J.). Ed. Chapman & Hall. London. UK. **1997**. pp. 41-70.
- RUSSELL, K. M.; MOLAN, P. C.; WILKINS, A. L.; HOLLAND, P. T. Identification of some antibacterial constituents of New Zealand manuka honey. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, 38, 10-13.
- SAAVEDRA, L.; GARCÍA, A.; BARBAS, C. Development and validation of a capillary electrophoresis method for direct measurement of isocitric, citric, tartaric and malic acids as adulteration markers in orange juice. *J. Chromatogr. A.* **2000**, 881, 395-401.
- SAAVEDRA, L.; RUPEREZ, F. J.; BARBAS, C. Capillary electrophoresis for evaluating orange juice authenticity: a study on Spanish oranges. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49(1), 9-13.

- 📖 SABATINI, A. G.; MARCAZZAN, G. L.; COLOMBO, R.; GARAGNANI, M. Applicazione di un metodo enzimatico per la determinazione dell'acido formico e dell'acido lattico presenti nel miele. *Apicoltura*, **1994**, 9, 135-145.
- 📖 SANCHO, M. T.; MUNIATEGUI, S.; HUIDOBRO, J. F.; SIMAL-LOZANO, J. Provincial classification of Basque Country (northern Spain) honeys by their chemical composition. *J. Apic. Res.* **1991**, 30 (3), 168-172.
- 📖 SANZ, S.; PEREZ, C.; HERRERA, A.; SANZ, M.; JUAN, T. Application of a statistical approach to the classification of honey by geographic origin. *J. Sci. Food Agric.* **1995**, 69, 135-140.
- 📖 SHUI, G.; LEONG, L. P. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* **2002**, 977, 89-96.
- 📖 SOGA, T. Analysis of inorganic and organic anions by capillary zone electrophoresis. *Hewlett Packard Application Note 12-5965-5744E.* **1996**.
- 📖 SOGA, T.; IMAIZUMI, M. Capillary electrophoresis method for the analysis of inorganic anions, organic anions, amino acids, nucleotides, carbohydrates and other anionic compounds. *Electrophoresis.* **2001**, 22, 3418-3425.
- 📖 SOGA, T.; ROSS, G. A. Capillary electrophoretic determination of inorganic and organic anions using 2,6-pyridinedicarboxylic acid: effect of electrolyte's complexing ability. *J. Chromatogr. A.* **1997**, 767 (1+2), 223-230.
- 📖 SOGA, T.; ROSS, G. A. Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids, amino acids and carbohydrates by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* **1999**, 837, 231-239.
- 📖 SOGA, T.; WAKAURA, M. Determination of inorganic and organic anions in beer and wort by capillary electrophoresis. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **1997**, 55 (2), 44-46.
- 📖 SOUSA, R.; DE LA MONTAÑA, J.; MÍGUEZ, M. Composición de mieles gallegas y su adecuación a las normativas vigentes. *Alimentaria.* **2002**, 39 (332), 127-132.
- 📖 STATHAKIS, C.; CASSIDY, R. M. Effect of electrolyte composition in the capillary electrophoretic separation of inorganic/organic anions in the presence of cationic polymers. *J. Chromatogr. A.* **1995**, 699 (1+2), 353-361.
- 📖 STEFANINI, R. Diagnosis of unifloral honeys. II. Numerical taxonomy of honey and statistical diagnostic test of its botanical origin. *Apicoltura.* **1988**, 4, 13-26.
- 📖 STINSON, E. E.; SUBERS, M. H.; PETTY, J.; WHITE, J. W. Jr. The composition of honey. V. Separation and identification of the organic acids. *Arch. Biochem. Biophys.* **1960**, 89, 6-12.
- 📖 STOVER, F. S. Organic acids and organic ions. En: *Handbook of Capillary Electrophoresis Applications.* (Shintani, H.; Polonský, J.). Ed. Chapman and Hall. London. UK. **1997**. pp.550-579.

- STOYA, W.; WACHENDOERFER, G.; KARY, I.; SIEBENTRITT, P.; KAISER, E. Formic acid as a therapeutic against varroatose and its effect on honey. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **1986**, 82 (7), 217-221.
- STOYA, W.; WACHENDOERFER, G.; KARY, I.; SIEBENTRITT, P.; KAISER, E. Milchsäure als Therapeutikum gegen Varroatose und ihre Auswirkung auf den Honig. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **1987**, 83 (9), 283-286.
- SUÁREZ-LUQUE, S.; MATO, I.; HUIDOBRO, J. F.; SIMAL-LOZANO, J.; SANCHO, M. T. Rapid determination of minority organic acids in honey by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* **2002a**, 955 (2), 207-214.
- SUÁREZ-LUQUE, S.; MATO, I.; HUIDOBRO, J. F.; SIMAL-LOZANO, J. Solid-phase extraction procedure to remove organic acids from honey. *J. Chromatogr. B.* **2002b**, 770 (1-2), 77-82.
- TALPAY, B. Inhaltsstoffe des Honigs-Citronensäure (Citrat). *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **1988**, 84 (2), 41-44.
- TALPAY, B. Inhaltsstoffe des Honigs-Ameisensäure (Formiat). *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **1989**, 85, 143-147.
- TAN, S. T.; HOLLAND, P. T.; WILKINS, A. L.; MOLAN, P. C. Extractives from New Zealand honeys. 1. White clover, manuka and kanuka unifloral honeys. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, 36, 453-460.
- TERRAB, A.; DÍEZ, M. J.; HEREDIA, F. J. Characterisation of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. *Food Chem.* **2002**, 79, 373-379.
- THE MERCK INDEX. An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 13th edition. (Budavari, S.). Ed. Merck Research Laboratories. Division of Merck & Co., Inc. New York. USA. **2001**.
- THIBAUT, P.; DOVICH, N. J. General instrumentation and detection systems including mass spectrometric interfaces. En: *Capillary Electrophoresis. Theory and practice.* 2nd edition. (Camilleri, P.). Ed. CRC Press LLC. Boca Raton. Florida. USA. **1998**. pp. 23-89
- TOURN, M. L.; LOMBARD, A.; BELLARDO, F.; BUFFA, M. Quantitative analysis of carbohydrates and organic acids in honeydew, honey and royal jelly by enzymic methods. *J. Apic. Res.* **1980**, 19 (2), 144-146.
- TREVASKIS, M.; TRENERRY, C. An investigation into the determination of oxalic acid in vegetables by capillary electrophoresis. *Food Chem.* **1996**, 57 (2), 323-330.
- TURCAT, S.; MASCLLET, P.; LISSOLO, T. Use of capillary electrophoresis to monitor concentrations of organic acids in snow and rain water. *The science of the total environment.* **1994**, 158, 21-29.
- VÁZQUEZ-ODERIZ, M. L.; VÁZQUEZ-BLANCO, M. E.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J.; SIMAL-LOZANO, J.; ROMERO-RODRÍGUEZ, M. A. Simultaneous determination of organic acids and vitamin C in green beans by liquid chromatography. *J. AOAC Int.* **1994**, 77 (4), 1056-1059.

- VERZERA, A.; CAMPISI, S.; ZAPPALÁ, M.; BONACCORSI, I. SPME-GC-MS analysis of honey volatile components for the characterization of different floral origin. *Am. Lab.* **2001**, 33 (15), 18-21.
- VOLGGER, D.; ZEMANN, A. J.; BONN, G. K.; ANTAL, M. J. JR. High-speed separation of carboxylic acids by co-electroosmotic capillary electrophoresis with direct and indirect UV detection. *J. Chromatogr. A.* **1997**, 758, 263-276.
- VORARAT, S.; AROMDEE, C.; PODOKMAI, Y. Determination of alpha hydroxy acids in fruits by capillary electrophoresis. *Anal. Sci.* **2002**, 18 (8), 893-896.
- WAHDAN, H. A. L. Causes of the antimicrobial activity of honey. *Infection.* **1998**, 26 (1), 30-35.
- WATERS. *CIA System. Manual de operación.* Revisión 3.0. **1995**.
- WESTON, R. J.; MITCHELL, K. R.; ALLEN, K. L. Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey. *Food Chem.* **1999**, 64 (3), 295-301.
- WHITE, J. W. Jr. Honey. En: *Advances in Food Research.* Ed. Board. Academic Press. New York. USA. **1978**. vol. 24, pp. 287-364.
- WHITE, J. W. Jr. Composición y propiedades de la miel. En: *La Apicultura en los Estados Unidos.* (McGregor, S. E.). Ed. Limusa. México. **1979**. pp 57-66.
- WHITE, J. W. Jr.; SUBERS, M. H.; SCHEPARTZ, A. I. The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochi. Biophys. Acta.* **1963**, 73, 57-70.
- WILEY, J. P. Determination of polycarboxylic acids by capillary electrophoresis with copper complexation. *J. Chromatogr. A.* **1995**, 692, 267-274.
- WILKINS, A. L.; LU, Y.; TAN, S. T. Extractives from New Zealand honeys. 5. Aliphatic dicarboxylic acids in New Zealand Rewerewa (*Knigtea excelsa*) honey. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 3021-3025.
- WU, C. H.; LO, Y. S.; LEE, Y. H.; LIN, T. Y. Capillary electrophoretic determination of organic acids with indirect detection. *J. Chromatogr. A.* **1995**, 716, 291-301.
- XIONG, X.; LI, S. F. Y. Selection and optimization of background electrolytes for simultaneous detection of small cations and organic acids by capillary electrophoresis with indirect photometry. *J. Chromatogr. A.* **1998**, 822, 125-136.
- XU, J.; CHEN, Z.; YU, J. C.; TANG, C. Simultaneous determination of inorganic anions, carboxylic and aromatic carboxylic acids by capillary zone electrophoresis with direct UV detection. *J. Chromatogr. A.* **2001**, 942, 289-294.
- YANG, J.; BOSE, S.; HAGE, D. S. Improved reproducibility in capillary electrophoresis through the use of mobility and migration time ratios. *J. Chromatogr. A.* **1996**, 735, 209-220.
- YATSUNAMI, K.; ECHIGO, T. Antibacterial activity of honey and royal jelly. *Honeybee Science.* **1984**, 5, 125-130.

-  ZEECE, M. Capillary electrophoresis: a new analytical tool for food science. *Trends Food Sci. Tech.* **1992**, 3, 6-10.



ESTUDIO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS
NO AROMÁTICOS EN LA MIEL



CAPÍTULO 6

EFECTO DEL ALMACENAMIENTO
SOBRE LOS PARÁMETROS FÍSICO
QUÍMICOS Y SOBRE LOS ÁCIDOS
ORGÁNICOS





6.1. INTRODUCCIÓN

Como cualquier producto biológico, la miel sufre a lo largo del tiempo una serie de modificaciones en su composición. Las mieles calentadas y/o almacenadas experimentan transformaciones espontáneas, variables pero irreversibles, siendo éstas mucho más rápidas cuando la temperatura del calentamiento y/o almacenamiento es elevada (Gonnet, 1982). En general, los cambios que se efectúan rápidamente durante el calentamiento también suceden al cabo de un período más largo de tiempo durante el almacenamiento, en una proporción que va a depender de la temperatura. Así por ejemplo, las transformaciones que se producen a 21 °C durante 100-120 días son equivalentes a las que se producen a 32 °C durante 10 días y, por otra parte, 40 días de almacenamiento a 25 °C producirá cambios similares a un procesado de la miel a 63 °C durante una hora (White, 1979).

Las principales alteraciones que afectan a una miel calentada de forma excesiva o que sufre un almacenamiento a temperatura ambiente durante un largo período de tiempo son fundamentalmente de dos tipos: *reacciones químicas* y *degradaciones biológicas*. En el primer caso, se produce una degradación lenta de los azúcares y una formación de hidroximetilfurfural (HMF). En lo que se refiere a las degradaciones biológicas, hay que destacar el descenso más o menos acentuado de la actividad enzimática de la miel. Las enzimas más afectadas son la invertasa, la diastasa y la glucosa oxidasa (Gonnet, 1982).

La importancia de todas las degradaciones químicas o biológicas está ligada, además de a las condiciones del calentamiento o almacenamiento, a la composición química de la miel. De manera general, cuando el contenido en agua es elevado y el pH bajo, la miel sufre mayores transformaciones. Esquemáticamente, los principales efectos del calentamiento y/o almacenamiento de la miel se pueden resumir de la siguiente manera (Gonnet, 1965; White, 1979; Grandi et al., 1980; Gonnet, 1982; Krauze y Krauze, 1991):

- Se intensifica el color.
- Aumenta el contenido de hidroximetilfurfural (HMF).
- Aumenta la acidez libre.
- Disminuye el contenido en azúcares reductores (sobre todo en glucosa).
- Disminuye la actividad enzimática.
- Los aromas son reemplazados poco a poco por sustancias con un olor desagradable. Estas sustancias provienen de transformaciones bioquímicas complejas que se producen en la denominada reacción de Maillard.

6.2. PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS RELACIONADOS CON LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS

6.2.1. CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA

6.2.1.1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Krauze y Krauze (1991) estudiaron los cambios producidos en la conductividad eléctrica, entre otros componentes, en 14 mieles de mielada no calentadas y almacenadas a la temperatura del laboratorio y en la oscuridad durante dos años. Se llevaron a cabo dos análisis, inicial y después del almacenamiento, comprobando que la conductividad eléctrica no variaba de forma significativa.

Cavia (2002) estudió el efecto del almacenamiento durante 30 meses sobre diferentes parámetros físico químicos, entre los que se encontraba la conductividad eléctrica, en dos poblaciones de mieles de la cosecha de 1998, una procedente de Burgos (25 muestras) y otra procedente de Galicia (35 muestras). Se realizaron seis análisis, a intervalos de cinco meses, comprobándose que en las mieles de Burgos, el valor medio de la conductividad eléctrica se mantuvo constante durante todo el estudio. Por su parte, las muestras de Galicia presentaron un valor medio constante durante los 20 primeros meses, disminuyendo ligeramente aunque no de forma significativa en los últimos 10 meses.

6.2.1.2. PARTE EXPERIMENTAL

El estudio del efecto del almacenamiento sobre la conductividad eléctrica se ha llevado a cabo en las 50 mieles de Galicia con Denominación de la cosecha de 1997. Los análisis han tenido lugar durante dos años a intervalos de cuatro meses, por lo que se han realizado siete determinaciones en cada una de las muestras. Durante todo el estudio las mieles se han almacenado en envases de vidrio a una temperatura media de 20 °C (15-25 °C), en un ambiente libre de olores y en la oscuridad.

El procedimiento de determinación así como el material, aparatos y reactivos utilizados son los descritos en el apartado 4.1.3. del capítulo 4 *Parámetros físico químicos relacionados con los ácidos orgánicos*.

6.2.1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla LIII se encuentran recogidos los resultados de la evolución de la conductividad eléctrica (10^{-4} S cm⁻¹) en las 50 mieles de Galicia con Denominación analizadas a lo largo de 24 meses.

Tabla LIII. Evolución de la conductividad eléctrica (10^{-4} S cm^{-1}) en las mieles de Galicia con Denominación a lo largo de 24 meses

Número de muestra	CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA (10^{-4} S cm^{-1})								Media	RSD%
	Inicial	4 meses	8 meses	12 meses	16 meses	20 meses	24 meses			
1	10.3	10.3	10.4	10.4	10.4	10.3	10.2	10.3	0.7	
2	19.9	20.3	20.1	20.0	19.9	19.5	19.5	19.9	1.5	
3	17.9	18.1	18.2	17.9	17.9	17.7	17.7	17.9	1.0	
4	4.5	4.5	4.5	4.6	4.6	4.5	4.6	4.5	1.2	
5	4.3	4.3	4.3	4.4	4.3	4.3	4.3	4.3	0.9	
6	4.3	4.2	4.3	4.3	4.3	4.3	4.3	4.3	0.9	
7	4.5	4.5	4.6	4.6	4.5	4.4	4.5	4.5	1.5	
8	4.4	4.4	4.5	4.5	4.5	4.4	4.5	4.5	1.2	
9	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.6	4.7	4.7	0.8	
10	4.4	4.4	4.5	4.5	4.4	4.4	4.5	4.4	1.2	
11	4.4	4.4	4.5	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	0.9	
12	4.1	4.1	4.1	4.2	4.1	4.1	4.2	4.1	1.2	
13	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.7	3.6	1.0	
14	5.3	5.3	5.3	5.3	5.3	5.3	5.4	5.3	0.7	
15	5.0	4.9	5.0	5.0	5.0	4.9	5.0	5.0	1.0	
16	5.3	5.2	5.3	5.3	5.3	5.3	5.3	5.3	0.7	
17	5.4	5.4	5.4	5.5	5.4	5.4	5.4	5.4	0.7	
18	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.5	5.6	5.6	0.7	
19	5.5	5.4	5.5	5.5	5.5	5.4	5.5	5.5	0.9	
20	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	0.0	
21	4.5	4.4	4.5	4.5	4.5	4.4	4.5	4.5	1.1	
22	4.3	4.3	4.3	4.3	4.3	4.3	4.3	4.3	0.0	
23	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.5	3.6	3.6	1.1	
24	4.3	4.3	4.4	4.4	4.3	4.3	4.4	4.3	1.2	
25	4.0	3.9	4.0	4.0	4.0	3.9	4.0	4.0	1.2	
26	6.4	6.4	6.4	6.5	6.4	6.4	6.5	6.4	0.8	
27	7.1	7.1	7.1	7.2	7.2	7.1	7.1	7.1	0.7	
28	7.1	7.0	7.1	7.2	7.1	7.0	7.1	7.1	1.0	
29	6.4	6.4	6.4	6.5	6.4	6.3	6.3	6.4	1.1	
30	6.4	6.3	6.4	6.4	6.4	6.3	6.4	6.4	0.8	
31	5.1	5.1	5.1	5.1	5.1	5.0	5.1	5.1	0.7	
32	9.0	9.1	9.1	9.1	9.0	8.9	8.9	9.0	1.0	
33	7.7	7.8	7.8	7.8	7.7	7.7	7.7	7.7	0.7	
34	6.6	6.5	6.6	6.7	6.6	6.5	6.6	6.6	1.0	
35	4.9	4.9	4.9	5.0	4.9	4.9	5.0	4.9	1.0	
36	3.6	3.6	3.6	3.7	3.6	3.6	3.6	3.6	1.0	
37	6.1	6.0	6.2	6.2	6.1	6.0	6.1	6.1	1.3	
38	5.5	5.5	5.5	5.6	5.5	5.4	5.4	5.5	1.3	
39	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.1	6.2	6.2	0.6	
40	6.6	6.5	6.6	6.6	6.6	6.6	6.7	6.6	0.9	
41	6.1	6.1	6.2	6.1	6.1	6.1	6.2	6.1	0.8	
42	10.8	10.8	10.8	10.9	10.8	10.7	10.6	10.8	0.9	
43	8.9	8.9	8.9	8.9	8.9	8.8	8.9	8.9	0.4	
44	17.2	17.4	17.4	17.1	17.1	17.0	17.1	17.2	0.9	
45	9.4	9.4	9.6	9.4	9.4	9.3	9.3	9.4	1.1	
46	5.4	5.3	5.4	5.4	5.4	5.3	5.4	5.4	0.9	
47	7.2	7.1	7.3	7.2	7.2	7.1	7.2	7.2	1.0	
48	7.5	7.5	7.6	7.6	7.5	7.5	7.5	7.5	0.6	
49	7.1	7.1	7.1	7.2	7.2	7.1	7.2	7.1	0.7	
50	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.5	5.6	5.6	0.7	
MEDIA	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.5	6.6	6.6	0.9	
SD	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.4	3.4	3.5	0.3	
RSD%	52.9	53.9	53.3	52.5	52.7	52.6	51.8	52.8	32.7	
Vmín	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.5	3.6	3.6	0.0	
Vmáx	19.9	20.3	20.1	20.0	19.9	19.5	19.5	19.9	1.5	

En esta tabla se observa como el valor medio de la conductividad eléctrica de todas las muestras analizadas permanece constante a lo largo del estudio, excepto a los 20 meses donde se produce un ligera disminución. Si se considera cada una de las muestras individualmente, la mayor variación producida entre los valores de los diferentes análisis fue de un 1.5%.

Las Figuras 61 y 62 muestran la evolución del valor medio de la conductividad eléctrica ($10^{-4} \text{ S cm}^{-1}$) durante los 24 meses del estudio en las mieles de Galicia con Denominación agrupadas según la provincia de procedencia del envasador y según el espectro polínico, respectivamente.

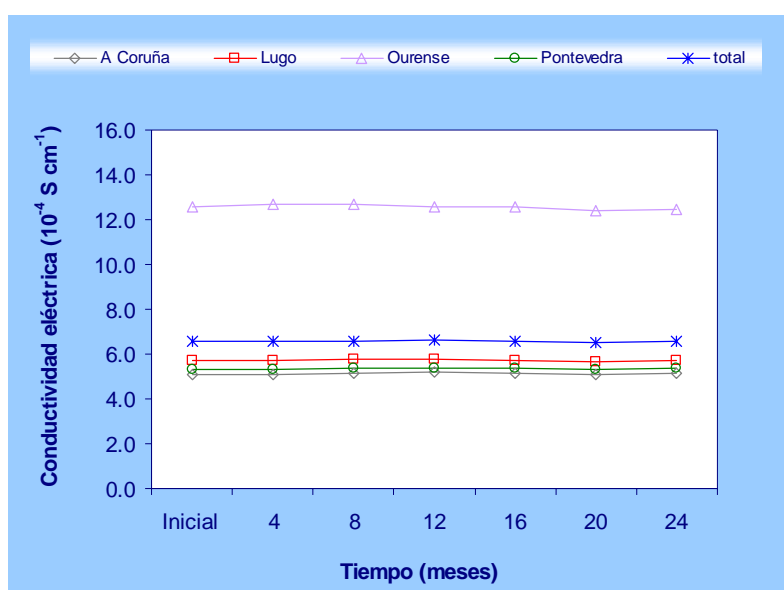


Figura 61. Evolución con el tiempo del valor medio de la conductividad eléctrica ($10^{-4} \text{ S cm}^{-1}$) en las mieles de Galicia con Denominación agrupadas según la provincia de procedencia del envasador.

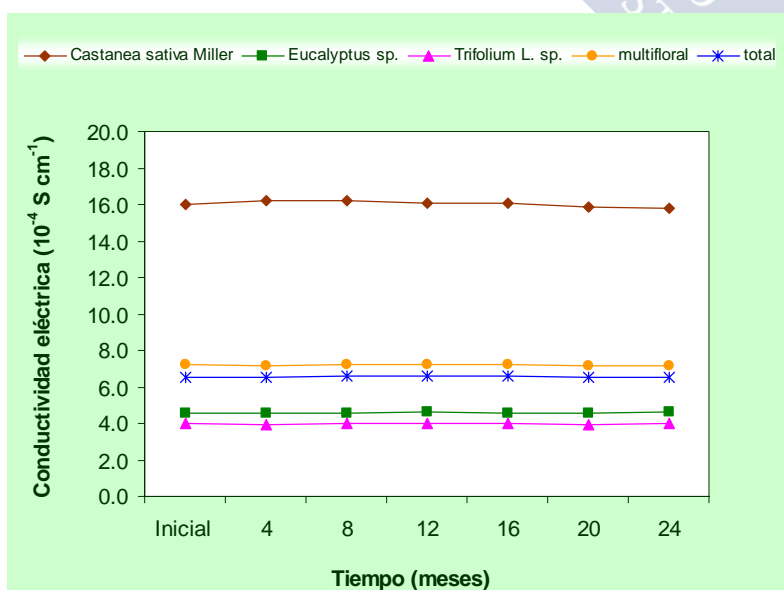


Figura 62. Evolución con el tiempo del valor medio de la conductividad eléctrica ($10^{-4} \text{ S cm}^{-1}$) en las mieles de Galicia con Denominación agrupadas según el espectro polínico.

En ambas figuras se observa como la conductividad eléctrica de las muestras no varía de forma significativa en los diferentes grupos. Este comportamiento similar indica que no existe influencia del origen geográfico ni del espectro polínico en la evolución de la conductividad eléctrica. Los resultados obtenidos coinciden con los encontrados por otros autores (*Krauze y Krauze, 1991; Cavia, 2002*).

6.2.2. pH Y TIPOS DE ACIDEZ

6.2.2.1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

White et al. (1961) estudiaron el efecto del almacenamiento durante dos años sobre los tipos de acidez, entre otros parámetros. El estudio se llevó a cabo en 10 mieles no calentadas, almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a la temperatura del laboratorio ($26 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$). Se realizaron dos análisis, inicial y después del almacenamiento, obteniéndose que, en la mayor parte de las mieles, se producían aumentos significativos en la acidez durante el almacenamiento.

Gonnet (1965) estudió los cambios producidos en varios constituyentes de mieles pasteurizadas y no pasteurizadas, almacenadas a $14\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a temperatura de laboratorio (aproximadamente $20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Este trabajo se desarrolló durante dos años y se realizaron tres análisis a intervalos de un año. Entre los parámetros estudiados se encontraban el pH y los tipos de acidez comprobándose que el pH no se modificaba significativamente a ninguna de las dos temperaturas. En el caso de la acidez libre, se produjo un aumento durante el almacenamiento que fue más importante a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ que a $14\text{ }^{\circ}\text{C}$. La acidez láctica y total variaron de forma irregular a lo largo de los dos años. Asimismo se llegó a la conclusión de que no existían diferencias significativas en el proceso de envejecimiento entre las mieles pasteurizadas y las no pasteurizadas.

Takenaka y Echigo (1974) estudiaron el efecto del almacenamiento sobre el pH y los tipos de acidez (libre, láctica y total), entre otros parámetros. El estudio se realizó en una muestra que se dividió en dos alícuotas, una no se sometió a calentamiento y la otra se calentó durante 30 minutos a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ambas alícuotas se almacenaron durante tres meses a la temperatura del laboratorio y en la oscuridad. Se llevaron a cabo dos análisis en cada alícuota, inicial y después del almacenamiento. En ambos casos el pH permaneció constante mientras que las variaciones en los tipos de acidez son ligeramente mayores en la miel sometida a calentamiento.

Wooton et al. (1976) estudiaron el efecto de un almacenamiento acelerado (44 días a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$) sobre el pH y los tipos de acidez (libre, láctica y total), entre otros parámetros, en 6

mieles de diferente origen botánico. Se realizaron dos análisis, inicial y después del almacenamiento, comprobando que dos mieles (*Medicago sativa* y *Eucalyptus coolabah*) mostraban un descenso considerable del pH mientras que en el resto estos cambios eran más suaves. Las modificaciones que se produjeron en la acidez libre, láctónica y total fueron pequeñas e irregulares, variando según el tipo de miel.

Grandi et al. (1980) analizaron la evolución de algunos parámetros químicos, físico químicos y microbiológicos, entre los que se encontraban el pH y los tipos de acidez, en cuatro mieles almacenadas durante 24 meses en un lugar semioscuro a temperatura ambiente. Se llevaron a cabo cinco análisis, a intervalos de seis meses, no encontrando diferencias estadísticamente significativas en el pH y tipos de acidez (libre, láctónica y total) durante el almacenamiento.

Sancho (1990) y *Sancho et al. (1991)* observaron la evolución del pH durante dos años en 115 mieles. Se llevaron a cabo tres análisis, a los 4, 16 y 28 meses posteriores a la extracción de las muestras. Los valores medios de pH obtenidos con el tiempo disminuían ligeramente a lo largo del estudio, ajustándose a una recta con un coeficiente de correlación lineal de 0.9934.

Krauze y Krauze (1991) estudiaron los cambios producidos durante dos años en varios componentes, entre los que se encontraba el pH y los tipos de acidez. El estudio se desarrolló en 14 mieles de mielada no calentadas y almacenadas a la temperatura del laboratorio y en la oscuridad. Se llevaron a cabo dos análisis, inicial y después del almacenamiento, comprobando que el pH no variaba de forma significativa durante todo el estudio mientras que la acidez libre y láctónica, y por tanto la acidez total, se veían muy influenciadas por el almacenamiento, aumentando de forma significativa su contenido. Hay que destacar que el incremento que se produjo en la acidez láctónica fue mayor que en la acidez libre.

Jiménez et al. (1994) estudiaron el efecto del almacenamiento a tres diferentes temperaturas (4-7 °C, temperatura del laboratorio y a 28 °C) sobre varios compuestos físico químicos y microbiológicos de una miel, entre los que se encontraban el pH y los tipos de acidez. Este trabajo se desarrolló durante dos años y se realizaron seis análisis, al tiempo inicial y a los 3, 6, 12, 18 y 24 meses. De los resultados obtenidos, los autores concluyeron que el pH se podría considerar prácticamente estable durante todo el estudio y que la acidez libre y láctónica aumentaban ligeramente. Además se ha encontrado que el tiempo de almacenamiento, pero no la temperatura, influye de forma significativa en los resultados.

Consentino et al. (1996) y Cherchi et al. (1997) estudiaron los cambios que se produjeron en varios parámetros físico químicos y microbiológicos de tres mieles de *Asphodelus microcarpus*, cada una de ellas almacenada en tres condiciones diferentes (a 4 °C, a la temperatura del laboratorio [18-27 °C] y a la temperatura del laboratorio pero en oscuridad [15-22 °C]). Este trabajo se desarrolló durante 24 meses y se llevaron a cabo siete análisis, con una frecuencia trimestral el primer año de almacenamiento y cuatrimestral el segundo. Entre los parámetros físico químicos estudiados se encontraban el pH y la acidez total, comprobándose que el pH se mantuvo constante en los 24 meses de almacenamiento en dos de las tres muestras y disminuía ligeramente en una de ellas. Por su parte, la acidez total aumentaba de forma sensible en las tres muestras analizadas y en todas las condiciones de almacenamiento. Los autores, sin embargo, no pudieron establecer una relación entre la acidez total y la modalidad de almacenamiento o conservación.

Azeredo et al. (1999) estudiaron los cambios que se produjeron en varios parámetros físico químicos de 60 mieles, entre los que se encontraban el pH y la acidez total. Cada una de las muestras fue dividida en varias alícuotas y almacenadas en diferentes condiciones (frasco de vidrio y a la luz, frasco de polipropileno y a la luz y frasco de polipropileno y en oscuridad) a temperatura ambiente (26-27 °C). Este trabajo se desarrolló durante un año y se llevaron a cabo cinco análisis a intervalos regulares de 90 días. Los autores concluyeron que el almacenamiento en las condiciones estudiadas no alteraba de forma significativa las características físico químicas de las mieles. En el caso de la acidez total, se observó un aumento cuando las mieles fueron almacenadas a la luz, independientemente del tipo de envase ensayado (vidrio y polipropileno).

Bath y Singh (2000) estudiaron el efecto del almacenamiento durante 12 meses sobre el pH, acidez libre y total, entre otros parámetros, en dos mieles monoflorales de diferente origen botánico (*Helianthus annuus* y *Eucalyptus lanceolatus*) que fueron sometidas a distintos tratamientos térmicos (Tª 50, 60, 70 y 80 °C). Se realizaron dos análisis, inicial y después del almacenamiento, comprobándose, por una parte, que el pH disminuía y, por otra, que la acidez libre y total aumentaban con el calentamiento y el almacenamiento en ambas muestras. Asimismo, se demostró que la duración del almacenamiento tenía un mayor efecto sobre los parámetros estudiados que la temperatura de calentamiento.

Cavia (2002) estudió el efecto del almacenamiento durante 30 meses sobre el pH y los tipos de acidez, entre otros parámetros físico químicos, en dos poblaciones de mieles de la cosecha de 1998, una procedente de Burgos (25 muestras) y otra procedente de Galicia (35 muestras). Se llevaron a cabo seis análisis, a intervalos de cinco meses,

comprobandose que la evolución del pH y tipos de acidez (libre, lactónica y total) en ambas poblaciones fue similar. En el caso del pH se observó que se mantuvo constante durante los primeros 15 meses, para posteriormente disminuir suavemente. Tanto la acidez libre como la acidez lactónica han experimentado continuas variaciones a lo largo del estudio, mostrando al final un aumento respecto a su valor inicial mucho menos acusado en el caso de la acidez lactónica. Por último la acidez total ha permanecido prácticamente constante durante los primeros 15 meses del estudio, experimentando un ligero aumento entre los 15 y 25 meses. En este trabajo también se ha encontrado que el valor inicial de pH y de acidez lactónica influían en su evolución con el tiempo mientras que, por el contrario, la evolución de la acidez libre y total no se vio condicionada por su valor inicial. Además según los resultados obtenidos es posible llevar a cabo la predicción en el tiempo de estos parámetros a partir de su valor inicial.

Cavia et al. (2002) observaron la evolución del pH, entre otros parámetros físico químicos, en 30 mieles no calentadas. Cada una de las muestras fue dividida en dos alícuotas siendo una de ellas sometida a una granulación inducida. Ambas alícuotas fueron almacenadas a la temperatura del laboratorio y en la oscuridad durante un año. Se llevaron a cabo tres análisis, a intervalos de cuatro meses, comprobándose que el pH se mantuvo constante durante todo el estudio tanto en las mieles sin manipular como en las sometidas a granulación inducida.

6.2.2.2. PARTE EXPERIMENTAL

El estudio del efecto del almacenamiento sobre el pH y los tipos de acidez (libre, lactónica y total) se ha llevado a cabo en las 50 mieles de Galicia con Denominación de la cosecha de 1997. Los análisis han tenido lugar durante dos años a intervalos de cuatro meses, por lo que se han realizado siete determinaciones en cada una de las muestras. Durante todo el estudio las mieles se han almacenado en envases de vidrio a una temperatura media de 20 °C (15-25 °C), en un ambiente libre de olores y en la oscuridad.

El procedimiento de determinación así como el material, aparatos y reactivos utilizados son los descritos en el apartado 4.2.3. del capítulo 4 *Parámetros físico químicos relacionados con los ácidos orgánicos*.

6.2.2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las Tablas LIV, LV, LVI y LVII se encuentran recogidos los resultados de la evolución del pH, acidez libre, acidez lactónica y acidez total, respectivamente, en las 50 mieles de Galicia con Denominación analizadas a lo largo de 24 meses.

Tabla LIV. Evolución del pH en las mieles de Galicia con Denominación a lo largo de 24 meses

Número de muestra	pH								Media	RSD%
	Inicial	4 meses	8 meses	12 meses	16 meses	20 meses	24 meses			
1	4.57	4.63	4.65	4.46	4.42	4.44	4.39	4.51	2.3	
2	5.36	5.23	5.18	5.02	4.98	4.94	4.84	5.08	3.6	
3	5.44	5.27	5.12	5.02	5.02	5.06	5.11	5.15	3.0	
4	4.06	4.13	4.20	4.07	4.06	4.07	4.09	4.10	1.2	
5	3.80	3.95	4.02	3.92	3.84	3.83	3.93	3.90	2.0	
6	3.94	4.07	4.11	3.99	3.91	3.86	3.83	3.96	2.6	
7	4.09	4.08	4.03	4.00	4.00	4.01	3.94	4.02	1.3	
8	3.99	4.01	4.00	3.95	3.94	3.92	3.82	3.95	1.7	
9	4.27	4.17	4.08	4.00	4.00	3.97	3.84	4.05	3.5	
10	4.45	4.31	4.19	4.09	4.10	4.12	4.04	4.18	3.5	
11	4.38	4.29	4.20	4.09	4.10	4.16	4.10	4.19	2.7	
12	4.03	4.07	4.04	3.94	3.93	3.95	3.92	3.98	1.5	
13	4.21	4.21	4.21	4.13	4.08	4.04	4.00	4.12	2.1	
14	3.95	3.89	3.92	3.84	3.84	3.86	3.76	3.86	1.7	
15	4.02	3.95	3.98	3.89	3.89	3.91	3.80	3.92	1.9	
16	3.75	3.66	3.63	3.71	3.64	3.57	3.54	3.64	2.0	
17	3.82	3.86	3.92	3.89	3.80	3.72	3.72	3.82	2.0	
18	3.92	3.94	3.95	3.87	3.84	3.81	3.71	3.86	2.2	
19	3.72	3.74	3.75	3.72	3.70	3.70	3.72	3.72	0.5	
20	4.43	4.41	4.40	4.20	4.20	4.29	4.22	4.31	2.4	
21	4.07	4.11	4.12	4.08	4.05	4.00	3.96	4.06	1.4	
22	4.31	4.27	4.24	4.22	4.15	4.09	4.05	4.19	2.3	
23	5.00	4.77	4.56	4.39	4.36	4.39	4.41	4.55	5.4	
24	4.66	4.54	4.40	4.26	4.24	4.27	4.21	4.37	3.9	
25	3.59	3.59	3.60	3.57	3.58	3.60	3.60	3.59	0.3	
26	4.38	4.46	4.50	4.38	4.28	4.22	4.21	4.35	2.6	
27	4.29	4.28	4.19	4.18	4.15	4.10	4.10	4.18	1.8	
28	4.32	4.27	4.21	4.18	4.13	4.10	4.09	4.18	2.1	
29	3.95	3.99	4.00	3.93	3.88	3.85	3.83	3.92	1.7	
30	4.16	4.08	4.11	3.99	4.00	4.02	3.92	4.04	2.0	
31	3.89	3.80	3.83	3.74	3.76	3.77	3.69	3.78	1.7	
32	4.48	4.41	4.34	4.26	4.29	4.29	4.22	4.33	2.1	
33	4.14	4.12	4.06	4.06	4.05	4.01	3.95	4.06	1.6	
34	3.80	3.86	3.90	3.83	3.77	3.74	3.65	3.79	2.2	
35	3.74	3.85	3.92	3.83	3.80	3.78	3.70	3.80	1.9	
36	3.68	3.76	3.82	3.72	3.70	3.70	3.71	3.73	1.2	
37	3.90	3.89	3.88	3.85	3.85	3.86	3.87	3.87	0.5	
38	3.76	3.82	3.88	3.77	3.77	3.81	3.81	3.80	1.1	
39	3.92	3.99	4.03	3.92	3.92	3.92	3.92	3.94	1.1	
40	3.96	4.03	4.08	3.99	3.97	3.97	3.99	4.00	1.1	
41	4.01	3.93	3.87	3.82	3.82	3.81	3.81	3.87	2.0	
42	4.62	4.60	4.59	4.39	4.39	4.44	4.38	4.49	2.5	
43	4.55	4.62	4.67	4.53	4.46	4.43	4.41	4.52	2.1	
44	5.12	5.00	4.92	4.85	4.79	4.77	4.75	4.89	2.8	
45	4.51	4.38	4.28	4.20	4.20	4.22	4.20	4.28	2.8	
46	3.86	3.84	3.84	3.82	3.78	3.77	3.78	3.81	0.9	
47	3.87	3.90	3.90	3.87	3.83	3.80	3.77	3.85	1.3	
48	4.25	4.27	4.26	4.21	4.15	4.12	4.12	4.20	1.6	
49	4.09	4.11	4.08	4.10	4.02	3.98	3.99	4.05	1.3	
50	4.02	3.89	3.81	3.76	3.73	3.74	3.75	3.81	2.8	
MEDIA	4.18	4.16	4.15	4.07	4.04	4.04	4.00	4.09	2.0	
SD	0.41	0.37	0.34	0.31	0.31	0.32	0.32	0.34	0.9	
RSD%	9.9	8.9	8.2	7.7	7.6	7.8	7.9	8.2	45.4	
Vmín	3.59	3.59	3.60	3.57	3.58	3.57	3.54	3.59	0.3	
Vmáx	5.44	5.27	5.18	5.02	5.02	5.06	5.11	5.15	5.4	

Tabla LV. Evolución de la acidez libre (meq/kg) en las mieles de Galicia con Denominación a lo largo de 24 meses

Número de muestra	ACIDEZ LIBRE (meq/kg)								Media	RSD%
	Inicial	4 meses	8 meses	12 meses	16 meses	20 meses	24 meses			
1	42.0	39.2	41.8	40.4	42.3	44.6	44.1	42.1	4.5	
2	34.4	32.8	35.7	34.7	38.7	40.7	40.8	36.8	8.7	
3	22.9	22.9	24.3	24.5	25.3	26.6	26.6	24.7	6.2	
4	16.7	14.9	13.6	12.9	12.6	12.9	13.6	13.9	10.5	
5	23.8	22.0	20.5	19.5	19.8	20.7	21.3	21.1	7.0	
6	23.0	20.1	16.6	17.2	16.7	17.4	19.1	18.6	12.6	
7	18.4	16.9	15.3	13.5	13.5	14.6	15.4	15.4	11.6	
8	24.5	22.2	20.1	18.4	18.6	20.8	21.3	20.8	10.2	
9	21.4	19.5	17.3	15.2	15.2	16.5	17.5	17.5	12.9	
10	15.4	14.7	14.5	13.2	13.3	14.5	15.4	14.4	6.2	
11	14.4	14.3	14.0	12.5	12.4	13.0	13.8	13.5	6.2	
12	16.6	16.9	17.0	15.3	15.0	15.5	16.6	16.1	5.2	
13	14.8	13.7	12.3	11.1	11.4	12.4	13.4	12.7	10.3	
14	25.0	24.9	24.8	24.0	24.3	25.0	25.5	24.8	2.0	
15	23.6	22.3	21.0	20.8	20.8	21.3	22.5	21.8	4.9	
16	43.1	41.1	39.7	37.8	39.0	40.7	40.4	40.3	4.2	
17	23.6	23.7	23.8	21.8	23.7	24.9	24.1	23.7	3.9	
18	26.3	26.2	26.0	25.2	25.5	26.5	27.1	26.1	2.4	
19	37.8	37.6	37.6	35.1	36.7	39.9	38.9	37.7	4.1	
20	9.2	10.4	10.7	10.3	9.3	9.4	10.9	10.0	7.1	
21	16.4	16.3	16.3	14.6	14.7	15.5	15.6	15.6	4.8	
22	11.7	11.2	10.7	10.0	10.6	11.5	11.5	11.0	5.6	
23	7.2	7.0	6.9	7.5	7.6	7.7	7.7	7.4	4.5	
24	10.2	10.3	9.4	10.6	10.0	9.7	11.1	10.2	5.5	
25	37.2	37.5	38.7	35.9	36.0	37.1	38.1	37.2	2.8	
26	23.0	22.1	23.0	21.6	23.0	24.1	24.6	23.1	4.5	
27	29.0	28.2	30.4	28.5	28.1	28.5	29.4	28.9	2.8	
28	28.8	27.6	30.3	28.1	27.9	28.7	29.6	28.7	3.4	
29	30.6	30.8	31.0	28.8	28.5	29.6	30.5	30.0	3.4	
30	29.6	30.3	30.5	27.7	27.6	29.2	29.9	29.3	4.0	
31	38.5	41.2	44.5	38.1	38.7	39.3	38.7	39.9	5.7	
32	32.0	35.4	38.1	38.3	38.2	38.1	38.2	36.9	6.5	
33	35.9	38.5	41.0	40.2	40.7	41.2	41.2	39.8	4.9	
34	44.4	43.1	46.5	46.0	48.1	49.5	47.5	46.4	4.7	
35	36.8	35.7	37.7	36.4	37.7	39.1	38.0	37.3	3.0	
36	28.1	28.6	26.9	27.3	28.5	29.2	28.7	28.2	2.9	
37	39.3	40.9	40.3	37.1	37.6	39.5	38.4	39.0	3.6	
38	39.2	38.4	40.4	36.9	37.5	38.0	37.2	38.2	3.2	
39	36.6	36.1	38.0	35.0	35.5	36.9	37.1	36.5	2.8	
40	38.2	39.2	39.1	38.1	39.2	40.1	39.2	39.0	1.7	
41	41.3	38.9	41.7	39.0	40.0	43.9	43.3	41.2	4.8	
42	39.9	40.3	43.6	43.5	44.4	45.3	45.7	43.2	5.3	
43	34.4	33.5	34.3	33.8	35.6	36.5	36.6	35.0	3.6	
44	28.4	27.1	29.6	29.2	30.3	31.5	31.8	29.7	5.6	
45	44.8	45.1	48.7	49.3	49.8	50.4	51.1	48.5	5.2	
46	35.2	36.0	36.0	34.5	35.3	36.0	35.8	35.5	1.6	
47	44.4	45.5	45.2	43.6	45.6	47.0	45.9	45.3	2.4	
48	34.4	33.8	34.2	32.7	34.0	35.8	35.1	34.3	2.9	
49	31.0	30.9	30.4	28.4	29.5	32.3	32.6	30.7	4.8	
50	41.0	37.6	41.5	39.4	40.8	43.3	42.6	40.9	4.7	
MEDIA	28.9	28.5	29.0	27.7	28.3	29.4	29.6	28.8	5.2	
SD	10.4	10.6	11.7	11.3	11.8	12.1	11.6	11.3	2.7	
RSD%	36.1	37.2	40.2	40.8	41.7	41.2	39.2	39.3	52.2	
Vmín	7.2	7.0	6.9	7.5	7.6	7.7	7.7	7.4	1.6	
Vmáx	44.8	45.5	48.7	49.3	49.8	50.4	51.1	48.5	12.9	

Tabla LVI. Evolución de la acidez láctica (meq/kg) en las mieles de Galicia con Denominación a lo largo de 24 meses

Número de muestra	ACIDEZ LÁCTICA (meq/kg)								Media	RSD%
	Inicial	4 meses	8 meses	12 meses	16 meses	20 meses	24 meses			
1	3.9	4.0	4.2	6.0	6.0	6.2	6.7	5.3	22.7	
2	1.4	2.7	3.9	5.4	5.5	5.6	6.5	4.4	41.5	
3	0.0	1.7	3.9	5.0	4.9	4.3	3.7	3.4	55.0	
4	0.3	2.9	5.3	5.8	6.2	6.4	5.4	4.6	48.3	
5	2.0	6.3	9.3	10.4	10.3	9.7	9.0	8.1	37.3	
6	0.0	3.2	8.1	7.7	8.6	8.5	6.9	6.1	53.5	
7	0.5	3.9	6.9	8.2	7.8	6.0	4.9	5.5	49.0	
8	0.0	3.9	8.4	10.2	9.7	8.1	7.2	6.8	53.5	
9	0.0	4.1	7.4	8.5	8.6	7.8	6.1	6.1	51.2	
10	0.3	3.4	5.7	7.2	7.1	5.4	4.7	4.8	49.6	
11	0.6	2.9	4.9	6.6	6.3	5.0	4.3	4.4	47.4	
12	2.9	4.6	6.1	8.2	8.2	6.7	5.8	6.1	31.4	
13	0.0	2.6	4.9	5.5	5.9	6.0	4.1	4.1	52.6	
14	6.3	9.1	10.7	11.4	11.5	11.3	10.7	10.1	18.6	
15	4.2	7.7	10.4	10.0	10.3	10.4	8.3	8.8	26.2	
16	8.7	13.6	16.7	17.6	16.8	16.2	16.1	15.1	20.4	
17	7.8	9.4	10.2	11.7	11.0	10.3	10.3	10.1	12.4	
18	6.7	9.8	11.7	12.7	12.3	11.4	10.5	10.7	19.0	
19	9.8	13.2	15.2	16.2	16.0	15.3	14.7	14.3	15.6	
20	0.0	0.2	1.8	3.4	3.1	2.4	1.8	1.8	72.6	
21	4.1	5.0	5.9	7.0	6.1	5.5	5.5	5.6	16.4	
22	0.9	2.7	4.1	4.6	4.3	4.1	4.2	3.6	37.1	
23	0.0	0.0	1.8	2.6	2.1	1.2	1.2	1.3	78.1	
24	0.0	0.3	3.1	3.6	3.2	2.8	3.0	2.3	64.7	
25	13.9	15.0	16.8	20.4	19.1	17.4	18.1	17.2	13.1	
26	2.4	4.1	5.1	5.5	6.5	7.0	5.3	5.1	29.8	
27	2.2	5.8	8.2	9.5	9.7	9.5	8.9	7.7	36.0	
28	4.3	6.4	7.5	9.5	9.8	9.1	8.6	7.9	25.1	
29	7.5	9.1	10.7	12.2	12.7	12.5	11.4	10.9	17.8	
30	8.2	9.0	10.5	13.4	13.4	12.7	12.2	11.3	18.7	
31	13.0	13.7	14.9	15.9	16.9	17.9	18.8	15.9	13.5	
32	2.9	5.7	7.8	9.8	9.0	8.4	9.1	7.5	32.3	
33	6.0	7.8	9.6	11.8	11.0	10.4	11.0	9.7	21.4	
34	16.0	16.9	18.2	20.7	18.8	15.1	18.7	17.8	10.7	
35	13.2	13.4	13.7	16.0	14.8	13.9	14.6	14.2	6.8	
36	4.5	9.1	12.0	12.5	11.4	10.8	10.6	10.1	26.8	
37	9.7	12.7	16.1	20.1	18.0	16.3	18.4	15.9	22.6	
38	11.8	12.3	13.9	17.9	16.5	14.4	15.9	14.7	15.2	
39	10.4	11.1	12.4	16.1	14.8	13.8	14.3	13.3	15.4	
40	9.3	11.7	13.5	15.5	14.7	13.7	15.4	13.4	16.7	
41	13.6	14.1	14.8	18.5	17.0	15.5	16.9	15.8	11.3	
42	3.9	5.2	6.4	8.0	7.7	7.3	7.2	6.5	22.8	
43	1.9	3.8	5.5	6.3	6.3	6.2	6.0	5.1	32.6	
44	4.4	4.6	4.8	6.2	6.5	6.7	7.1	5.8	19.5	
45	2.7	5.1	6.8	8.0	7.6	7.1	7.9	6.5	29.8	
46	10.0	13.4	16.3	19.1	17.0	15.9	17.8	15.6	19.5	
47	9.7	13.3	16.1	17.7	16.7	15.5	17.6	15.2	18.8	
48	5.0	6.9	8.0	9.0	8.9	8.7	9.5	8.0	19.7	
49	6.6	9.5	11.9	12.3	12.4	11.5	10.8	10.7	19.3	
50	15.1	15.2	15.5	18.6	17.3	15.3	16.9	16.3	8.4	
MEDIA	5.4	7.4	9.4	10.9	10.5	9.8	9.8	9.0	30.0	
SD	4.7	4.6	4.5	5.1	4.7	4.4	5.0	4.6	17.4	
RSD%	88.1	61.4	48.3	46.8	44.3	44.5	51.4	51.3	57.9	
Vmín	0.0	0.0	1.8	2.6	2.1	1.2	1.2	1.3	6.8	
Vmáx	16.0	16.9	18.2	20.7	19.1	17.9	18.8	17.8	78.1	

Tabla LVII. Evolución de la acidez total (meq/kg) en las mieles de Galicia con Denominación a lo largo de 24 meses

Número de muestra	ACIDEZ TOTAL (meq/kg)								Media	RSD%
	Inicial	4 meses	8 meses	12 meses	16 meses	20 meses	24 meses			
1	45.9	43.2	46.0	46.4	48.3	50.8	50.8	47.3	5.9	
2	35.8	35.5	39.6	40.1	44.2	46.3	47.3	41.3	11.6	
3	22.9	24.6	28.2	29.5	30.2	30.9	30.3	28.1	11.1	
4	17.0	17.8	18.9	18.7	18.8	19.3	19.0	18.5	4.4	
5	25.8	28.3	29.8	29.9	30.1	30.4	30.3	29.2	5.7	
6	23.0	23.3	24.7	23.1	24.3	25.9	26.0	24.3	5.3	
7	18.9	20.8	22.2	21.7	21.3	20.6	20.3	20.8	5.2	
8	24.5	26.1	28.5	28.6	28.3	28.9	28.5	27.6	6.0	
9	21.4	23.6	24.7	23.7	23.8	24.3	23.6	23.6	4.4	
10	15.7	18.1	20.2	20.4	20.4	19.9	20.1	19.3	9.2	
11	15.0	17.2	18.9	19.1	18.7	18.0	18.1	17.9	7.9	
12	19.5	21.5	23.1	23.5	23.2	22.2	22.4	22.2	6.2	
13	14.8	16.3	17.2	16.6	17.3	18.4	17.5	16.9	6.7	
14	31.3	34.0	35.5	35.4	35.8	36.3	36.2	34.9	5.1	
15	27.8	30.0	31.4	30.8	31.1	31.7	30.8	30.5	4.3	
16	51.8	54.7	56.4	55.4	55.8	56.9	56.5	55.4	3.1	
17	31.4	33.1	34.0	33.5	34.7	35.2	34.4	33.8	3.7	
18	33.0	36.0	37.7	37.9	37.8	37.9	37.6	36.8	5.0	
19	47.6	50.8	52.8	51.3	52.7	55.2	53.6	52.0	4.7	
20	9.2	10.6	12.5	13.7	12.4	11.8	12.7	11.8	12.7	
21	20.5	21.3	22.2	21.6	20.8	21.0	21.1	21.2	2.6	
22	12.6	13.9	14.8	14.6	14.9	15.6	15.7	14.6	7.3	
23	7.2	7.0	8.7	10.1	9.7	8.9	8.9	8.6	13.4	
24	10.2	10.6	12.5	14.2	13.2	12.5	14.1	12.5	12.6	
25	51.1	52.5	55.5	56.3	55.1	54.5	56.2	54.5	3.6	
26	25.4	26.2	28.1	27.1	29.5	31.1	29.9	28.2	7.4	
27	31.2	34.0	38.6	38.0	37.8	38.0	38.3	36.6	7.8	
28	33.1	34.0	37.8	37.6	37.7	37.8	38.2	36.6	5.8	
29	38.1	39.9	41.7	41.0	41.2	42.1	41.9	40.8	3.5	
30	37.8	39.3	41.0	41.1	41.0	41.9	42.1	40.6	3.8	
31	51.5	54.9	59.4	54.0	55.6	57.2	57.5	55.7	4.6	
32	34.9	41.1	45.9	48.1	47.2	46.5	47.3	44.4	10.8	
33	41.9	46.3	50.6	52.0	51.7	51.6	52.2	49.5	7.9	
34	60.4	60.0	64.7	66.7	66.9	64.6	66.2	64.2	4.5	
35	50.0	49.1	51.4	52.4	52.5	53.0	52.6	51.6	2.9	
36	32.6	37.7	38.9	39.8	39.9	40.0	39.3	38.3	6.9	
37	49.0	53.6	56.4	57.2	55.6	55.8	56.8	54.9	5.2	
38	51.0	50.7	54.3	54.8	54.0	52.4	53.1	52.9	3.0	
39	47.0	47.2	50.4	51.1	50.3	50.7	51.4	49.7	3.7	
40	47.5	50.9	52.6	53.6	53.9	53.8	54.6	52.4	4.7	
41	54.9	53.0	56.5	57.5	57.0	59.4	60.2	56.9	4.4	
42	43.8	45.5	50.0	51.5	52.1	52.6	52.9	49.8	7.4	
43	36.3	37.3	39.8	40.1	41.9	42.7	42.6	40.1	6.3	
44	32.8	31.7	34.4	35.4	36.8	38.2	38.9	35.5	7.6	
45	47.5	50.2	55.5	57.3	57.4	57.5	59.0	54.9	7.9	
46	45.2	49.4	52.3	53.6	52.3	51.9	53.6	51.2	5.8	
47	54.1	58.8	61.3	61.3	62.3	62.5	63.5	60.5	5.3	
48	39.4	40.7	42.2	41.7	42.9	44.5	44.6	42.3	4.5	
49	37.6	40.4	42.3	40.7	41.9	43.8	43.4	41.4	5.1	
50	56.1	52.8	57.0	58.0	58.1	58.6	59.5	57.2	3.9	
MEDIA	34.3	35.9	38.4	38.6	38.8	39.2	39.4	37.8	6.2	
SD	14.3	14.3	15.1	15.2	15.2	15.4	15.7	15.0	2.7	
RSD%	41.6	39.9	39.2	39.4	39.3	39.2	39.7	39.6	43.4	
Vmín	7.2	7.0	8.7	10.1	9.7	8.9	8.9	8.6	2.6	
Vmáx	60.4	60.0	64.7	66.7	66.9	64.6	66.2	64.2	13.4	

El valor medio de pH del conjunto de las muestras analizadas disminuye ligeramente a lo largo del estudio, lo que coincide con lo encontrado por otros autores (*Wootton et al., 1976; Sancho, 1990; Sancho et al., 1991; Cosentino et al., 1996*). Si se considera cada una de las mieles individualmente, se observa que a los 12 meses el 70% de las muestras poseen un valor de pH inferior al inicial mientras que a los 24 meses este porcentaje asciende a un 84% (Tabla LIV).

En cuanto a la acidez libre, la evolución de su valor medio durante el primer año no sigue una tendencia definida ya que se producen oscilaciones. A partir de los 12 meses se observa una ligera tendencia de aumento de forma que al final del estudio el valor medio de acidez libre es mayor que el valor medio inicial. Estas variaciones u oscilaciones en el valor de la acidez libre también han sido descritas por otros autores (*Wootton et al., 1976; Cavia, 2002*). Al considerar cada una de las mieles individualmente, se observa que a los 12 meses sólo el 22% de las muestras poseen una acidez libre superior al valor inicial mientras que a los 24 meses este porcentaje asciende al 66%. Es decir, al finalizar el estudio, la mayor parte de las mieles analizadas presentan una acidez libre superior al valor inicial (Tabla LV).

La acidez láctica media aumenta durante el primer año, a partir del cual disminuye ligeramente para acabar estabilizándose. Así al finalizar el estudio, el valor medio de acidez láctica es superior al valor medio inicial, lo que coincide con lo descrito por otros autores (*White et al., 1961; Krauze y Krauze, 1991; Jiménez et al., 1994*). Si se considera cada una de las mieles individualmente, se observa que tanto a los 12 como a los 24 meses el 100% de las muestras poseen un valor de acidez láctica superior al valor inicial, aunque sólo en el 10% de estas muestras el valor a los 24 meses es mayor que a los 12 meses (Tabla LVI).

Por último, el valor medio de acidez total de todas las muestras analizadas aumenta durante el almacenamiento siendo este aumento más acusado durante los 8 primeros meses del estudio. Posteriormente el incremento que se produce es muy pequeño por lo que se podría decir que prácticamente se estabiliza. Este aumento en el valor de la acidez total con el tiempo ha sido descrito también por otros autores (*White et al., 1961; Krauze y Krauze, 1991; Jiménez et al., 1994; Cosentino et al., 1996; Azeredo et al., 1999; Bath y Singh, 2000*). Al considerar cada una de las mieles individualmente, se observa que tanto a los 12 como a los 24 meses el 100% de las muestras poseen un valor de acidez total superior al valor inicial, aunque en el 64% de estas muestras el valor a los 24 meses es mayor que a los 12 meses (Tabla LVII).

Para cada una de las mieles, se han calculado los ajustes a una determinada función de los resultados obtenidos para el pH y tipos de acidez (acidez libre, láctónica y total) con el tiempo (Tabla LVIII). Sólo se han considerado aquellas relaciones significativas ($p < 0.05$) con coeficientes de correlación (r) mayores o iguales a 0.985. Los modelos generales de las ecuaciones se describen en dicha tabla, de forma que para todas ellas t es el parámetro analizado en cada caso y t el tiempo medido en días. Se ha utilizado el tiempo medido en días y no en meses para obtener un mejor ajuste de los datos. La obtención de un tipo de ajuste determinado permitiría, por interpolación, conocer los valores del pH o de los tipos de acidez de una miel a cualquier tiempo dentro de los dos años del estudio.

En el caso del pH, se han encontrado ajustes significativos en el 20% de las muestras, siendo el ajuste cuadrático o a un polinomio de grado dos el mayoritario. En lo que se refiere a la acidez libre, acidez láctónica y acidez total, los ajustes significativos con un coeficiente de correlación igual o mayor a 0.985, se han obtenido en el 10%, 18% y 26% de las muestras, respectivamente. Los ajustes encontrados en mayor proporción son el cuadrático o a un polinomio de grado dos para la acidez libre y el cúbico o a un polinomio de grado tres para la acidez láctónica y acidez total. Si se tienen en cuenta todos los tipos de ajustes significativos, independientemente del coeficiente de correlación obtenido, los porcentajes ascenderían al 64% de las muestras para el pH, al 34% para la acidez libre, al 42% para la acidez láctónica y al 64% para la acidez total.

En la bibliografía consultada, sólo *Cavia (2002)* ha estudiado los ajustes a una función de la evolución de estos parámetros con el tiempo en cada muestra de miel, aunque no se muestran los coeficientes de correlación obtenidos. En este trabajo, no se encontraron ajustes significativos para el pH ni en las mieles de Galicia ni en las de Burgos analizadas. En lo que se refiere a los tipos de acidez, se obtuvieron ajustes significativos a ecuaciones de tipo lineal, exponencial o inversa en algunas de las muestras analizadas. El porcentaje de muestras de Galicia cuya evolución con el tiempo se ajusta a alguna función fue del 17% para la acidez libre, 14% para la acidez láctónica y 54% para la acidez total. En el caso de las mieles de Burgos estos porcentajes fueron del 16% para la acidez libre, 40% para la acidez láctónica y 60% para la acidez total.

Tabla LVIII. Tipos de ajustes a una determinada función de los resultados obtenidos en la evolución de los valores de pH y tipos de acidez (libre, láctónica y total expresadas en meq/kg) con el tiempo (en días) en las mieles de Galicia con Denominación

TIPO DE AJUSTE	Nº MUESTRA (coeficiente de correlación)			
	pH	Acidez libre	Acidez láctónica	Acidez total
CUADRÁTICO $y = b_0 + (b_1 t) + (b_2 t^2)$	3 (0.988) 21 (0.989) 22 (0.988) 23 (0.991) 28 (0.989) 44 (1.000) 50 (0.999)	4 (0.999) 13 (0.987) 15 (0.990)	9 (0.988) 14 (0.994)	3 (0.994) 35 (0.994)
CÚBICO $y = b_0 + (b_1 t) + (b_2 t^2) + (b_3 t^3)$	47 (1.000) 48 (1.000)	36 (1.000)	5 (1.000) 8 (0.999) 24 (0.999) 27 (1.000) 29 (0.999) 36 (1.000) 43 (1.000)	11 (1.000) 33 (1.000) 36 (0.999) 39 (0.999) 40 (0.999) 45 (1.000)
INVERSO $y = b_0 + (b_1 / t)$	41 (0.985)	45 (0.989)		5 (0.986) 42 (0.999) 50 (0.997)
LOGARÍTMICO $y = b_0 + [b_1 \ln(t)]$				41 (0.994)
POTENCIAL $y = b_0 + (t^{b_1})$ ó $\ln(y) = \ln(b_0) + [b_1 \ln(t)]$				44 (0.993)

La Figura 63 muestra la evolución del valor medio de pH y de los tipos de acidez (libre, láctónica y total expresadas en meq/kg) durante los 24 meses del estudio en las mieles de Galicia con Denominación agrupadas según la provincia de procedencia del envasador.

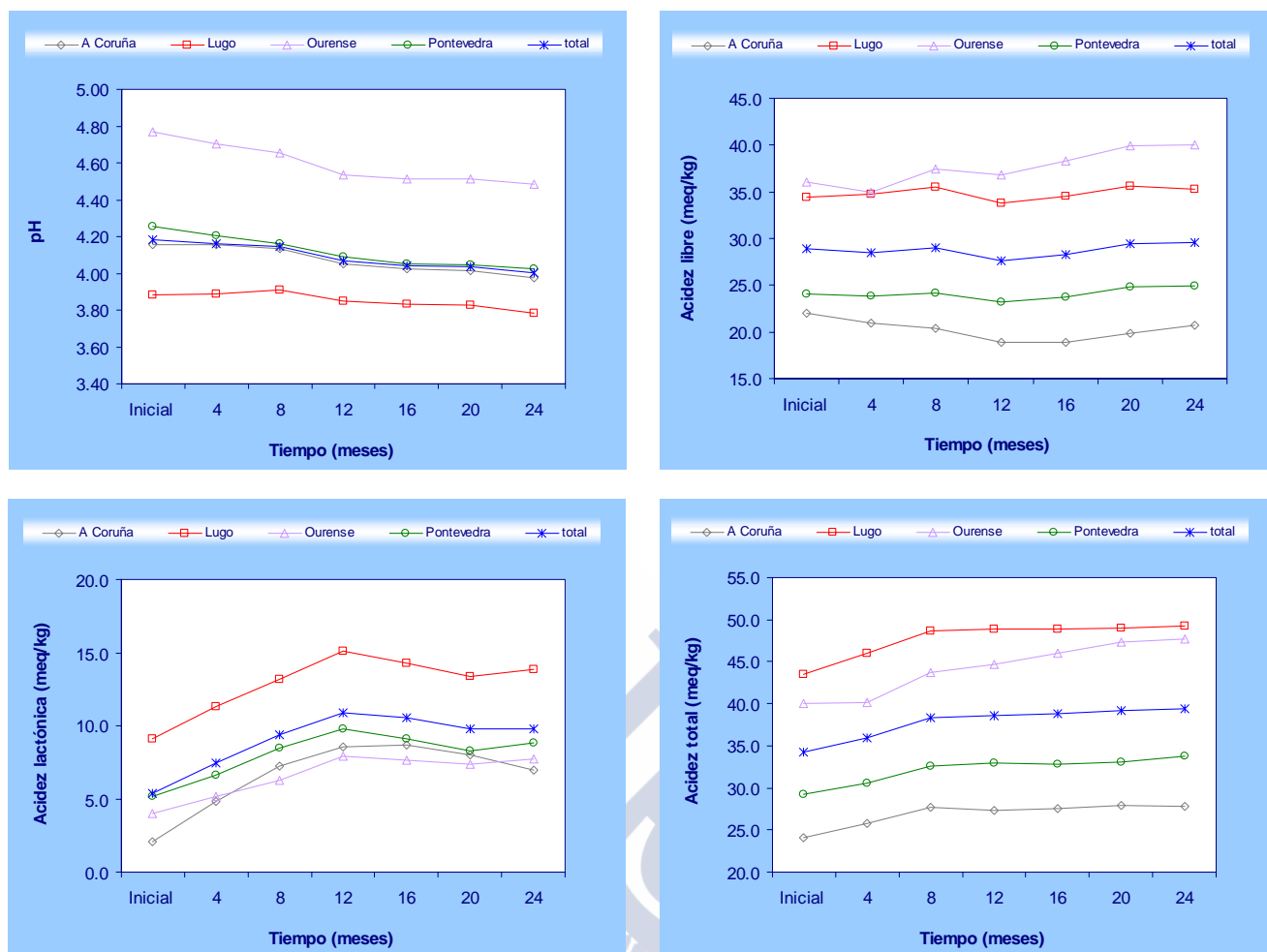


Figura 63. Evolución con el tiempo del valor medio de pH y de los tipos de acidez (libre, láctica y total expresadas en meq/kg) en las mieles de Galicia con Denominación agrupadas según la provincia de procedencia del envasador.

En cada uno de los gráficos de esta figura se observa lo siguiente:

pH: las variaciones mayores en el valor medio de pH de las mieles de las cuatro provincias se producen durante el primer año, estabilizándose posteriormente.

Acidez libre: el valor medio de la acidez libre es variable en las cuatro provincias gallegas durante el primer año del estudio. Sin embargo, en el segundo año, la evolución del valor medio de la acidez libre durante el almacenamiento es similar y con tendencia al aumento en todas las provincias.

Acidez láctica: durante el primer año del estudio, se produce un aumento en el valor medio de la acidez láctica que es prácticamente lineal en todas las provincias, salvo en la de A Coruña. A partir de los 12 meses, los valores medios de acidez láctica de las cuatro provincias disminuyen ligeramente o permanecen estables.

Acidez total: la evolución del valor medio de la acidez total es similar en todas las provincias salvo en la de Ourense. En esta provincia el valor medio se mantiene constante en los dos primeros análisis y aumenta en los restantes.

La Figura 64 recoge la evolución del valor medio de pH y de los tipos de acidez (libre, lactónica y total expresadas en meq/kg) durante los 24 meses del estudio en las mieles de Galicia con Denominación agrupadas según el espectro polínico.

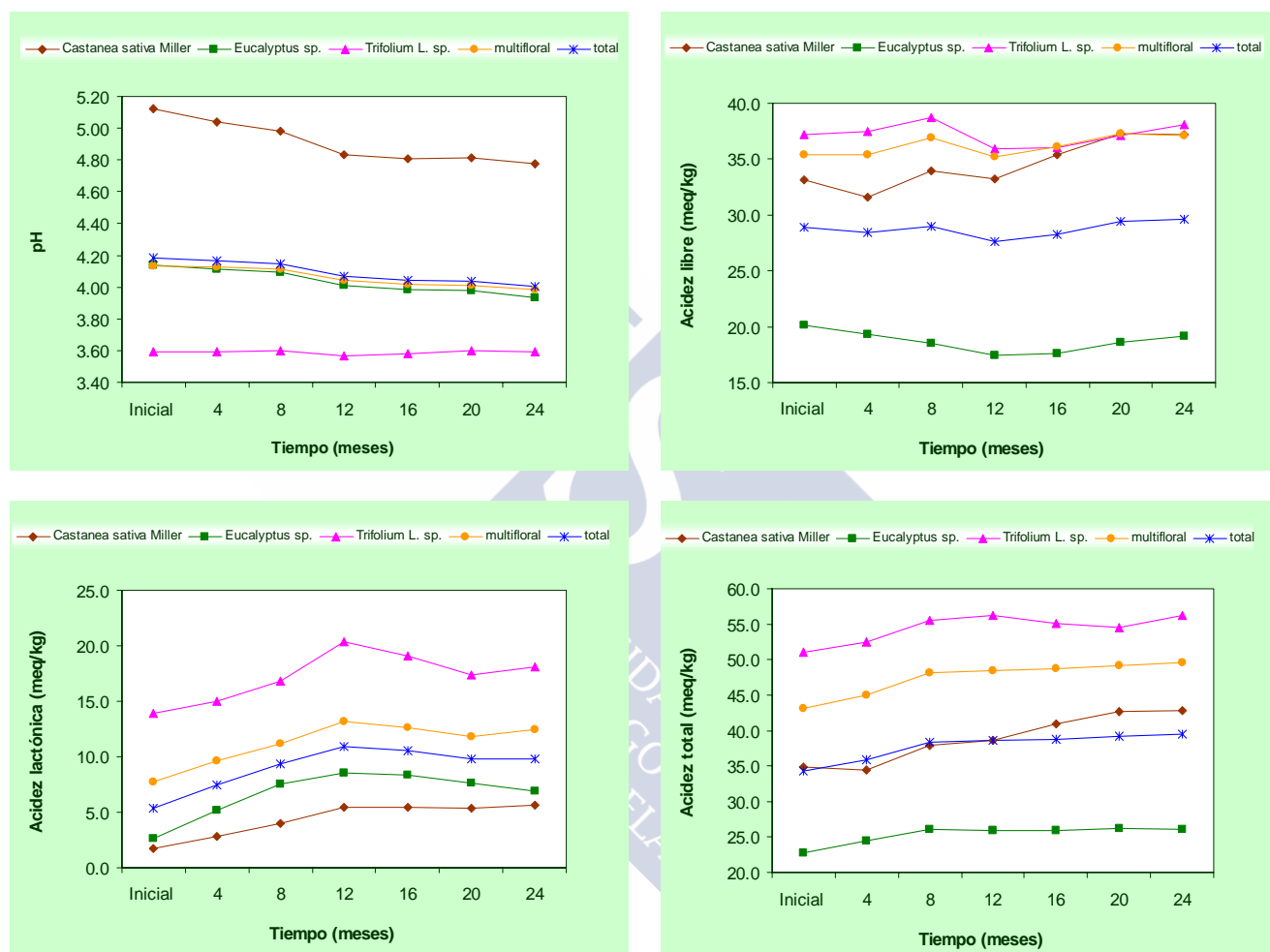


Figura 64. Evolución con el tiempo del valor medio de pH y de los tipos de acidez (libre, lactónica y total expresadas en meq/kg) en las mieles de Galicia con Denominación agrupadas según el espectro polínico.

En cada uno de los gráficos de esta figura se observa lo siguiente:

pH: las variaciones mayores en el valor medio de pH de las mieles de *Castanea sativa* Miller, *Eucalyptus* sp. y multiflorales se producen durante el primer año del estudio, estabilizándose posteriormente. En el caso de la muestra de *Trifolium* L.

sp. (como también se puede comprobar en la Tabla LIV) el valor de pH es prácticamente constante a lo largo de todo el estudio.

Acidez libre: se observa claramente que el espectro polínico va a influenciar la evolución del valor medio de la acidez libre, ya que su comportamiento a lo largo del almacenamiento es diferente en las mieles de *Castanea sativa* Miller, *Eucalyptus* sp., *Trifolium* L. sp y multiflorales.

Acidez láctica: para todos los orígenes botánicos, la evolución del valor medio de la acidez láctica durante el almacenamiento es similar. Así durante el primer año, este valor medio aumenta, siendo este aumento lineal en las mieles de *Castanea sativa* Miller y multiflorales. A partir de los 12 meses se produce una disminución del valor medio de la acidez láctica en todas las muestras analizadas.

Acidez total: la evolución del valor medio de acidez total es semejante en las muestras de *Eucalyptus* sp., *Trifolium* L. sp y multiflorales pero diferente en la de *Castanea sativa* Miller.

6.2.2.3.1. PREDICCIÓN DEL pH Y LOS TIPOS DE ACIDEZ CON EL TIEMPO

Uno de los objetivos de un estudio de evolución es establecer ecuaciones que permitan predecir los valores de un parámetro a lo largo del tiempo a partir de su valor inicial. Para ello se ha determinado la posible relación entre los valores iniciales de los distintos parámetros analizados y los valores experimentales obtenidos a los 4, 8, 12, 16, 20 y 24 meses.

Krauze y Krauze (1991) obtuvieron correlación significativa entre la acidez libre inicial y después de un almacenamiento de 24 meses ($r = 0.9570$). Sin embargo al estudiar la acidez láctica no encontraron ninguna relación significativa. *Cavia (2002)* encontró relaciones significativas entre los valores iniciales de pH, acidez libre, acidez láctica y acidez total y los valores experimentales a los 10, 15, 20, 25 y 30 meses.

En las Tablas LIX, LX, LXI y LXII se recogen, respectivamente, las correlaciones lineales entre los valores iniciales de pH, acidez libre, acidez láctica y acidez total y los valores experimentales obtenidos a los 4, 8, 12, 16, 20 y 24 meses. En todos los casos se comprueba que las correlaciones lineales son significativas a un nivel de confianza del 99%. En las Figuras 65, 66, 67 y 68 se pueden visualizar gráficamente las correlaciones lineales

que existen entre los valores iniciales de estos parámetros y los valores experimentales obtenidos a los 12 y 24 meses (V12e y V24e).

Tabla LIX. Correlaciones lineales entre el valor inicial de pH y los valores experimentales obtenidos a los 4, 8, 12, 16, 20 y 24 meses

pH	pH inicial (Vinicial)		
	Coefficiente de correlación de Pearson (r)	Sig. (bilateral)	Nº de muestras
pH a los 4 meses (V4e)	0.984*	0.000	50
pH a los 8 meses (V8e)	0.949*	0.000	50
pH a los 12 meses (V12e)	0.952*	0.000	50
pH a los 16 meses (V16e)	0.965*	0.000	50
pH a los 20 meses (V20e)	0.969*	0.000	50
pH a los 24 meses (V24e)	0.953*	0.000	50

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

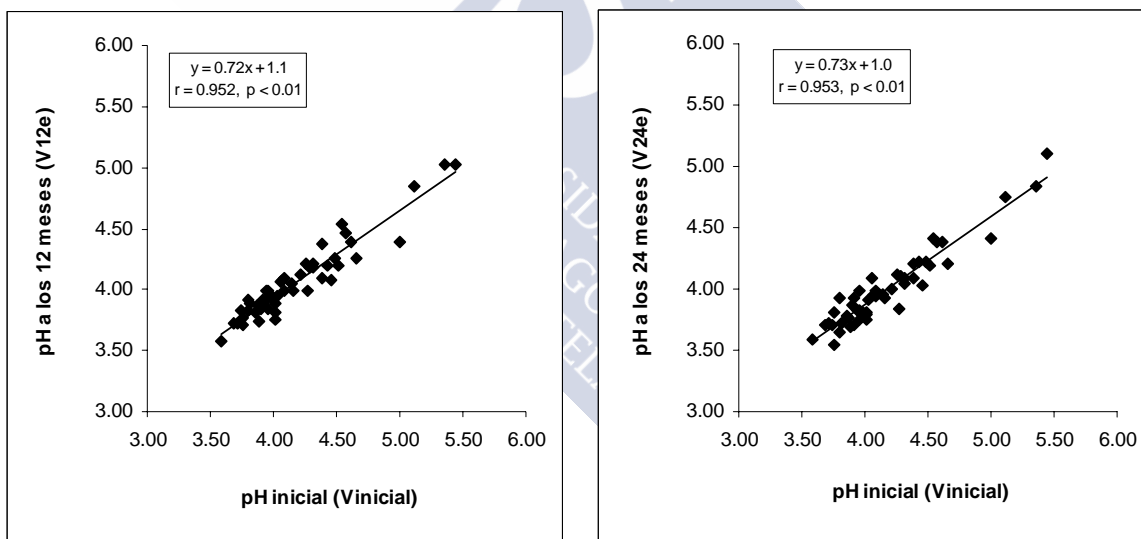


Figura 65. Representación gráfica de las correlaciones lineales entre el valor inicial de pH y los valores experimentales obtenidos a los 12 y 24 meses (V12e y V24e).

Tabla LX. Correlaciones lineales entre el valor inicial de acidez libre y los valores experimentales obtenidos a los 4, 8, 12, 16, 20 y 24 meses

Acidez libre (meq/kg)	Acidez libre inicial (Vinicial) (meq/kg)		
	Coefficiente de correlación de Pearson (r)	Sig. (bilateral)	Nº de muestras
Acidez libre a los 4 meses (V4e)	0.991*	0.000	50
Acidez libre a los 8 meses (V8e)	0.982*	0.000	50
Acidez libre a los 12 meses (V12e)	0.976*	0.000	50
Acidez libre a los 16 meses (V16e)	0.976*	0.000	50
Acidez libre a los 20 meses (V20e)	0.980*	0.000	50
Acidez libre a los 24 meses (V24e)	0.980*	0.000	50

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

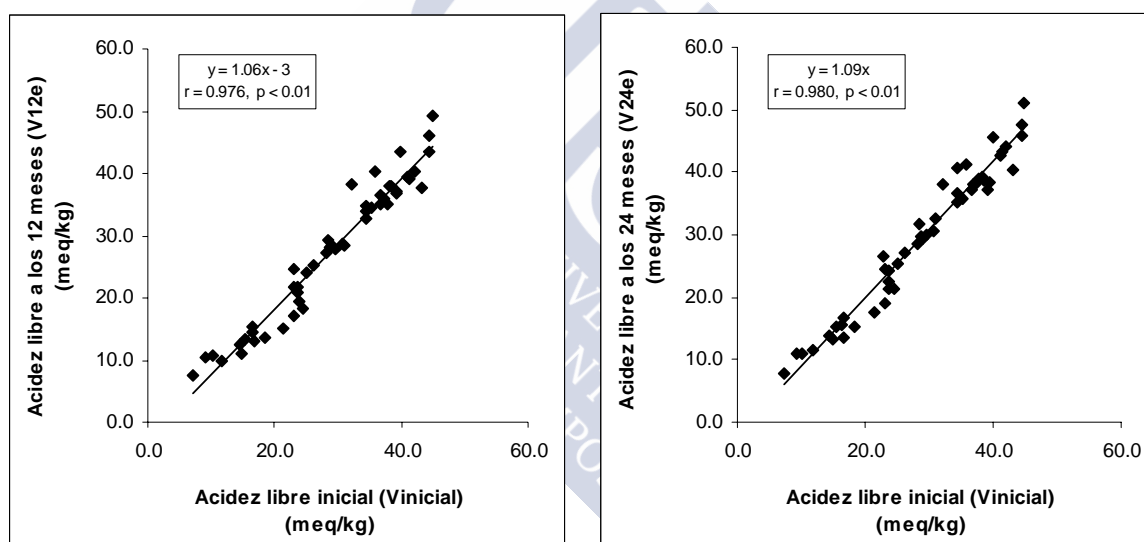


Figura 66. Representación gráfica de las correlaciones lineales entre el valor inicial de acidez libre y los valores experimentales obtenidos a los 12 y 24 meses (V12e y V24e).

Tabla LXI. Correlaciones lineales entre el valor inicial de acidez láctónica y los valores experimentales obtenidos a los 4, 8, 12, 16, 20 y 24 meses

Acidez láctónica (meq/kg)	Acidez láctónica inicial (Vinicial) (meq/kg)		
	Coefficiente de correlación de Pearson (r)	Sig. (bilateral)	Nº de muestras
Acidez láctónica a los 4 meses (V4e)	0.959*	0.000	50
Acidez láctónica a los 8 meses (V8e)	0.889*	0.000	50
Acidez láctónica a los 12 meses (V12e)	0.915*	0.000	50
Acidez láctónica a los 16 meses (V16e)	0.911*	0.000	50
Acidez láctónica a los 20 meses (V20e)	0.899*	0.000	50
Acidez láctónica a los 24 meses (V24e)	0.934*	0.000	50

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

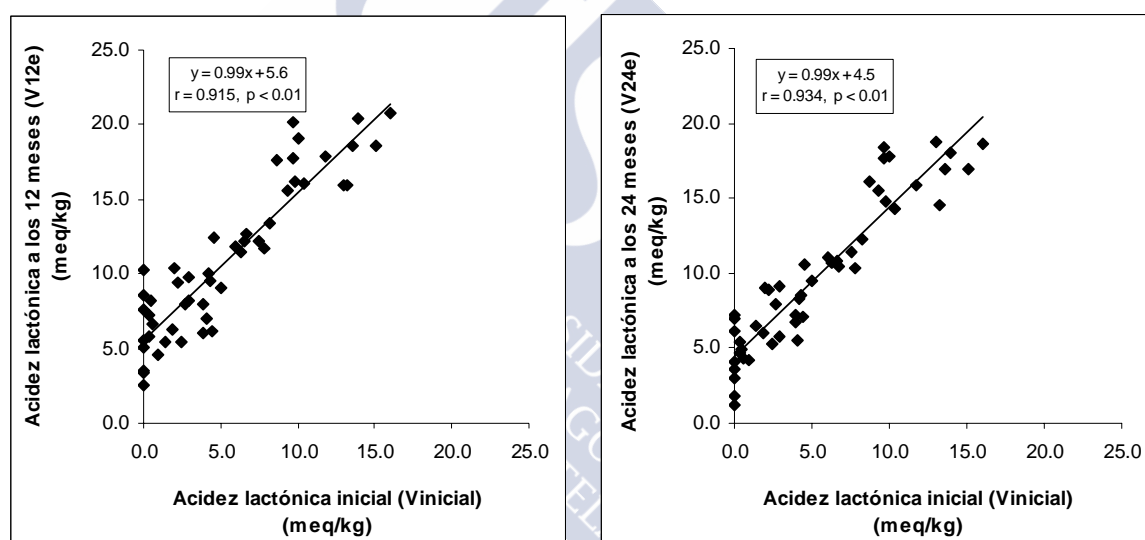


Figura 67. Representación gráfica de las correlaciones lineales entre el valor inicial de acidez láctónica y los valores experimentales obtenidos a los 12 y 24 meses (V12e y V24e).

Tabla LXII. Correlaciones lineales entre el valor inicial de acidez total y los valores experimentales obtenidos a los 4, 8, 12, 16, 20 y 24 meses

Acidez total (meq/kg)	Acidez total inicial (V _{inicial}) (meq/kg)		
	Coefficiente de correlación de Pearson (r)	Sig. (bilateral)	Nº de muestras
Acidez total a los 4 meses (V _{4e})	0.991*	0.000	50
Acidez total a los 8 meses (V _{8e})	0.990*	0.000	50
Acidez total a los 12 meses (V _{12e})	0.986*	0.000	50
Acidez total a los 16 meses (V _{16e})	0.988*	0.000	50
Acidez total a los 20 meses (V _{20e})	0.989*	0.000	50
Acidez total a los 24 meses (V _{24e})	0.988*	0.000	50

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

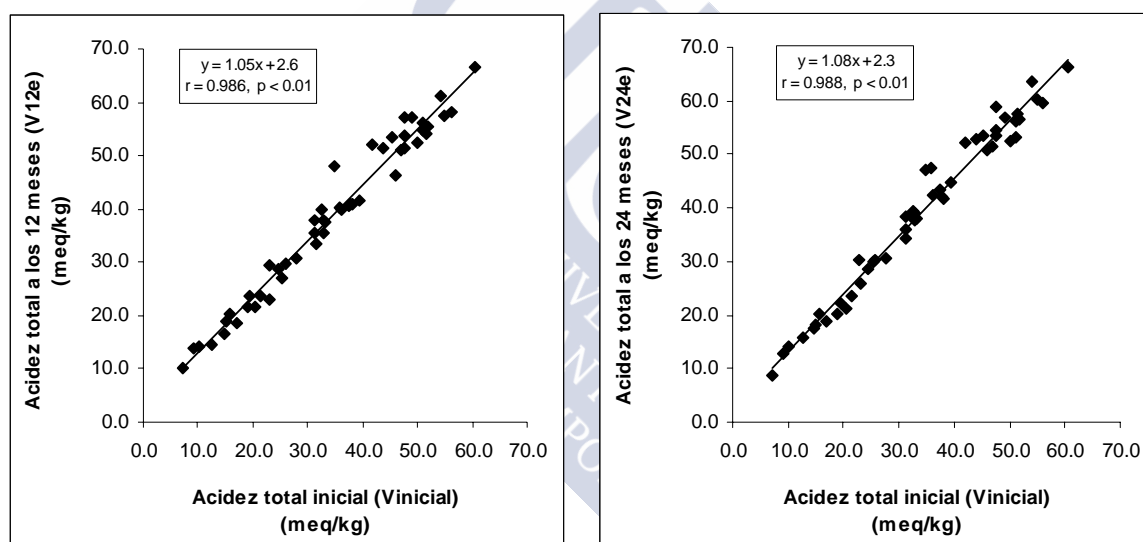


Figura 68. Representación gráfica de las correlaciones lineales entre el valor inicial de acidez total y los valores experimentales obtenidos a los 12 y 24 meses (V_{12e} y V_{24e}).

Una vez que se ha determinado la existencia de correlación significativa entre los valores iniciales y los valores experimentales obtenidos en los diferentes análisis, se van a calcular los valores (V_c) que se obtendrían a partir de las rectas de regresión lineal para cada uno de los parámetros estudiados. Al representar los valores experimentales (V_e) frente a los calculados (V_c) a partir de la recta de regresión lineal, se va a obtener una nueva recta para cada uno de los análisis. Se llega a la conclusión de que no hay

diferencias significativas entre los dos grupos de valores (experimentales y calculados) si se cumplen los siguientes requisitos (Miller y Miller, 2002):

- ✓ Que la regresión sea significativa, es decir, para que esto suceda es necesario que p sea < 0.05 a un nivel de confianza del 95%. Para determinar la significación de la regresión se realiza una prueba ANOVA.
- ✓ Que la ordenada en el origen y la pendiente de la recta de regresión no difieran de forma significativa de los valores ideales de 0 y 1, respectivamente. Para que esto suceda es necesario que el intervalo de confianza calculado para la ordenada en el origen incluya el valor ideal de 0 y el calculado para la pendiente incluya el valor ideal de 1.

A continuación y siguiendo el esquema anterior se va a analizar si es posible predecir los valores a los 12 y 24 meses a partir del valor inicial para cada parámetro individualmente. Se han elegido los valores a los 12 y 24 meses por ser los valores mitad y final del estudio.

pH

Para el cálculo de los valores de pH a los 12 y 24 meses (V12c y V24c) a partir del valor inicial se han utilizado las rectas de regresión lineal determinadas con anterioridad (Figura 65):

- Vinicial-V12e
 $y = 0.72 x + 1.1$ ($r = 0.952$, $p < 0.01$)
- Vinicial-V24e
 $y = 0.73 x + 1.0$ ($r = 0.953$, $p < 0.01$)

En las Tablas LXIII y LXIV se recogen los resultados obtenidos para las regresiones lineales entre los valores experimentales de pH a los 12 y 24 meses (V12e y V24e) y los calculados (V12c y V24c) a partir de las rectas de regresión Vinicial-V12e y Vinicial-V24e, respectivamente. Según estos resultados, a pesar de que las regresiones fueron significativas en ambos casos (Tabla LXIII), el pH inicial no se podría utilizar para predecir los valores a los 12 ni a los 24 meses ya que los valores experimentales y los calculados no son significativamente iguales (Tabla LXIV).

Tabla LXIII. Prueba de ANOVA para determinar la significación de las regresiones lineales entre los valores de pH experimentales (V12e y V24e) y calculados (V12c y V24c), ambos a los 12 y 24 meses

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p
V12e-V12c	Regresión	3.967	1	3.967	464.529	0.000
	Residual	0.410	48	8.541E-03		
	Total	4.377	49			
V24e-V24c	Regresión	4.055	1	4.055	468.112	0.000
	Residual	0.416	48	8.663E-03		
	Total	4.471	49			

Tabla LXIV. Coeficientes e intervalos de confianza de las rectas de regresión lineal entre los valores de pH experimentales (V12e y V24e) y calculados (V12c y V24c), ambos a los 12 y 24 meses

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	p	Intervalo de confianza para B al 95%	
		B	Error típ.	Beta			Límite inferior	Límite superior
V12e-V12c	Ordenada	0.405	0.172		2.351	0.023	0.059	0.752
	Pendiente	0.910	0.042	0.952	21.553	0.000	0.825	0.995
V24e-V24c	Ordenada	0.416	0.169		2.470	0.017	0.077	0.755
	Pendiente	0.908	0.042	0.952	21.636	0.000	0.824	0.993

Variables dependientes: V12c, V24c.

ACIDEZ LIBRE

Para el cálculo de los valores de acidez libre a los 12 y 24 meses (V12c y V24c) a partir del valor inicial se han utilizado las rectas de regresión lineal determinadas con anterioridad (Figura 66):

- Vinicial-V12e

$$y = 1.06 x + 3 \text{ (} r = 0.976, p < 0.01 \text{)}$$
- Vinicial-V24e

$$y = 1.09 x \text{ (} r = 0.980, p < 0.01 \text{)}$$

En las Tablas LXV y LXVI se recogen los resultados obtenidos para las regresiones lineales entre los valores experimentales de acidez libre a los 12 y 24 meses (V12e y V24e) y los calculados (V12c y V24c) a partir de las rectas de regresión Vinicial-V12e y Vinicial-V24e, respectivamente. En la Tabla LXV se pone de manifiesto que, en ambos casos, las

regresiones fueron significativas ($p < 0.01$). De acuerdo con los resultados obtenidos en la Tabla LXVI el valor de acidez libre inicial se podría utilizar para predecir los valores a los 12 meses ya que los valores experimentales y los calculados son significativamente iguales, pero no para predecir los valores a los 24 meses pues el valor de la ordenada en el origen no es significativamente igual a 0. La predicción de la acidez libre tiene gran importancia ya que éste es un parámetro que está legislado (DOCE, 2002; BOE, 2003).

Tabla LXV. Prueba de ANOVA para determinar la significación de las regresiones lineales entre los valores de acidez libre experimentales (V12e y V24e) y calculados (V12c y V24c), ambos a los 12 y 24 meses

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p
V12e-V12c	Regresión	5714.215	1	5714.215	954.391	0.000
	Residual	287.390	48	5.987		
	Total	6001.605	49			
V24e-V24c	Regresión	6089.412	1	6089.412	1171.545	0.000
	Residual	249.493	48	5.198		
	Total	6338.905	49			

Tabla LXVI. Coeficientes e intervalos de confianza de las rectas de regresión lineal entre los valores de acidez libre experimentales (V12e y V24e) y calculados (V12c y V24c), ambos a los 12 y 24 meses

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	P	Intervalo de confianza para B al 95%	
		B	Error típ.	Beta			Límite inferior	Límite superior
V12e-V12c	Ordenada	1.178	0.924		1.275	0.208	-0.679	3.035
	Pendiente	0.956	0.031	0.976	30.893	0.000	0.894	1.018
V24e-V24c	Ordenada	3.086	0.890		3.466	0.001	1.296	4.876
	Pendiente	0.959	0.028	0.980	34.228	0.000	0.903	1.015

Variables dependientes: V12c, V24c.

ACIDEZ LACTÓNICA

Para el cálculo de los valores de acidez lactónica a los 12 y 24 meses (V12c y V24c) a partir del valor inicial se han utilizado las rectas de regresión lineal determinadas con anterioridad (Figura 67):

- Vinicial-V12e

$$y = 0.99 x + 5.6 \text{ (} r = 0.915, p < 0.01 \text{)}$$

- Vinicial-V24e

$$y = 0.99 x + 4.5 \text{ (} r = 0.934, p < 0.01 \text{)}$$

En las Tablas LXVII y LXVIII se recogen los resultados obtenidos para las regresiones lineales entre los valores experimentales de acidez láctica a los 12 y 24 meses (V12e y V24e) y los calculados (V12c y V24c) a partir de las rectas de regresión Vinicial-V12e y Vinicial-V24e, respectivamente. Según estos resultados, a pesar de que las regresiones fueron significativas en ambos casos (Tabla LXVII), la acidez láctica inicial no se podría utilizar para predecir los valores a los 12 ni a los 24 meses ya que los valores experimentales y los calculados no son significativamente iguales (Tabla LXVIII).

Tabla LXVII. Prueba de ANOVA para determinar la significación de las regresiones lineales entre los valores de acidez láctica experimentales (V12e y V24e) y calculados (V12c y V24c), ambos a los 12 y 24 meses

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p
V12e-V12c	Regresión	898.729	1	898.729	245.265	0.000
	Residual	175.888	48	3.664		
	Total	1074.616	49			
V24e-V24c	Regresión	936.493	1	936.493	325.445	0.000
	Residual	138.124	48	2.878		
	Total	1074.616	49			

Tabla LXVIII. Coeficientes e intervalos de confianza de las rectas de regresión lineal entre los valores de acidez láctica experimentales (V12e y V24e) y calculados (V12c y V24c), ambos a los 12 y 24 meses

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	p	Intervalo de confianza para B al 95%	
		B	Error típ.	Beta			Límite inferior	Límite superior
V12e-V12c	Ordenada	1.775	0.644		2.757	0.008	0.481	3.070
	Pendiente	0.838	0.054	0.915	15.661	0.000	0.730	0.946
V24e-V24c	Ordenada	1.313	0.529		2.480	0.017	0.248	2.377
	Pendiente	0.868	0.048	0.934	18.040	0.000	0.771	0.964

Variables dependientes: V12c, V24c.

ACIDEZ TOTAL

Para el cálculo de los valores de acidez total a los 12 y 24 meses (V12c y V24c) a partir del valor inicial se han utilizado las rectas de regresión lineal determinadas con anterioridad (Figura 68):

- Vinicial-V12e

$$y = 1.05 x + 2.6 \quad (r = 0.986, p < 0.01)$$

- Vinicial-V24e

$$y = 1.08 x + 2.3 \quad (r = 0.988, p < 0.01)$$

En las Tablas LXIX y LXX se recogen los resultados obtenidos para las regresiones lineales entre los valores experimentales de acidez total a los 12 y 24 meses (V12e y V24e) y los calculados (V12c y V24c) a partir de las rectas de regresión Vinicial-V12e y Vinicial-V24e, respectivamente. En la Tabla LXIX se pone de manifiesto que, en ambos casos, las regresiones fueron significativas ($p < 0.01$). En la Tabla LXX aparece recogido que, por una parte, dentro del intervalo de confianza para la ordenada en el origen se encuentra el valor ideal de 0 y, por otra parte, dentro del intervalo de confianza para la pendiente se encuentra el valor ideal de 1. De acuerdo con estos resultados el valor de acidez total inicial se podría utilizar para predecir los valores a los 12 y 24 meses ya que los valores experimentales y los calculados son significativamente iguales.

Tabla LXIX. Prueba de ANOVA para determinar la significación de las regresiones lineales entre los valores de acidez total experimentales (V12e y V24e) y calculados (V12c y V24c), ambos a los 12 y 24 meses

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p
V12e-V12c	Regresión	10687.023	1	10687.023	1692.300	0.000
	Residual	303.124	48	6.315		
	Total	10990.147	49			
V24e-V24c	Regresión	11345.154	1	11345.154	1958.767	0.000
	Residual	278.015	48	5.792		
	Total	11623.170	49			

Tabla LXX. Coeficientes e intervalos de confianza de las rectas de regresión lineal entre los valores de acidez total experimentales (V12e y V24e) y calculados (V12c y V24c), ambos a los 12 y 24 meses

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	p	Intervalo de confianza para B al 95%	
		B	Error típ.	Beta			Límite inferior	Límite superior
V12e-V12c	Ordenada	1.051	0.979		1.073	0.289	-0.918	3.019
	Pendiente	0.974	0.024	0.986	41.138	0.000	0.926	1.021
V24e-V24c	Ordenada	0.969	0.931		1.041	0.303	-0.902	2.840
	Pendiente	0.972	0.022	0.988	44.258	0.000	0.928	1.016

Variables dependientes: V12c, V24c.

6.2.2.3.2. INFLUENCIA DE LOS VALORES INICIALES DE pH Y DE LOS TIPOS DE ACIDEZ EN SU EVOLUCIÓN DURANTE EL ALMACENAMIENTO

Como se ha podido comprobar, tanto el rango inicial de pH como el de los tipos de acidez (libre, láctica y total) de las mieles de Galicia con Denominación es muy amplio. Además no se ha encontrado, en las mieles analizadas, un comportamiento uniforme de estos parámetros físico químicos con el tiempo. Por estas razones se va a estudiar si el valor inicial de cada uno de estos parámetros va a influir en su comportamiento o evolución durante el almacenamiento. Para ello se ha analizado la correlación lineal que existe entre los valores iniciales de pH, acidez libre, acidez láctica y acidez total con los porcentajes de variación que experimenta cada parámetro en cada uno de los análisis. Los resultados obtenidos se encuentran recogidos, respectivamente, en las Tablas LXXI, LXXII, LXXIII y LXXIV.

Cavia (2002) sólo encontró correlaciones significativas entre los valores iniciales de pH y de acidez láctica y los porcentajes de variación que experimentan con el tiempo. Por lo que llegó a la conclusión de que los valores iniciales de pH y de acidez láctica influían en la evolución de estos parámetros con el tiempo mientras que, por el contrario, la evolución de la acidez libre y de la acidez total no se veían condicionadas por sus valores iniciales.

Tabla LXXI. Correlaciones lineales entre el valor inicial de pH y el porcentaje de variación que experimenta este parámetro en cada análisis

%pH	pH inicial		
	Coefficiente de correlación de Pearson (r)	Sig. (bilateral)	Nº de muestras
%pH a los 4 meses	-0.541**	0.000	50
%pH a los 8 meses	-0.606**	0.000	50
%pH a los 12 meses	-0.714**	0.000	50
%pH a los 16 meses	-0.765**	0.000	50
%pH a los 20 meses	-0.747**	0.000	50
%pH a los 24 meses	-0.667**	0.000	50

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Tabla LXXII. Correlaciones lineales entre el valor inicial de acidez libre y el porcentaje de variación que experimenta este parámetro en cada análisis

%Acidez libre	Acidez libre inicial (meq/kg)		
	Coefficiente de correlación de Pearson (r)	Sig. (bilateral)	Nº de muestras
%Acidez libre a los 4 meses	0.128	0.376	50
%Acidez libre a los 8 meses	0.419**	0.002	50
%Acidez libre a los 12 meses	0.340*	0.016	50
%Acidez libre a los 16 meses	0.456**	0.001	50
%Acidez libre a los 20 meses	0.488**	0.000	50
%Acidez libre a los 24 meses	0.256	0.073	50

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Tabla LXXIII. Correlaciones lineales entre el valor inicial de acidez láctica y el porcentaje de variación que experimenta este parámetro en cada análisis

%Acidez láctica	Acidez láctica inicial (meq/kg)		
	Coefficiente de correlación de Pearson (r)	Sig. (bilateral)	Nº de muestras
%Acidez láctica a los 4 meses	-0.514**	0.000	50
%Acidez láctica a los 8 meses	-0.562**	0.000	50
%Acidez láctica a los 12 meses	-0.562**	0.000	50
%Acidez láctica a los 16 meses	-0.561**	0.000	50
%Acidez láctica a los 20 meses	-0.570**	0.000	50
%Acidez láctica a los 24 meses	-0.571**	0.000	50

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Tabla LXXIV. Correlaciones lineales entre el valor inicial de acidez total y el porcentaje de variación que experimenta este parámetro en cada análisis

%Acidez total	Acidez total inicial (meq/kg)		
	Coefficiente de correlación de Pearson (r)	Sig. (bilateral)	Nº de muestras
%Acidez total a los 4 meses	-0.403**	0.004	50
%Acidez total a los 8 meses	-0.582**	0.000	50
%Acidez total a los 12 meses	-0.524**	0.000	50
%Acidez total a los 16 meses	-0.539**	0.000	50
%Acidez total a los 20 meses	-0.506**	0.000	50
%Acidez total a los 24 meses	-0.446**	0.001	50

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Según los resultados obtenidos en las tablas anteriores, el valor inicial de pH está correlacionado significativa e inversamente con el porcentaje de variación que experimenta el pH en las muestras analizadas, obteniéndose esta relación para todos los análisis. Lo mismo sucede para el caso de la acidez láctica y acidez total. Por tanto y de forma general, se puede decir que bajos valores iniciales de pH, acidez láctica y acidez total, van asociados a mayores porcentajes de variación de cada uno de los parámetros durante el almacenamiento.

En el caso de la acidez libre (Tabla LXXII), se observa que todos los coeficientes de correlación lineal son positivos y menores de 0.500 lo que indica que la relación entre las variables es directa y bastante débil, además algunas de estas relaciones no son significativas. Por lo tanto se puede concluir que el valor inicial de acidez libre que presenta una muestra de miel no va a condicionar su posterior evolución a lo largo del almacenamiento.

6.2.2.3.3. FECHA DE CONSUMO PREFERENTE PARA LA MIEL SEGÚN LA ACIDEZ LIBRE

Como ya se ha comentado en los capítulos 1 y 4, la acidez libre es el único tipo de acidez legislado. Hasta hace pocos meses, el límite legal era de 40 meq/kg (BOE, 1983), sin embargo, a partir de agosto de 2003, este límite ha aumentado a 50 meq/kg (DOCE, 2002; BOE, 2003).

En la Figura 69 se representa el porcentaje de muestras que superan los límites legales de 40 meq/kg y 50 meq/kg de acidez libre en los diferentes análisis. Cuando se considera el antiguo límite de 40 meq/kg, el 14% de las mieles ya superan este valor en el

momento inicial, sin que por ello presenten problemas de fermentación ni alteración. Este porcentaje, con excepción del análisis a los 8 meses, se mantiene en un valor similar para aumentar posteriormente hasta un 20-22% en los dos últimos análisis. Si consideramos el límite legal de 50 meq/kg, ninguna miel lo supera hasta el análisis a los 20 meses, donde solamente una muestra posee un valor de acidez libre mayor de 50 meq/kg.

Según estos resultados, y adoptando el límite legal de 50 meq/kg, se puede concluir que en lo que se refiere a la acidez libre, la fecha de consumo preferente para la miel podría ser de dos años desde su puesta en el mercado.

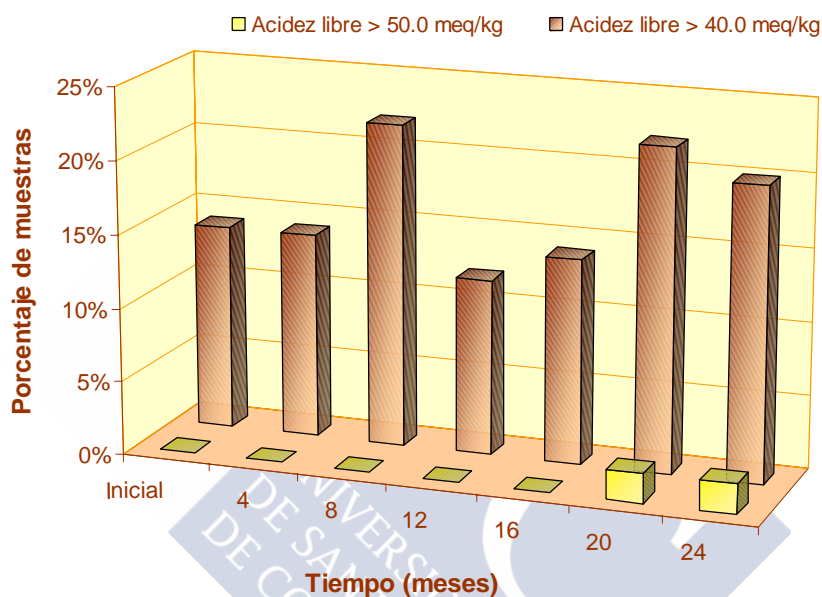


Figura 69. Porcentaje de muestras que superan los límites de 40 meq/kg y 50 meq/kg de acidez libre (DOCE, 2002; BOE, 2003) en los distintos análisis realizados.

6.3. ÁCIDOS ORGÁNICOS

6.3.1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

En la bibliografía consultada, no se ha encontrado ningún trabajo del efecto del almacenamiento sobre el contenido de los ácidos orgánicos en la miel.

6.3.2. PARTE EXPERIMENTAL

Al igual que en el caso de los parámetros físico químicos, el estudio del efecto del almacenamiento sobre el contenido de los ácidos D-glucónico total (g/kg), cítrico (mg/kg) y L-málico (mg/kg) se ha llevado a cabo en las 50 mieles de Galicia con Denominación de la

cosecha de 1997. Los análisis han tenido lugar durante dos años a intervalos de cuatro meses, por lo que se han realizado siete determinaciones en cada una de las muestras. Durante todo el estudio las mieles se han almacenado en envases de vidrio a una temperatura media de 20 °C (15-25 °C), en un ambiente libre de olores y en la oscuridad.

De los métodos puestos a punto en este trabajo para la determinación del contenido de los ácidos orgánicos (enzimático, cromatográfico [HPLC] y electroforesis capilar [CE]), el método de análisis elegido fue el enzimático, ya que a priori, debido a su mayor precisión y exactitud, permitiría detectar pequeñas variaciones en el contenido de estos ácidos orgánicos a lo largo del almacenamiento.

Los procedimientos de determinación así como el material, aparatos y reactivos utilizados son los descritos en los apartados 5.3.1.1. (ácido D-glucónico total), 5.3.1.2. (ácido cítrico) y 5.3.1.3. (ácido L-málico) del capítulo 5 *Determinación de los ácidos orgánicos no aromáticos*.

6.3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las Tablas LXXV, LXXVI y LXXVII se encuentran recogidos los resultados de la evolución del contenido de los ácidos D-glucónico total (g/kg), cítrico (mg/kg) y L-málico (mg/kg), respectivamente, en las 50 mieles de Galicia con Denominación analizadas a lo largo de 24 meses.

En lo que se refiere a la evolución del contenido medio de ácido D-glucónico total, éste aumenta de forma lineal ($r = 0.999$) a partir de los 4 meses de almacenamiento. Si se considera cada una de las mieles individualmente, se observa que a los 12 meses el 78% de las muestras poseen un contenido en ácido D-glucónico total superior al valor inicial mientras que a los 24 meses este porcentaje se incrementa hasta el 96% (Tabla LXXV).

El contenido medio de ácido cítrico de las 50 mieles analizadas disminuye de forma lineal ($r = 0.994$) durante todo el almacenamiento. Si se considera cada una de las mieles individualmente, se observa que a los 12 meses las muestras con un contenido de ácido cítrico inferior al contenido inicial es de un 60%, incrementándose hasta el 80% de las muestras a los 24 meses de almacenamiento (Tabla LXXVI).

Por último, el contenido medio de ácido L-málico del conjunto de muestras analizadas disminuye ligeramente durante todo el almacenamiento. Si se considera cada una de las mieles individualmente, se observa que a los 12 meses las muestras con un contenido de ácido L-málico inferior al contenido inicial es de un 64%, incrementándose hasta el 88% de las muestras a los 24 meses de almacenamiento (Tabla LXXVII).

Tabla LXXV. Evolución del contenido de ácido D-glucónico total (g/kg) en las mieles de Galicia con Denominación a lo largo de 24 meses

Número de muestra	ÁCIDO D-GLUCÓNICO TOTAL (g/kg)								Media	RSD%
	Inicial	4 meses	8 meses	12 meses	16 meses	20 meses	24 meses			
1	7.13	7.12	7.12	7.10	7.08	7.12	7.21	7.13	0.6	
2	12.17	11.92	12.02	12.15	12.22	12.36	12.64	12.21	1.9	
3	12.72	12.47	12.70	12.93	13.17	13.53	13.89	13.06	3.9	
4	3.63	3.69	3.82	3.99	4.14	4.28	4.35	3.99	7.1	
5	5.89	5.68	5.77	6.00	6.21	6.36	6.45	6.05	4.9	
6	5.01	5.00	5.07	5.17	5.30	5.43	5.60	5.23	4.4	
7	4.58	4.52	4.52	4.62	4.73	4.86	4.94	4.68	3.6	
8	5.64	5.66	5.79	6.00	6.23	6.42	6.57	6.04	6.2	
9	5.47	5.36	5.39	5.47	5.53	5.56	5.68	5.49	2.0	
10	4.50	4.60	4.77	4.94	5.11	5.26	5.43	4.94	7.0	
11	4.24	4.20	4.45	4.62	4.69	4.79	4.88	4.55	5.8	
12	4.58	4.64	4.77	4.94	5.15	5.34	5.53	4.99	7.2	
13	3.67	3.61	3.60	3.65	3.75	3.84	3.92	3.72	3.3	
14	6.32	6.34	6.40	6.49	6.59	6.68	6.74	6.51	2.6	
15	5.56	5.53	5.49	5.49	5.53	5.58	5.66	5.55	1.1	
16	8.42	8.42	8.36	8.38	8.42	8.48	8.50	8.43	0.6	
17	6.06	5.87	5.87	6.02	6.09	6.13	6.23	6.04	2.2	
18	6.53	6.43	6.57	6.79	6.93	7.02	7.15	6.77	4.0	
19	7.42	7.44	7.38	7.46	7.57	7.63	7.63	7.50	1.4	
20	2.38	2.57	2.82	3.01	3.16	3.24	3.25	2.92	11.7	
21	4.92	4.86	4.84	4.88	4.96	5.05	5.15	4.95	2.3	
22	3.78	3.73	3.75	3.80	3.92	4.07	4.26	3.90	5.1	
23	2.54	2.61	2.80	3.01	3.22	3.43	3.61	3.03	13.5	
24	3.31	3.39	3.63	3.94	4.24	4.54	4.79	3.98	14.4	
25	8.97	9.08	9.33	9.54	9.73	9.88	10.01	9.51	4.2	
26	4.77	4.77	4.81	4.88	4.98	5.09	5.24	4.93	3.6	
27	6.89	6.98	7.30	7.63	7.95	8.29	8.61	7.66	8.5	
28	6.83	6.98	7.25	7.49	7.74	7.99	8.25	7.50	7.0	
29	5.92	5.92	5.98	6.07	6.21	6.40	6.62	6.16	4.3	
30	7.29	7.36	7.53	7.70	7.87	8.04	8.21	7.71	4.5	
31	10.98	11.07	11.39	11.68	11.81	11.87	11.90	11.53	3.3	
32	8.84	9.05	9.46	9.84	10.20	10.54	10.86	9.83	7.7	
33	8.53	8.57	8.78	9.05	9.33	9.63	9.94	9.12	5.9	
34	12.17	12.34	12.70	13.02	13.32	13.59	13.81	12.99	4.8	
35	8.67	8.69	8.74	8.86	8.93	9.12	9.25	8.89	2.5	
36	5.34	5.37	5.51	5.68	5.89	6.09	6.26	5.73	6.2	
37	11.73	11.79	11.98	12.17	12.40	12.64	12.91	12.23	3.6	
38	10.05	10.18	10.45	10.73	10.99	11.28	11.56	10.75	5.2	
39	9.44	9.48	9.67	9.94	10.28	10.62	10.94	10.05	5.8	
40	10.77	10.60	10.52	10.62	10.82	11.03	11.17	10.79	2.2	
41	11.34	11.24	11.35	11.56	11.68	11.73	11.88	11.54	2.1	
42	8.74	8.80	9.05	9.33	9.61	9.94	10.28	9.39	6.2	
43	5.54	5.58	5.68	5.73	5.83	6.02	6.28	5.81	4.5	
44	13.53	13.38	13.28	13.23	13.28	13.30	13.42	13.35	0.8	
45	7.47	7.59	8.00	8.40	8.82	9.22	9.63	8.45	9.7	
46	10.43	10.46	10.62	10.81	11.01	11.24	11.51	10.87	3.7	
47	11.32	11.35	11.51	11.66	11.83	11.98	12.13	11.68	2.7	
48	6.76	6.77	6.83	6.93	7.04	7.19	7.38	6.99	3.3	
49	8.76	8.61	8.46	8.40	8.42	8.50	8.61	8.54	1.5	
50	11.05	11.07	11.26	11.54	11.88	12.21	12.45	11.64	4.8	
MEDIA	7.37	7.37	7.50	7.67	7.84	8.01	8.18	7.71	4.7	
SD	2.92	2.90	2.93	2.95	2.98	3.02	3.06	2.96	3.0	
RSD%	39.6	39.4	39.0	38.5	38.0	37.6	37.4	38.4	64.6	
Vmín	2.38	2.57	2.80	3.01	3.16	3.24	3.25	2.92	0.6	
Vmáx	13.53	13.38	13.28	13.23	13.32	13.59	13.89	13.35	14.4	

Tabla LXXVI. Evolución del contenido de ácido cítrico (mg/kg) en las mieles de Galicia con Denominación a lo largo de 24 meses

Número de muestra	ÁCIDO CÍTRICO (mg/kg)								Media	RSD%
	Inicial	4 meses	8 meses	12 meses	16 meses	20 meses	24 meses			
1	451.2	437.4	435.1	428.2	428.2	428.2	425.9	433.5	2.0	
2	437.4	423.6	423.6	421.3	416.7	416.7	416.7	422.3	1.7	
3	211.8	209.5	209.5	207.2	211.8	209.5	204.9	209.2	1.2	
4	39.1	48.3	52.9	52.9	50.6	48.3	48.3	48.6	9.6	
5	43.7	50.6	46.0	46.0	48.3	48.3	46.0	47.0	4.8	
6	41.4	48.3	41.4	43.7	46.0	43.7	39.1	43.4	7.1	
7	34.5	41.4	41.4	39.1	41.4	41.4	39.1	39.8	6.4	
8	32.2	41.4	36.8	36.8	41.4	41.4	39.1	38.4	9.0	
9	46.0	46.0	43.7	43.7	46.0	43.7	41.4	44.4	3.9	
10	62.2	59.9	59.9	59.9	57.6	55.2	55.2	58.6	4.5	
11	36.8	34.5	36.8	36.8	36.8	34.5	32.2	35.5	5.1	
12	43.7	41.4	41.4	41.4	36.8	36.8	36.8	39.8	7.3	
13	59.9	52.9	52.9	48.3	46.0	46.0	46.0	50.3	10.4	
14	29.9	36.8	39.1	36.8	34.5	34.5	32.2	34.8	8.9	
15	20.7	27.6	29.9	29.9	27.6	25.3	25.3	26.6	12.1	
16	25.3	29.9	32.2	29.9	29.9	27.6	25.3	28.6	9.1	
17	34.5	46.0	48.3	46.0	43.7	43.7	43.7	43.7	10.1	
18	36.8	41.4	39.1	39.1	36.8	34.5	34.5	37.5	6.8	
19	32.2	23.0	18.4	18.4	20.7	20.7	20.7	22.0	21.6	
20	46.0	43.7	43.7	41.4	41.4	41.4	41.4	42.7	4.2	
21	71.4	64.5	64.5	62.2	62.2	64.5	64.5	64.8	4.8	
22	39.1	36.8	36.8	36.8	36.8	36.8	36.8	37.1	2.3	
23	32.2	34.5	29.9	29.9	32.2	32.2	32.2	31.9	5.0	
24	41.4	43.7	41.4	41.4	41.4	41.4	41.4	41.7	2.1	
25	107.0	94.4	85.2	82.9	85.2	85.2	82.9	89.0	10.0	
26	179.6	179.6	172.7	170.3	172.7	172.7	170.3	174.0	2.3	
27	133.5	142.7	138.1	135.8	133.5	131.2	128.9	134.8	3.4	
28	138.1	142.7	140.4	140.4	140.4	135.8	128.9	138.1	3.3	
29	64.5	66.8	69.1	66.8	62.2	57.6	55.2	63.2	8.1	
30	73.7	80.6	73.7	73.7	73.7	71.4	71.4	74.4	3.9	
31	73.7	85.2	82.9	78.3	76.0	73.7	69.1	77.0	7.3	
32	292.4	285.4	283.1	285.4	280.8	278.5	273.9	282.8	2.1	
33	117.4	119.7	117.4	117.4	115.1	110.5	103.6	114.4	4.9	
34	80.6	87.5	87.5	85.2	82.9	80.6	78.3	83.2	4.3	
35	39.1	39.1	41.4	43.7	41.4	39.1	36.8	40.1	5.6	
36	105.9	96.7	92.1	92.1	87.5	87.5	87.5	92.8	7.3	
37	96.7	80.6	82.9	80.6	80.6	78.3	76.0	82.2	8.2	
38	96.7	89.8	82.9	82.9	82.9	82.9	80.6	85.5	6.7	
39	138.1	133.5	122.0	117.4	115.1	115.1	115.1	122.3	7.9	
40	149.6	140.4	140.4	135.8	128.9	126.6	126.6	135.5	6.4	
41	94.4	87.5	87.5	87.5	80.6	78.3	78.3	84.9	7.1	
42	435.1	421.3	412.1	405.2	400.5	398.2	398.2	410.1	3.4	
43	382.1	377.5	372.9	368.3	366.0	363.7	359.1	369.9	2.2	
44	181.9	181.9	177.3	177.3	175.0	175.0	175.0	177.6	1.7	
45	393.6	391.3	379.8	370.6	361.4	356.8	352.2	372.2	4.4	
46	71.4	59.9	52.9	57.6	57.6	57.6	55.2	58.9	10.1	
47	99.0	92.1	89.8	89.8	87.5	85.2	85.2	89.8	5.3	
48	147.3	142.7	135.8	135.8	135.8	135.8	133.5	138.1	3.6	
49	101.3	92.1	89.8	89.8	87.5	87.5	89.8	91.1	5.2	
50	74.8	76.0	66.8	66.8	64.5	64.5	64.5	68.3	7.3	
MEDIA	116.3	115.0	112.4	111.1	109.8	108.6	106.9	111.4	6.0	
SD	116.0	112.5	111.3	109.8	108.8	108.6	108.1	110.7	3.5	
RSD%	99.7	97.8	99.0	98.9	99.1	100.0	101.2	99.3	58.6	
Vmín	20.7	23.0	18.4	18.4	20.7	20.7	20.7	22.0	1.2	
Vmáx	451.2	437.4	435.1	428.2	428.2	428.2	425.9	433.5	21.6	

Tabla LXXVII. Evolución del contenido de ácido L-málico (mg/kg) en las mieles de Galicia con Denominación a lo largo de 24 meses

Número de muestra	ÁCIDO L-MÁLICO (mg/kg)								Media	RSD%
	Inicial	4 meses	8 meses	12 meses	16 meses	20 meses	24 meses			
1	512	507	503	490	486	480	476	493	2.8	
2	578	576	575	571	573	569	559	572	1.1	
3	212	206	204	208	210	214	214	210	1.9	
4	32	32	34	28	32	32	28	31	7.3	
5	19	17	19	21	25	23	15	20	17.3	
6	26	23	23	19	19	21	23	22	11.4	
7	25	26	25	23	25	25	23	25	4.6	
8	21	23	26	23	26	26	19	23	11.8	
9	25	25	25	23	25	23	17	23	12.6	
10	21	26	25	21	26	26	19	23	12.8	
11	21	23	21	21	19	19	19	20	7.4	
12	23	30	25	25	26	26	26	26	8.2	
13	26	25	25	25	25	23	19	24	9.9	
14	28	26	25	23	23	23	23	24	8.1	
15	19	26	21	23	23	21	17	21	13.7	
16	23	30	25	25	26	25	21	25	11.1	
17	19	19	21	21	25	23	17	21	13.0	
18	25	30	25	25	25	23	17	24	15.9	
19	32	26	25	26	26	26	23	26	10.5	
20	34	30	30	36	36	30	26	32	11.8	
21	26	23	23	26	25	25	21	24	7.7	
22	26	25	25	21	21	21	17	22	14.4	
23	17	13	13	17	17	15	11	15	16.5	
24	36	30	28	28	36	36	28	32	12.8	
25	8	11	8	6	8	9	11	9	20.6	
26	163	151	151	149	153	153	149	153	3.2	
27	132	129	129	130	129	125	117	127	3.9	
28	134	130	132	125	127	127	125	129	2.7	
29	30	36	32	28	28	26	26	29	12.2	
30	55	57	53	53	55	55	53	54	2.8	
31	40	43	43	40	42	42	38	41	4.5	
32	291	276	266	268	266	266	266	271	3.5	
33	74	74	68	72	72	70	66	71	4.3	
34	43	47	45	45	43	40	36	43	8.6	
35	25	30	21	23	25	23	19	24	14.8	
36	26	23	23	21	23	23	23	23	6.3	
37	21	23	21	21	21	21	21	21	3.6	
38	38	32	32	36	30	28	28	32	12.0	
39	55	49	47	45	47	47	43	48	7.9	
40	98	96	95	95	91	87	83	92	5.9	
41	42	36	32	34	36	34	30	35	10.9	
42	518	510	508	508	499	488	473	501	3.1	
43	231	232	229	221	225	225	221	226	2.0	
44	197	197	198	197	197	193	189	195	1.7	
45	234	229	231	221	217	214	212	223	3.9	
46	23	23	23	26	25	23	23	24	5.3	
47	43	34	32	36	32	28	26	33	16.9	
48	112	102	102	106	102	100	96	103	4.9	
49	36	32	36	42	38	38	38	37	8.1	
50	30	30	28	28	30	30	28	29	3.7	
MEDIA	91	89	88	87	87	86	82	87	8.4	
SD	132	130	130	128	127	126	125	128	5.0	
RSD%	146	146	148	148	146	147	152	148	59	
Vmín	8	11	8	6	8	9	11	9	1.1	
Vmáx	578	576	575	571	573	569	559	572	20.6	

Para cada una de las mieles, se han calculado los ajustes a una determinada función de los resultados obtenidos para el contenido de los ácidos D-glucónico total (Tabla LXXVIII), cítrico y L-málico (Tabla LXXIX) con el tiempo. En los modelos generales de las ecuaciones y es el parámetro analizado en cada caso y t el tiempo medido en días. Se ha utilizado el tiempo medido en días y no en meses para obtener un mejor ajuste a los datos. En la bibliografía consultada, no se han encontrado trabajos en los que se estudie el tipo de ajuste de la evolución del contenido de estos ácidos orgánicos con el tiempo en cada muestra. La obtención de un tipo de ajuste determinado permitiría, por interpolación, conocer el contenido de estos ácidos orgánicos en una miel a cualquier tiempo dentro de los dos años del estudio.

En la Tabla LXXVIII se recogen los tipos de cinéticas obtenidos en el ajuste del contenido del ácido D-glucónico total en cada una de las muestras analizadas, de forma que sólo se han considerado aquellas relaciones significativas ($p < 0.05$) con coeficientes de correlación (r) mayores o iguales a 0.985. Hay que destacar que sólo en dos muestras (Nº 16 y 19) el ajuste no fue significativo, siendo ambas de Barreiros (localidad de la provincia de Lugo) y de *Eucalyptus* sp. En las muestras 9 y 17 el ajuste fue significativo pero los coeficientes de correlación obtenidos fueron inferiores a 0.985 ($r = 0.959$ en la muestra Nº 9 y $r = 0.940$ en la Nº 17), siendo ambas de *Eucalyptus* sp. Se han encontrado tres tipos de ajustes en la evolución del contenido de ácido D-glucónico total con el tiempo:

- Lineal [$y = b_0 + (b_1 t)$]
- Cuadrática o polinomio de grado dos [$y = b_0 + (b_1 t) + (b_2 t^2)$]
- Cúbica o polinomio de grado tres [$y = b_0 + (b_1 t) + (b_2 t^2) + (b_3 t^3)$]

En la Figura 70 se observa que el ajuste cuadrático es el mayoritario, seguido del cúbico y por último encontramos el lineal. Como se puede comprobar en la Tabla LXXVIII, ni la provincia de procedencia del envasador ni el espectro polínico van a influir en el tipo de ajuste obtenido.

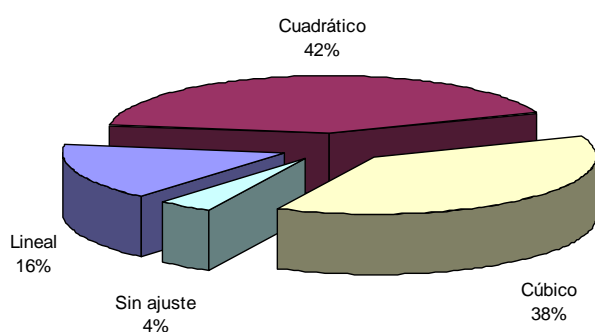


Figura 70. Porcentaje de cada uno de los tipos de ajustes a una determinada función de los resultados obtenidos en la evolución del contenido de ácido D-glucónico total en las mieles analizadas.

Tabla LXXVIII. Tipos de ajustes a una determinada función de los resultados obtenidos en la evolución del contenido del ácido D-glucónico total (g/kg) con el tiempo (en días) en las mieles de Galicia con Denominación

Número de muestra	Provincia	Espectro polínico	Tipo de ajuste	r
1	Ourense	<i>Castanea sativa</i> Miller	Cúbico	0,996
2	Ourense	<i>Castanea sativa</i> Miller	Cuadrático	0,991
3	Ourense	<i>Castanea sativa</i> Miller	Cuadrático	0,991
4	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	Cúbico	0,989
5	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	Cúbico	0,991
6	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	Cuadrático	0,995
7	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	Cúbico	1,000
8	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	Cúbico	0,999
9	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	Cuadrático	*
10	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	Lineal	0,997
11	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	Cúbico	0,990
12	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	Cúbico	0,999
13	A Coruña	<i>Eucalyptus</i> sp.	Cúbico	0,998
14	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	Cúbico	0,999
15	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	Cuadrático	0,997
16	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	Sin ajuste	-----
17	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	Cuadrático	*
18	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	Cúbico	0,994
19	Lugo	<i>Eucalyptus</i> sp.	Sin ajuste	-----
20	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.	Cuadrático	0,996
21	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.	Cúbico	0,998
22	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.	Cuadrático	0,996
23	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.	Lineal	0,998
24	Pontevedra	<i>Eucalyptus</i> sp.	Cúbico	0,998
25	Lugo	<i>Trifolium</i> L. sp.	Cuadrático	0,995
26	A Coruña	multifloral	Cuadrático	0,995
27	A Coruña	multifloral	Lineal	0,996
28	A Coruña	multifloral	Lineal	0,997
29	A Coruña	multifloral	Cuadrático	0,999
30	A Coruña	multifloral	Lineal	0,998
31	Lugo	multifloral	Cuadrático	0,992
32	Lugo	multifloral	Cuadrático	0,996
33	Lugo	multifloral	Cúbico	0,995
34	Lugo	multifloral	Cuadrático	0,997
35	Lugo	multifloral	Cúbico	0,994
36	Lugo	multifloral	Cúbico	1,000
37	Lugo	multifloral	Cuadrático	0,996
38	Lugo	multifloral	Lineal	0,997
39	Lugo	multifloral	Cúbico	1,000
40	Lugo	multifloral	Cúbico	0,999
41	Ourense	multifloral	Cuadrático	0,994
42	Ourense	multifloral	Cuadrático	0,996
43	Ourense	multifloral	Cuadrático	0,994
44	Ourense	multifloral	Cuadrático	0,993
45	Ourense	multifloral	Lineal	0,998
46	Pontevedra	multifloral	Cuadrático	0,995
47	Pontevedra	multifloral	Lineal	0,995
48	Pontevedra	multifloral	Cuadrático	0,998
49	Pontevedra	multifloral	Cúbico	0,995
50	Pontevedra	multifloral	Cúbico	0,998

* Coeficiente de correlación (r) inferior a 0.985

En la Tabla LXXIX aparecen recogidos los tipos de ajustes a una determinada función de los resultados obtenidos en la evolución del contenido de los ácidos cítrico y L-málico, de forma que sólo se han considerado aquellas relaciones significativas ($p < 0.05$) con coeficientes de correlación (r) mayores o iguales a 0.985.

Tabla LXXIX. Tipos de ajustes a una determinada función de los resultados obtenidos en la evolución del contenido de los ácidos cítrico y L-málico (mg/kg) con el tiempo (en días) en las mieles de Galicia con Denominación

TIPO DE AJUSTE	Nº MUESTRA (coeficiente de correlación)	
	Ácido cítrico	Ácido L-málico
CUADRÁTICO $y = b_0 + (b_1 t) + (b_2 t^2)$	33 (0.992) 39 (0.991) 42 (0.997)	
CÚBICO $y = b_0 + (b_1 t) + (b_2 t^2) + (b_3 t^3)$	4 (0.999) 15 (0.987) 19 (0.995) 25 (0.998) 45 (0.998)	3 (0.988) 19 (0.989) 27 (0.996) 41 (0.993) 42 (0.993) 44 (0.996)
POTENCIAL $y = b_0 + (t^{b_1})$ ó $\ln(y) = \ln(b_0) + [b_1 \ln(t)]$	13 (0.987)	

La Figura 71 muestra la evolución del contenido medio de los ácidos D-glucónico total (g/kg), cítrico (mg/kg) y L-málico (mg/kg) durante los 24 meses del estudio en las mieles de Galicia con Denominación agrupadas según la provincia de procedencia del envasador.

En los tres gráficos de esta figura se pone de manifiesto que la evolución con el tiempo del contenido medio de los ácidos D-glucónico total, cítrico y L-málico es semejante en todas las provincias. Esto indica que la provincia de procedencia del envasador no tiene una clara influencia en el modo de evolucionar del contenido de estos ácidos a lo largo del almacenamiento.

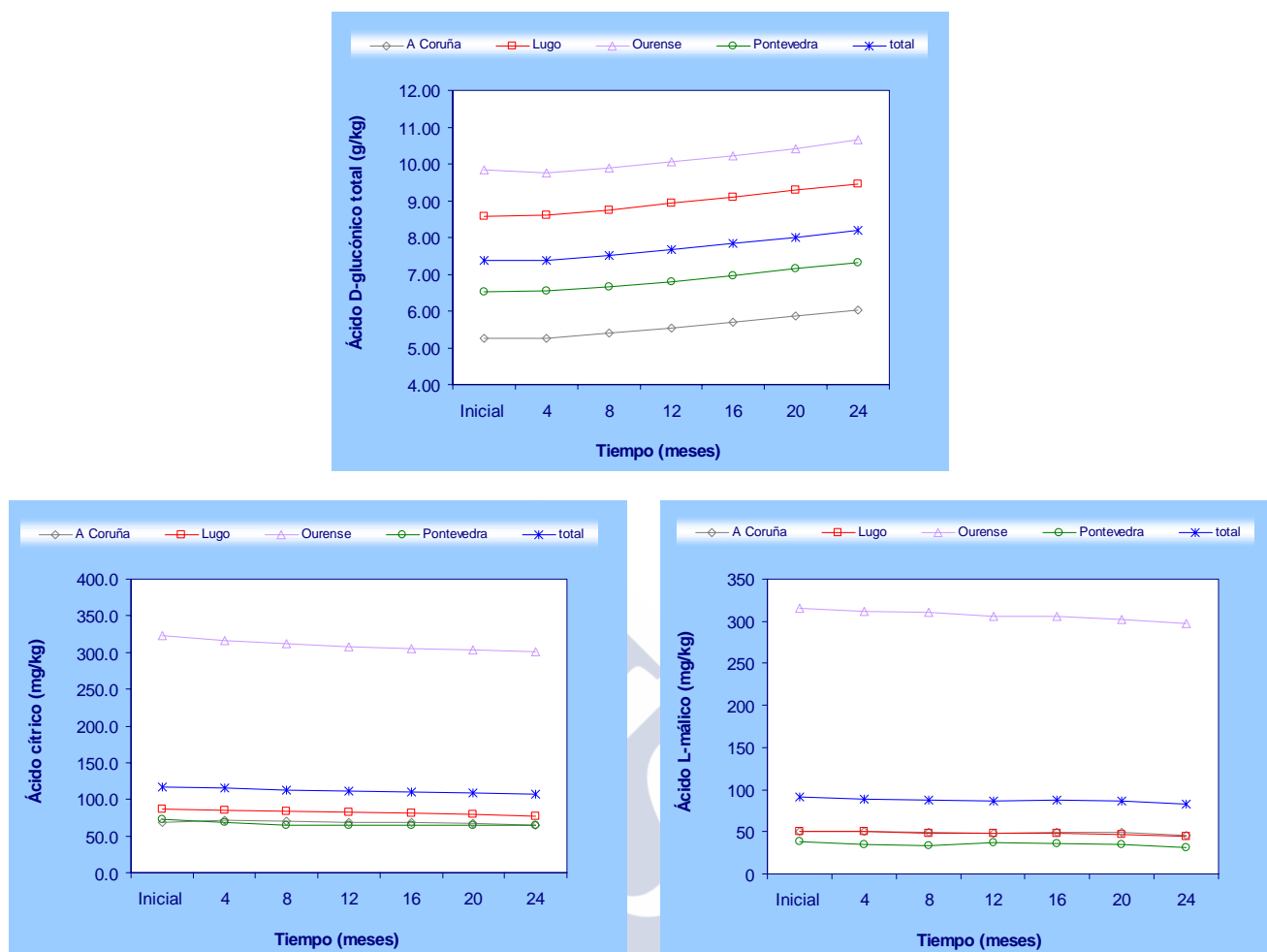


Figura 71. Evolución con el tiempo del contenido medio de los ácidos D-glucónico total (g/kg), cítrico (mg/kg) y L-málico (mg/kg) en las mieles de Galicia con Denominación agrupadas según la provincia de procedencia del envasador.

Por su parte la Figura 72 muestra la evolución del contenido medio de los ácidos D-glucónico total (g/kg), cítrico (mg/kg) y L-málico (mg/kg) durante los 24 meses del estudio en las mieles de Galicia con Denominación agrupadas según el espectro polínico.

Al igual que sucedía con la provincia de procedencia del envasador, en los tres gráficos de esta figura se pone de manifiesto que la evolución con el tiempo del contenido medio de los ácidos D-glucónico total, cítrico y L-málico es similar en todas las especies botánicas. Por lo tanto, el espectro polínico tampoco va a tener una clara influencia en el modo de evolucionar del contenido de estos ácidos a lo largo del almacenamiento.

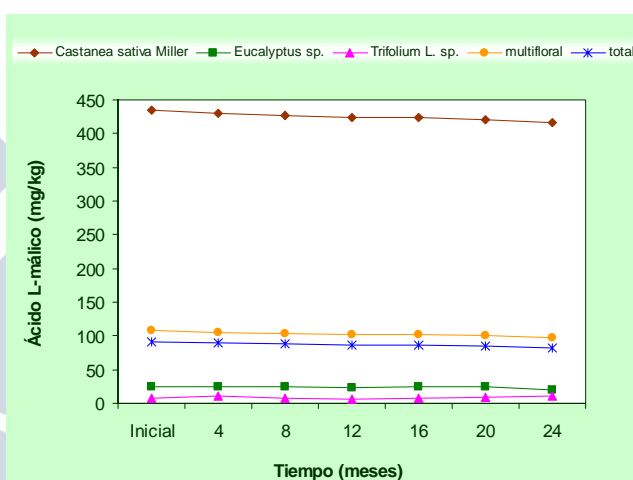
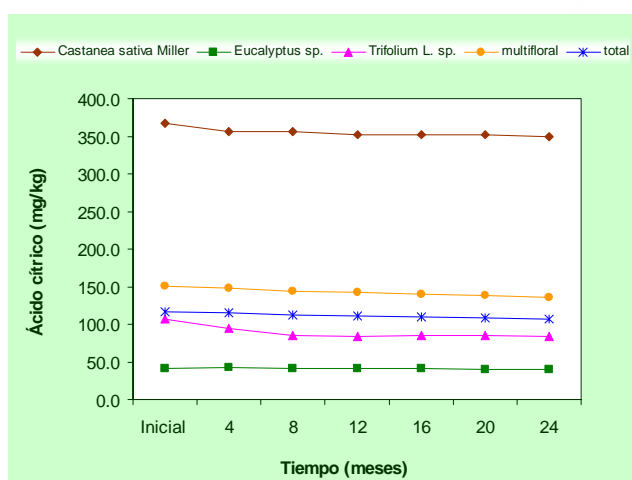
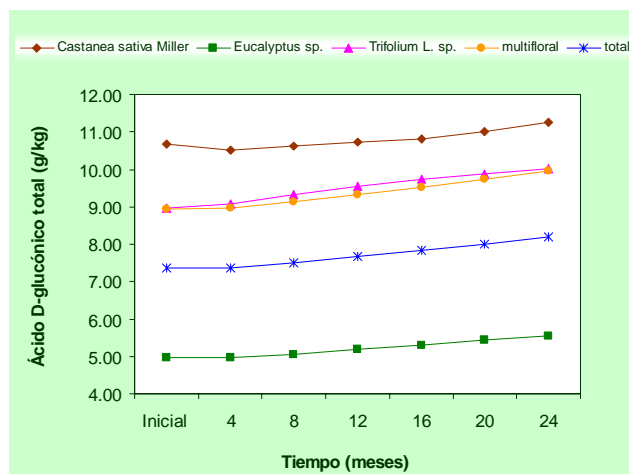


Figura 72. Evolución con el tiempo del contenido medio de los ácidos D-glucónico total (g/kg), cítrico (mg/kg) y L-málico (mg/kg) en las mieles de Galicia con Denominación agrupadas según el espectro polínico.

6.3.3.1. PREDICCIÓN DEL CONTENIDO DE LOS ÁCIDOS D-GLUCÓNICO TOTAL, CÍTRICO Y L-MÁLICO CON EL TIEMPO

Para establecer ecuaciones que permitan predecir los valores del contenido de los ácidos D-glucónico total, cítrico y L-málico a lo largo del tiempo a partir de su valor inicial, se ha determinado la posible relación entre el contenido inicial de estos ácidos y los valores experimentales obtenidos a los 4, 8, 12, 16, 20 y 24 meses.

En las Tablas LXXX, LXXXI y LXXXII se recogen, respectivamente, las correlaciones lineales obtenidas entre el contenido inicial de los ácidos D-glucónico total, cítrico y L-málico y los valores experimentales obtenidos a los 4, 8, 12, 16, 20 y 24 meses. En todos los casos

se comprueba que las correlaciones lineales son significativas a un nivel de confianza del 99%. En las Figuras 73, 74 y 75 se pueden visualizar gráficamente las correlaciones lineales que existen entre los valores iniciales de estos ácidos orgánicos y los valores experimentales obtenidos a los 12 y 24 meses (V12e y V24e).

Tabla LXXX. Correlaciones lineales entre el contenido inicial de ácido D-glucónico total y los valores experimentales obtenidos a los 4, 8, 12, 16, 20 y 24 meses

Ácido D-glucónico total (g/kg)	Ácido D-glucónico total inicial (Vinicial) (g/kg)		
	Coefficiente de correlación de Pearson (r)	Sig. (bilateral)	Nº de muestras
Ácido D-glucónico total a los 4 meses (V4e)	0.999*	0.000	50
Ácido D-glucónico total a los 8 meses (V8e)	0.997*	0.000	50
Ácido D-glucónico total a los 12 meses (V12e)	0.994*	0.000	50
Ácido D-glucónico total a los 16 meses (V16e)	0.991*	0.000	50
Ácido D-glucónico total a los 20 meses (V20e)	0.988*	0.000	50
Ácido D-glucónico total a los 24 meses (V24e)	0.984*	0.000	50

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

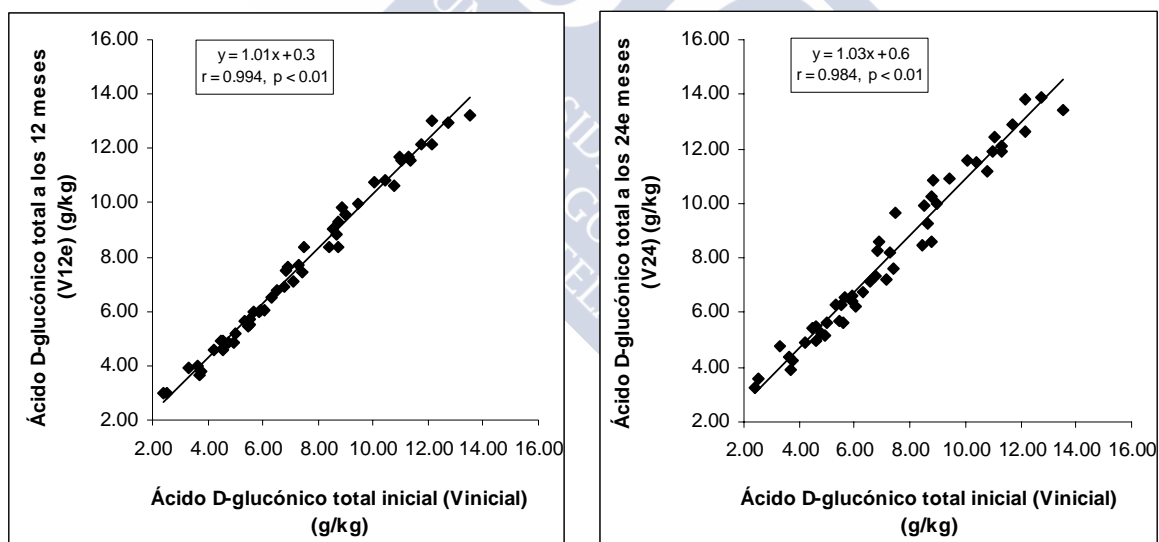


Figura 73. Representación gráfica de las correlaciones lineales entre el contenido inicial de ácido D-glucónico total y los valores experimentales obtenidos a los 12 y 24 meses (V12e y V24e).

Tabla LXXXI. Correlaciones lineales entre el contenido inicial de ácido cítrico y los valores experimentales obtenidos a los 4, 8, 12, 16, 20 y 24 meses

Ácido cítrico (mg/kg)	Ácido cítrico inicial (Vinicial) (mg/kg)		
	Coefficiente de correlación de Pearson (r)	Sig. (bilateral)	Nº de muestras
Ácido cítrico a los 4 meses (V4e)	0.998*	0.000	50
Ácido cítrico a los 8 meses (V8e)	0.998*	0.000	50
Ácido cítrico a los 12 meses (V12e)	0.998*	0.000	50
Ácido cítrico a los 16 meses (V16e)	0.997*	0.000	50
Ácido cítrico a los 20 meses (V20e)	0.998*	0.000	50
Ácido cítrico a los 24 meses (V24e)	0.998*	0.000	50

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

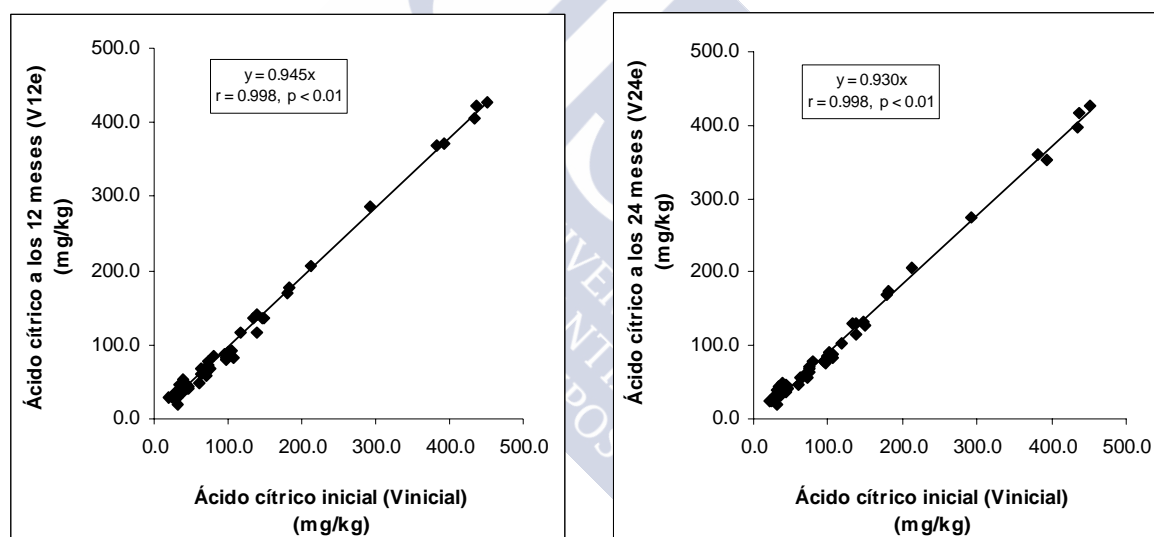


Figura 74. Representación gráfica de las correlaciones lineales entre el contenido inicial de ácido cítrico y los valores experimentales obtenidos a los 12 y 24 meses (V12e y V24e).

Tabla LXXXII. Correlaciones lineales entre el contenido inicial de ácido L-málico y los valores experimentales obtenidos a los 4, 8, 12, 16, 20 y 24 meses

Ácido L-málico (mg/kg)	Ácido L-málico inicial (Vinicial) (mg/kg)		
	Coefficiente de correlación de Pearson (r)	Sig. (bilateral)	Nº de muestras
Ácido L-málico a los 4 meses (V4e)	0.999*	0.000	50
Ácido L-málico a los 8 meses (V8e)	0.999*	0.000	50
Ácido L-málico a los 12 meses (V12e)	0.999*	0.000	50
Ácido L-málico a los 16 meses (V16e)	0.999*	0.000	50
Ácido L-málico a los 20 meses (V20e)	0.999*	0.000	50
Ácido L-málico a los 24 meses (V24e)	0.999*	0.000	50

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

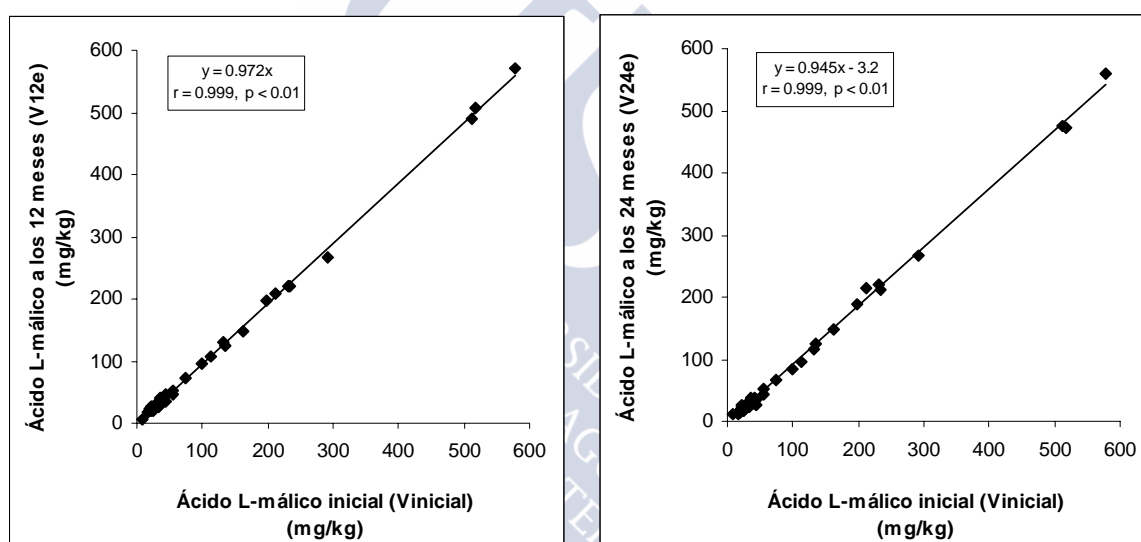


Figura 75. Representación gráfica de las correlaciones lineales entre el contenido inicial de ácido L-málico y los valores experimentales obtenidos a los 12 y 24 meses (V12e y V24e).

A continuación, y siguiendo el esquema descrito para el pH y los tipos de acidez (apartado 6.2.2.3.1.), se va a analizar si es posible predecir los valores a los 12 y 24 meses a partir del valor inicial para cada ácido individualmente. Al igual que en el caso de los anteriores parámetros físico químicos se han elegido los valores a los 12 y 24 meses por ser los valores mitad y final del estudio.

ÁCIDO D-GLUCÓNICO TOTAL

Para el cálculo de los valores de ácido D-glucónico total a los 12 y 24 meses (V12c y V24c) a partir del valor inicial se han utilizado las rectas de regresión lineal determinadas con anterioridad (Figura 73):

- Vinicial-V12e

$$y = 1.01 x + 0.3 \quad (r = 0.994, p < 0.01)$$

- Vinicial-V24e

$$y = 1.03 x + 0.6 \quad (r = 0.984, p < 0.01)$$

En las Tablas LXXXIII y LXXXIV se recogen los resultados obtenidos para las regresiones lineales entre los valores experimentales del contenido de ácido D-glucónico total a los 12 y 24 meses (V12e y V24e) y los calculados (V12c y V24c) a partir de las rectas de regresión Vinicial-V12e y Vinicial-V24e, respectivamente. En la Tabla LXXXIII se pone de manifiesto que, en ambos casos, las regresiones fueron significativas ($p < 0.01$). En la Tabla LXXXIV aparece recogido que, por una parte, dentro del intervalo de confianza para la ordenada en el origen se encuentra el valor ideal de 0 y, por otra parte, dentro del intervalo de confianza para la pendiente se encuentra el valor ideal de 1. De acuerdo con estos resultados el contenido inicial de ácido D-glucónico total se podría utilizar para predecir los valores a los 12 y 24 meses ya que los valores experimentales y los calculados son significativamente iguales.

Tabla LXXXIII. Prueba de ANOVA para determinar la significación de las regresiones lineales entre los valores del contenido de ácido D-glucónico total experimentales (V12e y V24e) y calculados (V12c y V24c), ambos a los 12 y 24 meses

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p
V12e-V12c	Regresión	421.574	1	421.574	4302.354	0.000
	Residual	4.703	48	9.799E-02		
	Total	426.277	49			
V24e-V24c	Regresión	429.549	1	429.549	1488.074	0.000
	Residual	13.856	48	0.289		
	Total	443.405	49			

Tabla LXXXIV. Coeficientes e intervalos de confianza de las rectas de regresión lineal entre los valores del contenido de ácido D-glucónico total experimentales (V12e y V24e) y calculados (V12c y V24c), ambos a los 12 y 24 meses

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	p	Intervalo de confianza para B al 95%	
		B	Error típ.	Beta			Límite inferior	Límite superior
V12e-V12c	Ordenada	0.130	0.124		1.047	0.300	-0.120	0.380
	Pendiente	0.993	0.015	0.994	65.592	0.000	0.963	1.024
V24e-V24c	Ordenada	0.271	0.219		1.236	0.223	-0.170	0.711
	Pendiente	0.968	0.025	0.984	38.576	0.000	0.918	1.019

Variables dependientes: V12c, V24c.

ÁCIDO CÍTRICO

Para el cálculo de los valores de ácido cítrico a los 12 y 24 meses (V12c y V24c) a partir del valor inicial se han utilizado las rectas de regresión lineal determinadas con anterioridad (Figura 74):

- Vinicial-V12e
 $y = 0.945 x$ ($r = 0.998$, $p < 0.01$)
- Vinicial-V24e
 $y = 0.930 x$ ($r = 0.998$, $p < 0.01$)

En las Tablas LXXXV y LXXXVI se recogen los resultados obtenidos para las regresiones lineales entre los valores experimentales del contenido de ácido cítrico a los 12 y 24 meses (V12e y V24e) y los calculados (V12c y V24c) a partir de las rectas de regresión Vinicial-V12e y Vinicial-V24e, respectivamente. En la Tabla LXXXV se pone de manifiesto que, en ambos casos, las regresiones fueron significativas ($p < 0.01$). En la Tabla LXXXVI aparece recogido que, por una parte, dentro del intervalo de confianza para la ordenada en el origen se encuentra el valor ideal de 0 y, por otra parte, dentro del intervalo de confianza para la pendiente se encuentra el valor ideal de 1. De acuerdo con estos resultados el contenido inicial de ácido cítrico se podría utilizar para predecir los valores a los 12 y 24 meses ya que los valores experimentales y los calculados son significativamente iguales.

Tabla LXXXV. Prueba de ANOVA para determinar la significación de las regresiones lineales entre los valores del contenido de ácido cítrico experimentales (V12e y V24e) y calculados (V12c y V24c), ambos a los 12 y 24 meses

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p
V12e-V12c	Regresión	586045.522	1	586045.522	10258.106	0.000
	Residual	2742.240	48	57.130		
	Total	588787.762	49			
V24e-V24c	Regresión	567638.287	1	567638.287	10693.769	0.000
	Residual	2547.898	48	53.081		
	Total	570186.185	49			

Tabla LXXXVI. Coeficientes e intervalos de confianza de las rectas de regresión lineal entre los valores del contenido de ácido cítrico experimentales (V12e y V24e) y calculados (V12c y V24c), ambos a los 12 y 24 meses

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	p	Intervalo de confianza para B al 95%	
		B	Error típ.	Beta			Límite inferior	Límite superior
V12e-V12c	Ordenada	-0.667	1.528		-0.436	0.665	-3.739	2.406
	Pendiente	0.996	0.010	0.998	101.282	0.000	0.976	1.015
V24e-V24c	Ordenada	1.790	1.456		1.229	0.225	-1.138	4.718
	Pendiente	0.995	0.010	0.998	103.411	0.000	0.976	1.015

Variables dependientes: V12c, V24c.

ÁCIDO L-MÁLICO

Para el cálculo de los valores de ácido L-málico a los 12 y 24 meses (V12c y V24c) a partir del valor inicial se han utilizado las rectas de regresión lineal determinadas con anterioridad (Figura 75):

- Vinicial-V12e
 $y = 0.972 x (r = 0.999, p < 0.01)$
- Vinicial-V24e
 $y = 0.945 x - 3.2 (r = 0.999, p < 0.01)$

En las Tablas LXXXVII y LXXXVIII se recogen los resultados obtenidos para las regresiones lineales entre los valores experimentales del contenido de ácido L-málico a los 12 y 24 meses (V12e y V24e) y los calculados (V12c y V24c) a partir de las rectas de regresión Vinicial-V12e y Vinicial-V24e, respectivamente. En la Tabla LXXXVII se pone de manifiesto que, en ambos casos, las regresiones fueron significativas ($p < 0.01$). En la Tabla LXXXVIII aparece recogido que, por una parte, dentro del intervalo de confianza para la ordenada en el origen se encuentra el valor ideal de 0 y, por otra parte, dentro del intervalo de confianza para la pendiente se encuentra el valor ideal de 1. De acuerdo con estos resultados el contenido inicial de ácido L-málico se podría utilizar para predecir los valores a los 12 y 24 meses ya que los valores experimentales y los calculados son significativamente iguales.

Tabla LXXXVII. Prueba de ANOVA para determinar la significación de las regresiones lineales entre los valores del contenido de ácido L-málico experimentales (V12e y V24e) y calculados (V12c y V24c), ambos a los 12 y 24 meses

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p
V12e-V12c	Regresión	807257.806	1	807257.806	36896.405	0.000
	Residual	1050.194	48	21.879		
	Total	808308.000	49			
V24e-V24c	Regresión	761944.999	1	761944.999	23597.525	0.000
	Residual	1549.881	48	32.289		
	Total	763494.880	49			

Tabla LXXXVIII. Coeficientes e intervalos de confianza de las rectas de regresión lineal entre los valores del contenido de ácido L-málico experimentales (V12e y V24e) y calculados (V12c y V24c), ambos a los 12 y 24 meses

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	p	Intervalo de confianza para B al 95%	
		B	Error típ.	Beta			Límite inferior	Límite superior
V12e-V12c	Ordenada	0.953	0.801		1.190	0.240	-0.658	2.565
	Pendiente	0.999	0.005	0.999	192.084	0.000	0.989	1.010
V24e-V24c	Ordenada	0.149	0.965		0.155	0.878	-1.792	2.090
	Pendiente	0.998	0.006	0.999	153.615	0.000	0.985	1.011

Variables dependientes: V12c, V24c.

6.3.3.2. INFLUENCIA DEL CONTENIDO INICIAL DE LOS ÁCIDOS D-GLUCÓNICO TOTAL, CÍTRICO Y L-MÁLICO EN SU EVOLUCIÓN DURANTE EL ALMACENAMIENTO

El rango del contenido inicial de los ácidos D-glucónico total, cítrico y L-málico de las mieles de Galicia con Denominación es muy amplio. Además no se ha encontrado, en las mieles analizadas, un comportamiento uniforme de estos ácidos con el tiempo. Por estas razones, al igual que se ha realizado con los parámetros físico químicos (apartado 6.2.2.3.2.), se va a estudiar si el valor inicial de cada uno de estos ácidos orgánicos va a influir en su comportamiento o evolución durante el almacenamiento. Para ello se ha analizado la correlación lineal que existe entre los valores iniciales del contenido D-glucónico total, cítrico y L-málico con los porcentajes de variación que experimenta cada ácido en cada uno de los análisis. Los resultados obtenidos se encuentran recogidos, respectivamente, en las Tablas LXXXIX, XC y XCI.

Tabla LXXXIX. Correlaciones lineales entre el contenido inicial de ácido D-glucónico total y el porcentaje de variación que experimenta este parámetro en cada análisis

%Ácido D-glucónico total	Ácido D-glucónico total inicial (meq/kg)		
	Coefficiente de correlación de Pearson (r)	Sig. (bilateral)	Nº de muestras
%Ácido D-glucónico total a los 4 meses	-0.232	0.105	50
%Ácido D-glucónico total a los 8 meses	-0.305*	0.031	50
%Ácido D-glucónico total a los 12 meses	-0.363**	0.009	50
%Ácido D-glucónico total a los 16 meses	-0.404**	0.004	50
%Ácido D-glucónico total a los 20 meses	-0.425**	0.002	50
%Ácido D-glucónico total a los 24 meses	-0.436**	0.002	50

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Tabla XC. Correlaciones lineales entre el contenido inicial de ácido cítrico y el porcentaje de variación que experimenta este parámetro en cada análisis

%Ácido cítrico	Ácido cítrico inicial (meq/kg)		
	Coefficiente de correlación de Pearson (r)	Sig. (bilateral)	Nº de muestras
%Ácido cítrico a los 4 meses	-0.252	0.077	50
%Ácido cítrico a los 8 meses	-0.200	0.163	50
%Ácido cítrico a los 12 meses	-0.205	0.153	50
%Ácido cítrico a los 16 meses	-0.215	0.134	50
%Ácido cítrico a los 20 meses	-0.175	0.225	50
%Ácido cítrico a los 24 meses	-0.123	0.394	50

Tabla XCI. Correlaciones lineales entre el contenido inicial de ácido L-málico y el porcentaje de variación que experimenta este parámetro en cada análisis

%Ácido L-málico	Ácido L-málico inicial (meq/kg)		
	Coefficiente de correlación de Pearson (r)	Sig. (bilateral)	Nº de muestras
%Ácido L-málico a los 4 meses	-0.113	0.433	50
%Ácido L-málico a los 8 meses	0.023	0.876	50
%Ácido L-málico a los 12 meses	0.016	0.912	50
%Ácido L-málico a los 16 meses	-0.120	0.406	50
%Ácido L-málico a los 20 meses	-0.060	0.680	50
%Ácido L-málico a los 24 meses	0.196	0.172	50

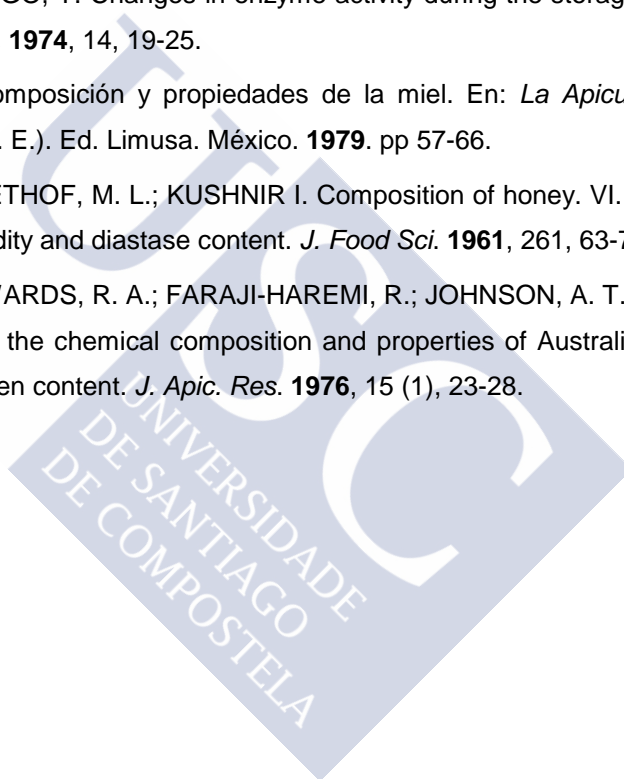
Los coeficientes de correlación lineal obtenidos para el ácido D-glucónico total son negativos y menores de 0.500 lo que indica que la relación entre las variables es inversa y bastante débil, además de no significativa en el primer análisis. Esta relación parece que va aumentado ligeramente al aumentar el tiempo de almacenamiento (Tabla LXXXIX).

En el caso de los ácidos cítrico y L-málico, los coeficientes de correlación lineal obtenidos son muy bajos lo que indica que la relación entre las variables es muy débil. Además ninguno de estos coeficientes de correlación lineal es significativo por lo que se puede concluir que el contenido inicial de los ácidos cítrico y L-málico presente en una muestra de miel no va a condicionar su posterior evolución a lo largo del almacenamiento (Tablas XC y XCI).

6.4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 📖 AZEREDO, M. A. A.; AZEREDO, L. C.; DAMASCENO, J. G. Physicochemical characteristics of the honeys from Sao Fidélis Township - RJ. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. **1999**, 19 (1), 3-7.
- 📖 BATH, P. K.; SINGH, N. Chemical changes in *Helianthus annuus* and *Eucalyptus lanceolatus* honey during storage. *J. Food Quality*. **2000**, 23, 443-451.
- 📖 BOE (BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO). Orden del 5 de agosto, por la que se aprueba la norma de calidad para la miel destinada al mercado interior. Madrid. España. **1983**.
- 📖 BOE (BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO). Real Decreto 1049/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Norma de calidad relativa a la miel. Madrid. España. **2003**.
- 📖 CAVIA, M. M. *Estudio del envejecimiento de mieles de Burgos y Galicia: Influencia de la granulación inducida*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos. Área de Nutrición y Bromatología. Universidad de Burgos. España. **2002**.
- 📖 CAVIA, M. M.; FERNÁNDEZ-MUIÑO, M. A.; GÓMEZ-ALONSO, E.; MONTES-PÉREZ, M. J.; HUIDOBRO, J. F.; SANCHO, M. T. Evolution of fructose and glucose in honey over one year: influence of induced granulation. *Food Chem*. **2002**, 78, 157-161.
- 📖 CHERCHI, A.; PORCU, M.; SPANEDDA, L.; TUBEROSO, C. I. G. Influence of ageing on the quality of honey. *Ind. Conser*. **1997**, 72, 266-271.
- 📖 COSENTINO, S.; TUBEROSO, C. I. G.; PISANO, B.; CHERCHI, A.; SPANEDDA, L.; PALMAS, F. Influenza di differenti modalità di conservazione sulla qualità del miele. *La Rivista di Scienza dell'Alimentazione*. **1996**, 25 (3), 253-260.
- 📖 DOCE (DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS). Directiva 2001/110/CE del Consejo de 20 de diciembre de 2001 relativa a la miel. Bruselas. Bélgica. **2002**.
- 📖 GONNET, M. Les modifications de la composition chimique des miels au cours de la conservation. *Ann. Abeilles*. **1965**, 8 (2), 129-146.
- 📖 GONNET, M. *Le miel. Composition, propriétés et conservation*. 2ème edition. Ed. Opida, I.N.R.A. Station expérimentale d'apiculture. Montfavet. La France. **1982**. pp. 1-30.
- 📖 GRANDI, A.; ROSSI, J.; BERTUCCIOLI, M. Evoluzione di alcuni parametri (chimici, fisico-chimici e microbiologici) durante la conservazione del miele. *Tecnologie Alimentari*. **1980**, 3, 19-26.
- 📖 JIMÉNEZ, M.; MATEO, J. J.; HUERTA, T.; MATEO, R. Influence of the storage conditions on some physicochemical and mycological parameters of honey. *J. Sci. Food Agric*. **1994**, 64, 67-74.

- 📖 KRAUZE, A.; KRAUZE, J. Changes in chemical composition of stored honeydew honeys. *Acta Alimentaria Polonica*. **1991**, 17 (2), 119-126.
- 📖 MILLER, J. N.; MILLER, J. C. *Estadística y quimiometría para Química Analítica*. 4ª ed. Ed. Pearson Education, S. A. Madrid. España. **2002**.
- 📖 SANCHO, M. T. *Estudio de las mieles producidas en la Comunidad Autónoma del País Vasco*. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Área de Nutrición y Bromatología. Universidad de Santiago de Compostela. España. **1990**.
- 📖 SANCHO, M. T.; MUNIATEGUI, S.; HUIDOBRO, J. F.; SIMAL-LOZANO, J. Mieles del País Vasco. I: pH y tipos de acidez. *Anal. Bromatol.* **1991**, 53 (1), 77-86.
- 📖 TAKENAKA, T.; ECHIGO, T. Changes in enzyme activity during the storage of honey. *Bull. Fac. Agr., Tamagawa Univ.* **1974**, 14, 19-25.
- 📖 WHITE, J. W. Jr. Composición y propiedades de la miel. En: *La Apicultura en los Estados Unidos*. (McGregor, S. E.). Ed. Limusa. México. **1979**. pp 57-66.
- 📖 WHITE, J. W. Jr.; RIETHOF, M. L.; KUSHNIR I. Composition of honey. VI. The effect of storage on carbohydrates, acidity and diastase content. *J. Food Sci.* **1961**, 261, 63-71.
- 📖 WOOTTON, M.; EDWARDS, R. A.; FARAJI-HAREMI, R.; JOHNSON, A. T. Effect of accelerated storage conditions on the chemical composition and properties of Australian honeys. I. Colour, acidity and total nitrogen content. *J. Apic. Res.* **1976**, 15 (1), 23-28.



ESTUDIO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS
NO AROMÁTICOS EN LA MIEL



CAPÍTULO 7

ANÁLISIS ESTADÍSTICO



7.1. COMPARACIÓN DE MÉTODOS

En este trabajo se han cuantificado los ácidos orgánicos no aromáticos en la miel por tres métodos: enzimático, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y electroforesis capilar (CE). El ácido glucónico se ha determinado por los métodos enzimático y CE, los ácidos cítrico y málico por los tres métodos (enzimático, HPLC y CE) y el ácido succínico por los métodos HPLC y CE.

En este apartado se pretende determinar si los métodos empleados conducen a resultados similares en la determinación de los citados ácidos orgánicos en la miel. Para ello se ha utilizado el programa estadístico *SPSS v. 10.0.6 (1999)* siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

- ✓ En primer lugar se ha estudiado la correlación que existe entre los resultados obtenidos por los diferentes métodos aplicados.
- ✓ Una vez que se ha comprobado que la correlación es significativa, se aplica el *test t de Student para muestras relacionadas* a un nivel de confianza del 99% para confirmar que no hay diferencias significativas entre los pares de valores.

Para llevar a cabo el análisis se han incluido todas las muestras analizadas en este trabajo (mieles de Galicia con Denominación y mieles de otras zonas de España) cuyo contenido en el ácido orgánico estudiado es cuantificado por dos o tres métodos, según corresponda.

7.1.1. ÁCIDO GLUCÓNICO

Se han utilizado las 75 mieles analizadas para realizar el estudio de comparación, ya que el ácido glucónico se ha cuantificado en todas las muestras por los métodos enzimático y electroforesis capilar (CE). Los valores del contenido del ácido glucónico se resumen en la Tabla XCII. Los valores que aparecen en la determinación del ácido glucónico por el método enzimático en las muestras de Galicia con Denominación son los obtenidos a los 28 meses y no los valores iniciales. Se han considerado los valores a los 28 meses ya que, como se ha comprobado en el estudio de evolución (apartado 6.3.), el contenido en ácido glucónico varía en gran medida durante el almacenamiento siguiendo cinéticas de tipo lineal, cuadrática y cúbica. Por esta razón es necesario determinar el ácido glucónico en las muestras por los dos métodos a la vez.

Tabla XCII. Contenido de ácido glucónico (g/kg) determinado por los métodos enzimático y CE

Número de muestra	Origen geográfico	Método enzimático	Método CE
1	Galicia	7.61	8.0
2	Galicia	12.83	12.9
3	Galicia	14.16	14.4
4	Galicia	3.80	3.7
5	Galicia	6.49	6.7
6	Galicia	5.85	6.0
7	Galicia	5.03	4.8
8	Galicia	6.60	6.6
9	Galicia	5.72	5.7
10	Galicia	5.62	5.4
11	Galicia	4.88	4.9
12	Galicia	5.37	5.3
13	Galicia	3.90	3.7
14	Galicia	6.77	6.9
15	Galicia	5.85	5.9
16	Galicia	8.50	8.4
17	Galicia	6.32	6.2
18	Galicia	7.27	7.0
19	Galicia	7.57	7.7
20	Galicia	3.58	3.5
21	Galicia	5.24	5.2
22	Galicia	4.54	4.5
23	Galicia	3.92	3.9
24	Galicia	4.81	4.7
25	Galicia	10.07	9.7
26	Galicia	5.47	5.0
27	Galicia	8.97	9.1
28	Galicia	8.52	8.3
29	Galicia	6.93	7.1
30	Galicia	8.38	8.1
31	Galicia	11.96	12.1
32	Galicia	11.20	11.4
33	Galicia	10.12	10.4
34	Galicia	13.98	14.0
35	Galicia	9.29	8.8
36	Galicia	6.07	6.2
37	Galicia	13.21	13.3
38	Galicia	11.87	11.5
39	Galicia	10.99	10.9
40	Galicia	11.68	11.8
41	Galicia	12.15	12.3
42	Galicia	10.67	11.0
43	Galicia	6.36	6.6
44	Galicia	13.59	13.8
45	Galicia	10.14	10.7
46	Galicia	11.88	11.9
47	Galicia	12.34	12.3
48	Galicia	7.63	7.7
49	Galicia	8.71	8.6
50	Galicia	12.81	12.6
1	Otras zonas de España	2.50	2.3
2	Otras zonas de España	2.52	2.6
3	Otras zonas de España	2.27	1.9
4	Otras zonas de España	4.56	4.3
5	Otras zonas de España	7.10	7.6
6	Otras zonas de España	4.24	4.6
7	Otras zonas de España	5.03	5.2
8	Otras zonas de España	3.25	3.2
9	Otras zonas de España	4.18	4.3
10	Otras zonas de España	4.37	4.8
11	Otras zonas de España	3.22	2.8
12	Otras zonas de España	3.37	3.0
13	Otras zonas de España	2.71	2.3
14	Otras zonas de España	2.18	1.9
15	Otras zonas de España	2.80	2.6
16	Otras zonas de España	2.91	3.1
17	Otras zonas de España	5.66	6.1
18	Otras zonas de España	4.31	4.2
19	Otras zonas de España	8.50	8.4
20	Otras zonas de España	5.89	5.7
21	Otras zonas de España	3.48	3.5
22	Otras zonas de España	5.28	5.6
23	Otras zonas de España	8.53	8.6
24	Otras zonas de España	5.58	6.0
25	Otras zonas de España	4.77	4.5

En la Figura 76 se visualiza la relación entre el método enzimático y el de CE, con un coeficiente de correlación lineal altamente significativo ($r = 0.998$).

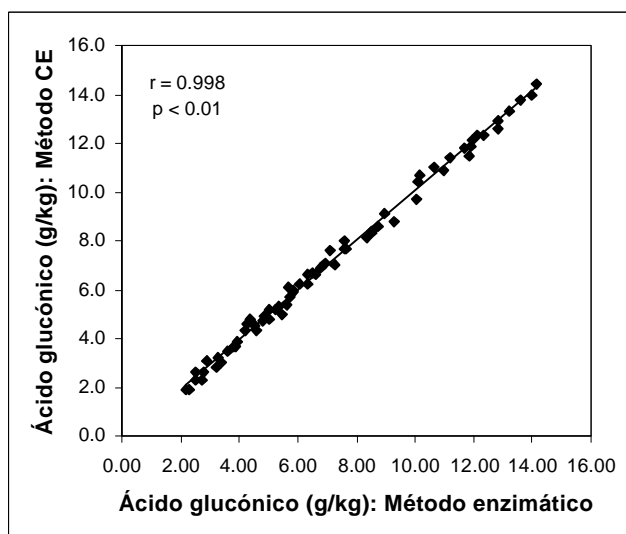


Figura 76. Correlación lineal entre el contenido en ácido glucónico (g/kg) determinado por el método enzimático y por el método CE.

Para confirmar que no hay diferencias significativas entre los pares de valores, se aplica el *test t de Student para muestras relacionadas* a los datos de ácido glucónico obtenidos por los dos métodos (Tabla XCIII).

Tabla XCIII. Resultados de la prueba t de Student para muestras relacionadas con el fin de determinar si los dos métodos de análisis del contenido de ácido glucónico en la miel son comparables

		Diferencias relacionadas				t	gl	Sig. (bilateral)	
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	99% Intervalo de confianza para la diferencia				
					Inferior				Superior
Par 1	Método enzimático- Método CE	1.733E-03	.2439	2.817E-02	-7.27E-02	7.620E-02	.062	74	.951

En esta tabla se muestra como no hay diferencias significativas ($p > 0.01$), a un nivel de confianza del 99%, entre los resultados obtenidos por el método enzimático y el de CE, por lo que ambos métodos son comparables. El método enzimático posee las ventajas de una mayor especificidad y sensibilidad mientras que el método de CE posee como ventaja la posibilidad de determinar conjuntamente otros ácidos orgánicos. La precisión y exactitud, como ya se ha comentado en el capítulo 5, son similares en ambos métodos, aunque ligeramente mejores en el caso del método enzimático.

7.1.2. ÁCIDO CÍTRICO

Se han utilizado 67 de las 75 mieles analizadas para realizar el estudio de comparación, ya que son las muestras en las que el ácido cítrico fue cuantificado por los tres métodos. Los valores del contenido del ácido cítrico aparecen recogidos anteriormente en el trabajo y se resumen en la Tabla XCIV. Como se puede observar en esta tabla, los valores que aparecen en la determinación del ácido cítrico por el método enzimático en las muestras de Galicia con Denominación son los obtenidos a los 24 meses y no los valores iniciales. Se han considerado los valores a los 24 meses ya que, como se ha comprobado en el estudio de evolución (apartado 6.3.), hay una pequeña variación en el contenido de ácido cítrico durante el almacenamiento. Por tanto y, para evitar posibles errores en la comparación de métodos, se utilizaron los valores del método enzimático que coinciden en el tiempo con los datos determinados por HPLC y CE.



Tabla XCIV. Contenido de ácido cítrico (mg/kg) determinado por los métodos enzimático, HPLC y CE

Número de muestra	Origen geográfico	Método enzimático	Método HPLC	Método CE
1	Galicia	425.9	334	351
2	Galicia	416.7	394	329
3	Galicia	204.9	184	158
4	Galicia	48.3	38	49
5	Galicia	46.0	44	48
6	Galicia	39.1	40	51
7	Galicia	39.1	39	38
8	Galicia	39.1	39	46
9	Galicia	41.4	59	41
10	Galicia	55.2	50	49
13	Galicia	46.0	49	36
14	Galicia	32.2	33	41
15	Galicia	25.3	26	33
19	Galicia	20.7	20	30
20	Galicia	41.4	36	49
21	Galicia	64.5	60	76
24	Galicia	41.4	35	32
25	Galicia	82.9	78	65
26	Galicia	170.3	137	140
27	Galicia	128.9	120	123
28	Galicia	128.9	130	109
29	Galicia	55.2	65	47
30	Galicia	71.4	77	51
31	Galicia	69.1	70	72
32	Galicia	273.9	246	276
33	Galicia	103.6	109	109
34	Galicia	78.3	74	50
36	Galicia	87.5	89	78
37	Galicia	76.0	46	60
38	Galicia	80.6	76	54
39	Galicia	115.1	100	124
40	Galicia	126.6	123	133
41	Galicia	78.3	71	63
42	Galicia	398.2	348	331
43	Galicia	359.1	320	315
44	Galicia	175.0	146	138
45	Galicia	352.2	322	292
46	Galicia	55.2	45	71
47	Galicia	85.2	77	91
48	Galicia	133.5	126	123
49	Galicia	89.8	72	125
50	Galicia	64.5	58	65
1	Otras zonas de España	128.9	143	129
2	Otras zonas de España	115.1	122	114
3	Otras zonas de España	64.5	90	57
4	Otras zonas de España	142.7	175	138
5	Otras zonas de España	400.5	426	379
6	Otras zonas de España	257.8	237	255
7	Otras zonas de España	66.8	68	74
8	Otras zonas de España	513.3	546	590
9	Otras zonas de España	82.9	88	85
10	Otras zonas de España	494.9	537	460
11	Otras zonas de España	389.0	434	395
12	Otras zonas de España	92.1	92	86
13	Otras zonas de España	41.4	44	37
14	Otras zonas de España	48.3	49	59
15	Otras zonas de España	48.3	51	54
16	Otras zonas de España	46.0	50	45
17	Otras zonas de España	451.2	455	454
18	Otras zonas de España	117.4	127	118
19	Otras zonas de España	278.5	300	249
20	Otras zonas de España	785.0	832	723
21	Otras zonas de España	128.9	144	107
22	Otras zonas de España	124.3	115	141
23	Otras zonas de España	626.1	614	622
24	Otras zonas de España	550.2	545	528
25	Otras zonas de España	596.2	609	593

En una primera exploración de los datos (Figura 77) se observa la existencia de correlación lineal entre el contenido en ácido cítrico de las mieles analizadas por los tres métodos.

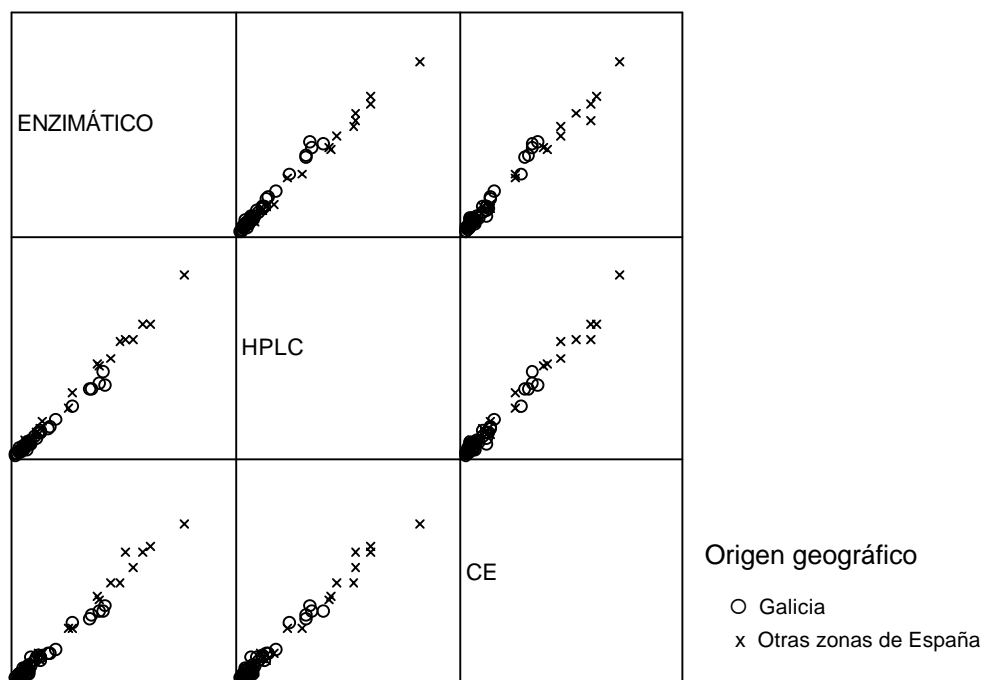


Figura 77. Gráfico draftsman para los valores del contenido en ácido cítrico determinados por los tres métodos de análisis desarrollados en este trabajo (enzimático, HPLC y CE).

En las Figuras 78, 79 y 80 se visualizan más claramente dichas correlaciones. En todos los casos los coeficientes de correlación lineal fueron significativos e iguales o superiores a 0.990.

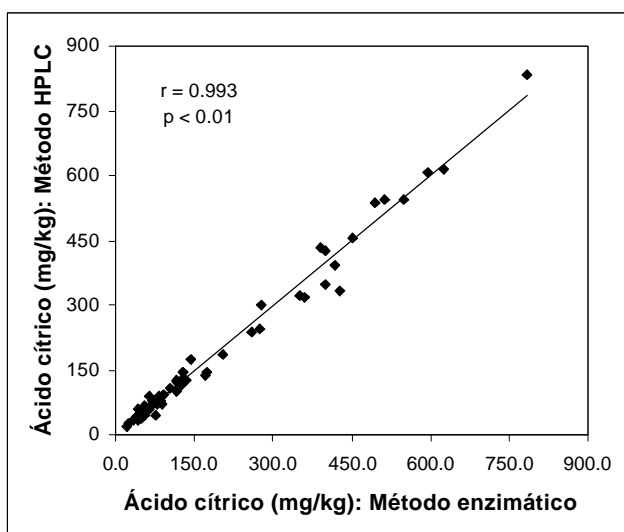


Figura 78. Correlación lineal entre el contenido en ácido cítrico (mg/kg) determinado por el método enzimático y por el método HPLC.

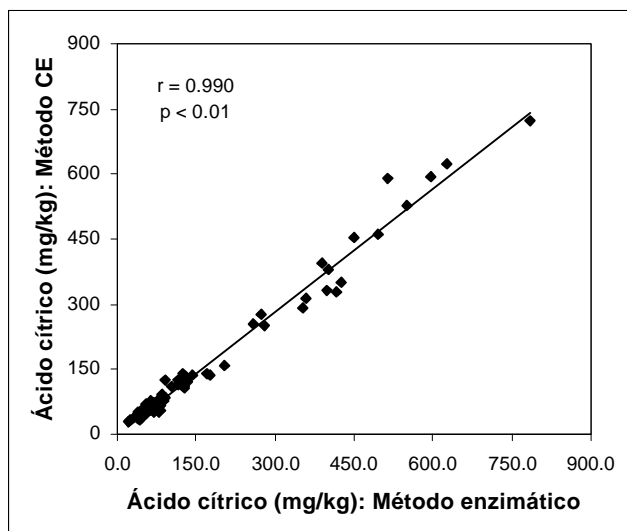


Figura 79. Correlación lineal entre el contenido en ácido cítrico (mg/kg) determinado por el método enzimático y por el método CE.

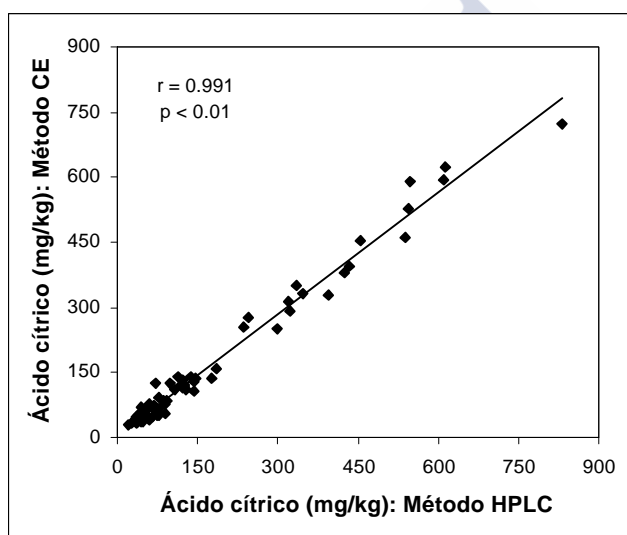


Figura 80. Correlación lineal entre el contenido en ácido cítrico (mg/kg) determinado por el método HPLC y por el método CE.

Para confirmar que no hay diferencias significativas entre los pares de valores se aplica el *test t de Student para muestras relacionadas* a los datos de ácido cítrico obtenidos por los tres métodos (Tabla XCV).

Tabla XCV. Resultados de las pruebas t de Student para muestras relacionadas con el fin de determinar si los tres métodos de análisis del contenido de ácido cítrico en la miel son comparables

		Diferencias relacionadas				t	gl	Sig. (bilateral)	
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	99% Intervalo de confianza para la diferencia				
					Inferior				Superior
Par 1	Método enzimático - Método HPLC	2.370	21.575	2.636	-4.621	9.361	.899	66	.372
Par 2	Método enzimático - Método CE	8.997	25.331	3.095	.789	17.205	2.907	66	.005
Par 3	Método HPLC - Método CE	6.63	26.25	3.21	-1.88	15.13	2.066	66	.043

En esta tabla se muestra como no hay diferencias significativas ($p > 0.01$), a un nivel de confianza del 99%, entre los resultados obtenidos por el método enzimático y HPLC y entre los resultados obtenidos por los métodos de HPLC y CE. Sin embargo no se llega a los mismos resultados al comparar el contenido en ácido cítrico obtenido por el método enzimático y por el método de CE.

Como se refleja en las figuras anteriores, la mayor parte de las muestras presentan un contenido bajo de ácido cítrico. Los puntos más alejados, es decir, con mayor contenido de ácido cítrico pueden crear el denominado *efecto eleva* que consiste en que pequeños errores asociados a estos puntos producen importantes variaciones en el modelo. Por esta razón se podrían rechazar estos puntos y comparar las mieles con menor contenido de ácido cítrico. Por ejemplo, las mieles con un contenido inferior a 250 mg/kg son el 68% y en este caso no hay diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza del 99% entre los tres métodos analizados, es decir, los tres métodos son comparables (Tabla XCVI).

Tabla XCVI. Resultados de las pruebas t de Student para muestras relacionadas con el fin de determinar si los tres métodos de análisis del contenido de ácido cítrico en la miel son comparables cuando la concentración de ácido cítrico es inferior a 250 mg/kg

		Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	99% Intervalo de confianza para la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	Método enzimático - Método HPLC	2.194	13.040	1.791	-2.595	6.984	1.225	52	.226
Par 2	Método enzimático - Método CE	3.892	14.945	2.053	-1.596	9.381	1.896	52	.064
Par 3	Método HPLC - Método CE	1.70	18.84	2.59	-5.22	8.62	.656	52	.515

Se puede concluir que para la determinación del ácido cítrico, los métodos de elección son el enzimático y el HPLC. El método enzimático posee la ventaja de una mayor sencillez, especificidad y precisión mientras que el método de HPLC posee como ventajas una mayor sensibilidad y la posibilidad de determinar conjuntamente otros ácidos orgánicos. Los porcentajes de recuperación, como ya se ha comentado en el capítulo 5, son similares en ambos métodos.

7.1.3. ÁCIDO MÁLICO

Se han utilizado 47 de las 75 mieles analizadas para realizar el estudio de comparación, ya que son las muestras en las que el ácido málico fue cuantificado por los tres métodos. Los valores del contenido del ácido málico aparecen recogidos anteriormente

en el trabajo y se resumen en la Tabla XCVII. Como se puede observar en esta tabla, los valores que aparecen en la determinación del ácido málico por el método enzimático en las muestras de Galicia con Denominación son los obtenidos a los 24 meses y no los valores iniciales. Se han considerado los valores a los 24 meses ya que, al igual que sucedía con el ácido cítrico, hay una pequeña variación en el contenido de ácido málico durante el almacenamiento por lo que se utilizan los valores del método enzimático que coinciden en el tiempo con los datos determinados en las mieles por HPLC y CE.

Tabla XCVII. Contenido de ácido málico (mg/kg) determinado por los métodos enzimático, HPLC y CE

Número de muestra	Origen geográfico	Método enzimático	Método HPLC	Método CE
1	Galicia	476	345	486
2	Galicia	559	434	539
3	Galicia	214	182	206
20	Galicia	26	20	21
24	Galicia	28	46	28
26	Galicia	149	236	127
27	Galicia	117	217	103
28	Galicia	125	225	105
30	Galicia	53	134	45
31	Galicia	38	93	30
32	Galicia	266	185	256
33	Galicia	66	179	67
34	Galicia	36	81	38
38	Galicia	28	39	29
39	Galicia	43	57	40
40	Galicia	83	71	75
41	Galicia	30	38	32
42	Galicia	473	364	485
43	Galicia	221	192	212
44	Galicia	189	180	187
45	Galicia	212	218	209
47	Galicia	26	30	21
48	Galicia	96	95	95
49	Galicia	38	49	37
50	Galicia	28	37	29
1	Otras zonas de España	40	87	37
2	Otras zonas de España	38	72	35
3	Otras zonas de España	43	66	36
5	Otras zonas de España	748	789	777
6	Otras zonas de España	274	368	275
7	Otras zonas de España	91	142	80
8	Otras zonas de España	98	138	87
9	Otras zonas de España	38	65	26
10	Otras zonas de España	503	610	508
11	Otras zonas de España	42	69	37
12	Otras zonas de España	144	220	147
15	Otras zonas de España	32	82	30
16	Otras zonas de España	30	60	21
17	Otras zonas de España	461	534	474
18	Otras zonas de España	28	45	22
19	Otras zonas de España	268	269	250
20	Otras zonas de España	516	518	535
21	Otras zonas de España	45	46	46
22	Otras zonas de España	127	210	113
23	Otras zonas de España	431	521	437
24	Otras zonas de España	782	568	787
25	Otras zonas de España	342	376	330

En una primera exploración de los datos (Figura 81) se observa la existencia de correlación lineal entre el contenido en ácido málico de las mieles analizadas por los tres métodos.

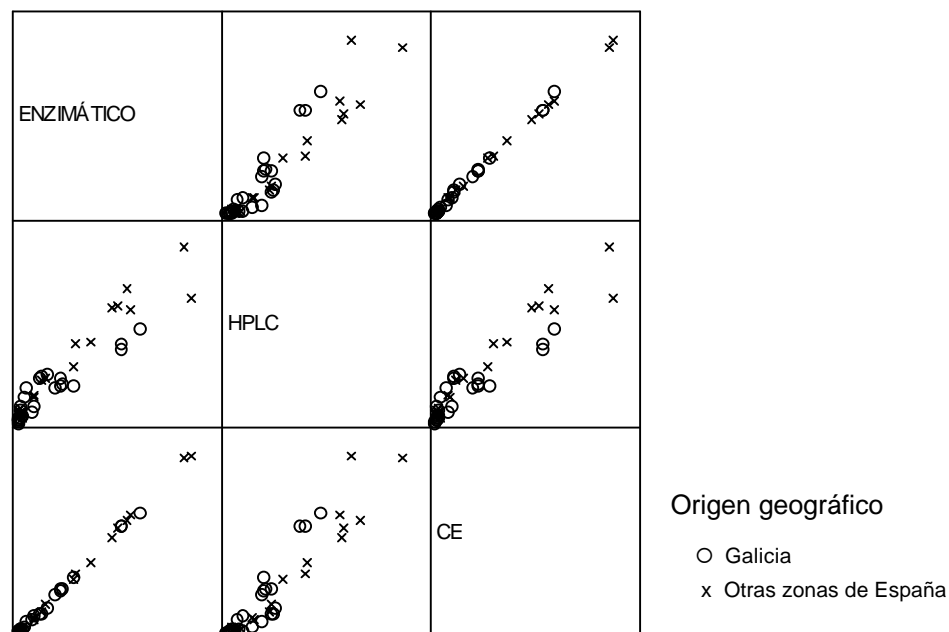


Figura 81. Gráfico draftsman para los valores del contenido en ácido málico determinados por los tres métodos de análisis desarrollados en este trabajo (enzimático, HPLC y CE).

En las Figuras 82, 83 y 84 se visualizan más claramente dichas correlaciones. En todos los casos los coeficientes de correlación lineal fueron significativos. La mejor correlación lineal se obtiene entre los métodos enzimático y CE ($r = 0.999$).

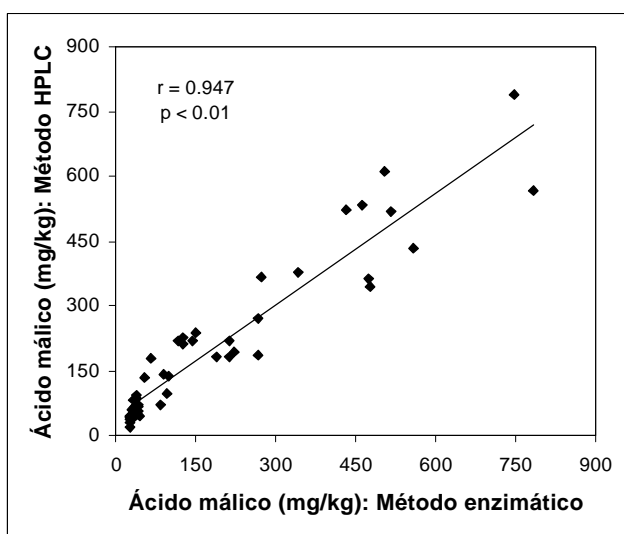


Figura 82. Correlación lineal entre el contenido en ácido málico (mg/kg) determinado por el método enzimático y por el método HPLC.

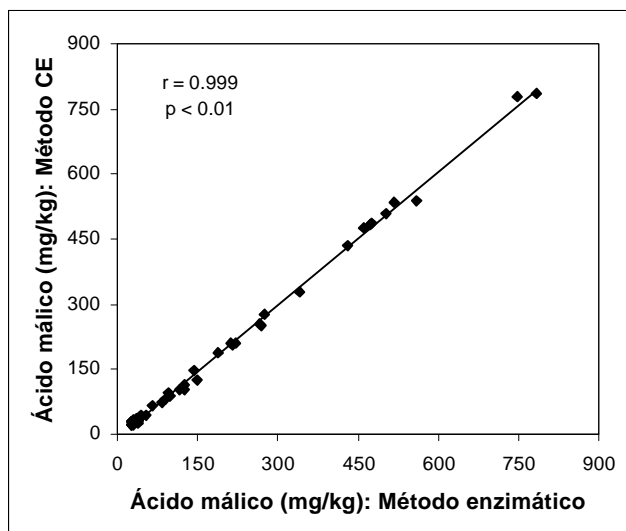


Figura 83. Correlación lineal entre el contenido en ácido málico (mg/kg) determinado por el método enzimático y por el método CE.

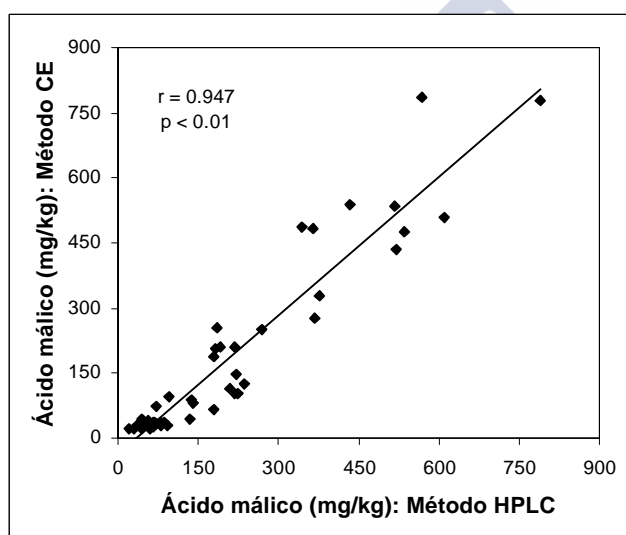


Figura 84. Correlación lineal entre el contenido en ácido málico (mg/kg) determinado por el método HPLC y por el método CE.

Para confirmar que no hay diferencias significativas entre los pares de valores se aplica el *test t de Student para muestras relacionadas* a los datos de ácido málico obtenidos por los tres métodos (Tabla XCVIII).

Tabla XCVIII. Resultados de las pruebas t de Student para muestras relacionadas con el fin de determinar si los tres métodos de análisis del contenido de ácido málico en la miel son comparables

		Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	99% Intervalo de confianza para la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	Método enzimático - Método HPLC	-18.32	65.73	9.59	-44.08	7.44	-1.911	46	.062
Par 2	Método enzimático - Método CE	3.17	9.90	1.44	-.71	7.05	2.196	46	.033
Par 3	Método HPLC - Método CE	21.49	67.64	9.87	-5.02	48.00	2.178	46	.035

En esta tabla se muestra como no hay diferencias significativas ($p > 0.01$), a un nivel de confianza del 99%, entre los resultados obtenidos por los tres métodos estudiados, es decir, los tres métodos serían comparables en el rango estudiado.

Aunque todos los métodos son comparables, se puede concluir que los métodos de elección para la determinación del ácido málico son el enzimático y el de CE. El método enzimático posee la ventaja de una mayor especificidad y sensibilidad mientras que el método de CE posee como ventaja la posibilidad de determinar conjuntamente otros ácidos orgánicos. La precisión y exactitud, como ya se ha comentado en el capítulo 5, son similares en ambos, aunque ligeramente mejores en el caso del método de CE.

7.1.4. ÁCIDO SUCCÍNICO

Se han utilizado 25 de las 75 mieles analizadas para realizar el estudio de comparación, ya que son las muestras en las que el ácido succínico fue cuantificado por los métodos de HPLC y CE. Los valores del contenido del ácido succínico aparecen recogidos anteriormente en el trabajo y se resumen en la Tabla XCIX.

Tabla XCIX. Contenido de ácido succínico (mg/kg) determinado por los métodos HPLC y CE

Número de muestra	Origen geográfico	Método HPLC	Método CE
1	Galicia	71	187
2	Galicia	1012	60
3	Galicia	209	29
26	Galicia	53	26
28	Galicia	84	37
32	Galicia	102	90
40	Galicia	27	17
42	Galicia	106	197
43	Galicia	40	90
44	Galicia	358	15
45	Galicia	52	142
48	Galicia	67	34
5	Otras zonas de España	137	216
6	Otras zonas de España	148	158
8	Otras zonas de España	79	13
9	Otras zonas de España	69	24
10	Otras zonas de España	118	164
12	Otras zonas de España	169	129
15	Otras zonas de España	106	13
17	Otras zonas de España	150	151
20	Otras zonas de España	395	117
22	Otras zonas de España	95	54
23	Otras zonas de España	254	298
24	Otras zonas de España	198	227
25	Otras zonas de España	842	366

En la Figura 85 se visualiza que no existe correlación lineal significativa entre ambos métodos. Tanto en la tabla anterior como en la figura, se observa como hay varias muestras cuyo contenido en ácido succínico es mucho mayor cuando se determina por HPLC que por CE. Probablemente esto sea debido a una posible interferencia debida a una sustancia que coeluye con el ácido succínico. En este caso el método de elección es el método de CE porque no presenta los problemas de interferencias que se han detectado en el método de HPLC. Además la exactitud del método de CE, como ya se ha comentado en el capítulo 5, es mucho mayor (expresada como porcentajes de recuperación) que la del método de HPLC.

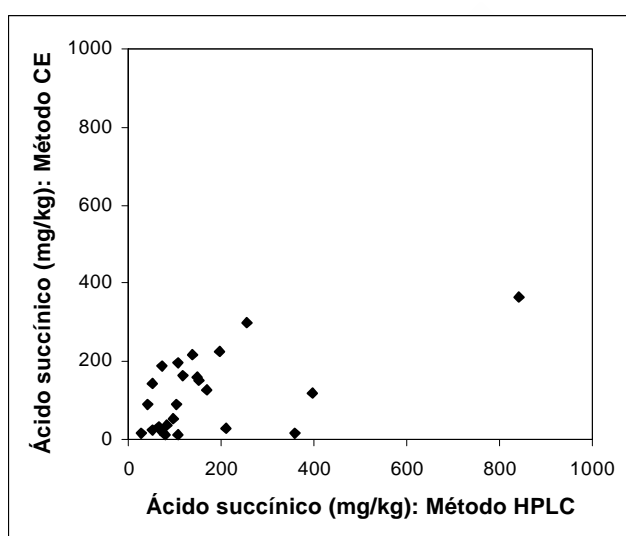


Figura 85. Gráfico de dispersión entre el contenido en ácido succínico (mg/kg) determinado por el método HPLC y por el método CE.

7.2. RELACIONES ENTRE LOS PARÁMETROS ANALIZADOS

7.2.1. RELACIONES ENTRE LOS PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS

En la Tabla C aparecen recogidos los coeficientes de correlación lineal entre los parámetros físico químicos estudiados tanto en las muestras de Galicia con Denominación como en las muestras procedentes de otras zonas de España. En las mieles de Galicia con Denominación, al haber realizado un estudio de evolución, también se han calculado las relaciones que existen entre los parámetros físico químicos a los 12 y 24 meses para comprobar si estas relaciones se modifican o no con el tiempo. Este análisis de correlaciones se ha llevado a cabo utilizando el programa estadístico SPSS (1999).

Tabla C. Correlaciones lineales significativas a un nivel de 0.01 (bilateral) entre los parámetros físico químicos determinados en las muestras analizadas en este trabajo (mieles de Galicia con Denominación y mieles procedentes de otras zonas de España)

RELACIÓN	MIELES DE GALICIA CON DENOMINACIÓN			MIELES DE OTRAS ZONAS DE ESPAÑA
	Inicial	12 meses	24 meses	Inicial
Conductividad-pH	0.718	0.787	0.771	0.781
Conductividad-ac. libre	0.306 ^a	0.384	0.415	0.917
Conductividad-ac. láctónica	----- ^b	----- ^b	----- ^b	----- ^b
Conductividad-ac. total	----- ^b	----- ^b	----- ^b	0.880
pH-ac. libre	-0.290 ^a	----- ^b	----- ^b	0.631
pH-ac. láctónica	-0.582	-0.718	-0.615	----- ^b
pH-ac. total	-0.406	-0.341 ^a	----- ^b	0.568
Ac. libre-ac. láctónica	0.729	0.652	0.722	0.459 ^a
Ac. libre-ac. total	0.974	0.967	0.975	0.988
Ac. láctónica-ac. total	0.866	0.824	0.858	0.592

^a La correlación es significativa a un nivel de 0.05

^b La correlación no es significativa

La relación entre la conductividad eléctrica y el pH ha sido descrita previamente por varios autores. *Kohlich y Krenn (1985)* obtuvieron una relación significativa ($p < 0.01$) con un coeficiente de correlación lineal de 0.79 en 144 mieles austríacas de diferente origen botánico. *Sanjuán et al. (1997)* encontraron una relación significativa entre ambos parámetros físico químicos ($p < 0.01$) con un coeficiente de correlación lineal de 0.761 en mieles españolas, concretamente de la isla de la Palma. *Cavia (2002)* también encontró una correlación lineal significativa ($p < 0.01$) entre la conductividad eléctrica y el pH, en mieles de Burgos (coeficientes de correlación lineal entre 0.736 y 0.786) y en mieles de Galicia (coeficientes de correlación lineal entre 0.821 y 0.848), relación que se mantiene en el tiempo. En la Tabla C se puede comprobar como, tanto en las mieles de Galicia con Denominación como en las mieles procedentes de otras zonas de España, la relación entre la conductividad y el pH es significativa, con coeficientes de correlación lineal similares a los encontrados en los estudios anteriores. En esta tabla también se observa como esta relación se conserva a lo largo del tiempo.

Kohlich y Krenn (1985) estudió la relación entre la conductividad eléctrica y la acidez libre en 40 mieles austríacas de diferente origen botánico obteniendo un coeficiente de correlación lineal de 0.48 ($p < 0.01$). En las mieles de Galicia con Denominación analizadas en este trabajo esta relación lineal fue también significativa aunque los coeficientes de correlación son inferiores (Tabla C). Por el contrario, se obtuvo un coeficiente de correlación lineal de 0.917 en las mieles procedentes de otras zonas de España (Tabla C). En cuanto a la relación de la conductividad con los otros tipos de acidez, sólo se ha encontrado una relación lineal significativa con la acidez láctica en las mieles de otras zonas de España ($r = 0.880$).

Tanto *White (1979)* como *Mostafa et al. (1982)* concluyeron que no había relación entre el pH y la acidez libre. *Cavia (2002)*, por el contrario, encontró que existía una relación significativa en mieles de Burgos entre ambos parámetros y que se mantenía a lo largo del tiempo, con coeficientes de correlación lineal que oscilaban entre 0.390 y 0.544. En su estudio, *Cavia (2002)* también los determinó en mieles de Galicia pero no obtuvo ninguna relación significativa. En la Tabla C se observa como en las mieles de Galicia con Denominación hay una relación inversa y significativa aunque muy débil ($r = -0.290$) entre el pH y la acidez libre. Esta relación no se mantiene a lo largo del tiempo. En el caso de las mieles procedentes de otras zonas de España la relación es significativa y directa ($r = 0.631$).

En lo que se refiere a la relación entre el pH y la acidez láctica, *White (1962)* encontró valores de pH extremadamente altos en mieles que no tenían acidez láctica. Esto fue posteriormente confirmado por *Sancho et al. (1991a)* y *Cavia (2002)* que observaron que las muestras con menor acidez láctica presentaban un pH más elevado, comprobando en el caso del estudio de *Cavia (2002)* la existencia de una relación lineal, significativa e inversa entre ambos parámetros. En las mieles de Galicia con Denominación analizadas en este trabajo se ha encontrado una relación lineal significativa e inversa entre el pH y la acidez láctica, que además se mantiene con el tiempo (Tabla C). Sin embargo no se obtuvo ninguna relación lineal significativa entre estos parámetros en las mieles procedentes de otras zonas de España.

En la bibliografía consultada no se han encontrado relaciones significativas entre el pH y la acidez total. En la Tabla C se pone de manifiesto una correlación lineal significativa e inversa entre ambos parámetros en las muestras de Galicia con Denominación, aunque esta relación no se mantiene a lo largo del tiempo. En las mieles procedentes de otras zonas de España se ha obtenido una correlación lineal significativa pero directa entre el pH y la acidez total.

Martínez-Gómez et al. (1990) investigaron la existencia de posibles relaciones entre varios parámetros físico químicos de 25 mieles comerciales de eucalipto procedentes de varias zonas de España, obteniendo correlaciones lineales significativas ($p < 0.01$) entre la acidez libre y la acidez total ($r = 0.948$) y entre la acidez lactónica y la acidez total ($r = 0.536$). *Frías et al. (1991)* encontraron, también, correlaciones lineales significativas ($p < 0.01$) entre la acidez libre y la acidez total ($r = 0.90$) y entre la acidez lactónica y la acidez total ($r = 0.71$) de 38 mieles artesanales de Santa Cruz de Tenerife. Las correlaciones lineales entre los diferentes tipos de acidez (libre, lactónica y total) son significativas en todas las muestras analizadas en este trabajo (mieles de Galicia con Denominación y mieles procedentes de otras zonas de España) (Tabla C). Además, en las mieles de Galicia con Denominación, estas relaciones se conservan a lo largo del tiempo (a los 12 y 24 meses). La correlación entre la acidez libre y la acidez total es muy fuerte, lo que es previsible al ser la acidez libre el componente con mayor peso de la acidez total.

7.2.2. RELACIONES ENTRE LOS PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS Y LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS NO AROMÁTICOS

A pesar de que algunos ácidos orgánicos no aromáticos se han determinado por dos o tres métodos, a la hora de establecer las relaciones existentes entre los parámetros físico químicos y estos ácidos sólo se ha considerado la determinación por uno de los métodos. La elección del método se ha establecido según los resultados obtenidos en el apartado 7.1.:

- ✓ Ácidos D-glucónico total, cítrico y L-málico: Método enzimático.
- ✓ Ácidos maleico y fumárico: Método de HPLC.
- ✓ Ácidos oxálico, fórmico, succínico, acético y láctico: Método de CE.

En la Tabla CI se analizan las correlaciones lineales que existen entre los parámetros físico químicos y los ácidos orgánicos determinados por el método enzimático (ácidos D-glucónico total, cítrico y L-málico). Este estudio se ha realizado para todas las muestras en el momento inicial y a los 12 y 24 meses en las mieles de Galicia con Denominación con el fin de determinar como evolucionan a lo largo del tiempo las posibles relaciones encontradas. Este análisis de correlaciones se ha llevado a cabo utilizando el programa estadístico *SPSS (1999)*.

Tabla CI. Correlaciones lineales significativas a un nivel de 0.01 (bilateral) entre los parámetros físico químicos y los ácidos orgánicos determinados por el método enzimático en las muestras analizadas (mieles de Galicia con Denominación y mieles procedentes de otras zonas de España)

RELACIÓN	MIELES DE GALICIA CON DENOMINACIÓN			MIELES DE OTRAS ZONAS DE ESPAÑA
	Inicial	12 meses	24 meses	Inicial
Conductividad-ácido D- glucónico total	0.593	0.571	0.573	0.873
Conductividad-ácido cítrico	0.712	0.727	0.724	0.803
Conductividad-ácido L-málico	0.767	0.778	0.778	0.887
pH-ácido D-glucónico total	----- ^b	----- ^b	----- ^b	0.497 ^a
pH-ácido cítrico	0.551	0.640	0.645	0.883
pH-ácido L-málico	0.632	0.702	0.691	0.769
Ac. libre-ácido D-glucónico total	0.768	0.798	0.801	0.895
Ac. libre-ácido cítrico	0.426	0.501	0.508	0.741
Ac. libre-ácido L-málico	0.307 ^a	0.385	0.409	0.845
Ac. láctónica-ácido D-glucónico total	0.650	0.628	0.683	0.596
Ac. láctónica-ácido cítrico	----- ^b	----- ^b	----- ^b	----- ^b
Ac. láctónica-ácido L-málico	----- ^b	0.329 ^a	----- ^b	----- ^b
Ac. total-ácido D-glucónico total	0.778	0.808	0.814	0.917
Ac. total-ácido cítrico	----- ^b	0.288 ^a	0.325 ^a	0.694
Ac. total-ácido L-málico	----- ^b	----- ^b	----- ^b	0.777

^a La correlación es significativa a un nivel de 0.05

^b La correlación no es significativa

En la Tabla CI se pone de manifiesto lo siguiente:

- ↗ Hay una relación lineal significativa ($p < 0.01$) y directa entre la conductividad eléctrica y los ácidos D-glucónico total, cítrico y L-málico. En el caso de las mieles de Galicia con Denominación esta correlación se mantiene a lo largo del tiempo.
- ↗ No existe relación lineal significativa entre el pH y el ácido D-glucónico total en las mieles gallegas aunque sí en las mieles de otras zonas de España ($p < 0.05$). En lo que se refiere a los ácidos cítrico y L-málico sí existe relación lineal

significativa en todas las muestras analizadas y ésta, además, se mantiene con el tiempo.

- ⇒ El ácido D-glucónico total es el único que está correlacionado linealmente y de manera significativa con los tres tipos de acidez. Los mayores coeficientes de correlación lineal y, por tanto, las relaciones más fuertes se establecen entre este ácido orgánico y la acidez libre y la acidez total. Estas relaciones son predecibles, debido a que, como ya se ha comentado, el ácido D-glucónico total es el mayoritario en la miel por lo que la mayor parte de la acidez correspondería a este ácido. En la Figura 86 se representan las relaciones del ácido D-glucónico total con la acidez libre (A) y la acidez total (B) en las muestras de Galicia con Denominación (punto inicial). En ambos gráficos de esta figura se observa claramente la existencia de 3 muestras que tienen un alto contenido en ácido D-glucónico total pero una acidez baja. Si se eliminan estas muestras los coeficientes de correlación lineal aumentan de forma considerable (Figura 87). Las mieles cuyo comportamiento es claramente diferente al del resto son las muestras Nº 2, 3 y 44. Las dos primeras son monoflorales de *Castanea sativa* Miller (proporción de pólenes superior a 90%) mientras que la tercera es una muestra multifloral, con una proporción de pólenes de *Castanea sativa* Miller de aproximadamente el 87%. La relación entre el ácido D-glucónico total y la acidez libre (A) y la acidez total (B) en las mieles procedentes de otras zonas de España se representan en la Figura 88, obteniendo coeficientes de correlación similares a los de las mieles gallegas. Como cabía esperar, tanto en las mieles de Galicia con Denominación como en las procedentes de otras zonas de España, la correlación lineal del ácido D-glucónico total con la acidez total es mejor que la correlación con la acidez libre. Esto es debido a que en el análisis enzimático se determina el ácido D-glucónico total como la suma del ácido D-glucónico libre y la gluconolactona.

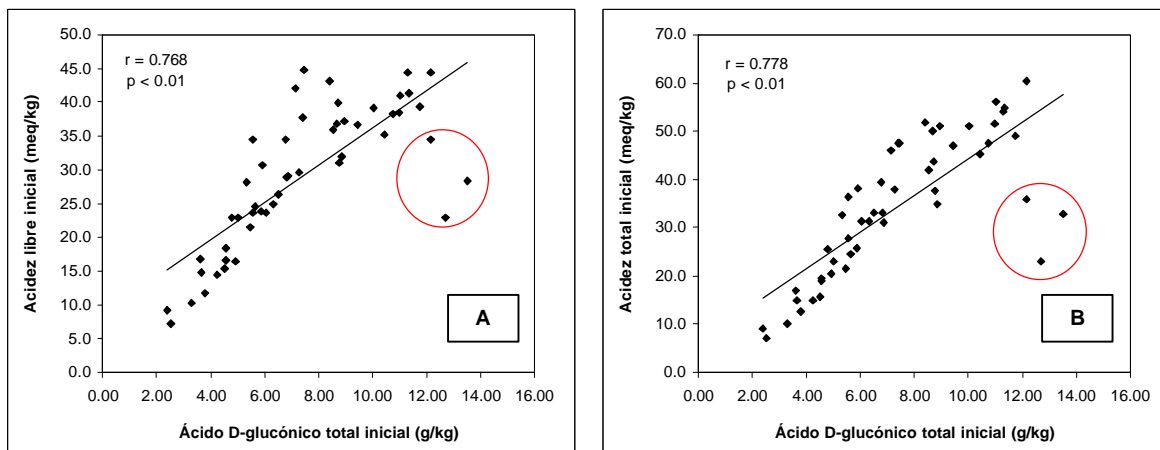


Figura 86. Relaciones lineales del ácido D-glucónico total con la acidez libre (A) y la acidez total (B) en las muestras de Galicia con Denominación (punto inicial).

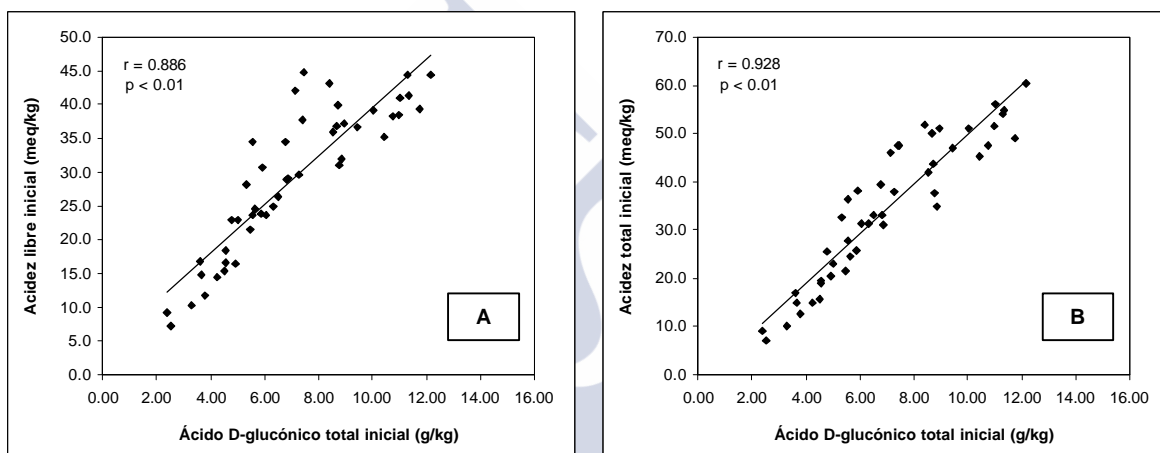


Figura 87. Relaciones lineales del ácido D-glucónico total con la acidez libre (A) y la acidez total (B) en las muestras de Galicia con Denominación (punto inicial) después de eliminar tres muestras con alto contenido en Castanea sativa Miller.

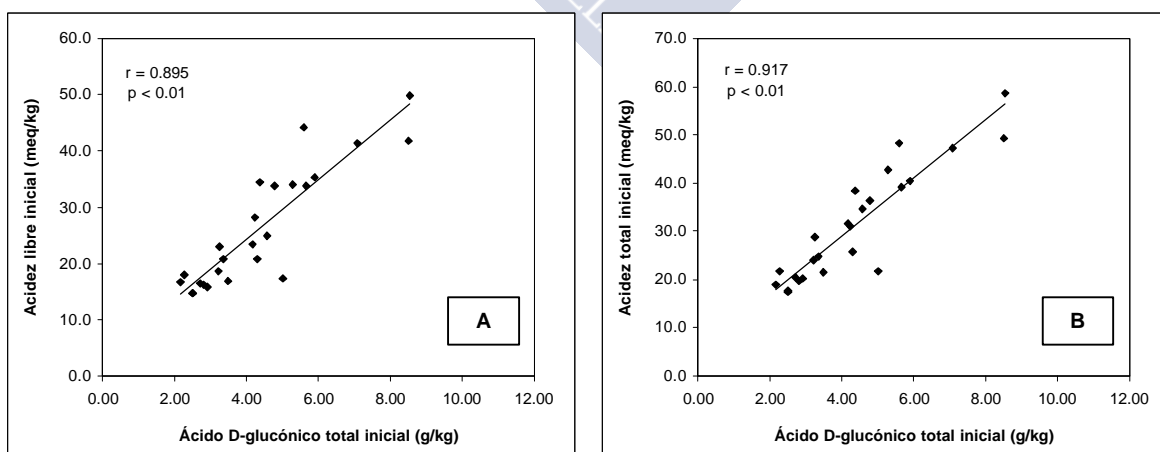


Figura 88. Relaciones lineales del ácido D-glucónico total con la acidez libre (A) y la acidez total (B) en las muestras procedentes de otras zonas de España.

En la Tabla CII se analizan las correlaciones lineales que existen entre los parámetros físico químicos y los ácidos orgánicos determinados por los métodos de HPLC y CE que no han sido determinados por el método enzimático. Este estudio se ha realizado en las muestras de Galicia con Denominación y en las muestras procedentes de otras zonas de España.

En esta tabla se pone de manifiesto:

- ↗ De todas las relaciones, cabe destacar la elevada correlación existente entre el ácido fórmico y la conductividad eléctrica, con coeficientes mayores de 0.9 en ambos grupos de muestras.
- ↗ En la mayor parte de las relaciones encontradas los coeficientes de correlación lineal son mejores en el caso de las mieles procedentes de otras zonas de España que en las mieles de Galicia.

En la Tabla CII no aparece la acidez lactónica relacionada con los ácidos orgánicos objeto del estudio porque no se ha encontrado ninguna relación estadísticamente significativa en ambos grupos de mieles. Esto, a priori, es lógico ya que la acidez lactónica es una medida de las lactonas y no de los ácidos orgánicos libres. Tampoco aparece el ácido maleico (determinado por HPLC), ya que no se ha encontrado ninguna relación estadísticamente significativa con los parámetros físico químicos ni en las mieles de Galicia con Denominación ni en las mieles procedentes de otras zonas de España.

Tabla CII. Correlaciones lineales significativas a un nivel de 0.01 (bilateral) entre los parámetros físico químicos y los ácidos orgánicos determinados por HPLC y CE en las muestras analizadas (mieles de Galicia con Denominación y mieles procedentes de otras zonas de España)

RELACIÓN	MIELES DE GALICIA CON DENOMINACIÓN	MIELES DE OTRAS ZONAS DE ESPAÑA
Conductividad-ácido fumárico	0.676	0.853
Conductividad-ácido oxálico	0.435	----- ^b
Conductividad-ácido fórmico	0.963	0.914
Conductividad-ácido succínico	----- ^b	0.721
Conductividad-ácido acético	0.535	0.867
Conductividad-ácido láctico	0.430	0.762
pH-ácido fumárico	0.606	0.700
pH-ácido oxálico	----- ^b	0.592
pH-ácido fórmico	0.752	0.722
pH-ácido succínico	----- ^b	0.539 ^a
pH-ácido acético	----- ^b	----- ^b
pH-ácido láctico	----- ^b	0.452 ^a
Ac. libre-ácido fumárico	----- ^b	0.836
Ac. libre-ácido oxálico	----- ^b	----- ^b
Ac. libre-ácido fórmico	----- ^b	0.823
Ac. libre-ácido succínico	0.671 ^a	0.683
Ac. libre-ácido acético	0.329 ^a	0.794
Ac. libre-ácido láctico	0.533	0.876
Ac. total-ácido fumárico	----- ^b	0.777
Ac. total-ácido oxálico	----- ^b	----- ^b
Ac. total-ácido fórmico	----- ^b	0.811
Ac. total-ácido succínico	----- ^b	0.594 ^a
Ac. total-ácido acético	----- ^b	0.806
Ac. total-ácido láctico	0.393	0.865

^a La correlación es significativa a un nivel de 0.05

^b La correlación no es significativa

7.2.3. RELACIONES ENTRE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS

Al igual que en el apartado anterior, los datos de los ácidos orgánicos que se han utilizado son los obtenidos por el método enzimático para los ácidos D-glucónico total, cítrico y L-málico; por el método de HPLC para los ácidos maleico y fumárico y por el método de CE para los ácidos oxálico, fórmico, succínico, acético y láctico.

En las Tablas CIII y CIV aparecen recogidas las correlaciones lineales obtenidas para los ácidos orgánicos antes mencionados en las muestras de Galicia con Denominación y en las procedentes de otras zonas de España, respectivamente. Este análisis de correlaciones se ha llevado a cabo utilizando el programa estadístico SPSS (1999).

Tabla CIII. Correlaciones lineales significativas a un nivel de 0.01 (bilateral) entre los ácidos orgánicos en las mieles de Galicia con Denominación

		Acido D-glucónico total (g/kg) ENZ	Acido cítrico (mg/kg) ENZ	Acido L-málico (mg/kg) ENZ	Acido maleico (mg/kg) HPLC	Acido fumárico (mg/kg) HPLC	Acido oxálico (mg/kg) CE	Acido fórmico (mg/kg) CE	Acido succínico (mg/kg) CE	Acido acético (mg/kg) CE
Ácido cítrico (mg/kg) ENZ	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	.320* .024 50								
Ácido L-málico (mg/kg) ENZ	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	.286* .044 50	.935** .000 50							
Ácido maleico (mg/kg) HPLC	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	.235 .124 44	-.039 .803 44	-.108 .485 44						
Ácido fumárico (mg/kg) HPLC	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	.228 .115 49	.914** .000 49	.926** .000 49	-.035 .823 43					
Ácido oxálico (mg/kg) CE	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	.158 .272 50	.523** .000 50	.506** .000 50	.008 .959 44	.490** .000 49				
Ácido fórmico (mg/kg) CE	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	.483** .000 50	.601** .000 50	.668** .000 50	-.008 .961 44	.577** .000 49	.506** .000 50			
Ácido succínico (mg/kg) CE	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	.076 .737 22	.880** .000 22	.813** .000 22	-.021 .931 20	.908** .000 22	.584** .004 22	.182 .418 22		
Ácido acético (mg/kg) CE	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	.305* .031 50	.288* .042 50	.310* .029 50	.044 .778 44	.224 .122 49	.508** .000 50	.602** .000 50	.015 .949 22	
Ácido láctico (mg/kg) CE	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	.326* .021 50	.768** .000 50	.667** .000 50	-.069 .656 44	.678** .000 49	.293* .039 50	.286* .044 50	.942** .000 22	.033 .822 50

*. La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

**.. La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Tabla CIV. Correlaciones lineales significativas a un nivel de 0.01 (bilateral) entre los ácidos orgánicos en las mieles procedentes de otras zonas de España

		Ácido D-glucónico total (g/kg) ENZ	Ácido cítrico (mg/kg) ENZ	Ácido L-málico (mg/kg) ENZ	Ácido maleico (mg/kg) HPLC	Ácido fumárico (mg/kg) HPLC	Ácido oxálico (mg/kg) CE	Ácido fórmico (mg/kg) CE	Ácido succínico (mg/kg) CE	Ácido acético (mg/kg) CE
Ácido cítrico (mg/kg) ENZ	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	.571** .003 25								
Ácido L-málico (mg/kg) ENZ	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	.670** .000 25	.763** .000 25							
Ácido maleico (mg/kg) HPLC	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	-.088 .688 23	.029 .894 23	-.028 .898 23						
Ácido fumárico (mg/kg) HPLC	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	.675** .000 25	.727** .000 25	.941** .000 25	-.011 .960 23					
Ácido oxálico (mg/kg) CE	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	.044 .854 20	.433 .057 20	.202 .393 20	.224 .358 19	.143 .548 20				
Ácido fórmico (mg/kg) CE	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	.837** .000 24	.729** .000 24	.769** .000 24	-.040 .859 22	.705** .000 24	.392 .087 20			
Ácido succínico (mg/kg) CE	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	.510 .052 15	.623* .013 15	.669** .006 15	.144 .609 15	.683** .005 15	-.066 .822 14	.335 .242 14		
Ácido acético (mg/kg) CE	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	.870** .000 14	.372 .191 14	.708** .005 14	.569* .034 14	.663** .010 14	-.065 .826 14	.905** .000 14	.289 .389 11	
Ácido láctico (mg/kg) CE	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	.743** .000 21	.662** .001 21	.669** .001 21	.165 .488 20	.739** .000 21	.135 .594 18	.643** .002 20	.713** .003 15	.622* .023 13

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

De estas tablas se puede concluir que los ácidos L-málico, fumárico y succínico que son estructuralmente similares están relacionados entre sí tanto en las mieles de Galicia con Denominación como en las mieles procedentes de otras zonas de España. Esto indica que probablemente tengan un origen común en la miel, y como todos ellos están también relacionados con el ácido cítrico, este origen puede ser el de ser intermediarios en el ciclo de Krebs, como ya fue sugerido por *Echigo y Takenaka (1974)* y *White (1979)*.

Los ácidos maleico y fumárico son isómeros estructurales, sin embargo, su comportamiento es muy diferente ya que mientras el ácido maleico no está relacionado prácticamente con ningún ácido orgánico, el ácido fumárico presenta correlaciones lineales más o menos fuertes con casi todos los ácidos orgánicos estudiados.

En las mieles de Galicia con Denominación los ácidos orgánicos más fuertemente relacionados, es decir, los que tienen un coeficiente de correlación lineal mayor de 0.800 son, por una parte, los ácidos cítrico, L-málico, fumárico y succínico entre sí y, por otra, el ácido succínico con el láctico. En la Figura 89 se visualiza la representación gráfica de las relaciones existentes entre los ácidos cítrico, L-málico, fumárico y succínico.

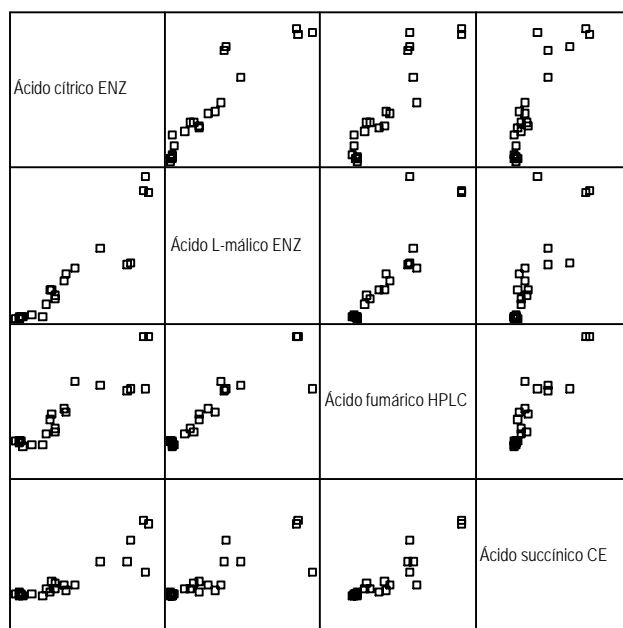


Figura 89. Gráfico draftsman para los datos de los ácidos cítrico, L-málico, fumárico y succínico en las mieles de Galicia con Denominación.

En las mieles procedentes de otras zonas de España los ácidos orgánicos más fuertemente relacionados son los ácidos D-glucónico total, fórmico y acético entre sí. Una representación gráfica de estas relaciones es la de la Figura 90.

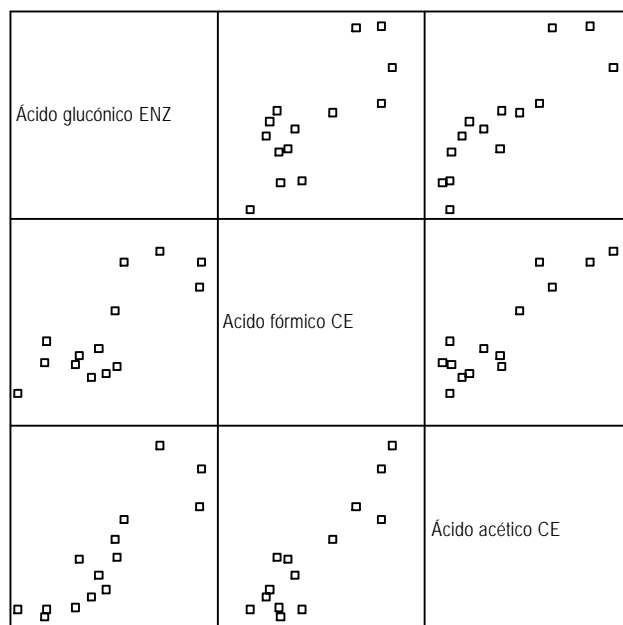


Figura 90. Gráfico draftsman para los datos de los ácidos D-glucónico total, fórmico y acético en las mieles procedentes de otras zonas de España.

7.3. ANÁLISIS MULTIVARIANTE

7.3.1. INTRODUCCIÓN

El análisis multivariante es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas que se aplican al análisis de muchas variables. El tratamiento de datos es, por tanto, multidimensional (*Bisquerra, 1989*). En los últimos años, su desarrollo ha tenido un creciente auge en la práctica totalidad de las ciencias experimentales y su utilización se ha convertido en imprescindible para la interpretación de los resultados experimentales.

7.3.1.1. TÉCNICAS DE CLASIFICACIÓN

7.3.1.1.1. ANÁLISIS NO SUPERVISADO: TÉCNICAS CLUSTER

El análisis no supervisado es el más general ya que asume un menor conocimiento previo del problema. Se sospecha que deben existir agrupamientos pero no se sabe cuantos ni se dispone de objetos característicos de los mismos.

El *análisis cluster* es una técnica de clasificación no supervisada cuyo objetivo global es la búsqueda de grupos similares de objetos o de variables que se van agrupando en conglomerados (clusters) homogéneos. Estos conglomerados pueden sugerir categorías o clases sirviendo de orientación para posteriores estudios de clasificación. Los objetos o variables que queden clasificados en un mismo conglomerado tendrán propiedades más similares entre sí que los que pertenecen a otros conglomerados. El resultado de un análisis cluster se obtiene gráficamente, como gráficos bidimensionales que se denominan dendogramas (*Bisquerra, 1989; Miller y Miller, 2002*).

7.3.1.1.2. ANÁLISIS SUPERVISADO

Estos métodos se caracterizan por la existencia de un grupo de objetos cuyo origen, categoría o clase es conocida previamente. A partir de estos objetos y mediante su caracterización por medio de un grupo de variables adecuado, se desarrolla un modelo que permite relacionar las variables de agrupación con las variables medidas. Dicho modelo puede ser posteriormente utilizado con fines predictivos para nuevos objetos desconocidos.

Dentro de las técnicas de clasificación supervisadas, hay que diferenciar aquellas cuyo objetivo es de *clasificación* (ya descrito anteriormente) y aquellas cuyo objetivo es la *modelización de clases* (es decir, se pretende discriminar una clase de todas las demás). El *análisis lineal discriminante (LDA)* y el *método de los K vecinos más próximos (KNN)*

pertenecen al primer grupo mientras que el *modelado independiente suave de analogía de clase* (SIMCA) pertenece al segundo (Bisquerra, 1989; Miller y Miller, 2002).

7.3.1.2. TÉCNICAS DE REDUCCIÓN DE DATOS

Un problema que aparece en el análisis multivariante es que el volumen bruto de los datos puede dificultar el reconocimiento de pautas y relaciones. Por eso existen técnicas multivariantes cuyo objetivo es la reducción de los datos.

Dentro de estas técnicas destaca el *análisis de componentes principales* (PCA), que permite transformar un conjunto de variables intercorrelacionadas en otro conjunto de variables no correlacionadas, denominadas factores. Los factores son combinaciones lineales de las variables originales. El primer componente principal o factor es el que mejor contribuye a explicar la varianza total. El segundo componente principal es el que aporta un máximo de la varianza residual resultante, siendo independiente del primero, y así sucesivamente (Bisquerra, 1989; Miller y Miller, 2002).

7.3.2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Las técnicas multivariantes se han aplicado para caracterizar muchos alimentos, como por ejemplo, leche (López-Mahía *et al.*, 1992a, b y c), zumos de piña (Cámara *et al.*, 1995), queso (Califano y Bevilacqua, 1999), agua de bebida (Ortiz-Estarellas *et al.*, 2001), café (Maeztu *et al.*, 2001), patatas (Padín *et al.*, 2001, Peña *et al.*, 2001), vinos (Meléndez *et al.*, 2001; Pérez-Magariño *et al.*, 2002), cerveza (Alcázar *et al.*, 2002), etc.

Desde hace unos años y utilizando estas técnicas multivariantes, también se ha intentado caracterizar la miel, tanto desde el punto de vista de su origen botánico como geográfico. Con ello se pretende determinar cuales son los compuestos químicos que tienen una mayor influencia a la hora de diferenciar entre grupos de mieles. En los estudios revisados se han empleado varias técnicas multivariantes aplicadas a distintos parámetros analizados en la miel (Tabla CV).

Como se puede observar en esta tabla, los parámetros físico químicos son los más utilizados a la hora de intentar caracterizar las mieles tanto desde el punto de vista botánico como geográfico. Dentro de estos parámetros se incluyen, entre otros, humedad, actividad de agua, color, conductividad eléctrica, cenizas, sólidos insolubles, pH, tipos de acidez, azúcares reductores, sacarosa aparente, prolina, índice de diastasas (ID) e hidroximetilfurfural (HMF). Además se han utilizado series de componentes como azúcares (mono, di y trisacáridos), minerales, aminoácidos, aniones y cationes inorgánicos.

Tabla CV. Estudios de aplicación de diversas técnicas multivariantes a la miel con el fin de caracterizarla desde el punto de vista botánico o geográfico

Tipo de caracterización	Autor/les	Técnica multivariante	Parámetros analizados
Según origen botánico	<i>Stefanini (1984)</i>	Análisis cluster	Parámetros físico químicos
	<i>Stefanini (1988)</i>	Análisis cluster	Parámetros físico químicos Mono, di y trisacáridos
	<i>Krauze y Zalewski (1991)</i>	Análisis de componentes principales (PCA)	Parámetros físico químicos Mono, di y trisacáridos
	<i>Sancho et al. (1991b)</i>	Análisis cluster	Parámetros físico químicos Mono, di y trisacáridos
	<i>Földházi et al. (1996)</i>	Análisis lineal discriminante (LDA)	Parámetros físico químicos Minerales Monosacáridos
	<i>Conte et al. (1998)</i>	Análisis lineal discriminante (LDA)	Parámetros físico químicos Aminoácidos
	<i>Mateo y Bosch-Reig (1998)</i>	Análisis lineal discriminante (LDA)	Parámetros físico químicos Mono y disacáridos
	<i>Radovic et al. (2001)</i>	Análisis lineal discriminante (LDA)	Oligosacáridos Aniones y cationes inorgánicos
	<i>Popek (2002)</i>	Análisis lineal discriminante (LDA)	Parámetros físico químicos
	<i>Terrab et al. (2002)</i>	Análisis de componentes principales (PCA) Análisis lineal discriminante (LDA)	Parámetros físico químicos
Según origen geográfico	<i>Sancho et al. (1991c)</i>	Análisis lineal discriminante (LDA)	Parámetros físico químicos Monosacáridos
	<i>Peña y Herrero (1993)</i>	Análisis de componentes principales (PCA) Análisis lineal discriminante (LDA) Método de los K vecinos más próximos (KNN) Modelado independiente suave de analogía de clase (SIMCA)	Parámetros físico químicos
	<i>Sanz et al. (1995)</i>	Análisis factorial Análisis lineal discriminante (LDA)	Parámetros físico químicos Mono y disacáridos
	<i>López et al (1996)</i>	Análisis de componentes principales (PCA) Análisis cluster Análisis lineal discriminante (LDA) Método de los K vecinos más próximos (KNN) Modelado independiente suave de analogía de clase (SIMCA)	Parámetros físico químicos
	<i>Latorre et al. (1999)</i>	Análisis de componentes principales (PCA) Análisis lineal discriminante (LDA) Método de los K vecinos más próximos (KNN) Modelado independiente suave de analogía de clase (SIMCA)	Minerales
	<i>Gómez-Bárez et al. (2000)</i>	Análisis lineal discriminante (LDA)	Parámetros físico químicos Mono, di y trisacáridos
	<i>González-Paramás et al. (2000)</i>	Análisis lineal discriminante (LDA)	Parámetros físico químicos Minerales
	<i>Latorre et al. (2000)</i>	Análisis cluster Análisis de componentes principales (PCA) Redes neuronales	Minerales

En los estudios anteriores, tanto la acidez libre (*Krauze y Zalewski, 1991; Peña y Herrero, 1993; Sanz et al., 1995*) como la acidez total (*Sancho et al., 1991c; López et al., 1996; Poppek, 2002*) se consideran parámetros clave en la caracterización tanto botánica como geográfica.

Sin embargo y debido a la gran variabilidad de las mieles, en la mayor parte de los trabajos mencionados en la Tabla CV, se considera que el análisis polínico sigue siendo muy importante a la hora de caracterizar una miel desde el punto de vista botánico. Mejores resultados se han obtenido a la hora de diferenciar mieles de diferentes orígenes geográficos concretos, aunque es necesario realizar un estudio más amplio en el que se incluyan mieles de varias cosechas.

Como ya se ha comentado en el capítulo 5, los ácidos orgánicos no aromáticos son un grupo de compuestos que podrían utilizarse para la caracterización de las mieles de diferentes orígenes botánicos o geográficos (*Molan, 1996; Anklam, 1998*). Sin embargo, en la bibliografía consultada, no se han encontrado estudios de análisis multivariante utilizando estos ácidos orgánicos.

7.3.3. PARTE EXPERIMENTAL

El análisis de datos se ha llevado a cabo utilizando el software estadístico *Pirouette v. 3.0 (2000)*. Las variables utilizadas fueron los parámetros físico químicos (conductividad eléctrica, pH, acidez libre, acidez láctica y acidez total) y los contenidos de los ácidos orgánicos no aromáticos determinados por el método enzimático (D-glucónico total, L-málico y cítrico), por el método de HPLC (maleico y fumárico) y por el método de CE (oxálico, fórmico, succínico, acético y láctico) de las 75 muestras analizadas (50 mieles de Galicia con Denominación y 25 mieles de otras zonas de España). En las muestras en las que no se ha detectado un determinado ácido se ha sustituido el valor no detectable (ND) por 0, mientras que en las que no se ha cuantificado, el valor no cuantificable (NC) se ha sustituido por el límite de cuantificación en cada caso.

Con el fin de caracterizar las mieles analizadas se han realizado tres estudios:

1. Diferenciación de las mieles de Galicia con Denominación según la provincia de procedencia del envasador

En este caso, la matriz de datos es de 50 x 15, en la que las filas se corresponden con las muestras (objetos) y las columnas con las variables (parámetros físico químicos y contenido en ácidos orgánicos no aromáticos). Se

establecen cuatro clases, coincidiendo con las provincias de procedencia del envasador: A Coruña, Lugo, Ourense y Pontevedra.

2. Diferenciación de las mieles de Galicia con Denominación según su espectro polínico

Al igual que en el apartado anterior, la matriz de datos es de 50 x 15, en la que las filas se corresponden con las muestras (objetos) y las columnas con las variables (parámetros físico químicos y contenido en ácidos orgánicos no aromáticos). En este estudio, también, se distinguen cuatro clases: *Castanea sativa* Miller, *Eucalyptus* sp., *Trifolium* sp. L. y multiflorales. Hay que destacar que de la primera clase sólo hay 3 muestras y de la tercera una.

3. Diferenciación entre las mieles de Galicia con Denominación y las procedentes de otras zonas de España

De esta forma se tiene una matriz de datos de 75 x 15, en la que las filas se corresponden con las muestras (objetos) y las columnas con las variables (parámetros físico químicos y contenido en ácidos orgánicos no aromáticos). En este caso se establecen dos clases: mieles de Galicia con Denominación y mieles de otras zonas de España.

En los tres estudios se llevaron a cabo las siguientes pruebas:

- a. *Análisis de cluster aglomerativo* (datos autoescalados; estrategia flexible; orientación: muestras; similitud: distancia euclídea).
- b. *Análisis de componentes principales* (datos autoescalados; rotación: varimax, normal). En los dos estudios de las mieles de Galicia con Denominación, el máximo número de factores es 6, la validación es cruzada por grupos de 5 muestras y el máximo número de factores rotados 4. En el caso del estudio de las muestras de Galicia con Denominación frente a muestras procedentes de otras zonas de España, el máximo número de factores es 4, la validación es cruzada por grupos de 10 muestras y el máximo número de factores rotados 3.
- c. *Clasificación mediante el método de los K vecinos más próximos* (datos autoescalados; máximo número de vecinos 10).

7.3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.3.4.1. DIFERENCIACIÓN DE LAS MIELES DE GALICIA CON DENOMINACIÓN SEGÚN LA PROVINCIA DE PROCEDENCIA DEL ENVASADOR

7.3.4.1.1. ANÁLISIS CLUSTER AGLOMERATIVO

En la Figura 91 se representa el dendrograma obtenido para las muestras de Galicia con Denominación agrupadas según la provincia de procedencia del envasador.

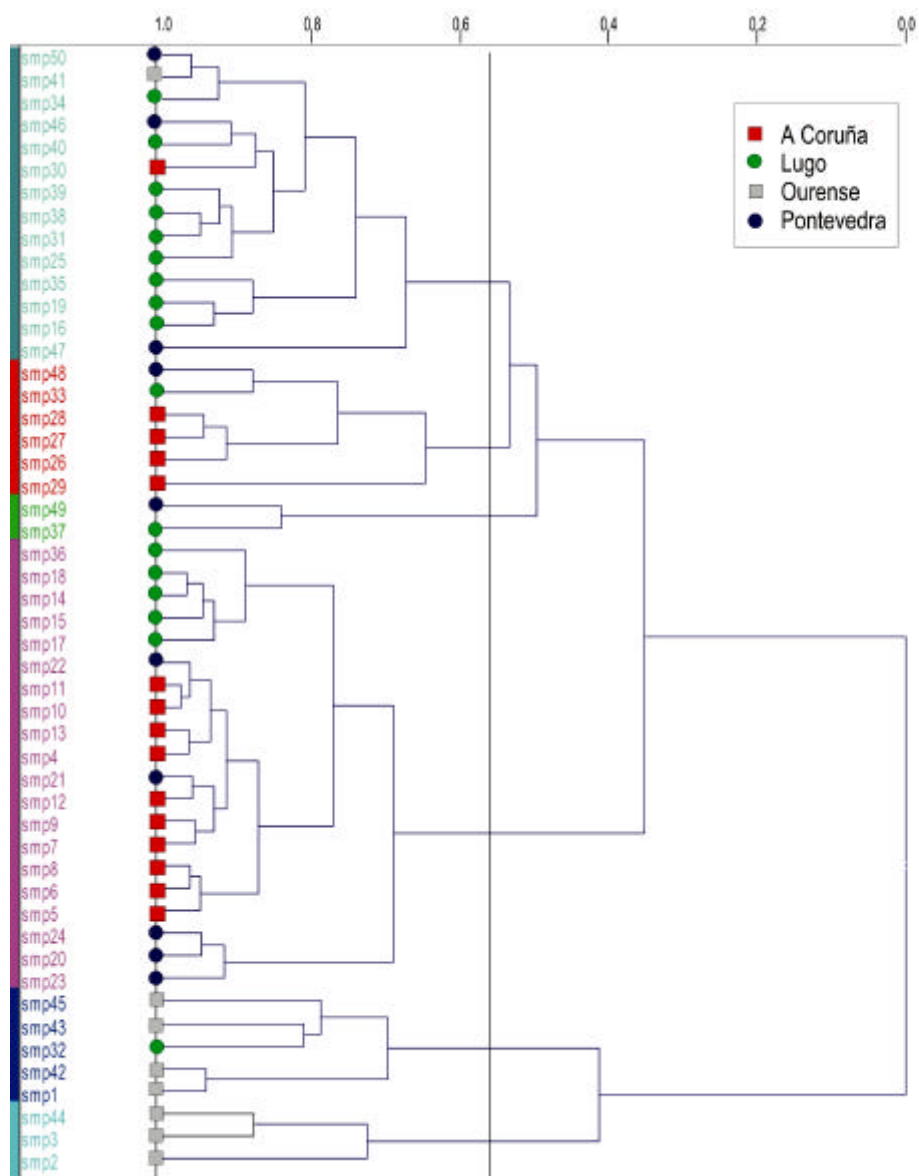


Figura 91. Dendrograma del análisis cluster realizado en las mieles de Galicia con Denominación agrupadas según la provincia de procedencia del envasador (■ A Coruña, ● Lugo, ■ Ourense y ● Pontevedra).

Este dendrograma indica la existencia de ciertos agrupamientos en las muestras, excepto para las que corresponden a la provincia de Pontevedra. No obstante, en las restantes provincias, aparecen muestras claramente no similares al conjunto.

7.3.4.1.2. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

Se acepta un modelo con 5 factores, siendo la varianza explicada del 92.9 %. Los factores de más peso son los cuatro primeros ya que representan el 87.0 % de la varianza acumulada. La proyección de los tres primeros factores indica la existencia de agrupamientos (aunque no compactos) en las clases organizadas de acuerdo con la provincia de procedencia del envasador. Las muestras de Ourense (color gris) parecen diferenciarse de forma más clara respecto a las demás, las cuales aparecen bastante mezcladas en todos los casos (Figura 92). Las proyecciones parciales en espacios de dos factores permiten visualizar mejor esta última circunstancia (Figura 93).

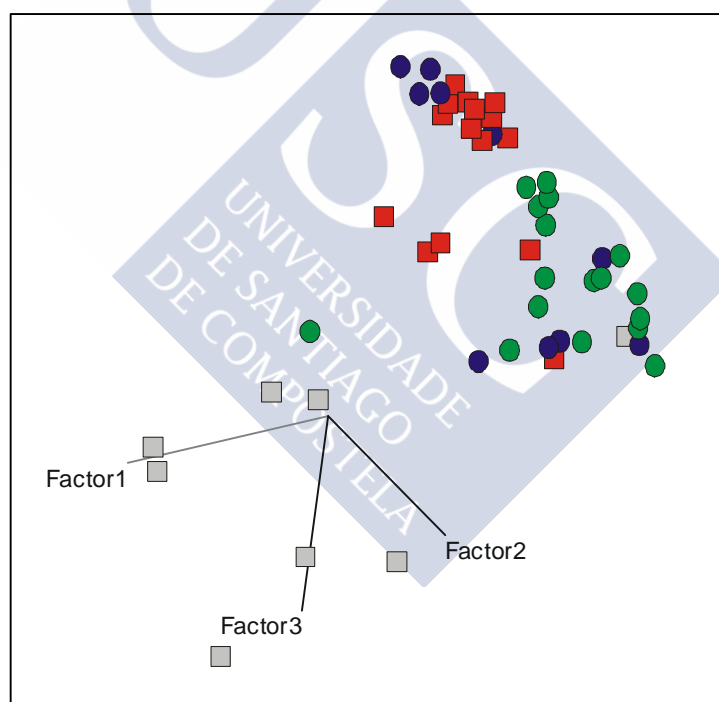


Figura 92. Proyección en el espacio de los tres primeros componentes principales del análisis de componentes principales aplicado a las muestras de Galicia con Denominación, agrupadas según la provincia de procedencia del envasador (■ A Coruña, ● Lugo, ■ Ourense y ● Pontevedra).

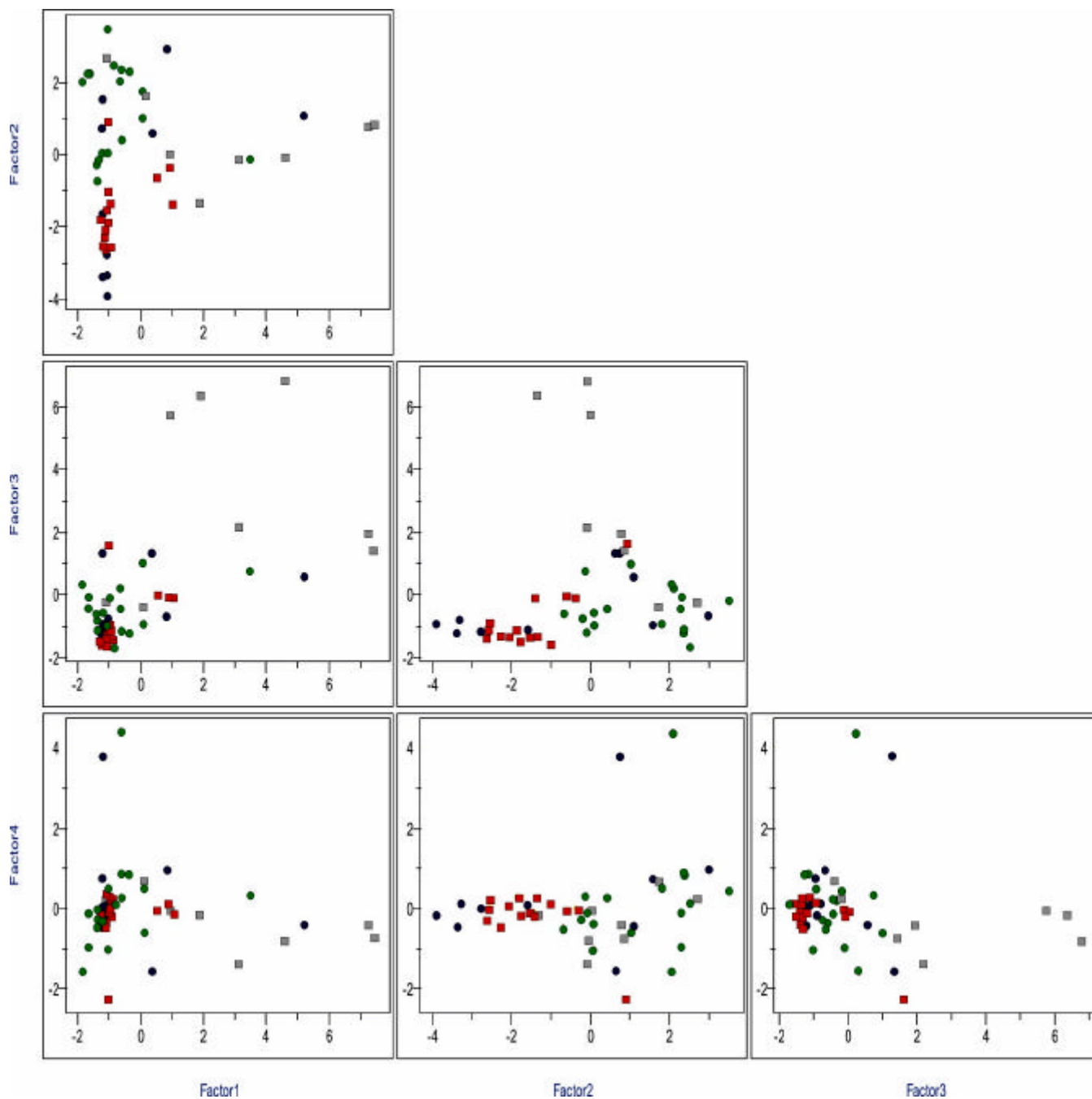


Figura 93. Proyecciones parciales en espacios de dos factores o componentes principales del análisis de componentes principales aplicado a las muestras de Galicia con Denominación, agrupadas según la provincia de procedencia del envasador (■ A Coruña, ● Lugo, ■ Ourense y ● Pontevedra).

En la Tabla CVI se muestran los valores de los pesos de las variables en los componentes principales rotados.

Tabla CVI. Pesos de las variables en los componentes principales rotados en el estudio de las mieles de Galicia con Denominación

	Factor1	Factor2	Factor3	Factor4	Factor5
conductividad	0.084529	0.010468	0.457064	0.056272	-0.206356
pH	0.124907	-0.306017	0.343159	0.082540	-0.202273
ac. libre	0.127014	0.479039	-0.008355	-0.011999	0.025524
ac. láctónica	-0.117897	0.486119	-0.043138	0.017801	-0.086266
ac. total	0.053794	0.511909	-0.020435	-0.002869	-0.009966
D-glucónico total	-0.037837	0.351843	0.281212	0.266611	-0.320329
cítrico	0.407109	0.032979	0.069732	-0.001447	0.025946
L-málico	0.370378	-0.022564	0.126136	-0.036606	-0.050260
fumárico	0.416606	-0.056480	0.064119	0.036470	0.068061
maleico	-0.043553	0.012497	0.156451	0.802117	0.539789
oxálico	0.081986	0.068931	0.237172	-0.322771	0.597391
fórmico	-0.002265	-0.053333	0.520001	-0.005352	-0.187612
succínico	0.480576	0.008994	-0.103640	-0.075011	0.149087
acético	-0.172348	0.161060	0.430039	-0.398773	0.280308
láctico	0.444000	0.126690	-0.142190	0.059589	-0.116713

El factor o componente principal 1 se encarga de diferenciar las muestras de Ourense (color gris) con respecto a las demás. Este factor se asocia (véase la Tabla CVI) a los ácidos cítrico, L-málico, fumárico, succínico y láctico. Por tanto, la conclusión es que las muestras procedentes de Ourense presentan niveles más elevados de estos ácidos en relación a las muestras procedentes de las restantes provincias.

El factor 2, diferencia fundamentalmente las muestras de A Coruña (color rojo) y Lugo (color verde), mientras que las muestras de Pontevedra (color azul) aparecen dispersas en todas las zonas del gráfico de proyección. Este factor 2 se asocia principalmente con los tipos de acidez, expresada en sus diferentes formas, de modo que las muestras de Lugo poseen mayores valores de acidez que las de las de la provincia de A Coruña. Los tipos de acidez de las muestras de la provincia de Ourense son intermedios entre los dos anteriores y, por último, los tipos de acidez de las muestras de Pontevedra presentan una dispersión considerable.

El factor 3 vuelve a marcar diferencias entre las muestras de Ourense y las restantes. Este factor se asocia con el valor de la conductividad eléctrica y del contenido de los ácidos fórmico y acético, siendo superiores en las muestras de la provincia de Ourense.

Finalmente, el factor 4 se asocia mayoritariamente al ácido maleico, aunque las proyecciones no indican que ese factor permita diferenciar las muestras de las diferentes provincias sino que, probablemente se asocia a un par de datos anómalos.

En el gráfico de outliers se observa claramente la existencia de algunas muestras fuera de las distribuciones, que se corresponden a datos muy alejados de las clases (Figura 94). Cabe destacar que las mieles procedentes de la provincia de Ourense aparecen con distancias de Mahalanobis importantes, lo que indica la existencia de diferencias notables entre dichas muestras y el resto de las que forman el conjunto de las mieles con respecto al cual se calcula el gráfico.

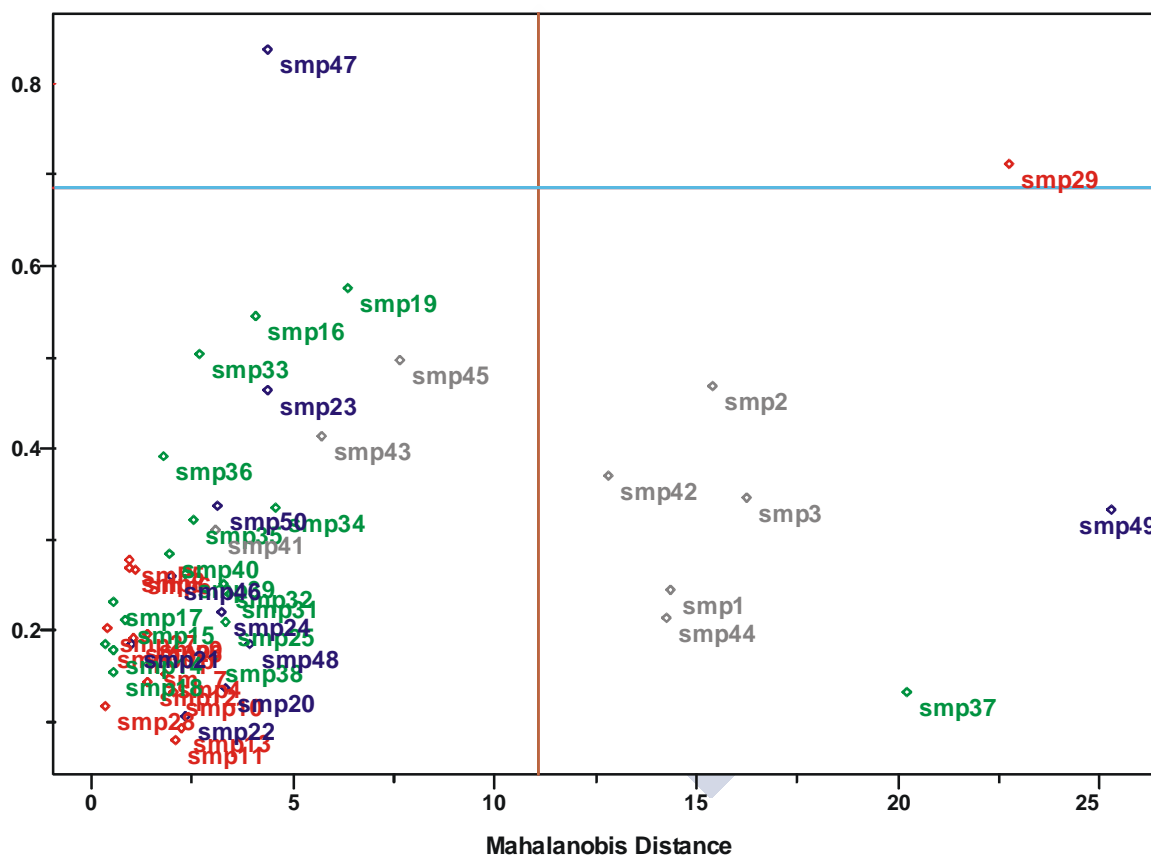


Figura 94. Gráficos de outliers del análisis de componentes principales aplicado a las muestras de Galicia con Denominación, agrupadas según la provincia de procedencia del envasador (A Coruña, Lugo, Ourense y Pontevedra).

7.3.4.1.3. MÉTODO DE LOS K VECINOS MÁS PRÓXIMOS

Los mejores resultados se obtienen para $K=4$, con una matriz de clasificación como la que aparece recogida en la Tabla CVII, que confirma los resultados obtenidos por PCA. Se han clasificado correctamente el 87% de las muestras de la provincia de A Coruña, el 82% de las de Lugo, el 75% de las de Ourense y el 30% de las de Pontevedra.

Tabla CVII. Matriz de clasificación según el método de los K vecinos más próximos (KNN) para las mieles de Galicia con Denominación usando todas las variables (factor de clasificación: provincia de procedencia del envasador)

Predichos \ Medidos	A Coruña	Lugo	Ourense	Pontevedra	Total
A Coruña	13	2	0	0	15
Lugo	2	14	0	1	17
Ourense	0	1	6	1	8
Pontevedra	2	5	0	3	10

A la vista de los resultados de estos estudios se puede concluir que, utilizando las variables seleccionadas para el estudio, no se puede efectuar una clasificación mínimamente robusta de la procedencia de las muestras de miel de Galicia con Denominación según el criterio de división territorial de la provincia de procedencia del envasador.

7.3.4.2. DIFERENCIACIÓN DE LAS MIELES DE GALICIA CON DENOMINACIÓN SEGÚN EL ESPECTRO POLÍNICO

7.3.4.2.1. ANÁLISIS CLUSTER AGLOMERATIVO

En la Figura 95 se representa el dendrograma obtenido para las muestras de Galicia con Denominación agrupadas según el espectro polínico.

El dendrograma muestra claramente el agrupamiento de las muestras. Las mieles de *Eucalyptus* sp. y multiflorales forman clusters bastante compactos. No es posible extraer conclusiones con respecto a las mieles de *Castanea sativa* Miller (3 muestras) y de *Trifolium* L. sp. (1 muestra) debido a que se dispone de un número reducido de ellas. No obstante, las tres mieles de *Castanea sativa* Miller disponibles parecen similares. Además las muestras

multiflorales Nº 42, 43, 44 y 45 con gran similitud a las mieles de *Castanea sativa* Miller poseen un alto contenido (> 60 %) de pólenes de *Castanea sativa* Miller, siendo el polen predominante en estas mieles. La miel Nº 44, como ya se ha mencionado anteriormente, llega a tener un contenido de pólenes de *Castanea sativa* Miller de aproximadamente el 87%.

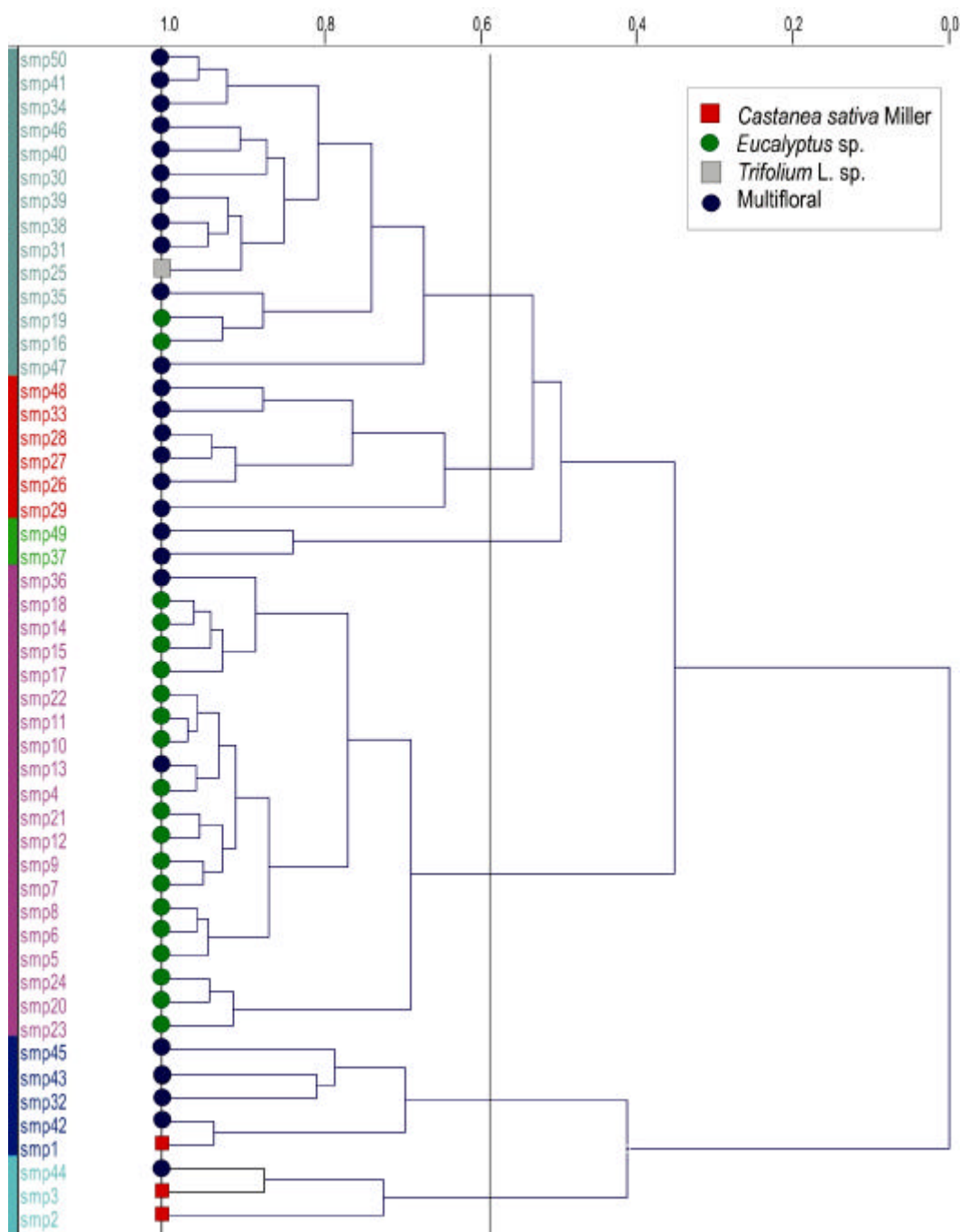


Figura 95. Dendrograma del análisis cluster realizado en las mieles de Galicia con Denominación agrupadas según el espectro polínico (■ *Castanea sativa* Miller, ● *Eucalyptus* sp., ■ *Trifolium* L. sp., ● multifloral).

7.3.4.2.2. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

Al trabajar con las mismas muestras (mieles de Galicia con Denominación) el modelo obtenido en el análisis de componentes principales es el mismo, independientemente del criterio de clasificación elegido. Por tanto, al igual que en el caso anterior, el modelo que se acepta presenta 5 factores que explican una varianza del 92.9 %. La proyección indica la existencia de agrupamientos en las clases organizadas según el espectro polínico (Figura 96).

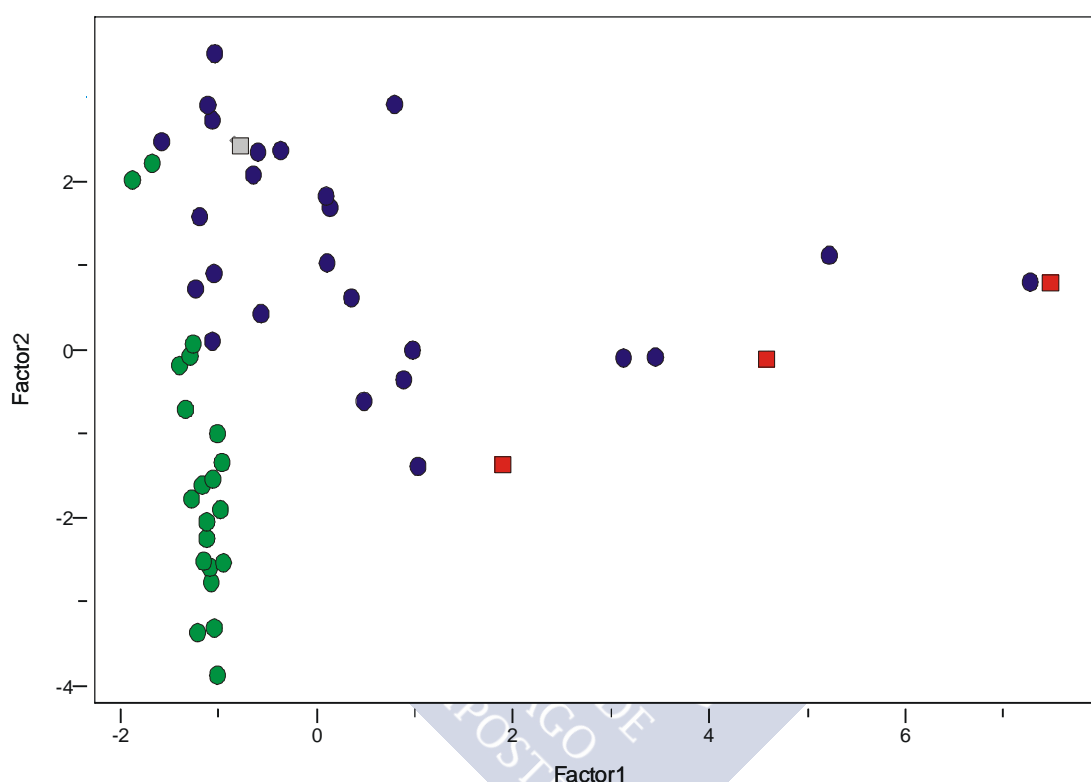


Figura 96. Proyección en el espacio de los dos primeros componentes principales del análisis de componentes principales aplicado a las muestras de Galicia con Denominación, agrupadas según el espectro polínico (■ *Castanea sativa* Miller, ● *Eucalyptus* sp., ■ *Trifolium* L. sp., ● multifloral).

El factor 1 separa las muestras de *Castanea sativa* Miller (color rojo) y algunas multiflorales (color azul), con respecto a las demás. El primer factor, al igual que en el caso de la provincia de procedencia del envasador, se asocia a los ácidos cítrico, L-málico, fumárico, succínico y láctico, por lo que debe admitirse que las muestras de *Castanea sativa* Miller presentan valores más elevados para estos ácidos que las restantes (con la excepción de algunas multiflorales que se sitúan en estas mismas condiciones). Estas mieles multiflorales son muestras que no superan los límites establecidos en el análisis polínico

para su clasificación como mieles de *Castanea sativa* Miller pero cuyo contenido en este polen es predominante.

El factor 2 se encarga de diferenciar las muestras de *Eucalyptus* sp. y multiflorales entre si. Prácticamente existe un plano de separación entre ambas en el gráfico de la proyección, excepto por la presencia de dos muestras de *Eucalyptus* sp. (Nº 16 y 19). El factor 2, al igual que en el caso de la provincia de procedencia del envasador, se asocia a los tipos de acidez y, por tanto, debe concluirse que las mieles de *Eucalyptus* sp. presentan menor acidez que las multiflorales.

En la Figura 97 se observa claramente como las variables con más peso en el factor 1 son los ácidos cítrico, L-málico, fumárico, succínico y láctico y en el factor 2 los tres tipos de acidez (libre, lactónica y total). En ambos grupos las variables están muy próximas, lo que indica que están correlacionadas entre ellas, como ya se ha visto en los apartados 7.2.2. y 7.2.3.

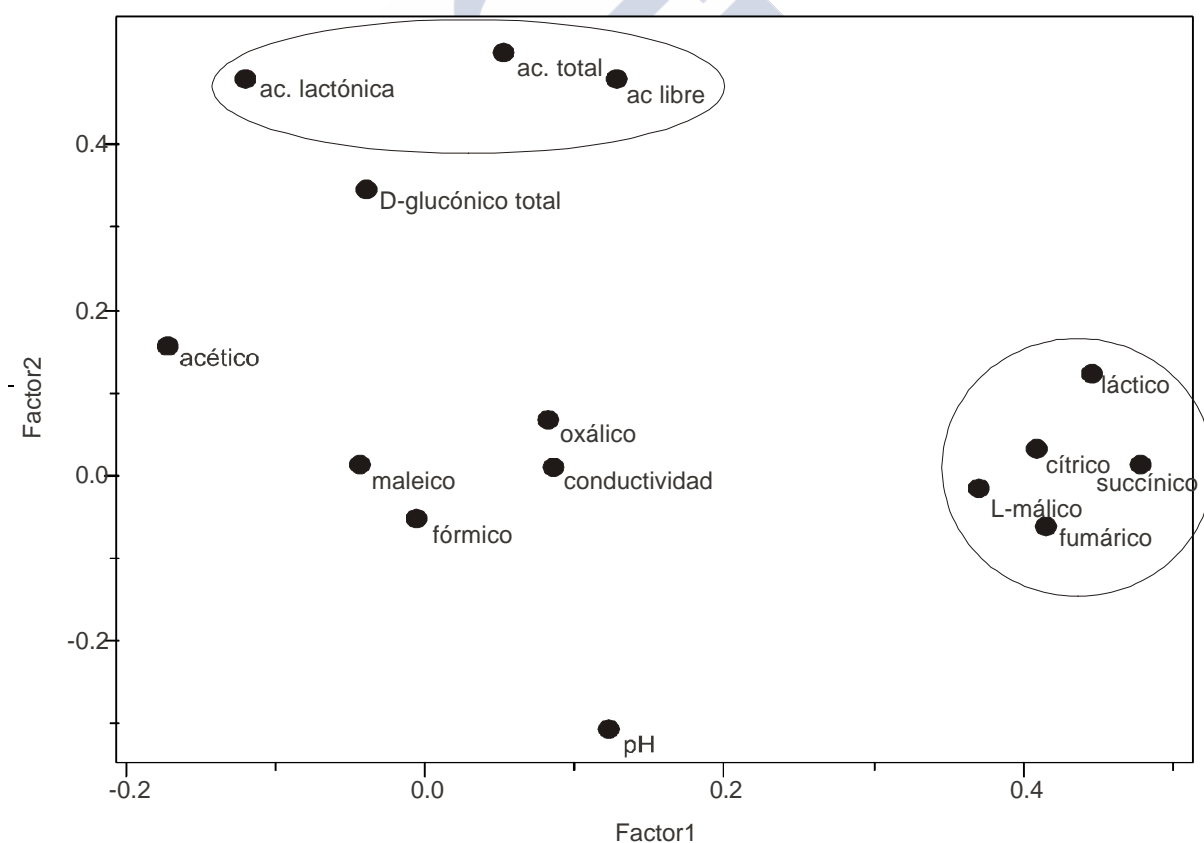


Figura 97. Gráfico de variables proyectadas en el espacio de los dos primeros componentes principales del análisis de componentes principales aplicado a las muestras de Galicia con Denominación.

7.3.4.2.3. MÉTODO DE LOS K VECINOS MÁS PRÓXIMOS

Aunque con tan pocas muestras de *Castanea sativa* Miller y *Trifolium* L. sp. este tipo de modelo no puede ofertar buenos resultados, la matriz de clasificación (eliminando la miel de *Trifolium* L. sp.) se presenta en la Tabla CVIII. Se han clasificado correctamente el 33% de las mieles de *Castanea sativa* Miller, el 100% de las de *Eucalyptus* sp. y el 84% de las multiflorales. Estos resultados confirman lo obtenido en el análisis de componentes principales.

Tabla CVIII. Matriz de clasificación según el método de los K vecinos más próximos (KNN) para las mieles de Galicia con Denominación usando todas las variables (factor de clasificación: espectro polínico)

Predichos \ Medidos	<i>Castanea sativa</i> Miller	<i>Eucalyptus</i> sp.	multifloral	Total
<i>Castanea sativa</i> Miller	1	0	2	3
<i>Eucalyptus</i> sp.	0	21	0	21
multifloral	2	2	21	25

A la vista de los resultados de estos estudios se puede concluir que las variables seleccionadas en el estudio tienen influencia a la hora de clasificar las mieles según su espectro polínico. Sin embargo sería necesario tener un mayor número de muestras (sobre todo de *Castanea sativa* Miller) para poder confirmar esta influencia y realizar una clasificación más robusta.

7.3.4.3. DIFERENCIACIÓN ENTRE LAS MIELES DE GALICIA CON DENOMINACIÓN Y LAS PROCEDENTES DE OTRAS ZONAS DE ESPAÑA

7.3.4.3.1. ANÁLISIS CLUSTER AGLOMERATIVO

En la Figura 98 se representa el dendrograma obtenido para todas las mieles analizadas agrupadas según procedan de Galicia o de otras zonas de España. Los extremos marcados mediante puntos de color verde corresponden con las mieles de otras zonas de España.

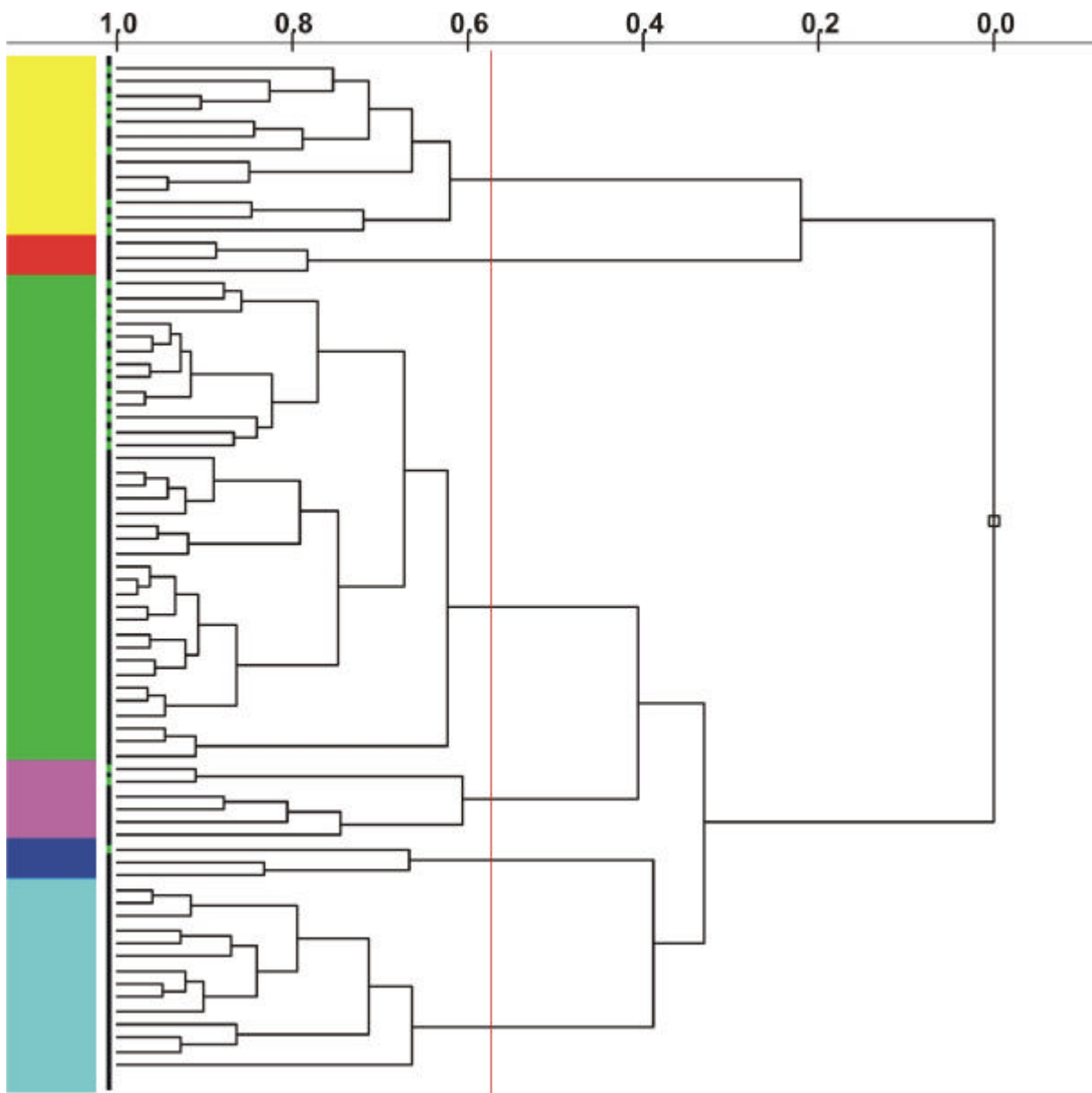


Figura 98. Dendograma del análisis cluster realizado en todas las mieles analizadas (las muestras marcadas como puntos de color verde se corresponden con las mieles procedentes de otras zonas de España, el resto son las mieles de Galicia con Denominación).

En el dendograma se aprecia un agrupamiento de las muestras, aunque no una separación neta entre ambas clases. Algunas muestras comerciales no procedentes de Galicia se intercalan con las muestras procedentes de Galicia. Por tanto, el análisis cluster sugiere la existencia de diferencias entre las muestras que son manifestadas por el conjunto de variables utilizadas, aunque no lo suficiente como para definir netamente una frontera entre ambos tipos de muestras. No obstante, la presencia de outliers no puede descartarse.

7.3.4.3.2. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

Se acepta un modelo con 4 factores. En la Figura 99 se muestran las proyecciones en el espacio de los tres primeros componentes principales (que explican el 76.5% de la varianza) indicando nuevamente la existencia de dos grupos más o menos claramente diferenciados (las muestras en color azul corresponden a las mieles de Galicia con Denominación, mientras que las de color rojo, corresponden a las procedentes de otras zonas de España).

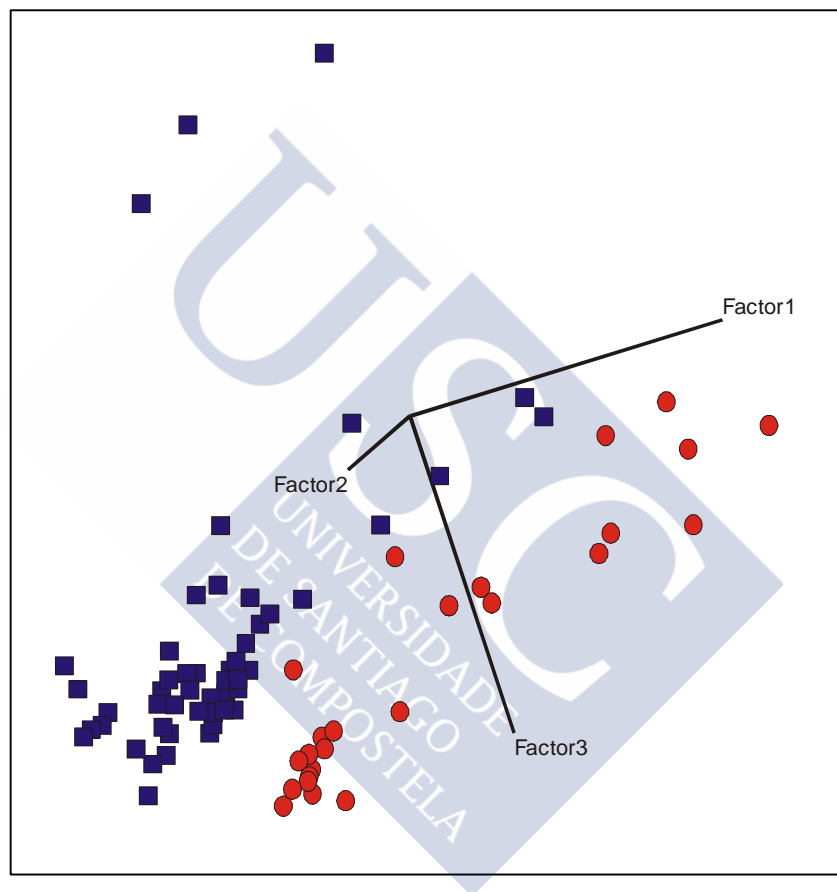


Figura 99. Proyección en el espacio de los tres primeros componentes principales del análisis de componentes principales aplicado a todas las muestras analizadas (■ mieles de Galicia con Denominación; ● mieles procedentes de otras zonas de España).

En las proyecciones parciales en espacios de dos factores se observa que son los factores 2 y 3 los que proporcionan una mayor diferenciación entre las clases (Figura 100).

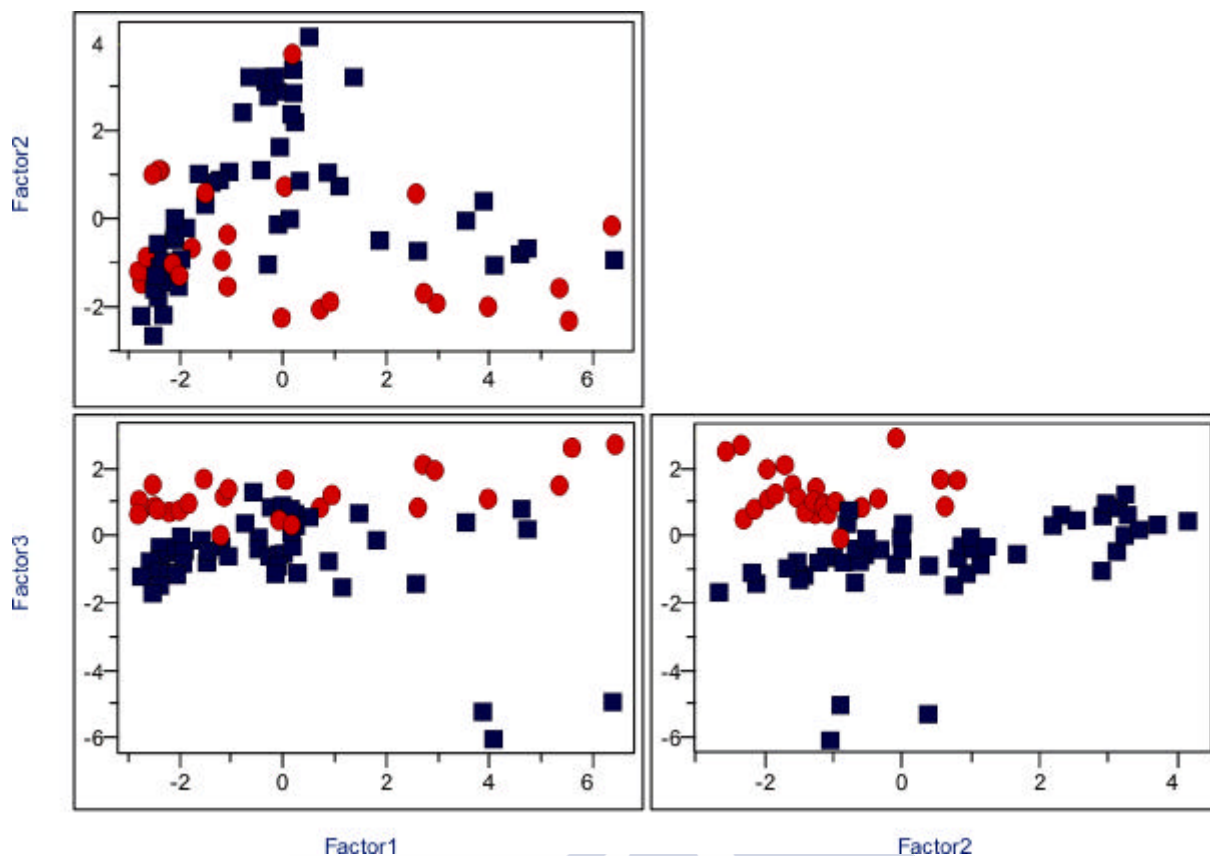


Figura 100. Proyecciones parciales en espacios de dos factores o componentes principales del análisis de componentes principales aplicado a todas las muestras analizadas (■ mieles de Galicia con Denominación; ● mieles procedentes de otras zonas de España).

En la Tabla CIX se muestran los valores de los pesos de las variables en los componentes principales rotados.

El factor 1 está asociado fundamentalmente (véase Tabla CIX) a los ácidos cítrico, L-málico, fumárico y succínico. Las muestras que presentan valores elevados para estos ácidos se sitúan a la derecha en el eje del factor 1. El segundo factor se asocia a la acidez (expresada en sus diferentes formas, pero obviamente correlacionadas), mientras que el tercer factor se asocia a la conductividad eléctrica y al pH, así como a los ácidos fórmico y acético. En definitiva, el rasgo que mejor parece diferenciar los dos grupos de muestras son los tipos de acidez en la manera en que se expresa mediante los factores 2 y 3.

Tabla CIX. Pesos de las variables en los componentes principales rotados en el estudio de todas las mieles analizadas

	Factor1	Factor2	Factor3	Factor4
conductividad	0.094733	0.043534	-0.457018	0.001208
pH	0.151494	-0.267112	-0.400256	0.034840
ac. libre	0.122983	0.460661	-0.052181	-0.063049
ac. láctónica	-0.083527	0.502216	0.132390	0.092166
ac. total	0.070934	0.509787	-0.001065	-0.021589
D-glucónico total	-0.147579	0.370836	-0.300801	0.035526
cítrico	0.429816	0.018740	-0.039629	0.048454
L-málico	0.402584	0.006693	-0.107536	-0.060235
fumárico	0.467056	-0.045120	0.194234	0.112239
maleico	0.051136	0.082894	0.075308	0.863192
oxálico	0.246204	-0.040789	-0.091354	0.318203
fórmico	-0.007697	-0.070005	-0.522490	0.087406
succínico	0.446451	0.038836	0.051979	-0.152507
acético	-0.129570	0.105757	-0.419628	0.039522
láctico	0.273511	0.190694	-0.059449	-0.295295

En la Figura 101 se observa como las variables con más peso en el factor 1 son los ácidos cítrico, L-málico, fumárico y succínico y en el factor 2 los tres tipos de acidez (libre, láctónica y total). En ambos grupos las variables están muy próximas, lo que indica que están correlacionadas entre ellas, como ya se ha visto en los apartados 7.2.2. y 7.2.3.

Por último, en el gráfico de outliers se muestra claramente la existencia de algunas muestras fuera de ambas distribuciones, que se corresponden a datos muy alejados de las clases (Figura 102).

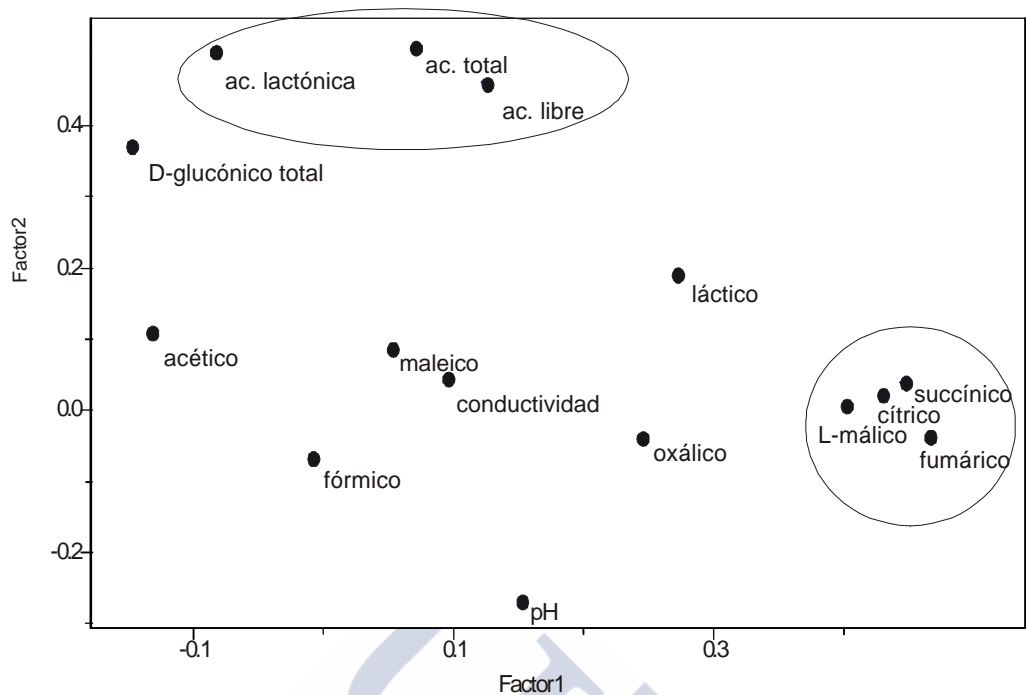


Figura 101. Gráfico de variables proyectadas en el espacio de los dos primeros componentes principales del análisis de componentes principales aplicado a todas las muestras analizadas.

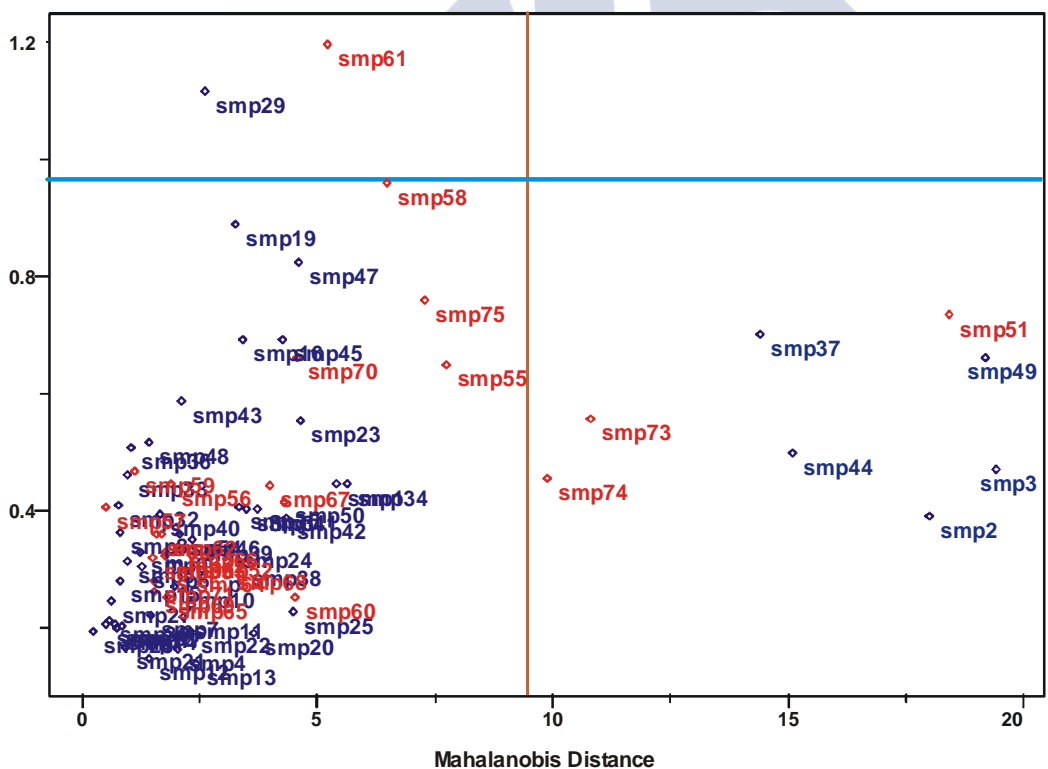


Figura 102. Gráficos de outliers del análisis de componentes principales aplicado a todas las muestras analizadas (mieles de Galicia con Denominación y mieles procedentes de otras zonas de España).

7.3.4.3.3. MÉTODO DE LOS K VECINOS MÁS PRÓXIMOS

El modelo KNN obtiene resultados óptimos para 5 vecinos, con una matriz de clasificación como la que aparece recogida en la Tabla CX. Las mieles gallegas se han clasificado correctamente en su totalidad (100%), mientras que las mieles procedentes de otras zonas de España se clasifican correctamente en un 92%, debido a su enorme variedad tanto geográfica como botánica. En este último caso, las dos muestras mal clasificadas son las números 69 y 73.

Tabla CX. Matriz de clasificación según el método de los K vecinos más próximos (KNN) para todas las mieles analizadas usando todas las variables (factor de clasificación: mieles de Galicia frente a las de otras zonas de España)

Predichos \ Medidos	Mieles de Galicia con Denominación	Mieles procedentes de otras zonas de España	Total
Mieles de Galicia con Denominación	50	0	50
Mieles procedentes de otras zonas de España	2	23	25

A la vista de los resultados de estos estudios se puede concluir que las variables seleccionadas en el estudio tienen influencia a la hora de diferenciar entre las mieles de Galicia con Denominación y las mieles procedentes de otras zonas de España. Esto tiene gran importancia, ya que permitiría la detección de posibles fraudes a la hora de etiquetar miel de otras zonas como miel de Galicia con Denominación. Sin embargo sería necesario hacer un estudio en el que se incluyera un mayor número de muestras de otras zonas de España para confirmar esta afirmación.

7.4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCÁZAR, A.; PABLOS, F.; MARTÍN, M. J.; GONZÁLEZ, A. G. Multivariate characterisation of beers according to their mineral content. *Talanta*. **2002**, 57, 45-52.
- ANKLAM, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem.* **1998**, 63 (4), 549-562.
- BISQUERRA, R. *Introducción conceptual al análisis multivariable. Un enfoque informático con los paquetes SPSS-X, BMDP, LISREL y SPAD*. Ed. Promociones y Publicaciones Universitarias S. A. Barcelona. España. **1989**.
- CALIFANO, A. N.; BEVILACQUA, A. E. Freezing low moisture Mozzarella cheese: changes in organic acid content. *Food Chem.* **1999**, 64, 193-198.
- CÁMARA, M.; DÍEZ, C.; TORIJA, E. Chemical characterization of pineapple juices and nectars. Principal components analysis. *Food Chem.* **1995**, 54 (1), 93-100.
- CAVIA, M. M. *Estudio del envejecimiento de mieles de Burgos y Galicia: Influencia de la granulación inducida*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos. Área de Nutrición y Bromatología. Universidad de Burgos. España. **2002**.
- CONTE, L. S.; MIORINI, M.; GIOMO, A.; BERTACCO, G.; ZIRONI, R. Evaluation of some fixed components for unifloral honey characterization. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46 (5), 1844-1849.
- ECHIGO, T.; TAKENAKA, T. Production of organic acids in honey by honeybees. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*. **1974**, 48 (4), 225-230.
- FÖLDHÁZI, G.; AMTMANN, M.; FODOR, P.; ITTZÉS, A. The physico-chemical properties and composition of honeys of different botanical origin. *Acta Alimentaria*. **1996**, 25 (3), 237-256.
- FRÍAS, I.; HARDISSON DE LA TORRE, A.; CORRALES, J. Parámetros físico químicos en mieles artesanales de Santa Cruz de Tenerife. *Anal. Bromatol.* **1991**, 53 (4), 339-356.
- GÓMEZ-BÁREZ, J. A.; GARCÍA-VILLANOVA, R. J.; ELVIRA-GARCÍA, S.; RIVAS-PALÁ, T.; GONZÁLEZ-PARAMÁS, A. M.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, J. Geographical discrimination of honeys through the employment of sugar patterns and common chemical quality parameters. *Eur. Food Res. Technol.* **2000**, 210, 437-444.
- GONZÁLEZ-PARAMÁS, A. M.; GÓMEZ-BÁREZ, J. A.; GARCÍA-VILLANOVA, R. J.; RIVAS-PALÁ, T.; ARDANUY-ALBAJAR, R.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, J. Geographical discrimination of honeys by using mineral composition and common chemical quality parameters. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80, 157-165.
- KOHLICH, A.; KRENN, H. Ergebnisse von Untersuchungen über die Werte chemischer und physikalischer Merkmale von Honigen. *Mitt. Klosterneuburg*. **1985**, 35, 210-217.

- 📖 KRAUZE, A.; ZALEWSKI, R. I. Classification of honeys by principal component analysis on the basis of chemical and physical parameters. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1991**, 192, 19-23.
- 📖 LATORRE, M. J.; PEÑA, R.; GARCÍA, S.; HERRERO, C. Authentication of Galician (N. W. Spain) honeys by multivariate techniques based on metal content data. *Analyst.* **2000**, 125 (2), 307-312.
- 📖 LATORRE, M. J.; PEÑA, R.; PITA, C.; BOTANA, A.; GARCÍA, S.; HERRERO, C. Chemometric classification of honeys according to their type. II. Metal content data. *Food Chem.* **1999**, 66 (2), 263-268.
- 📖 LÓPEZ, B.; LATORRE, M. J.; FERNÁNDEZ, M. I.; GARCÍA, M. A.; GARCÍA, S.; HERRERO C. Chemometric classification of honeys according to their type based on quality control data. *Food Chem.* **1996**, 55 (3), 281-287.
- 📖 LÓPEZ-MAHÍA, P.; PASEIRO LOSADA, P.; SIMAL LOZANO, J.; SIMAL GÁNDARA, J. Aplicación de técnicas multivariantes a resultados de los análisis en leche natural de vaca: I. Análisis factorial. *Anal. Bromatol.* **1992a**, 54 (4), 229-236.
- 📖 LÓPEZ-MAHÍA, P.; PASEIRO LOSADA, P.; SIMAL LOZANO, J.; SIMAL GÁNDARA, J. Aplicación de técnicas multivariantes a resultados de los análisis en leche natural de vaca: II. Análisis cluster. *Anal. Bromatol.* **1992b**, 54 (4), 237-245.
- 📖 LÓPEZ-MAHÍA, P.; PASEIRO LOSADA, P.; SIMAL LOZANO, J.; SIMAL GÁNDARA, J. Aplicación de técnicas multivariantes a resultados de los análisis en leche natural de vaca: III. Análisis discriminante. *Anal. Bromatol.* **1992c**, 54 (4), 247-256.
- 📖 MAEZTU, L.; ANDUEZA, S.; IBAÑEZ, C.; DE PEÑA, M. P.; BELLO, J.; CID, C. Multivariate methods for characterization and classification of espresso coffees from different botanical varieties and types of roast by foam, taste and mouthfeel. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 4743-4747.
- 📖 MARTÍNEZ-GÓMEZ, E.; MONTILLA-GÓMEZ, J.; GUERRA-HERNÁNDEZ, E. Análisis de la composición de la miel comercial de eucalipto adquirida en España. En: *5º Congreso Nacional de Apicultura. Don Benito (Badajoz).* **1990**, 114-118.
- 📖 MATEO, R.; BOSCH-REIG, F. Classification of Spanish unifloral honeys by discriminant analysis of electrical conductivity, color, water content, sugars, and pH *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 393-400.
- 📖 MELÉNDEZ, M. E.; SÁNCHEZ, M. S.; ÍÑIGUEZ, M.; SARABIA, L. A.; ORTIZ, M. C. Psychophysical parameters of colour and the chemometric characterisation of wines of the certified denomination of origin "Rioja". *Anal. Chim. Acta.* **2001**, 446, 159-169.
- 📖 MILLER, J. N.; MILLER, J. C. *Estadística y quimiometría para Química Analítica.* 4ª ed. Ed. Pearson Education, S. A. Madrid. España. **2002**.
- 📖 MOLAN, P. C. Authenticity of Honey. En: *Food Authentication.* (Ashurst, P. R. y Dennis, M. J.). Ed. Blackie Academic and Professional. London. UK. **1996**. pp. 259-303.

- 📖 MOSTAFA, A.; AHMED, A.; MAHMOUD, M. Studies of Lybian honeys. *J. Food Quality*. **1982**, 4, 185-201.
- 📖 ORTIZ-ESTARELLES, O.; MARTÍN-BIOSCA, Y.; MEDINA-HERNÁNDEZ, M. J.; SAGRADO, S.; BONET-DOMINGO, E. Multivariate data analysis of quality parameters in drinking water. *Analyst*. **2001**, 126, 91-96.
- 📖 PADÍN, P. M.; PEÑA, R. M.; GARCÍA, S.; IGLESIAS, R.; BARRO, S.; HERRERO, C. Characterization of Galician (N.W. Spain) quality brand potatoes: a comparison study of several pattern recognition techniques. *Analyst*. **2001**, 126, 97-103.
- 📖 PEÑA, R. M.; GARCÍA, S.; IGLESIAS, R.; BARRO, S.; HERRERO, C. Authentication of Galician (N.W. Spain) quality brand potatoes using metal analysis. Classical pattern recognition techniques versus a new vector quantization-based classification procedure. *Analyst*. **2001**, 126, 2186-2193.
- 📖 PEÑA, R.; HERRERO, C. Pattern recognition analysis applied to classification of honeys from two geographic origin. *J. Agric. Food Chem*. **1993**, 41, 560-564.
- 📖 PÉREZ-MAGARIÑO, S.; ORTEGA-HERAS, M.; GONZÁLEZ-SAN JOSÉ, M. L. Multivariate classification of rosé wines from different Spanish protected designations of origin. *Anal. Chim. Acta*. **2002**, 458, 187-190.
- 📖 PIROUETTE. Multivariate data analysis for Windows 95/98 and NT v. 3.0. Infometrics Inc. Woodinville. USA. **2000**.
- 📖 POPEK, S. A procedure to identify a honey type. *Food Chem*. **2002**, 79, 401-406.
- 📖 RADOVIC, B. S.; WHITE, R.; PARKER, I.; DENNIS, M. J.; SHARMAN, M.; GEISS, H.; ANKLAM, E. Contribution of high temperature gas chromatographic analysis of oligosaccharides and ion chromatographic analysis of various cations and anions to authenticity testing of honey. *Deut. Lebensmittel- Rundsch*. **2001**, 97 (10), 380-384.
- 📖 SANCHO, M. T.; MUNIATEGUI, S.; HUIDOBRO, J. F.; SIMAL-LOZANO, J. Miel del País Vasco. I: pH y tipos de acidez. *Anal. Bromatol*. **1991a**, 53 (1), 77-86.
- 📖 SANCHO, M. T.; MUNIATEGUI, S.; HUIDOBRO, J. F.; SIMAL-LOZANO, J. Miel del País Vasco. VIII: Análisis "cluster" aplicado a los parámetros físico químicos. *Anal. Bromatol*. **1991b**, 53 (2), 267-273.
- 📖 SANCHO, M. T.; MUNIATEGUI, S.; HUIDOBRO, J. F.; SIMAL-LOZANO, J. Provincial classification of Basque Country (northern Spain) honeys by their chemical composition. *J. Apic. Res*. **1991c**, 30 (3), 168-172.
- 📖 SANJUÁN, E.; ESTUPIÑAN, S.; MILLÁN, R.; CASTELO, M.; PENEDO, J. C.; CARDONA, A. Contribution to the quality evaluation and the water activity prediction of the La Palma island honey. *J. Food Quality*. **1997**, 20, 225-234.
- 📖 SANZ, S.; PÉREZ, C.; HERRERA, A.; SANZ, M.; JUAN, T. Application of a statistical approach to the classification of honey by geographic origin. *J. Sci. Food Agric*. **1995**, 69, 135-140.

- 📖 SPSS for Windows v. 10.0.6. SPSS Inc. **1999**.
- 📖 STEFANINI, R. Variability and cluster analysis of Italian honeys. *Apiacta*. **1984**, XIX, 109-114.
- 📖 STEFANINI, R. Diagnosis of unifloral honeys. II. Numerical taxonomy of honey and statistical diagnostic test of its botanical origin. *Apicoltura*. **1988**, 4, 13-26.
- 📖 TERRAB, A.; DÍEZ, M. J.; HEREDIA, F. J. Characterisation of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. *Food Chem*. **2002**, 79, 373-379.
- 📖 WHITE, J. W. Jr. Determination of acidity, nitrogen and ash in honey. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1962**, 45 (3), 548-551.
- 📖 WHITE, J. W. Jr. Composition of honey; Physical characteristics of honey. En: *Honey: A Comprehensive Survey*. (Crane, E.). Ed. Heinemann, London. UK. **1979**. pp 157-239.



ESTUDIO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS
NO AROMÁTICOS EN LA MIEL



CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES



SOBRE LOS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS NO AROMÁTICOS EN LA MIEL

1. Se han puesto a punto tres técnicas para la determinación de los ácidos orgánicos no aromáticos en la miel:

a. Métodos enzimáticos

Se han desarrollado tres métodos que permiten la cuantificación individual de los ácidos D-glucónico total, cítrico y L-málico, siendo la primera vez que se aplica el método enzimático a la determinación del ácido D-glucónico total en la miel. Para los ácidos cítrico y L-málico se ha mejorado la precisión y exactitud con respecto a los métodos de otros autores. En los tres casos se utilizan micrométodos, reduciéndose entre un 30 y un 50% los reactivos empleados, lo que supone una disminución del coste de los tests. El tratamiento de la muestra es sencillo ya que consiste en una dilución, excepto para el ácido cítrico en el que se hace necesario realizar una clarificación con polivinilpolipirrolidona. Los valores de precisión, exactitud y especificidad de estos métodos son altamente satisfactorios lo que permite utilizarlos como métodos de referencia.

b. Método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se han identificado y cuantificado conjuntamente los ácidos málico, maleico, cítrico y fumárico en menos de quince minutos. El ácido maleico se ha determinado por primera vez en la miel. El método propuesto es simple y rápido ya que utiliza una única columna de fase reversa y detección UV. La preparación de la muestra consiste en una extracción en fase sólida de los ácidos orgánicos de la miel con un cartucho de intercambio iónico. Dicho método es sensible, preciso y exacto para los ácidos málico, maleico, cítrico y fumárico. En el caso del ácido succínico se ha comprobado que se ve afectado por una interferencia que impide su correcta cuantificación.

c. Método de electroforesis capilar (CE)

Se ha puesto a punto, por primera vez en la miel, un método de electroforesis capilar con detección UV directa para la determinación conjunta y en menos de 4 minutos de los ácidos oxálico, fórmico, málico, succínico, pirúvico, acético, láctico, cítrico y glucónico. La única preparación a la que se somete la muestra es la dilución y posterior filtración. Hay que destacar que el ácido acético se ha cuantificado en la miel por primera vez en este trabajo. Asimismo, este método permite la determinación de los ácidos tartárico y maleico si se encuentran en

cantidades superiores al límite de cuantificación. El ácido glutárico se ha utilizado como compuesto de referencia para el cálculo de los tiempos de migración relativos, ya que se ha comprobado que son más reproducibles que los tiempos de migración absolutos, utilizándolos para llevar a cabo la identificación de los ácidos orgánicos. Los buenos resultados de la validación, la sencillez en la preparación de la muestra y la rapidez del método, unido a su bajo coste lo hacen apto para su aplicación en el análisis rutinario de determinación de los ácidos orgánicos no aromáticos en la miel.

2. Se han obtenido las siguientes conclusiones en la comparación de métodos:

- a. El ácido glucónico se ha determinado mediante los métodos enzimático y CE, los cuales son comparables en el rango de concentraciones estudiado, para un nivel de confianza del 99%. El método enzimático posee las ventajas de una mayor especificidad y sensibilidad mientras que el método de CE posee como ventaja la posibilidad de determinar conjuntamente otros ácidos orgánicos. La precisión y exactitud son similares en ambos métodos, aunque ligeramente mejores en el caso del método enzimático.
- b. El ácido cítrico se ha determinado mediante los métodos enzimático, HPLC y CE, los cuales son comparables para concentraciones inferiores a 250 mg/kg, para un nivel de confianza del 99%. Para cualquier concentración sólo son comparables, por una parte, el método enzimático con el de HPLC y, por otra parte, el método de HPLC con el de CE. Los métodos de elección para la determinación del ácido cítrico son el enzimático y el HPLC. El método enzimático posee la ventaja de una mayor especificidad, precisión y sencillez mientras que el método de HPLC posee como ventajas una mayor sensibilidad y la posibilidad de determinar conjuntamente otros ácidos orgánicos. Los porcentajes de recuperación son similares en ambos métodos.
- c. El ácido málico se ha determinado mediante los métodos enzimático, HPLC y CE, los cuales son comparables en el rango de concentraciones estudiado, para un nivel de confianza del 99%. Los métodos de elección para la determinación del ácido málico son el enzimático y el de CE. El método enzimático posee la ventaja de una mayor especificidad y sensibilidad mientras que el método de CE posee como ventaja la posibilidad de determinar conjuntamente otros ácidos orgánicos. La precisión y exactitud son similares en ambos, aunque ligeramente mejores en el caso del método de CE. El hecho de que los resultados del ácido L-málico

obtenidos por el método enzimático sean comparables a los de los otros métodos en los que se determina el ácido málico total indica que la cantidad de ácido D-málico que existe en las mieles analizadas no es significativa.

- d. El ácido succínico se ha determinado por los métodos HPLC y CE, los cuales no son comparables. El método de elección es el de CE porque no presenta los problemas de interferencias que se han detectado en el método de HPLC.

SOBRE LOS RESULTADOS

3. Conductividad eléctrica:

- a. Todas las mieles analizadas, tanto de Galicia con Denominación como procedentes de otras zonas de España, poseen una conductividad eléctrica que se encuentra dentro de los límites legales vigentes.
- b. Las muestras de Galicia con Denominación presentan valores de conductividad eléctrica superiores a las mieles procedentes de otras zonas de España.
- c. Dentro de las mieles de Galicia con Denominación, las muestras de la provincia de Ourense presentan, en general, un valor mayor de conductividad eléctrica que las otras provincias gallegas, lo que puede ser explicado por su elevado contenido en *Castanea sativa* Miller.

4. pH y tipos de acidez:

- a. Todas las mieles analizadas, tanto de Galicia con Denominación como procedentes de otras zonas de España, poseen una acidez libre inferior al límite legal de 50 meq/kg, actualmente vigente.
- b. Los valores de pH y tipos de acidez son similares en ambas poblaciones (mieles de Galicia con Denominación y mieles procedentes de otras zonas de España), siendo ligeramente superiores en las mieles de Galicia con Denominación.

5. Ácidos orgánicos no aromáticos:

- a. Se ha cuantificado el ácido glucónico, ácido predominante en la miel, que se encuentra en concentraciones de g/kg frente a los mg/kg de los restantes (ácidos minoritarios). Se han determinado los ácidos cítrico y málico que se relacionan, según varios autores, con el origen botánico. También se han cuantificado los ácidos oxálico, fórmico y láctico de gran importancia ya que son utilizados en la lucha contra la varroasis por lo que se podría realizar el análisis de los posibles

residuos que pudiese contener una miel después de un tratamiento contra la *Varroa jacobsoni*.

- b. Se observa una gran variabilidad en la concentración de los ácidos orgánicos no aromáticos en las mieles analizadas dentro de un mismo grupo geográfico y/o botánico. Los ácidos orgánicos minoritarios que se encuentran en mayor proporción, dentro del grupo de las mieles de Galicia con Denominación, son los ácidos fórmico, acético y láctico, mientras que dentro del grupo de las mieles procedentes de otras zonas de España son los ácidos cítrico, málico y láctico. El ácido pirúvico sólo se encuentra en una miel gallega y en dos mieles de otras zonas de España.
- c. Al comparar los valores medios de contenido de los ácidos orgánicos entre las mieles de Galicia con Denominación y las de otras zonas de España, se observa que las mieles gallegas poseen un mayor contenido medio de los ácidos glucónico, fórmico y acético, en tanto que las de otras zonas de España poseen un mayor contenido medio de los ácidos cítrico, málico, maleico, fumárico, oxálico y succínico. El ácido láctico es similar en ambos grupos de muestras. Los ácidos minoritarios, en general, tienen un mayor peso en las mieles de otras zonas de España que en las mieles de Galicia con Denominación.
- d. Dentro de las mieles de Galicia con Denominación, se comprueba que las muestras de la provincia de Ourense presentan un mayor contenido en ácidos orgánicos no aromáticos, siendo particularmente importante la diferencia con las otras provincias en los ácidos cítrico, málico, fumárico, fórmico, succínico y láctico. También se ha determinado la influencia del espectro polínico, observándose que las mieles de *Castanea sativa* Miller poseen un elevado contenido en ácidos orgánicos, lo que las diferencia claramente de las de *Eucalyptus* sp.

SOBRE EL EFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN LOS PARÁMETROS ANALIZADOS EN LAS MIELES DE GALICIA CON DENOMINACIÓN

Durante dos años, se ha llevado a cabo un estudio de evolución de los parámetros físico químicos (conductividad eléctrica, pH y tipos de acidez) y de los ácidos orgánicos no aromáticos determinados por el método enzimático (D-glucónico total, cítrico y L-málico), realizando análisis cada cuatro meses.

6. Conductividad eléctrica:

- a. El valor medio permanece constante a lo largo del estudio, excepto a los 20 meses donde se produce una ligera disminución. Si se considera cada una de las muestras individualmente, la mayor variación producida entre los valores de los diferentes análisis fue de un 1.5%.
- b. Ni la provincia de procedencia del envasador ni el espectro polínico tienen una clara influencia en el modo de evolucionar del valor medio de la conductividad eléctrica a lo largo del almacenamiento.

7. pH y tipos de acidez:

- a. El valor medio de *pH* disminuye ligeramente a lo largo del estudio. En el caso de la *acidez libre*, la evolución de su valor medio durante el primer año no sigue una tendencia definida ya que se producen oscilaciones. A partir de los 12 meses se observa una ligera tendencia de aumento de forma que, al final del estudio, el valor medio de acidez libre es mayor que el valor medio inicial. Por su parte, la *acidez láctica* media aumenta durante el primer año, a partir del cual disminuye ligeramente para acabar estabilizándose. Por último, el valor medio de *acidez total* de todas las muestras analizadas aumenta durante el almacenamiento siendo este aumento más acusado durante los 8 primeros meses del estudio. Posteriormente el incremento que se produce es muy pequeño por lo que se podría decir que prácticamente se estabiliza.
- b. Si se considera cada una de las mieles individualmente la mayor parte de las muestras poseen, al acabar el estudio, un valor de pH inferior al inicial. Por el contrario, en la mayor parte de las muestras la acidez libre, acidez láctica y acidez total presentan valores finales superiores a los valores iniciales.
- c. Ni la provincia de procedencia del envasador ni el espectro polínico tienen una clara influencia en el modo de evolucionar del valor medio de pH ni de la acidez láctica a lo largo del almacenamiento. Sin embargo ambos aspectos van a influir en el modo de evolucionar del valor medio de la acidez libre y de la acidez total.
- d. En el estudio de la cinética de evolución del pH, acidez libre, acidez láctica y acidez total se han logrado ajustes significativos a una determinada función ($r \geq 0.985$, $p < 0.05$) en el 20%, 10%, 18% y 26% de las muestras, respectivamente. El tipo de ajuste encontrado para el pH y tipos de acidez no se ve influido ni por la provincia de procedencia del envasador ni por el espectro polínico.

- e. No se han podido establecer ecuaciones lineales que permitiesen predecir los valores del pH y de la acidez láctica a los 12 y/o a los 24 meses a partir del pH inicial o de la acidez láctica inicial, respectivamente. En el caso de la acidez libre, que es el único tipo de acidez legislado, se podría utilizar el valor de acidez libre inicial para predecir los valores a los 12 meses, pero no para predecir los valores a los 24 meses ya que en este último caso no se ha encontrado una ecuación lineal significativa. Por su parte, para la acidez total se han obtenido ecuaciones lineales que permitirían el cálculo de los valores de la acidez total a los 12 y 24 meses a partir de su valor inicial.
- f. Se ha observado que los valores iniciales de pH, acidez láctica y acidez total que presenta una miel van a condicionar su posterior evolución a lo largo del almacenamiento ya que valores iniciales menores van asociados a mayores porcentajes de variación durante el almacenamiento. Por el contrario, el valor inicial de acidez libre que posee una miel no va a condicionar su posterior evolución a lo largo del almacenamiento.
- g. La fecha de consumo preferente para la miel, en lo que se refiere a la acidez libre, se puede establecer en dos años desde su puesta en el mercado.

8. Ácidos orgánicos no aromáticos determinados por el método enzimático:

- a. El contenido medio de ácido D-glucónico total aumenta de forma lineal a partir de los 4 meses de almacenamiento. Los valores medios de los ácidos cítrico y L-málico disminuyen de forma lineal, aunque más claramente en el caso del ácido cítrico.
- b. Si se considera cada una de las mieles individualmente, al finalizar el estudio, la mayor parte de las muestras presentan un contenido en ácido D-glucónico total superior al contenido inicial. En los casos de los ácidos cítrico y el L-málico la mayor parte de las muestras poseen un contenido inferior al inicial.
- c. Ni la provincia de procedencia del envasador ni el espectro polínico tienen una clara influencia en el modo de evolucionar del contenido medio del ácido D-glucónico total, ácido cítrico y ácido L-málico a lo largo del almacenamiento.
- d. En el estudio de la cinética de evolución del contenido del ácido D-glucónico total se han logrado ajustes significativos a una determinada función ($r \geq 0.985$, $p < 0.05$) en la mayoría de las muestras (92%), siendo el ajuste a un polinomio de grado dos el mayoritario. Sin embargo la evolución de los contenidos de los ácidos cítrico y L-málico sólo se ajustan a una determinada función en el 18% y 12% de

las muestras, respectivamente. El tipo de ajuste encontrado para el contenido de los ácidos D-glucónico total, cítrico y L-málico no se ve influenciado ni por la provincia de procedencia del envasador ni por el espectro polínico.

- e. Se han establecido ecuaciones lineales que permiten predecir los valores de los contenidos de los ácidos D-glucónico total, cítrico y L-málico a los 12 y 24 meses a partir de sus respectivos contenidos iniciales en la miel.
- f. Se ha observado que los valores iniciales del contenido de los ácidos D-glucónico total, cítrico y L-málico de la miel no van a condicionar su posterior evolución a lo largo del almacenamiento.

SOBRE LAS RELACIONES ENTRE LOS PARÁMETROS ANALIZADOS

9. Dentro de las relaciones significativas entre los parámetros físico químicos, destaca la correlación directa entre la conductividad eléctrica y el pH, que se produce tanto en las mieles de Galicia con Denominación como en las procedentes de otras zonas de España.
10. Dentro de las relaciones significativas entre los parámetros físico químicos y los ácidos orgánicos no aromáticos cabe destacar que:
 - a. Se observan relaciones lineales y directas entre la conductividad eléctrica y prácticamente todos los ácidos orgánicos estudiados. De todas estas correlaciones, la más fuerte es la existente entre la conductividad eléctrica y el ácido fórmico.
 - b. Los tres tipos de acidez se correlacionan linealmente y de manera significativa solamente con el ácido D-glucónico total. Los mayores coeficientes de correlación lineal y, por tanto, las relaciones más fuertes se establecen con la acidez libre y, sobre todo, con la acidez total.
11. Dentro de las relaciones significativas entre los ácidos orgánicos no aromáticos destaca que:
 - a. Los ácidos L-málico, fumárico y succínico son estructuralmente similares y están relacionados entre sí tanto en las mieles de Galicia con Denominación como en las mieles procedentes de otras zonas de España. Esto indica que probablemente tengan un origen común en la miel, y como todos ellos están también relacionados con el ácido cítrico, este origen se puede atribuir al hecho de ser intermediarios en el ciclo de Krebs.

- b. Los ácidos maleico y fumárico son isómeros estructurales, sin embargo, su comportamiento es muy diferente ya que mientras el ácido maleico no está relacionado prácticamente con ningún ácido orgánico, el ácido fumárico presenta correlaciones lineales más o menos fuertes con casi todos los ácidos orgánicos estudiados.

SOBRE LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS MULTIVARIANTE

12. Utilizando las 15 variables seleccionadas para llevar a cabo el estudio (conductividad eléctrica, pH, acidez libre, acidez lactónica, acidez total, ácidos D-glucónico total, cítrico, L-málico, maleico, fumárico, oxálico, fórmico, succínico, acético y láctico) no se ha conseguido efectuar una clasificación mínimamente robusta de la procedencia de las muestras de miel de Galicia con Denominación, según el criterio de división territorial de la provincia de procedencia del envasador.
13. Se ha comprobado que tanto los parámetros físico químicos como los ácidos orgánicos no aromáticos seleccionados en el estudio tienen influencia a la hora de clasificar las mieles según su espectro polínico. Las variables con más peso en los componentes principales 1 (ácidos cítrico, L-málico, fumárico, succínico y láctico) y 2 (acidez libre, lactónica y total) son las que influyen fundamentalmente en la separación de clases. Sin embargo sería necesario tener un mayor número de muestras (sobre todo de *Castanea sativa* Miller) para realizar una clasificación más robusta.
14. Se ha comprobado que tanto los parámetros físico químicos como los ácidos orgánicos no aromáticos seleccionados en el estudio tienen influencia a la hora de diferenciar entre las mieles de Galicia con Denominación y las mieles procedentes de otras zonas de España. En este caso, las variables con más peso en los componentes principales 2 (acidez libre, lactónica y total) y 3 (conductividad eléctrica, pH, ácidos fórmico y acético) son las que más influyen en la separación de clases. Esta diferenciación tiene gran importancia, ya que permitiría la detección de posibles fraudes a la hora de etiquetar miel de otras zonas como miel de Galicia con Denominación. Sin embargo, para confirmar esta afirmación, sería necesario hacer un estudio en el que se incluyera un mayor número de muestras de otras zonas de España.
15. Se confirma la influencia que tienen los tipos de acidez, ya mencionada por otros autores, así como la de ciertos ácidos orgánicos a la hora de discriminar entre mieles de diferentes orígenes tanto geográficos como botánicos.

ESTUDIO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS
NO AROMÁTICOS EN LA MIEL



ANEXO

RELACIÓN DE PUBLICACIONES Y
COMUNICACIONES A CONGRESOS



Parte de la investigación contenida en esta Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes:

PUBLICACIONES EN REVISTAS INTERNACIONALES

1. **"Enzymatic determination of total D-gluconic acid in honey"**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1997**, 45 (9), 3550-3553.
2. **"Enzymatic determination of citric acid in honey by using polyvinylpyrrolidone-clarification"**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1998**, 46 (1), 141-144.
3. **"Enzymatic determination of L-malic acid in honey"**. *Food Chemistry*. **1998**, 62 (4), 503-508.
4. **"Calculation of different citric acid forms in honey and their relationships with honey pH"**. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. **2000**, 96 (5), 177-180.
5. **"Rapid determination of minority organic acids in honey by high performance liquid chromatography"**. *Journal of Chromatography A*. **2002**, 955 (2), 207-214.
6. **"Solid-phase extraction procedure to remove organic acids from honey"**. *Journal of Chromatography B*. **2002**, 770 (1), 77-82.
7. **"Different forms of maleic and fumaric acids (*cis* and *trans* of 2-butenedioic acid) in honey"**. *Food Chemistry*. **2003**, 80, 215-219.
8. **"Significance of nonaromatic organic acids in honey"**. *Journal of Food Protection*. **2003**, 66 (12), 2371-2376.
9. **"Fumaric acid as a possible discriminant parameter of geographical origin in honey samples"**. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. (Enviada).
10. **"Optimization of a capillary zone electrophoresis method with direct UV detection for the determination of organic acids"**. *Journal of Chromatography A*. (Enviada).

COMUNICACIONES A CONGRESOS INTERNACIONALES

- 1 **"D-Gluconic acid, citric acid and L-malic acid contents in northwestern spanish honeys"**. *XXXVth International Apicultural Congress*. Amberes, Bélgica. 1-6 de septiembre 1997. Póster.
- 2 **"Concentraciones molares de las diferentes formas del ácido cítrico en la miel"**. *IV Congreso Internacional de Química de la ANQUE*. Lugo, España. 21-25 de septiembre 1998. Póster.
- 3 **"Influence of the harvest in the content of total D-gluconic acid in honey"**. *VII Ibra Conference of Tropical Bees*. Tailandia. 19-25 de marzo 2000. Póster.

- 4 **"Concentraciones molares del ácido fumárico total y sus formas en la miel"**. *XIV Encontro Luso-Galego de Química*. Braga, Portugal. 22-24 de noviembre 2000. Comunicación Oral.
- 5 **"Molar concentrations of total L-malic acid and its forms in honey"**. *World Chemistry Congress (38th IUPAC Congress)*. Brisbane, Australia. 1-6 de julio 2001. Póster.
- 6 **"Fumaric acid as a discriminant parameter of geographical origin in honey samples"**. *2nd International Symposium "Separations in the Biosciences" SBS 2001*. Praga, República Checa. 17-20 de septiembre 2001. Póster.
- 7 **"Solid-phase extraction procedure to removed organic acids from honey"**. *2nd International Symposium "Separations in the Biosciences" SBS 2001*. Praga, República Checa. 17-20 de septiembre 2001. Póster.
- 8 **"HPLC determination of organic acids in commercial honey samples"**. *2nd International Symposium "Separations in the Biosciences" SBS 2001*. Praga, República Checa. 17-20 de septiembre 2001. Póster.
- 9 **"Conductividad eléctrica de las mieles de Galicia 'Producto Galego de Calidade-Mel de Galicia'"**. *XV Encontro Gallego-Portugués de Química*. A Coruña, España. 21-23 de noviembre 2001. Póster.

COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES

- 1 **"Aplicación de los métodos enzimáticos en la región UV a la determinación de los ácidos mayoritarios en la miel"**. *XVII Reunión Nacional de Espectroscopía*. León, España. 24-29 de septiembre 2000. Póster.
- 2 **"Determinación de ácidos orgánicos mediante absorción UV. Detector de fotodiodos array (PDA)"**. *XVII Reunión Nacional de Espectroscopía*. León, España. 24-29 de septiembre 2000. Póster.